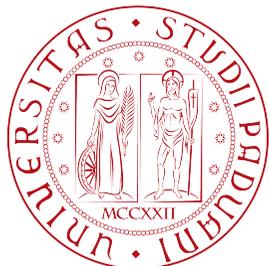


**UNIVERSITÀ DEGLI  
STUDI DI PADOVA**



1222 • 2022  
**800**  
ANNI

# **NBT**

## **new breeding techniques**

### **le nuove tecniche di miglioramento genetico delle piante come leva per lo sviluppo sostenibile del territorio**

**Gianni Barcaccia**

**Laboratorio di Genetica e Genomica**

Direttore DAFNAE [www.dafnae.unipd.it](http://www.dafnae.unipd.it)

E-mail: [gianni.barcaccia@unipd.it](mailto:gianni.barcaccia@unipd.it)

Web-site: [www.giannibarcaccia.com](http://www.giannibarcaccia.com)

**DAFNAE**

Dipartimento di Agronomia Animali  
Alimenti Risorse naturali e Ambiente

Rovigo, 14 Dicembre 2019



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**DAFNAE**

Dept. Agronomy Food Natural resources Animals Environment

1222 · 2022  
**800**  
ANNI

Il miglioramento genetico delle piante è vecchio quanto l'agricoltura: per molti secoli è stato praticato empiricamente.

Solo agli inizi del secolo scorso è stato introdotto un cambiamento radicale nei metodi.

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Il ruolo del miglioramento genetico



*"Seeds are the promise  
of new life"*

Il seme delle varietà migliorate geneticamente rappresenta il più alto concentrato di tecnologia che possa essere messo a disposizione degli agricoltori (Lorenzetti F., 1986)



### Precision Breeding

siamo ora in grado di intervenire sui genomi delle piante per correggere specifici geni endogeni (NBT) senza dover trasferire stabilmente geni esogeni (OGM)

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Metodi convenzionali vs. biotecnologici

