

# Nuove Biotecnologie in Agricoltura

## *Dalla trasformazione genetica al genome editing*

La produzione primaria è alla base della nutrizione umana ed animale e fonda le sue radici sin da quando la nostra specie è passata da una vita essenzialmente nomade ad una vita stanziale imparando a selezionare prodotti vegetali, coltivarne un numero sempre più elevato di specie, equilibrando la sua dieta, modificando la stessa struttura ed organizzazione sociale, sancendo di fatto la nascita dell'agricoltura, circa 11.000 anni fa. Sin da allora, un'accresciuta "competenza" nel selezionare i migliori individui (più performanti) di ogni specie coltivata ed allevata ha sostanzialmente **modificato** le specie addomesticate, tanto da renderle più produttive e qualitativamente migliori, ma contemporaneamente rendendole "dipendenti" dall'uomo per la loro sopravvivenza in ambienti controllati, inadatte quindi a competere con le vicine specie selvatiche più robuste e capaci di sopravvivere in un ambiente naturale, in scarsità di acqua e nutrienti nel terreno, in presenza di patogeni e parassiti. Nonostante le crescenti potenzialità delle colture selezionate, l'uomo ha vissuto periodi di carestie e pestilenze, che sono quasi ovunque scomparse grazie alle migliorate tecnologie e conoscenze, culminate con la **rivoluzione verde** degli anni '50. In questo sviluppo è stato fondamentale il contributo (oltre il 50%) del miglioramento genetico, che sin da allora ha fornito e continua a fornire gli strumenti per una costante crescita, oggi fortunatamente anche nei paesi in via di sviluppo. A fronte di una indiscutibile crescita della produzione primaria si rileva tuttavia una ancor più importante crescita della popolazione mondiale che supererà i 7,5 miliardi di persone con inevitabile crescita delle necessità nutrizionali (Fig. 1).

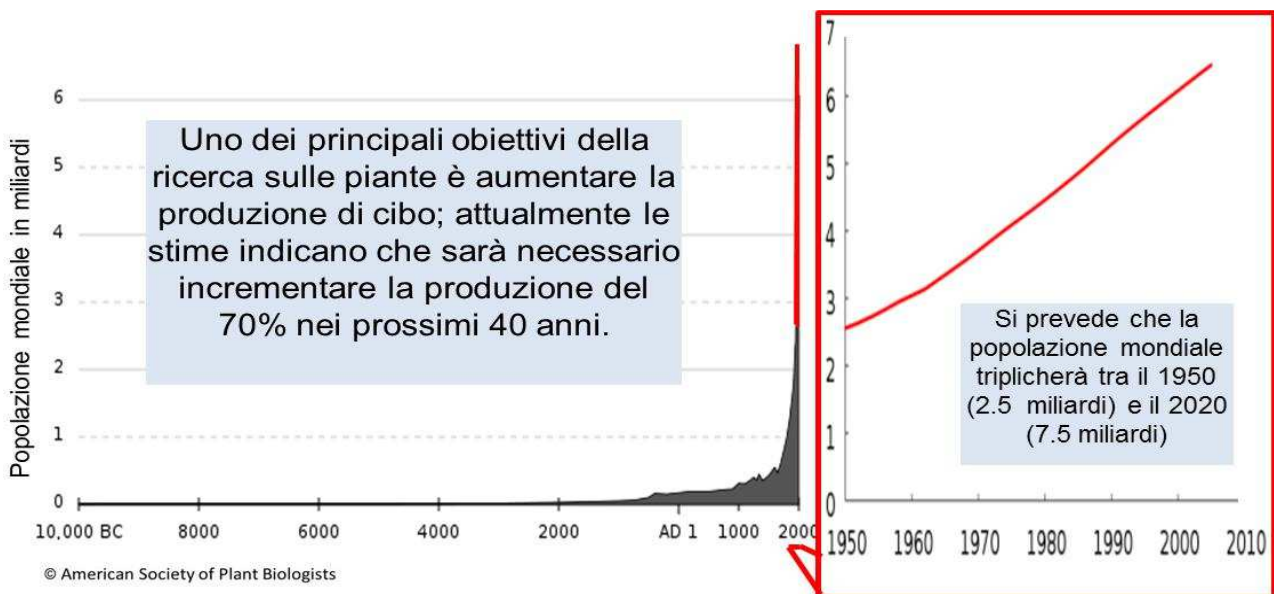


Fig.1. Crescita della popolazione mondiale dalla nascita dell'agricoltura ad oggi e proiezioni del possibile necessario incremento della produzione primaria entro il 2050.

### ***Dalla green revolution alla gene revolution***

L'esplorazione della **variabilità genetica**, frutto di continue mutazioni del DNA di una specie e del loro accumulo nei milioni di anni della loro evoluzione, è stata alla base della rivoluzione verde che dagli anni cinquanta ha caratterizzato l'aumento di quantità e qualità delle produzioni soprattutto dei cereali, con effetto di trascinamento anche di altre colture industriali e ortofrutticole, pur in misura minore. L'esistenza di un numero rilevante di geni, che nelle specie vegetali varia tra i 25.000 e gli 80.000, e delle varianti alleliche per ogni singolo gene, garantiscono un numero di combinazioni talmente elevato da essere ancora molto lontano dall'essere completamente esplorato<sup>1</sup>. Oltre alla naturale variabilità genetica, l'uomo ha sfruttato anche la capacità di radiazioni

ad alta energia (raggi X e gamma) o mutageni chimici (es. etilmetanosulfonato, EMS) per incrementare la **variabilità allelica** esistente nelle collezioni delle specie coltivate. Su tutti si ricordano gli effetti nanizzanti nei grani, o l'incapacità della pianta di liberare i semi per facilitarne la raccolta, insieme agli aumenti di produzione per ettaro decuplicata in pochi decenni, nonché l'incremento di contenuto proteico e di acidi grassi di molti semi di cereali, legumi e piante oleaginose.

