

Genome editing: a che punto siamo per la vite?



Le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) come il gene editing rappresentano un passo importante in questa direzione e sono attualmente allo studio applicazioni in viticoltura così come su altre specie. Si basano sulla tecnologia Crispr/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Crispr-associated), scoperta da Jennifer Doudna ed Emanuelle Charpentier (Jinek et al., 2012) e valse loro il premio Nobel per la chimica nel 2020. In pratica gli enzimi di tipo Cas (come il Cas9) sono **forbici molecolari che tagliano il DNA** della cellula in un

punto specifico. Una forbice Cas9 si accoppia a una molecola di RNA chiamata guida, che la conduce a un punto specifico del genoma dove c'è perfetta complementarità di sequenza tra l'RNA e il DNA.

Se l'appaiamento tra l'RNA guida e il genoma è perfetto allora Cas9 taglia il DNA obbligando la cellula a riparare tale rottura, con un processo soggetto a errore. Spesso, infatti, il sistema di aggiustamento del DNA causa l'introduzione di una piccola mutazione come la scomparsa o l'aggiunta di una «lettera» alla sequenza di DNA. **Tale mutazione è detta puntiforme**, e mima perfettamente quello che capita in natura (per questo motivo sono state chiamate Tecniche di Evoluzione Assistita), in un processo sempre in corso e che tramite selezione dei mutanti ha permesso la domesticazione di tutte le specie vegetali che coltiviamo.

Sequenze bersaglio: geni di suscettibilità

Molto spesso mutazioni nella sequenza codificante di un gene come piccole inserzioni o delezioni di paia di basi portano all'alterazione del registro di lettura del gene stesso da parte del ribosoma, per cui non viene prodotta una proteina funzionale: si parla in questo caso di mutazione a perdita di funzione o più spesso di inattivazione («knockout») del gene. I bersagli ideali per dei knockout mirati sono quindi **geni che, se attivi nella pianta, consentono e/o facilitano l'infezione da parte del fungo patogeno**: tali geni sono definiti geni S, o geni di suscettibilità.

Editing nella cellula

Per introdurre le mutazioni mirate nei geni S è necessario fornire alle cellule della pianta un complesso **Crispr/Cas** funzionale, composto dalla proteina Cas9 e dall'RNA guida. Questo si ottiene tradizionalmente in vite tramite l'inserzione nella pianta dei geni che codificano per il complesso.

Questo approccio classico comporta degli svantaggi: innanzitutto la pianta prodotta è transgenica, e in secondo luogo il transgene che codifica per Crispr/Cas continua a essere presente e attivo nella pianta, rendendo nel tempo non più trascurabile il rischio di avere mutazioni fuori bersaglio.

Esistono solo due modi per rimuovere il **DNA esogeno** integrato dalla pianta:

- tramite segregazione: questa strategia è stata applicata con successo a specie orticole, ma in vite farebbe cadere il presupposto del mantenimento varietale e clonale;
- tramite excisione molecolare: esistono protocolli già usati in ricerca sulla vite (Dalla Costa et al., 2020) per l'eliminazione del transgene, il processo però è impreciso e non porta all'eliminazione totale del DNA esogeno, e le tracce che rimangono sono sufficienti per mantenere la pianta classificata come transgenica secondo la legge italiana.

Per superare questi problemi è opportuno adottare una strategia che non preveda l'uso di DNA esogeno, ma **l'inserimento in pianta direttamente del complesso proteina-RNA**

, che è in grado di apportare le mutazioni desiderate in maniera transiente.

Tratto dall'articolo pubblicato su *Vite&Vino* n. 2/2023

Genome editing: a che punto siamo?

di U. Salvagnin, L. Giacomelli, C. Moser

Per leggere l'articolo completo **abbonati** a *Vite&Vino*