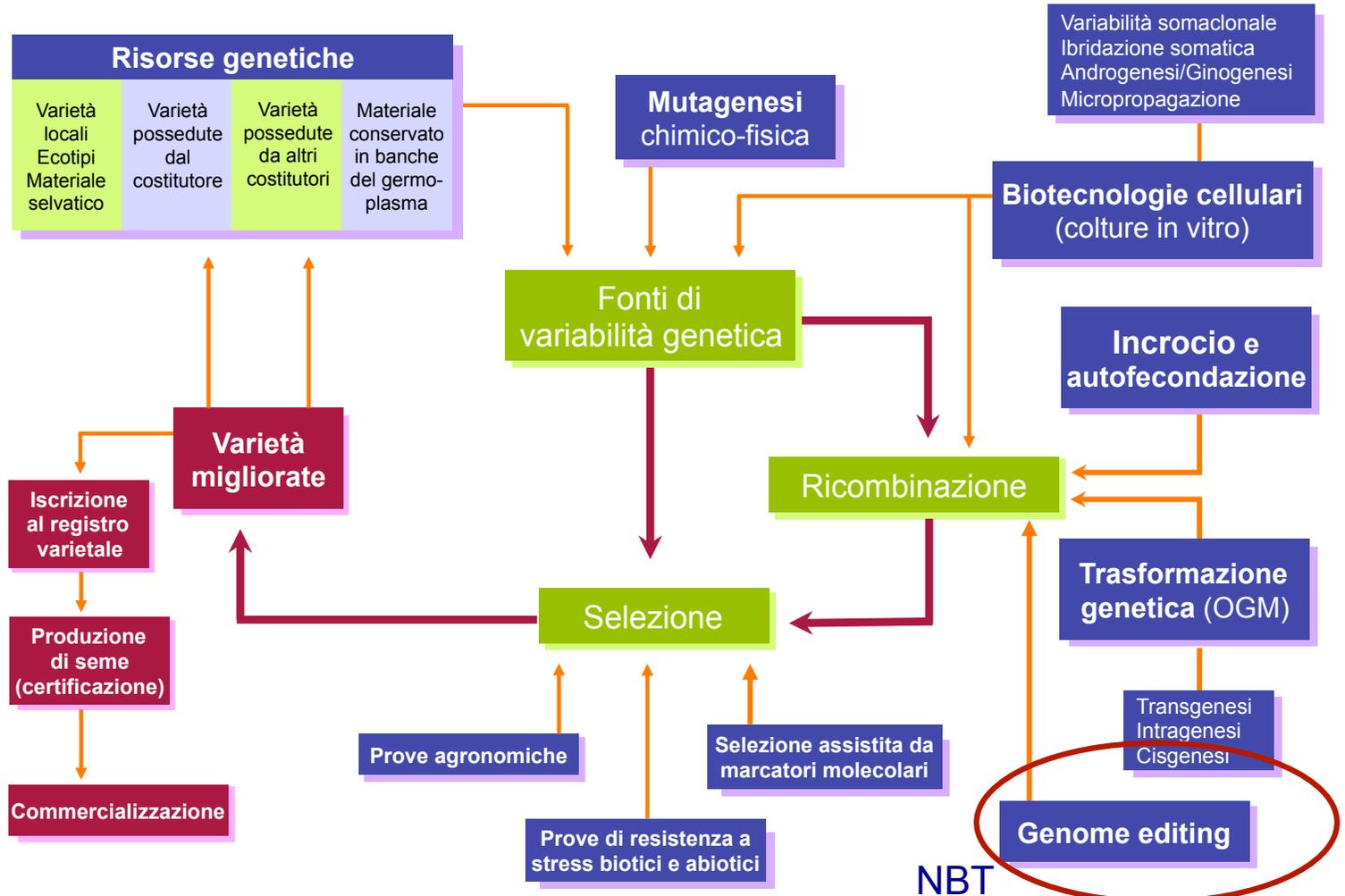




# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico



## Metodi di miglioramento genetico



Fonti di variabilità genetica naturali e artificiali

Bioteecnologie a livello cellulare e molecolare: da OGM a NBT attraverso MAB (usando *genotyping* e *phenotyping*)



# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico



Eventi di mutazione  
e ricombinazione  
genetica (spontanei  
o indotti)

casuali e non  
riproducibili

Problema di base:  
mancanza di  
variabilità biologica  
(varianti geniche)

## Fonti di variabilità genetica naturali e artificiali



Collezioni di germoplasma: varietà locali (*landraces*) e materiale selvatico (*wild relatives*)



(Griffiths et al. 1996)



Popolazioni ricombinate ( $F_2$ )



Popolazioni mutagenizzate ( $M_2$ )



Caratteri poligenici  
→ metodi  
convenzionali e  
molecolari di  
selezione varietale

Caratteri monogenici  
→ metodi  
biotecnologici  
per la costituzione  
di nuovi genotipi

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Nuove tecniche di miglioramento genetico

- ✓ **Rese unitarie superiori – produttività**  
(resistenza/tolleranza a malattie, erbicidi e stress ambientali, sviluppo e metabolismo delle piante, ecc.)
- ✓ **Miglioramento della qualità globale  
caratteristiche nutrizionali e di salubrità**  
(più vitamine, antiossidanti, amminoacidi essenziali e meno acidi grassi saturi e carica allergenica, composti antinutrizionali)
- ✓ **Controllo del sistema riproduttivo delle piante  
e sviluppo del frutto**  
(maschiosterilità, autoincompatibilità, partenocarpia/  
partenogenesi... apomissia, sfruttamento delle varietà F1)



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**DAFNAE**  
Dept. Agronomy Food Natural resources Animals Environment

1222 · 2022  
**800**  
ANNI



### **Transgenesi:**

Van Montagu e Shell  
(1983–1987)

### **Intragenesi:**

Rommens (2007)

### **Cisgenesi:**

Schouten, Krens e  
Jacobsen (2006)

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Sviluppo di piante geneticamente modificate (PGM)

### ▪ **Transgenesi**

si basa sul trasferimento di uno o più geni esogeni provenienti da specie diversa o da regno diverso (il transgene è tipicamente chimerico).