Grazie a tali e tanti successi nel miglioramento genetico si è potuto garantire cibo e benessere ad una importante parte della popolazione mondiale, e l'auspicabile diffusione ulteriore di tale benessere si sta pian piano realizzando anche in altre parti del mondo in rapida crescita. Tuttavia, anche grazie al conseguito benessere, nuove sensibilità si sono sviluppate con particolare attenzione alla salvaguardia ambientale e al maggiore equilibrio col mondo che ci circonda. Garantire alle generazioni future non solo cibo ma anche e soprattutto **un ambiente salubre è diventato prioritario**. A questo proposito l'attenzione si rivolge necessariamente alle piante selvatiche, affini a quelle coltivate, sessualmente compatibili e quindi in grado di supplire a quei tratti fenotipici correlati alle resistenze genetiche a patogeni e parassiti, largamente combattuti con composti chimici di sintesi per salvaguardare le produzioni, in quantità ad oggi non più sostenibili.

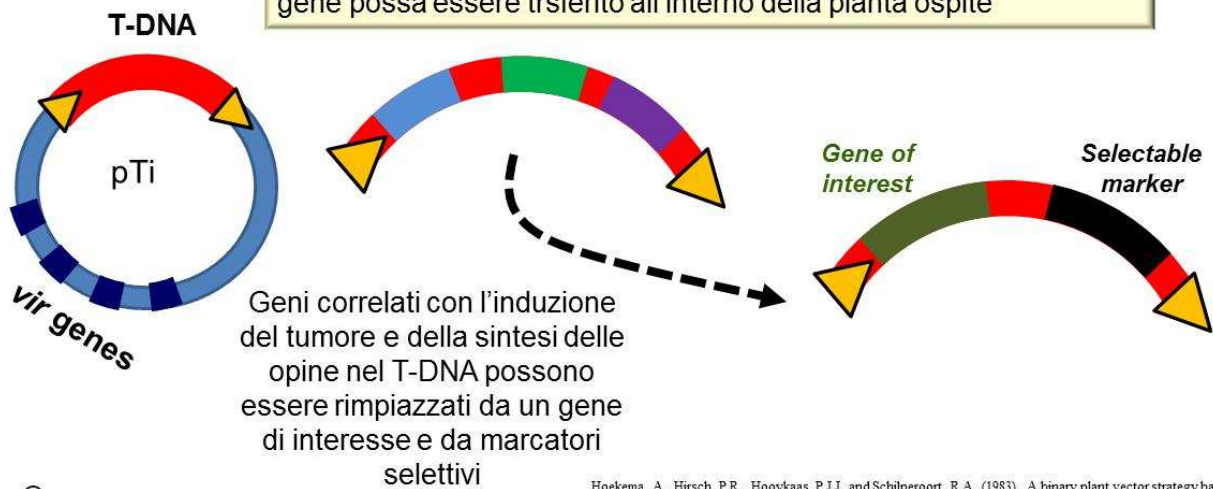
Il processo di ibridazione tra pianta coltivata e pianta selvatica e l'incrocio reiterato con la pianta coltivata (re-incrocio), che è necessario per concentrare le caratteristiche di produttività e qualità con le resistenze genetiche che si accompagnano normalmente a indesiderati tratti di scarsa qualità, è lungo e dispendioso per quanto indispensabile. La lunghezza dei tempi del miglioramento genetico, in particolare a seguito di incroci con piante selvatiche (in termine tecnico: introgressione tramite re-incrocio), è un fattore limitante. Sono infatti necessari da diversi anni (per piante erbacee annuali) a alcuni decenni (per piante arboree), tuttavia ciò non ha fermato il miglioramento genetico anzi ha stimolato la ricerca di nuove soluzioni per accelerare e migliorare l'intervento antropico nello sviluppo di nuove varietà coltivate.

La prepotente affermazione della **genomica**, la scienza che abbraccia lo studio dei genomi delle varie specie nella loro complessità, resa possibile dagli sviluppi tecnologici e informatici moderni, ha fornito strumenti e conoscenza indispensabili per comprendere struttura e interazioni funzionali di interi genomi, contenuti genici, variabilità allelica all'interno della specie oggetto di studio e delle specie affini. Ad oggi tutti i maggiori cereali, molte delle specie industriali ed ortofrutticole sono state sequenziate<sup>2</sup> con un importante contributo dell'Italia soprattutto nelle colture mediterranee per noi così importanti. **Le informazioni genetiche non sono più una limitazione**, oggi è la correlazione tra geni e le loro funzioni il vero limite, ciò su cui dovremo impegnarci maggiormente nel prossimo futuro. Il miglioramento genetico già beneficia da alcuni anni delle informazioni delle migliori combinazioni alleliche per ottenere piante migliorate, almeno per quei geni di cui è conosciuta la funzione. Molto però c'è ancora da fare per aumentare le conoscenze, così come per accelerare i tempi o magari incrementare di una o poche ulteriori caratteristiche una varietà già per molti versi ottima. In particolare per questi ultimi obiettivi, alcune eventuali opportunità sono offerte dal continuo sviluppo di strumenti biotecnologici o tecnologie del DNA ricombinante.

