



Aspetti innovativi del miglioramento genetico



Riccardo Velasco, PhD
Direttore CREA-VE





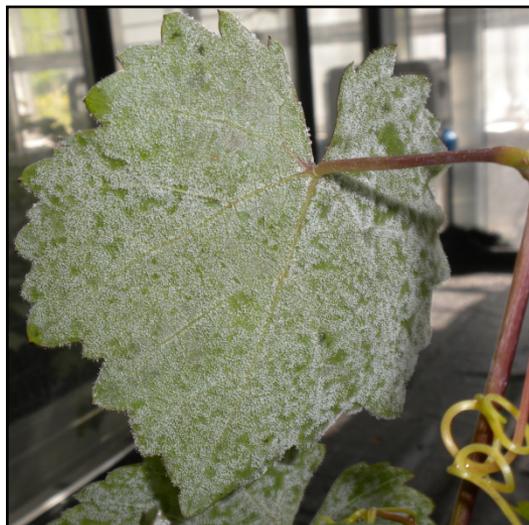
***Esplorare la biodiversità:
una intensa attività di miglioramento genetico per indagare
quanto ancora inesplorato...nella qualità...***



....e nelle resistenze ai maggiori patogeni

Fenotipizzazione di 100 accessioni presenti a FEM per la resistenza a Peronospora (su piante in vaso e dischetti fogliari) e a Oidio (su piante in vaso) – almeno due repliche.

(*Vezzulli et al.*, submitted to EJPP)



Sintomi di Peronospora (DM)

(*Plasmopara viticola*)



Sintomi di Oidio (PM)

(*Oidium tuckeri*)

Centri di breeding in Europa:

Germania:

Geilweierhof
Freiburg

Austria:

Klosterneuburg
Weiss (privati)

Ungheria:

Pecs

Italia:

FEM-IASMA
University of Udine
Innovitis (privati)
CREA-VE

Francia:

INRA Bordeaux e Colmar

Obiettivo: resistenza a quali patogeni?

OIDIO (*Erysiphe necator*)



Dornfelder trattato e non trattato



PERONOSPORA (*Plasmopara viticola*)



PHYLLOXERA (*Daktulosphaira vitifoliae*)





Cosa significa resistenza:

- L'immunità non esiste
- Esistono diversi livelli di resistenza
- Ci sarà sempre comunque bisogno di mantenere i patogeni sotto controllo



Varietà resistenti registrate nei cataloghi nazionali

Germania: **Regent** (r); **Bronner** (b);

Johanniter, **Merzling**, Solaris, Helios, Prior, Baron,
Monarch, Cabernet Cortis, Cabernet Carol, Cabernet
Carbon

Calandro, Felicia, Reberger, Villararis

Austria: Roesler (r); Rathay (r)

Italia: **Regent**, **Bronner** + altre 6, giugno 2014+10 (UniUD)