### ▪ **Intragenesi**

la sequenza codificante del gene impiegato nel trasferimento è assemblata con quelle regolatrici di altri geni di specie affini e la sequenza codificante è in orientamento corretto (guadagno di funzione) o opposto (perdita di funzione) a quello originale.

### ▪ **Cisgenesi**

prevede il trasferimento di un gene con le proprie sequenze regolatrici, e nel normale orientamento, tra organismi appartenenti alla stessa specie o anche a specie diverse ma affini e sessualmente compatibili: la sequenza codificante del gene trasferito contiene i propri introni e la sua espressione è sotto il controllo del promotore e del terminatore nativi.



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



### Cisgenesi

a trasformazione genetica prevede il trasferimento di uno specifico gene (con la proprie sequenze codificanti e regolatrici) da specie affini e sessualmente compatibili

### EFSA

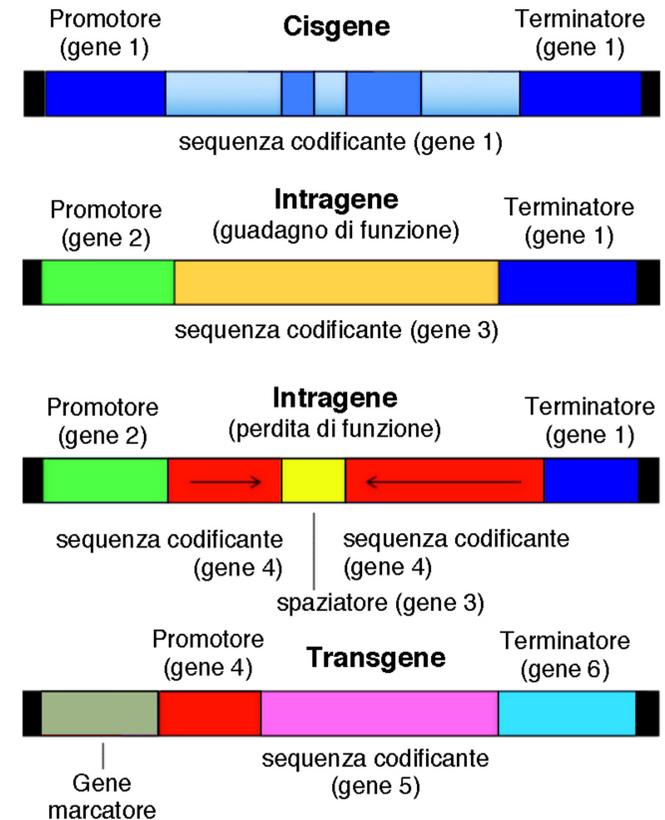
European Food Safety Authority

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Breeding cisgenico

La cisgenesi [intragenesi] è una **tecnologia concettualmente innovativa** rispetto alla transgenesi:

- produce un **organismo simile a quello che si ottiene con il breeding tradizionale**, avendo però il vantaggio di ridurre i tempi necessari per costituire una varietà e di evitare il trasferimento indesiderato di sequenze aventi un effetto negativo sul fenotipo.



la cisgenesi non è potenzialmente rischiosa per l'ambiente e la salute (mentre i rischi connessi alla intragenesi sono ritenuti del tutto simili a quelli associati alla transgenesi)

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Applicazione di Intragenesi e Cisgenesi

Negli ultimi anni sono state utilizzate per migliorare caratteri rilevanti in agricoltura, come la resistenza/tolleranza a stress biotici o abiotici (produttività) e la qualità delle produzioni