### ***Transgenesi, cisgenesi, genome editing***

Già nei primi anni '70 si erano intuiti alcuni passaggi essenziali nello sviluppo di galle (crescita incontrollata di cellule di natura tumorale nelle piante) che caratterizzavano i rapporti tra il batterio *Agrobacterium tumefaciens* e i suoi ospiti (soprattutto in vite ed altri fruttiferi)<sup>3</sup>. Circa dieci anni però ci sono voluti perchè alcuni gruppi di scienziati intuissero le enormi potenzialità che sottintendevano il trasferimento orizzontale (trasferimento tra specie, da distinguere con quello verticale tra generazioni) di DNA tra questo microrganismo e i suoi ospiti<sup>4</sup> (Fig. 2).

La scoperta che il T-DNA (transfer DNA) si inserisce nel genoma della pianta ospite ha reso idealmente possibile che qualunque gene possa essere trasferito all'interno della pianta ospite



© American Society of Plant Biologists

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303: 179-180.

Fig. 2. a) Il plasmide (pTi) contenente il T-DNA o DNA transfer (b) in grado di trasferirsi dall'elemento genetico del batterio al genoma della pianta ospite, naturalmente necessario per l'insorgenza del tumore nel quale il batterio stabilisce la sua forma di parassitizzazione, ma sfruttabile per trasferire pressochè qualunque frammento di DNA (c) nel genoma dell'ospite creando così un organismo geneticamente modificato GM.

La scoperta in realtà sottende un fenomeno abbastanza diffuso tanto che ad oggi è noto che numerose sequenze di DNA sono state trasferite durante milioni di anni tra specie anche distanti (virus, batteri, funghi e piante superiori) e se ne trovano tracce soprattutto adesso che sono disponibili i genomi delle maggiori specie coltivate<sup>1</sup>.

Una ulteriore condizione indispensabile al successo delle biotecnologie, mai sufficientemente ricordata, è la capacità delle molte cellule vegetali di essere totipotenti, ovvero di essere in grado di rigenerare un intero organismo, completo di tutti i suoi organi (foglie, radici, fusto, fiori e frutti) a partire da una singola cellula somatica. Questo potenziale era noto da quasi un secolo ma con la scoperta delle tecnologie del DNA ricombinante ha espresso tutta la sua potenzialità.

Le tecniche di ingegneria genetica si sono evolute rapidamente e già nella metà degli anni '80 la produzione di piante geneticamente modificate, comunemente definite **Organismi Geneticamente Modificati** (OGM) è proliferata ampiamente, prevalentemente per scopi di studio, ma si è rapidamente compreso l'enorme potenziale economico, nonchè le questioni etiche che questo enorme potenziale implica.

Sostanzialmente la possibilità di trasferire qualsiasi frammento di DNA all'interno di un genoma che precedentemente non lo conteneva ampliava le potenzialità del mero miglioramento genetico, **superando i limiti della riproduzione sessuale**. Questo non solo perchè DNA esogeno può essere inserito dentro il genoma di una pianta che altrimenti non potrebbe riceverlo, ma soprattutto frammenti di DNA naturalmente endogeni, ovvero della stessa specie o specie affini sessualmente compatibili, possono essere trasferiti, con l'innegabile vantaggio di **superare limiti temporali**, riducendo sensibilmente i lunghi tempi del miglioramento genetico tradizionale. Un necessario distinguo è quindi stato necessario per differenziare ciò che non sarebbe naturalmente possibile e ciò che invece rappresenta un maggior efficientamento di quanto esistente in natura.

In base all'origine del DNA che può essere trasferito si distinguono quindi:

- DNA transgenico**, quando il DNA trasferito appartiene a una specie che non può essere incrociata (non è in grado di fecondarlo) con l'organismo ricevente;

- b. **DNA intragenico**, quando il DNA trasferito può essere ricevuto anche per via sessuale, ma il DNA che lo fa esprimere (ovvero la sequenza regolatrice che di solito precede il gene e “decide” quando e dove questo debba essere espresso) appartiene ad altre specie;
- c. **DNA cisgenico**, quando tutta la sequenza del DNA appartiene alla specie ricevente o ad una affine sessualmente, sia nella sequenza codificante che in quella regolatrice.

In questa classificazione è però escluso il DNA che di solito accompagna il gene di interesse che si vuole trasferire nel genoma accettore (che lo accoglie). Sono infatti necessarie nel processo di trasferimento del DNA anche delle sequenze di un gene che consentano di distinguere gli individui che hanno avuto origine dalle singole cellule trasformate (OGM) da quelli che si originano da singole cellule non-OGM (Fig. 2c, selectable markers o marcatore selettivo). Queste sequenze di DNA esogeno generalmente corrispondono a geni che conferiscono la resistenza ad un antibiotico o ad un erbicida, così da eliminare facilmente tutto ciò che non è transgenico in coltura. Tuttavia, negli anni si sono evolute tecniche che consentono di utilizzare geni che conferiscono anche solo un colore (per esempio il colore rosso, dato dal gene di melo *Myb10*), ma soprattutto che possono essere eliminati una volta che hanno svolto la loro funzione e non sono più necessari (Fig. 3).