Combinazione di diversi genotipi con resistenze di diversa origine



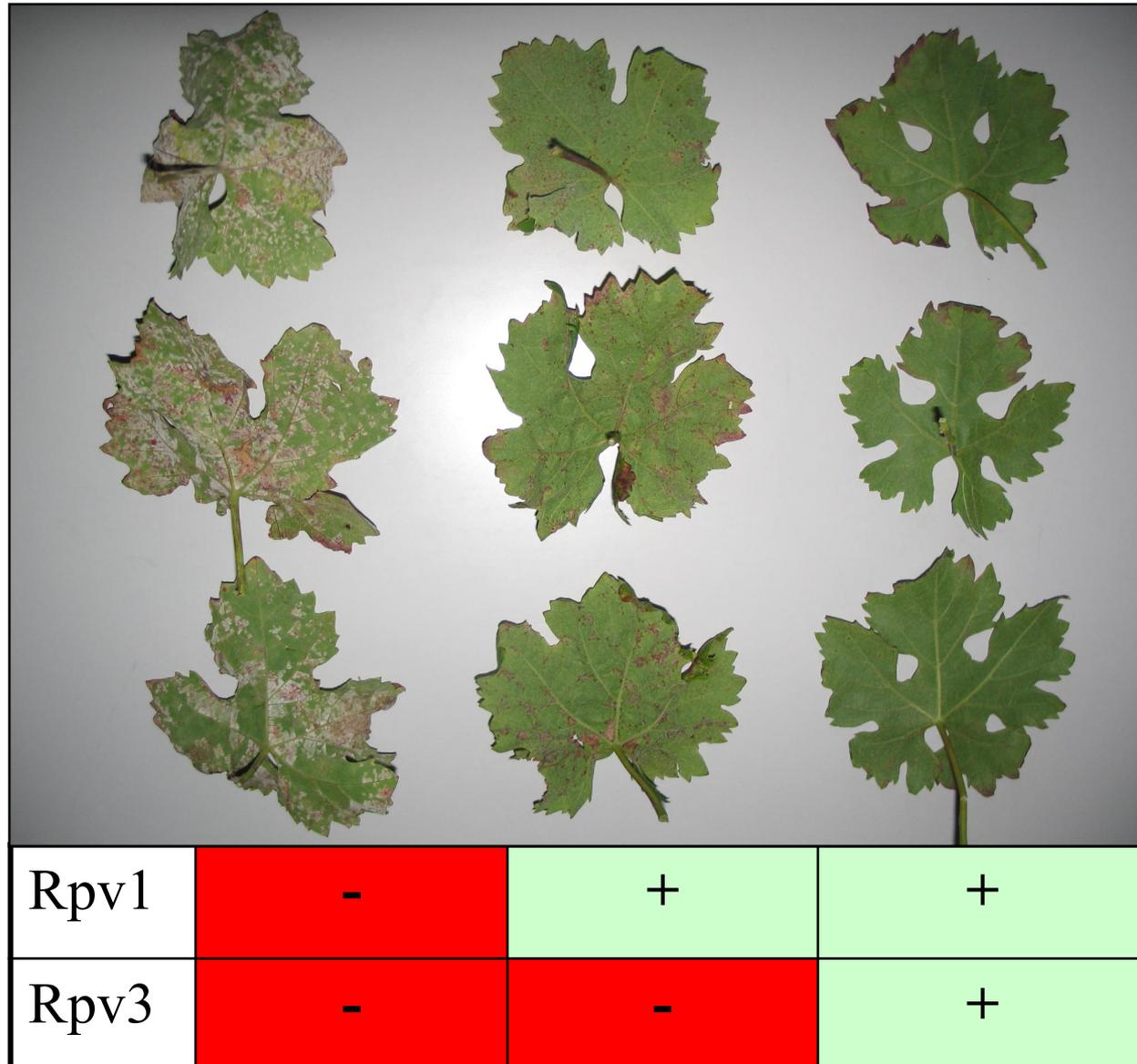
Marcatori per:
Run1: oidio (LG12)
Rpv1: peronospora (LG12)