Specie	Carattere	Tecnologia
<b>Erba medica</b>	Contenuto di lignina	Intragenesi
<b>Fragola</b>	Resistenza a muffa grigia ( <i>Botrytis cinerea</i> )	Intragenesi
<b>Grano duro</b>	Qualità panificatoria	Cisgenesi
<b>Loglio perenne</b>	Tolleranza a siccità	Intragenesi
<b>Melo</b>	Resistenza a ticchiolatura ( <i>Venturia inaequalis</i> )	Cisgenesi, Intragenesi
<b>Orzo</b>	Contenuto di acido fitico	Cisgenesi
<b>Patata</b>	Resistenza a peronospora ( <i>Phytophthora infestans</i> )	Cisgenesi
	Ridotto imbrunimento del tubero	Intragenesi
	Degradazione dell'amido (Contenuto di acrilamide in seguito a frittura)	Intragenesi
<b>Pioppo</b>	Forma e crescita della pianta	Cisgenesi

Fonte: Cardi T. (2015) Terra e Vita, n. 21: p. 16-17



→ In meno di 20 anni siamo passati dall'era pre-genomica a quella post-genomica muovendosi dalla genetica in avanti alla genetica inversa

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Ricerca di nuove vie di miglioramento genetico

### ▪ Forward genetics

- Generare un nuovo carattere (fenotipo) in un organismo ricorrendo a mutagenesi casuale per clonare la sequenza genica responsabile (genotipo)
  - T-DNA tagging oppure TE tagging (mutagenesi inserzionale)

### ▪ Reverse genetics

- Correggere la sequenza genica di un organismo (genotipo) attraverso mutagenesi sito-specifica per modificare e migliorare un suo carattere (fenotipo)
  - antisense RNA [asRNA]
  - RNA interference [short interfering RNA, siRNA]
  - TILLING – Targeting Induced Local Lesions in Genomes (mutazioni puntiformi causate da EMS)
  - **Gene editing** (genome editing with engineered nucleases, GEEN)



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**DAFNAE**

Dept. Agronomy Food Natural resources Animals Environment

1222 · 2022  
**800**  
ANNI

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Genome editing

Biotecnologia che consente di “riscrivere i geni”



Applicazioni di guadagno di funzione genica (*gene replacement*)  
e perdita di funzione genica (*gene silencing*)

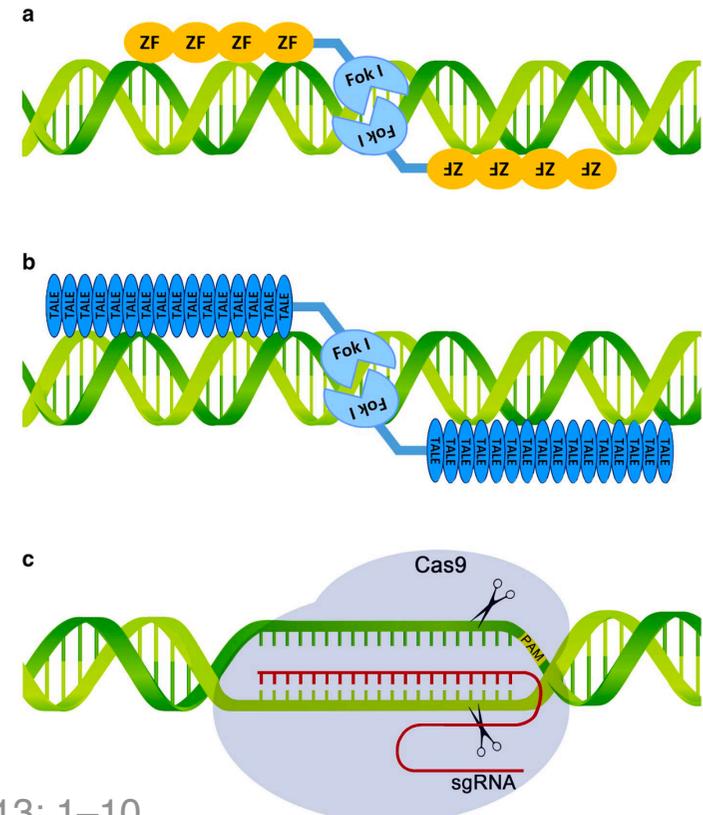
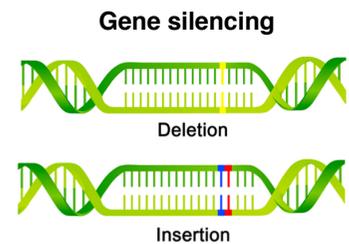
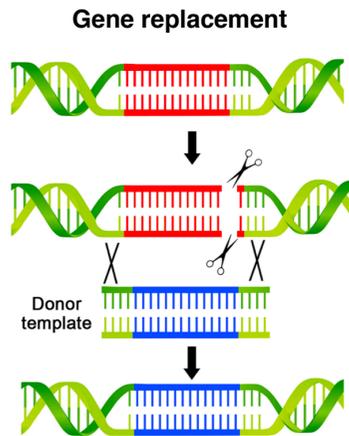


# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Genome editing

Metodologia di ingegneria genetica utile a inserire o sostituire in un genoma o rimuovere da un genoma sequenze di DNA in regioni predeterminate mediante nucleasi ingegnerizzate:

- Zinc-Finger Nucleases (ZFNs)
- Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs)
- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs)



Fonte: Plant Biotechnology Reports (2019) 13: 1–10

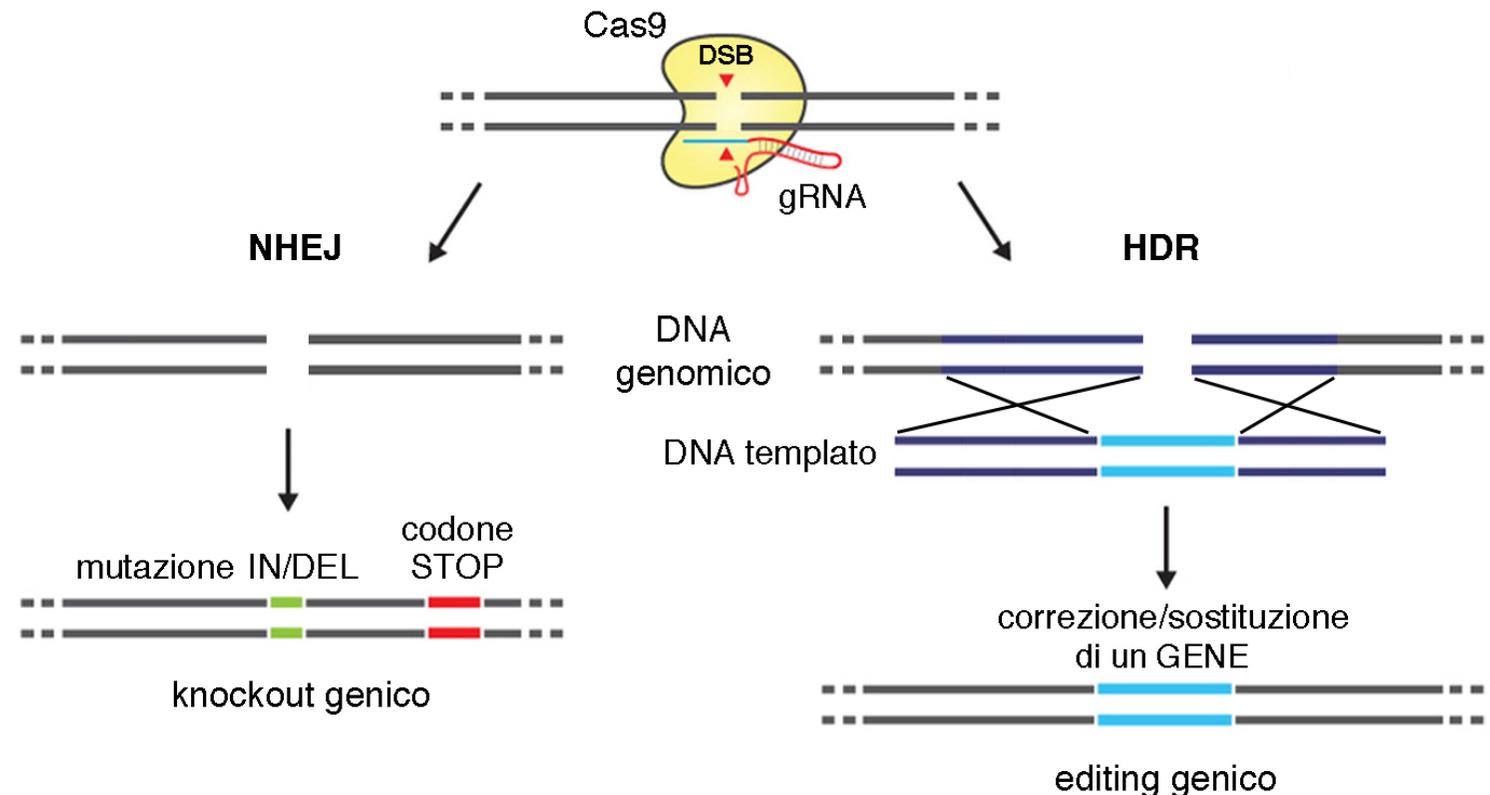


# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

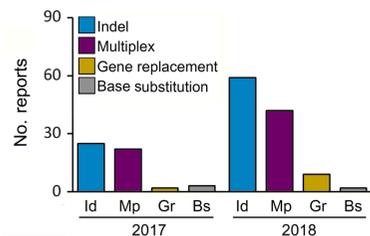
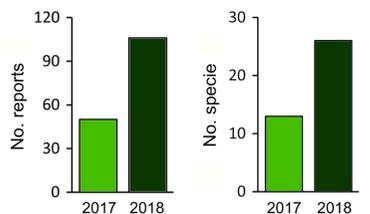


## Genome editing

CRISPR/Cas9 è una tecnologia applicabile per silenziare un gene con effetto negativo (perdita-di-funzione) oppure per correggere o sostituire un gene con effetto positivo (guadagno-di-funzione)



Plant Biotechnology Reports (2019) 13: 1–10





**25/07/2018**

la Corte di Giustizia Europea ha stabilito che i prodotti ottenuti con NBT sono da considerare OGM così come definiti nell'art. 2 della Direttiva 2001/18/CE (il Genome Editing risale al 2012)

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Metodi di editing genetico

- consentono la modifica genetica pre-determinata e sito-specifica di un genoma e garantiscono la totale assenza di DNA esogeno nelle piante delle varietà sviluppate attraverso questi sistemi:
  - il prodotto finale (alimento) non conterrà DNA esogeno e la mutazione indotta non sarà distinguibile da una mutazione spontanea
  - da non trascurare è inoltre la possibilità molto vantaggiosa di poter intervenire su più geni/caratteri contemporaneamente (GM/QTL)