### Ingegneria genetica “pulita” per la trasformazione di melo (cisgenesis)

Design di un nuovo vettore per la selezione di trasgenici senza l'uso di kanamicina e con la rimozione di marcatori selettivi

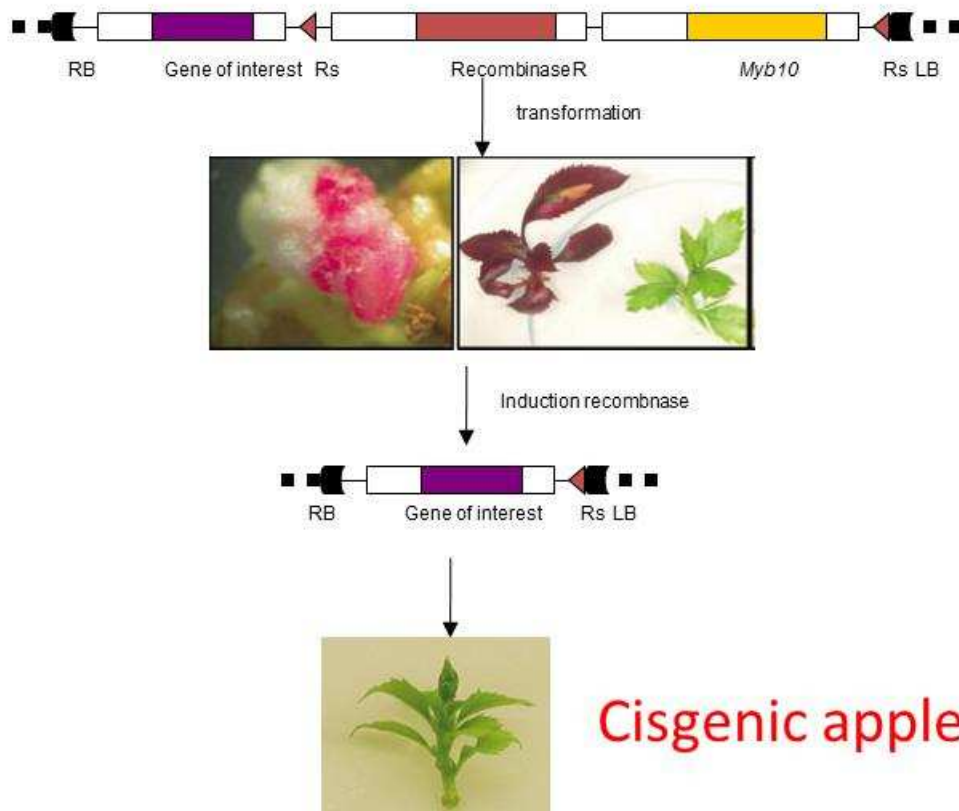


Fig. 3. Nei frammenti di DNA di “nuovo design” oggi si riesce ad evitare la presenza di marcatori selettivi indesiderati come la resistenza agli antibiotici sostituiti da geni decisamente meno impattanti e di origine vegetale come il gene

*Myb10* di melo che dà colore rosso, e a indurre l'eliminazione del DNA non più necessario (tranne quindi il gene di interesse, ad esempio un gene di resistenza ad una malattia) tra i due margini indicati con RB ed LB nella figura (Right e Left Border).

Il DNA esogeno rimanente, nel caso della cisgenesi, è così limitato ai soli bordi estremi RB e LB (Right e Left Border in figura 3) che sono le sequenze ripetute che guidano il DNA dall'*Agrobacterium* nel genoma della pianta ricevente, mentre viene eliminato tutto il rimanente DNA esogeno, seppur meno impattante delle resistenze agli antibiotici usate negli anni '80/'90.

**Nuove tecnologie per il miglioramento genetico (New Breeding Technologies, NBTs)**

Alcune nuove biotecnologie (New Breeding Technologies o NBTs) permettono di modificare in modo voluto e preciso una specifica sequenza di DNA senza spostarla dalla sua posizione naturale nel genoma, un procedimento definito *genome editing* (“correzione o revisione” del genoma) (Fig.4). I metodi elencati più diffusi sono legati a delle nucleasi (enzimi che tagliano il DNA) reclutando un sistema di riparazione che al termine del processo può essere causa di mutazione, inserzione, o sostituzione di DNA<sup>6,7</sup>.