X

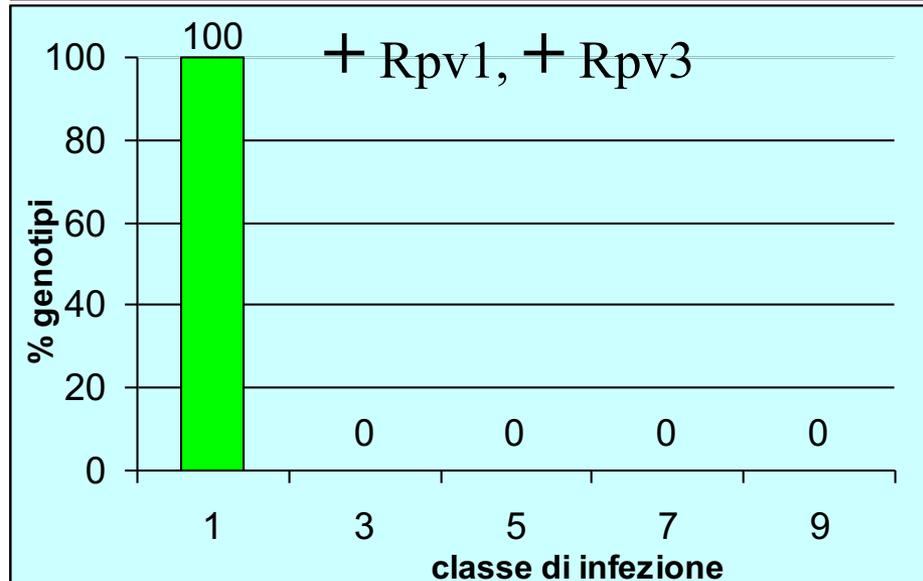
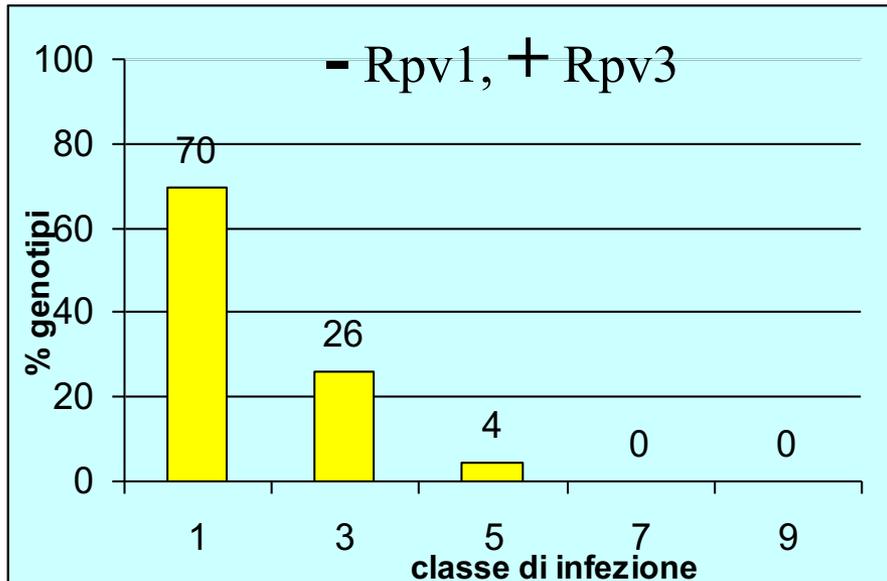
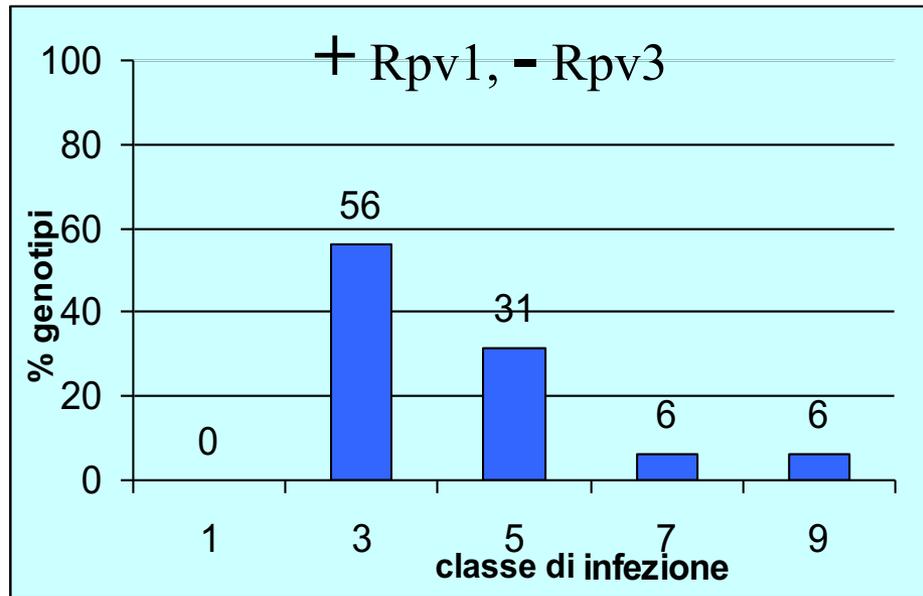
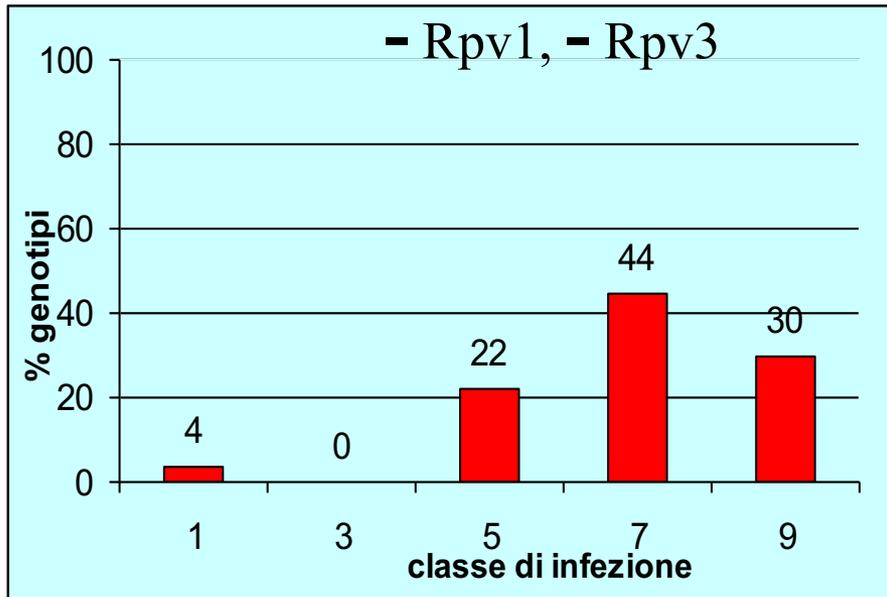