- le piante ottenute attraverso editing genomico (come quelle prodotte mediante breeding cisgenico) sono uguali o assimilabili alle piante ottenute con procedure tradizionali (in assenza di DNA esogeno nel loro genoma, non è possibile determinare con certezza quali tecniche siano state impiegate per ottenerle)

**2018–2018**

i caratteri agronomici maggiormente editati riguardano la qualità nutrizionale degli alimenti e la produttività delle colture per effetto della resistenza a patogeni e erbicidi

## Genome [Gene] editing

- Applicazioni: caratteri migliorati nelle piante agrarie

Type	Gene	Traits	Crop	References
<b>Gene editing</b>	<i>FAD2</i>	Nutritional quality	Brassica	Jiang et al. (2017)
	<i>LOB1</i>	Pathogen resistance	Citrus	Peng et al. (2017)
	<i>ALS</i>	Herbicide resistance	Rice	Shimatani et al. (2018)
	<i>CDC48</i>	Senescence	Rice	Zong et al. (2017)
	<i>SLR1</i>	Plant growth	Rice	Lu and Zhu (2017)
	<i>ACC-T1</i>	Herbicide resistance	Rice	Li et al. (2018a)
	<i>eIF4G</i>	Pathogen resistance	Rice	Macovei et al. (2018)
	<i>AAP3</i>	Yield increase	Rice	Lu et al. (2018)
	<i>CycB</i>	Nutritional quality	Tomato	Zsögön et al. (2018)
	<i>JAZ2</i>	Pathogen resistance	Tomato	Ortigosa et al. (2018)
<b>Gene replacement</b>	<i>16DOX</i>	Crop quality	Potato	Nakayasu et al. (2018)
	<i>FT2a</i>	Flowering time	Soybean	Cai et al. (2018)
	<i>ALC</i>	Crop quality	Tomato	Yu et al. (2017)
	<i>ALS</i>	Herbicide resistance	Rice	Li et al. (2018c)
	<i>NRT1.1B</i>	Crop quality	Rice	Li et al. (2018b)
	<i>EPSPS</i>	Herbicide resistance	Cassava	Hummel et al. (2018)