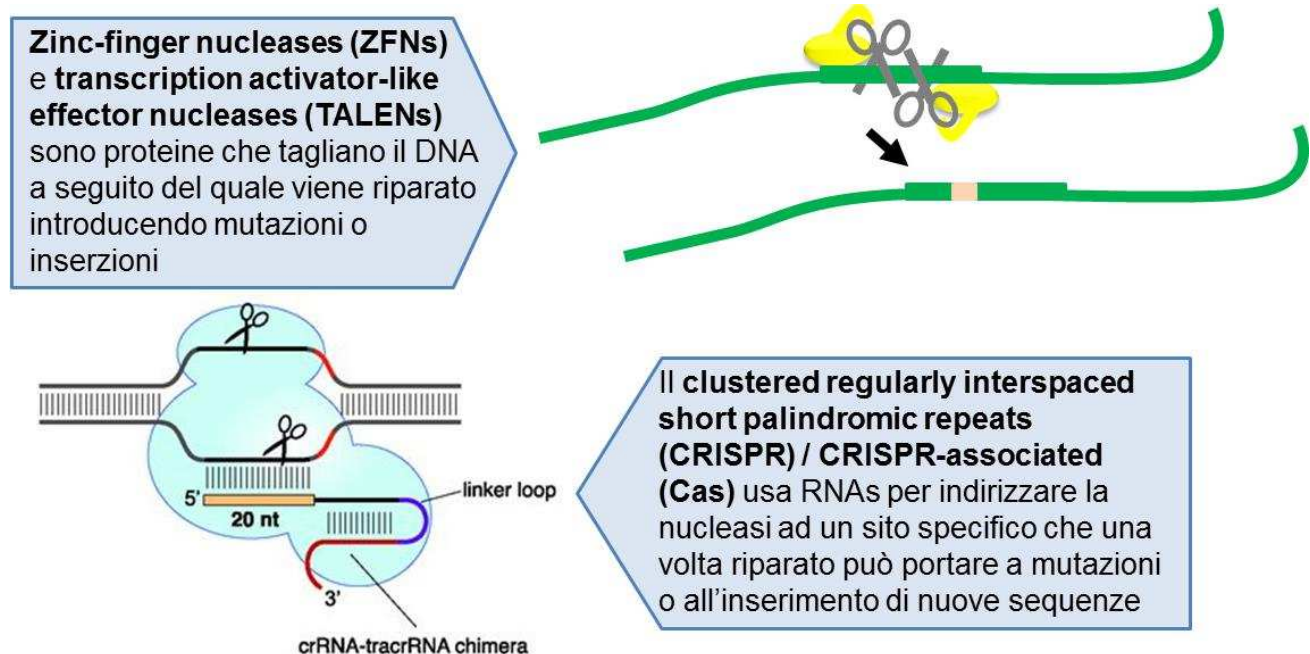


Fig. 4. Tre metodi che possono essere utilizzati per ottenere la “revisione” del genoma, attraverso un taglio sito mirato e una successiva riparazione che può portare ad una mutazione (caso più seplice), una sostituzione di uno o pochi nucleotidi, o una inserzione di un DNA omologo (cisgenesi) o eterologo (transgenesi).

Tra i tre sistemi disponibili il metodo più promettente è al momento il sistema CRISPR associato all'enzima Cas9 (CRISPR/Cas9). L'enzima Cas9 è stato isolato nel batterio *Streptococcus pyogenes* e fa parte della famiglia delle nucleasi, enzimi in grado di tagliare il DNA. Cas9 viene diretto verso sequenze specifiche nel genoma attraverso una molecola di RNA-guida, questi può essere artificialmente creato all'occorrenza e in maniera specifica per il sito che deve riconoscere e penetrare all'interno della cellula da mutagenizzare insieme al gene che codifica Cas9. La molecola di RNA-guida indirizza la nucleasi sul sito bersaglio, al che la nucleasi Cas9 taglia il DNA che conseguentemente viene riparato dalla cellula con tre possibili risultati, a seconda che la **Nucleasi Sito Diretta** (SDN) sia programmata per operare:

- **Mutazione casuale:** (SDN-1) la nucleasi opera il taglio nella molecola di DNA con il meccanismo di riparazione cellulare del DNA che provvede a risaldare le estremità. Questo processo di

riparazione produce mutazioni nel sito scelto per il taglio, che possono consistere in sostituzioni nucleotidiche oppure l'aggiunta o perdita di uno o pochi nucleotidi.

- **Mutazione con stampo di DNA (SDN-2)** oltre ad usare la nucleasi per introdurre il taglio nella molecola di DNA, viene accoppiata nella reazione di neosintesi anche una molecola di DNA che funziona nella cellula come "stampo" per riparare la lesione guidando la riparazione, di fatto mutagenizzando in maniera condizionata secondo la sequenza desiderata (non per un evento di transgenesi, ovvero non per inserirla direttamente nel DNA della pianta ricevente, bensì destinata ad essere digerita immediatamente dopo la reazione mutagenica).

- **Integrazione di una molecola di DNA nota (SDN-3)** a seguito del taglio in un sito predefinito operato dalla nucleasi si può far seguire l'integrazione di una nuova sequenza, producendo così una pianta transgenica, intragenica o cisgenica a seconda dell'origine e della natura della sequenza inserita (vedi sopra). Le piante prodotte con questa tecnica sono simili a quelle piante prodotte mediante transgenesi, intragenesi o cisgenesi, con la sola differenza che in questo caso l'inserimento del nuovo gene avviene in una **posizione predefinita del genoma**.

Questo processo ovvia ad una delle abituali critiche alla trasformazione genica tramite l'*Agrobacterium*, dove nell'inserimento casuale del DNA esogeno può essere fonte di possibile disfunzioni del genoma accogliente, mentre col genome editing l'inserimento invece è sito specifico e predeterminato (Fig. 5).