Marcatori per:
Ren2: oidio (LG15)
Rpv3: peronospora(LG18)

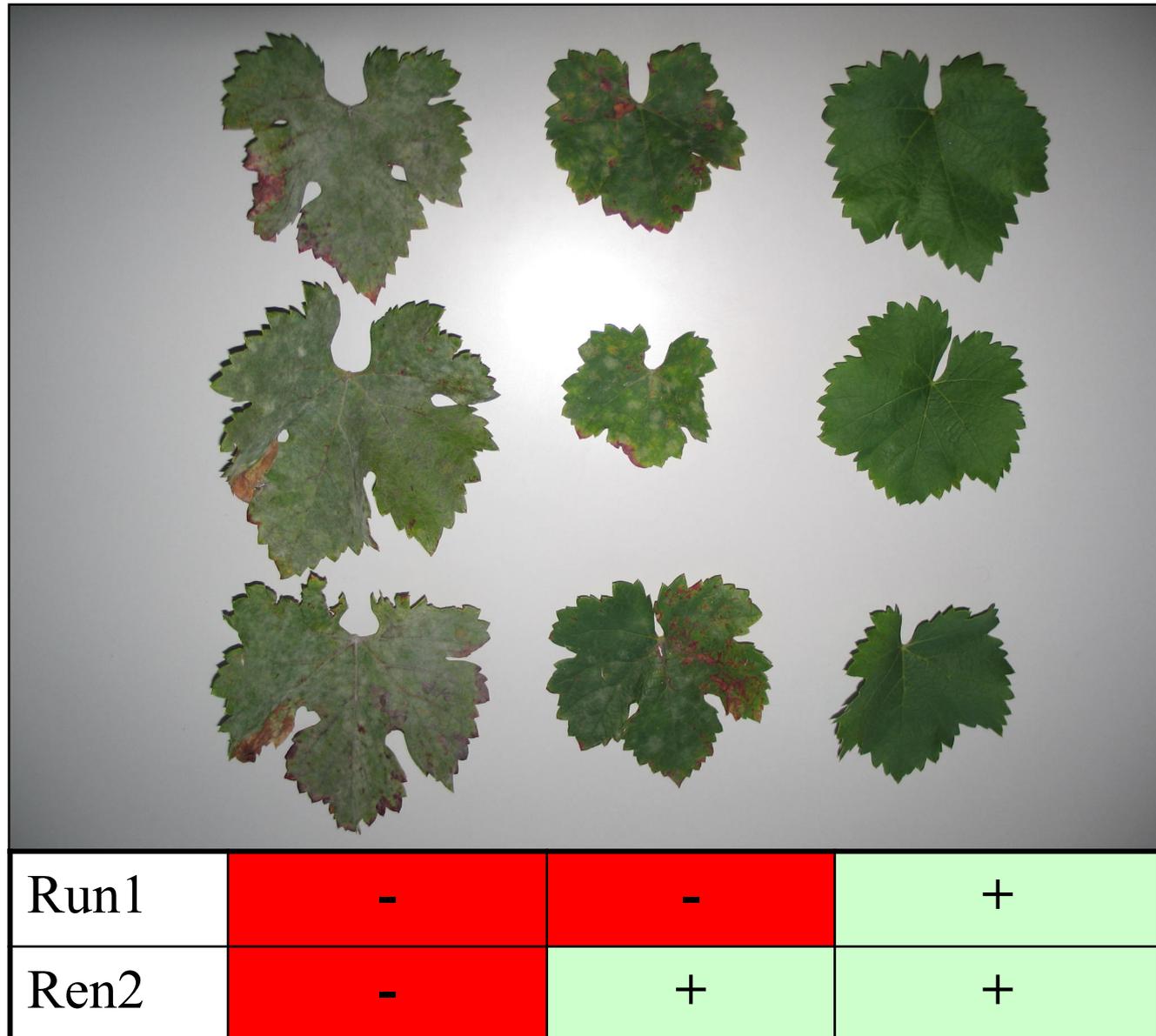
Effetto additivo della resistenza in presenza di geni diversi (peronospora)