Fonte: Plant Biotechnology Reports (2019) 13: 1–10 <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0509-4>



# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico



## HI-Edit: haploid induction editing



Letter | Published: 04 March 2019

### One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction

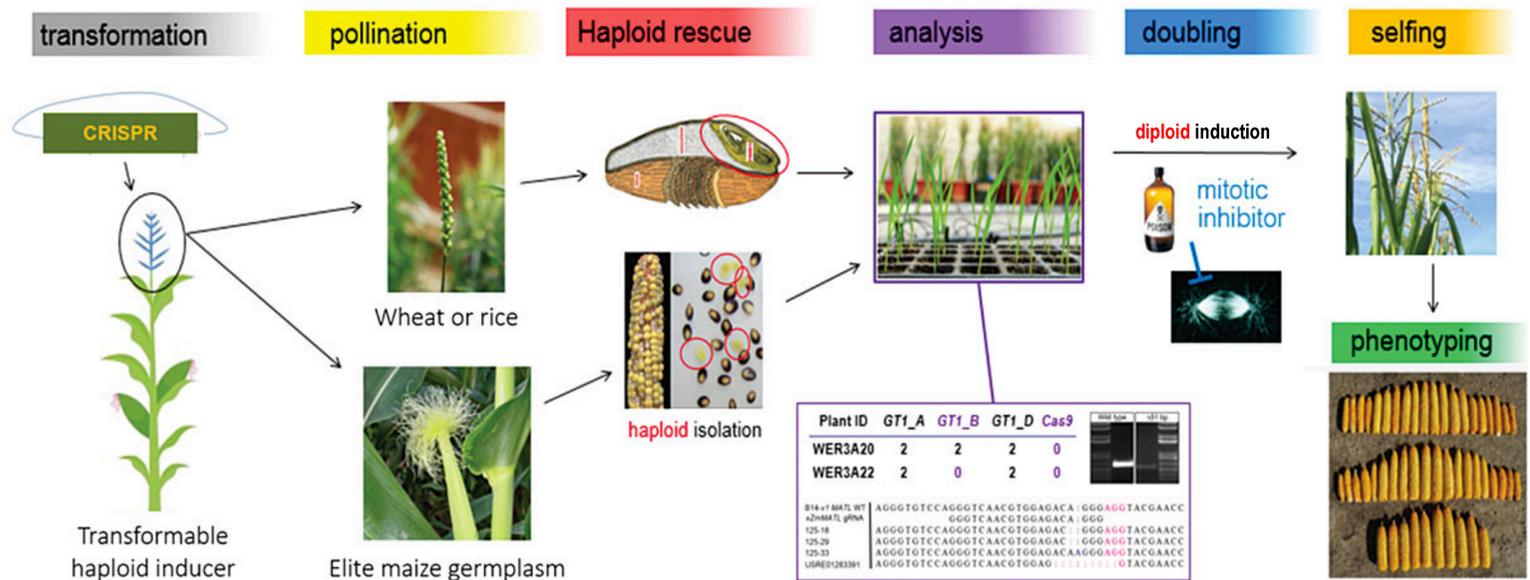
Timothy Kelliher , Dakota Starr, Xiujuan Su, Guozhu Tang, Zhongying Chen, Jared Carter, Peter E. Wittich, Shujie Dong, Julie Green, Erin Burch, Jamie McCuiston, Weining Gu, Yuejin Sun, Tim Strebbe, James Roberts, Nic J. Bate & Quideng Que 

Nature Biotechnology 37, 287–292(2019) | Cite this article



## One-Step Genome-Editing: HI-Edit

- Nuova tecnica applicabile in mais, frumento e riso



Il sistema molecolare CRISPR/Cas9 disegnato per uno specifico gene può essere trasferito direttamente nelle varietà mediante polline usando piante geneticamente trasformate della linea HI: lo stato transiente degli ibridi porta alla eliminazione cromosomica uniparentale del sistema molecolare di editing.