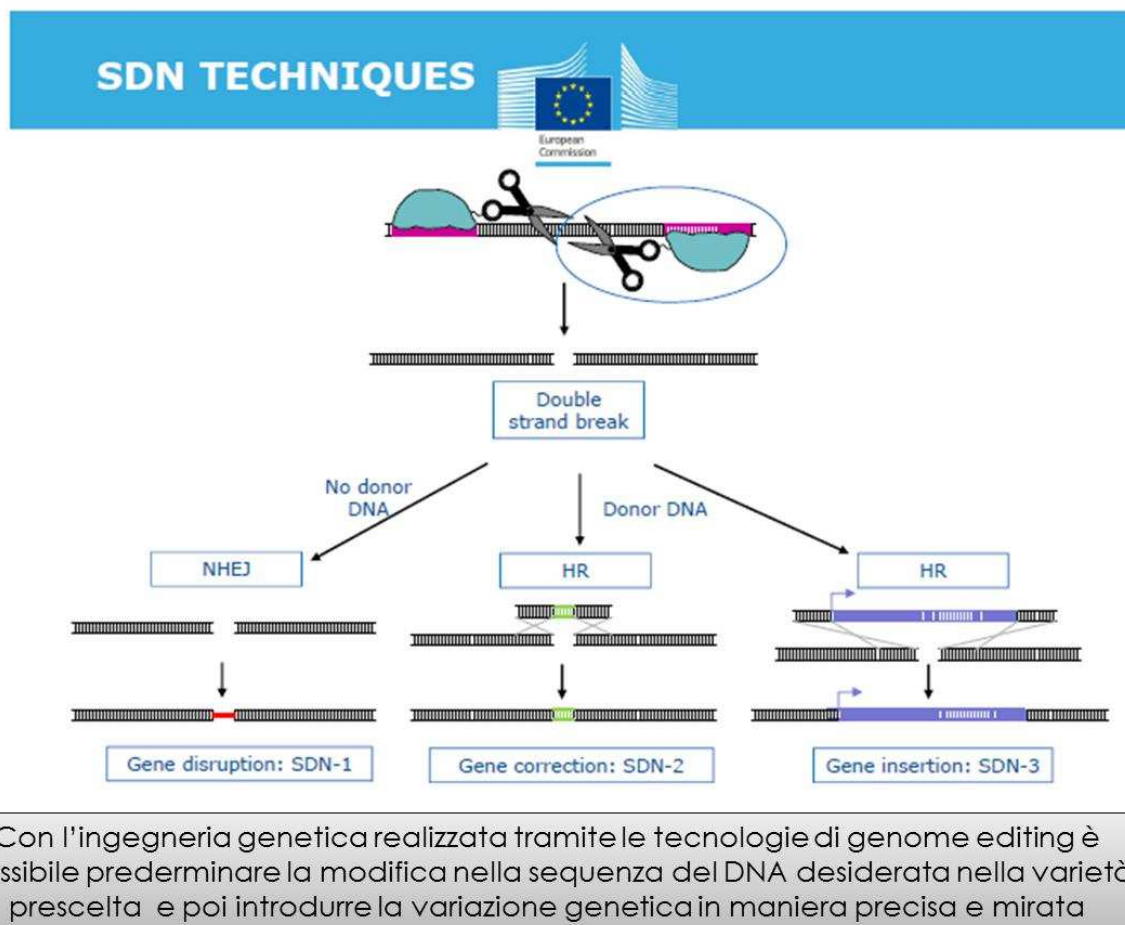


Fig. 5 Le tre tecniche di genome editing descritte come riportato dal sito della Commissione Europea.

Il genome editing può essere considerato a tutti gli effetti un metodo di **mutagenesi biologica mirata**, che differisce dalle altre metodologie che utilizzano mutageni fisici o chimici solo dal fatto

che è mirata e non casuale, con un'efficienza ed un razionale molto più funzionali allo scopo. Il risultato più frequente di tale processo di mutagenesi è infatti quello di rendere inattivo il gene bersaglio (SDN-1), in maniera molto simile a quanto avviene con la mutagenesi casuale indotta da agenti fisici o chimici che generano invece altre mutazioni in tutto il patrimonio genetico dell'individuo in maniera casuale, difficilmente controllabili.

Con l'approccio SDN-2 si ottengono invece mutazioni mirate, che possono consistere in specifiche sostituzioni di nucleotide oppure aggiunte o perdite di nucleotidi, in funzione della sequenza che viene usata come stampo. In questo caso, il genome editing può portare a generare per uno specifico gene una variante già esistente in natura oppure una nuova variante ma, comunque, con caratteristiche predefinite dallo sperimentatore, sfruttando conoscenze pregresse ottenute tramite studi biologico-molecolari. Mediante il *genome editing* si può generare in una varietà coltivata una qualsiasi **mutazione favorevole** che sia stata individuata in individui selvatici o specie affini, **senza introdurre nuovi geni** e soprattutto evitando le lunghe pratiche di incrocio e reincrocio.

Solo nella modalità SDN-3, il *genome editing* riconduce di fatto alla transgenesi quando può essere utilizzato per trasferire geni da specie non sessualmente compatibili, mentre quando la molecola inserita deriva per intero da una specie sessualmente compatibile è assimilabile in tutto e per tutto alla cisgenesi. Lo stesso vale per l'intragenesi, dove il DNA che si vuole inserire nel sito selezionato è parzialmente di origine omologa ed in parte eterologa, ad es. nel suo tratto regolatore (vedi sopra).

### **Tracciabilità e normative vigenti**

Dalla promulgazione della Direttiva 2001/18/EC del Parlamento Europeo sono trascorsi 15 anni e molte tecnologie sono comparse così come le conoscenze genetiche e tecnologiche sono aumentate esponenzialmente. A causa di questa rapida evoluzione a fronte di un relativo vuoto normativo si rileva che potranno nascere difficoltà difficilmente sormontabili a seguito di rapidi ed interessanti sviluppi tecnico-scientifici.