Fonte: Kelliher et al. Nature Biotechnology (2019) 37: 287–292  
<https://www.nature.com/articles/s41587-019-0038-x>



Per capire i paradossi bisogna essere intelligenti, mentre per seguirli bisogna essere stupidi:

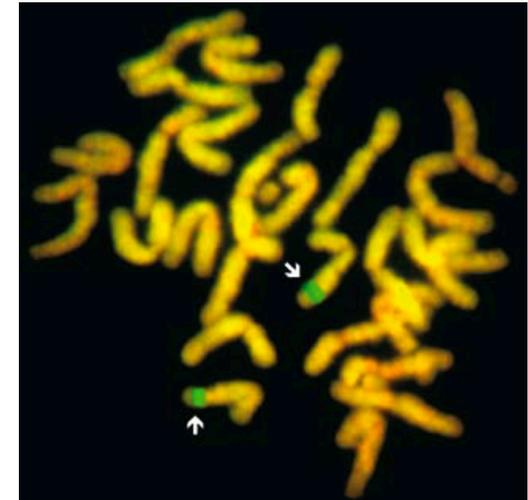
la discriminante è quindi soltanto il metodo usato e non il prodotto da esso ottenuto!

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Paradosso: breeding assistito vs. editing genomico

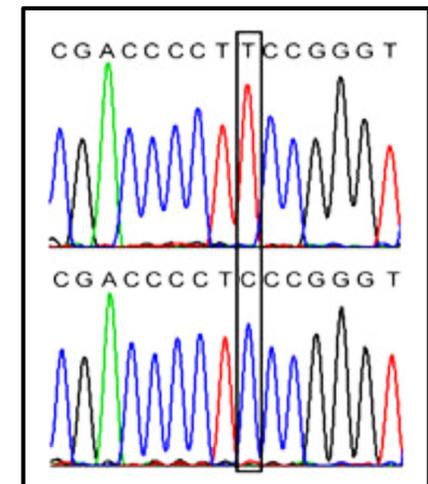
- Ibridazione genomica interspecifica, **sì**

con ricombinazione/introgressione di interi blocchi cromosomici (per trasferire e ricombinare tanti geni – anche esogeni – in modo non prevedibile e secondo un evento non riproducibile)



- Correzione genica intraspecifica, **no**

tecnologia per silenziare singoli geni endogeni con effetti negativi sul fenotipo oppure per modificare o sostituire specifici geni endogeni con effetti positivi sul fenotipo (in un locus genomico specifico e secondo un evento controllabile e riproducibile)





Le NBT  
consentono di  
agire sui geni di  
interesse via  
biosintetiche e  
reti regolative.

# Le nuove vie del miglioramento genetico: dalle tecnologie di 'breeding cisgenico' a quelle di 'editing' genomico

## Conclusioni

Non possiamo perdere altro tempo, è venuto il momento di innovare ricorrendo alle nuove vie... NBT

- sappiamo indurre le mutazioni genetiche e usare le trasformazioni genetiche per creare nuovi alleli e produrre piante con nuovi caratteri;
- abbiamo una grande tradizione nel miglioramento genetico delle piante agrarie, anche sull'uso di metodi di selezione genetica assistita da marcatori molecolari.

Il ricorso alle nuove tecniche di miglioramento genetico per la creazione di variabilità biologica (varianti geniche) e per la costituzione di nuove varietà non è più procrastinabile se vogliamo davvero puntare a una agricoltura sostenibile e competitiva.