Alcuni esempi pratici possono aiutarci a capire come la mutagenesi biologica possa farci ottenere importanti risultati, ad esempio nell'introduzione di resistenze genetiche fondate sulle caratteristiche intrinseche delle specie coltivate o loro affini, ma i cui risultati sono difficili da inquadrare nella normativa vigente:

Caso 1: Geni di Suscettibilità (S) ai patogeni. Questi geni sono responsabili del riconoscimento della pianta ospite da parte del patogeno e sono causa del successo del patogeno sull'ospite. L'esempio più eclatante è rappresentato dal gene *mlo*. Scoperto nell'orzo all'inizio degli anni '90 questo gene nella sua forma recessiva (silenziosa) non viene espresso e ciò impedisce l'ingresso del fungo (oidio) nel cereale<sup>10</sup> (Fig. 7). Recentemente sono stati identificati geni in vite che hanno lo stesso ruolo.



Fig. 7. a) orzo suscettibile e resistente, b) vite suscettibile, c) vite resistente per mutagenesi del gene *mlo*.

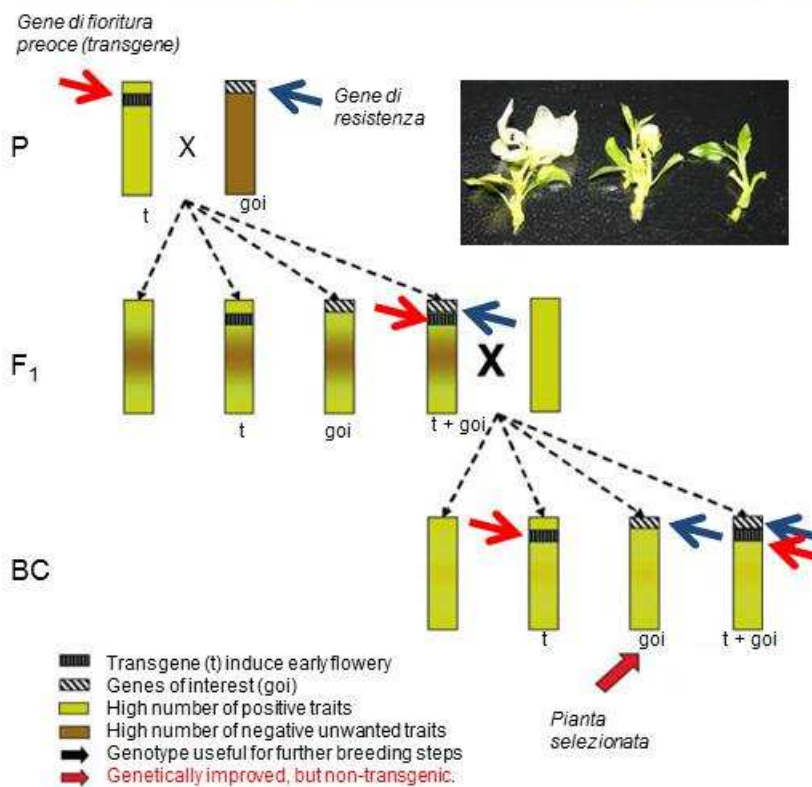
L'ottenimento di una vite resistente ad un patogeno fungino come l'oidio potrebbe portare ad una diminuzione importante nell'uso dei fitofarmaci in viticoltura (si ricorda che la sola viticoltura in Europa impiega oltre il 60% dei fitofarmaci dell'insieme delle piante coltivate). I vantaggi sono

tangibili in quanto si potrebbe idealmente mutagenizzare il più ampio numero di varietà di vite coltivate nelle varie regioni italiane mantenendo così le caratteristiche di pregio delle uve, salvaguardando la tipicità del prodotto e la qualità del vitigno.

Caso 2: Fast Breeding/miglioramento genetico accelerato. La scoperta di alcuni geni in grado di controllare la fioritura anche in piante arboree, com'è noto le più difficili da migliorare geneticamente per ovvii motivi di tempo, spazio e costi relativi, fornisce l'opportunità di accelerare il miglioramento genetico tramite l'inserzione di un gene esogeno (transgenico) in un processo chiamato "early flowering". Tuttavia come mostrato in figura 8, dopo diverse successive generazioni di reincrocio si può selezionare la progenie non più contenente il gene per la fioritura precoce (transgene) ma solo il gene di interesse (ad es. la resistenza genetica come indicato in figura 8).

## Sviluppo di linee accelerate di fioritura in melo

Trasformazione, fioritura annuale, backcross fino al raggiungimento di adeguata qualità, eliminazione del trasgene



In entrambi i casi 1 e 2, la normativa vigente non consente una facile gestione. Nel primo caso, applicando il genome editing e "spegnendo" il gene che favorisce il riconoscimento dell'ospite da parte del patogeno abbiamo un caso di vuoto normativo, e, se si propendesse per la comparabilità di questo caso ad un OGM invece che per la comparabilità alla mutagenesi chimico/fisica, non solo si priverebbe di una opportunità l'Europa ma ci renderebbe anche difficile la protezione da eventuali frodi. Infatti questo individuo mutagenizzato potrebbe essere tranquillamente venduto come mutazione spontanea da chiunque volesse far entrare in Europa un prodotto di tali caratteristiche purtroppo impossibili da distinguere da un organismo mutante naturale o ottenuto con metodi chimico/fisici normati all'art. 3 (deroghe) della Direttiva 2001/18/EC (vedi sotto).

Il secondo caso è perfino peggiore poiché il prodotto ottenuto per miglioramento genetico tradizionale con un pedigree contenente piante transgeniche, non sarebbe in alcun modo tracciabile



e distinguibile da un prodotto del normale miglioramento genetico non avendo più tracce nel suo DNA delle generazioni transgeniche precedenti.

Riguardo agli organismi geneticamente modificati la Direttiva 2001/18/EC recita all'articolo 2<sup>1</sup>:  
«*organismo geneticamente modificato (OGM)*», un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale. Ai fini della presente definizione:  
a) una modificazione genetica è ottenuta almeno mediante l'impiego delle tecniche elencate nell'allegato I A, parte 1;

...

Il successivo Articolo 3 specifica delle deroghe:

*Deroghe*

1. La presente direttiva non si applica agli organismi ottenuti con le tecniche di modificazione genetica di cui all'allegato I B.

...

Sotto gli allegati:

Allegato 1A

*TECNICHE DI CUI ALL'ARTICOLO 2, PARAGRAFO 2*

*PARTE 1*

*Le tecniche di modificazione genetica di cui all'articolo 2, paragrafo 2, lettera a), comprendono tra l'altro:*

- 1) *tecniche di ricombinazione dell'acido nucleico che comportano la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento in un virus, un plasmide batterico o qualsiasi altro vettore, di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo all'esterno di un organismo, nonché la loro incorporazione in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;*
- 2) *tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;*
- 3) *fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali.*

.....

Allegato I B

*TECNICHE DI CUI ALL'ARTICOLO 3*

*Le tecniche o i metodi di modificazione genetica che implicano l'esclusione degli organismi dal campo di applicazione della presente direttiva, a condizione che non comportino l'impiego di molecole di acido nucleico ricombinante o di organismi geneticamente modificati diversi da quelli prodotti mediante una o più tecniche oppure uno o più metodi elencati qui di seguito sono:*

1. *la mutagenesi;*
2. *la fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali.*

La Direttiva 2001/18/EC regola **prevalentemente il metodo** utilizzato per produrre una nuova pianta che non le caratteristiche della pianta. Non è tuttavia una normativa di puro processo: teoricamente, non è sufficiente utilizzare le tecniche di DNA ricombinante per rientrare sotto la giurisdizione della Direttiva. E' necessario anche un requisito di novità, cioè la presenza di "nuove combinazioni di materiale genetico" (Allegato 1A della Direttiva, paragrafo 1). Quindi la Direttiva è anche una normativa di prodotto, seppure in subordine<sup>1</sup>.

È abbastanza evidente che in ogni caso la Direttiva necessita degli aggiornamenti e, se del caso, sarebbe probabilmente opportuno rivedere l'intera normativa al riguardo al fine di non perdere

opportunità particolarmente interessanti emergenti come il genome editing, ed anche impedire a paesi terzi di invadere l'Europa con prodotti non tracciabili, consentendo a enti pubblici e realtà private europee di mantenere uno stretto controllo sui prodotti tipici e caratterizzanti i nostri territori.

## Sommario

In tabella si pongono a confronto le diverse tecniche di miglioramento genetico e esplorazione delle potenzialità genetiche di una specie. Come si può osservare gli approcci non sono necessariamente escludenti l'un l'altro, piuttosto risultano complementari per molti aspetti, e finalizzati ad ottenere prodotti diversi.

<b>Differenze/Analogie</b>	<b>Miglioramento Genetico</b>	<b>Mutagenesi fisico/chimica</b>	<b>Genome Editing</b>
<b>Tempistica</b>	Lunga/molto lunga	Breve	Breve
<b>Precisione</b>	Parzialmente definita	Casuale	Predefinita
<b>Costi</b>	Elevati (tempi e spazi)	Limitati	Decisamente limitati
<b>Conoscenza pregressa</b>	Esperienza pratica e/o assistita da marcatori	Creazione variabilità ex-novo	Indispensabile
<b>Caratteristiche varietali</b>	Completamente rimescolate (elevata biodiversità)	Prevalentemente conservate, novità casuale	Completamente conservate con una caratteristica in + o -
<b>Valore aggiunto</b>	Esplorazione del potenziale genetico	Creazione nuove caratteristiche e maggiore biodiversità	Esaltazione della tipicità e ottimizzazione
<b>Resistenze genetiche</b>	Lungo decorso a discapito della qualità	Del tutto casuale ed improbabile che avvenga	Perfettamente finalizzato anche per resistenze multiple
<b>Organismo Geneticamente Modificato</b>	No	No	Non normato (possibilmente no per similarità con mutagenesi chimico/fisica: all. IB della 2001/18/EC)

## Letteratura

- 1) [http://www.geneticagraria.it/news\\_dett.asp?a\\_pag=3&id=1176](http://www.geneticagraria.it/news_dett.asp?a_pag=3&id=1176), Documento congiunto SIPV-SIGA. Considerazioni riguardo la tecnica del genome editing per il miglioramento genetico delle colture agrarie
- 2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>
- 3) Larebeke, N.V., Engler, G., Holsters, M., Den Elsacker, S.V., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J. (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*. 252: 169-170.
- 4) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303: 179-180.
- 5) Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature*. 303: 209-213
- 6) Boch, J., Bonas, U. and Lahaye, T. (2014). TAL effectors – pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytol.* 823-832
- 7) Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337: 816-821
- 8) [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/2943.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2943.pdf)
- 9) Direttiva 2001/18 [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol1/dir\\_2001\\_18/dir\\_2001\\_18\\_it.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol1/dir_2001_18/dir_2001_18_it.pdf)
- 10) Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Gronendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F., Schulze-Lefert, P. (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88: 695-705