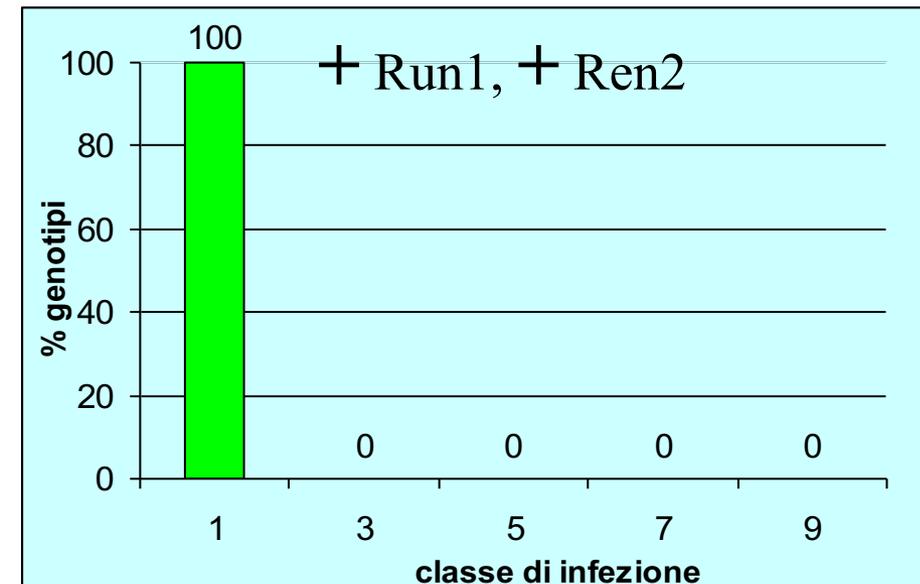
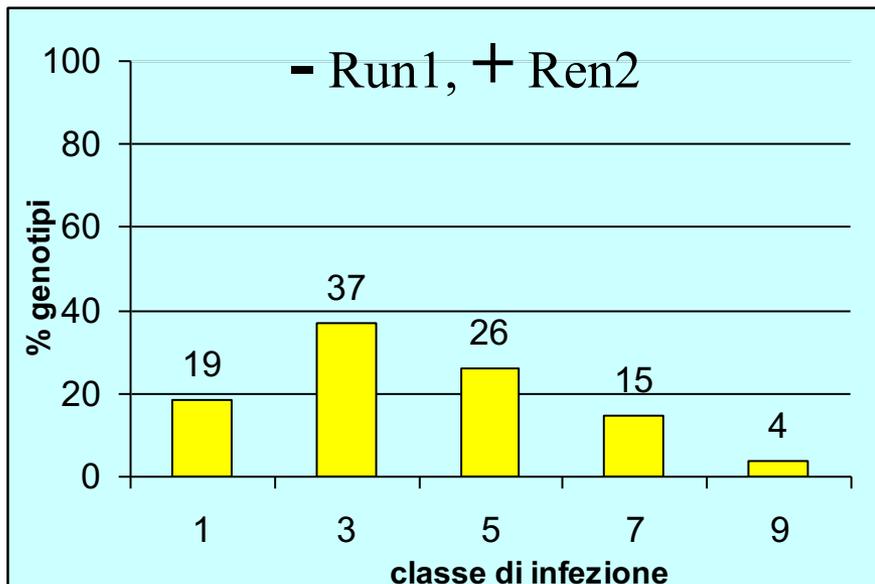
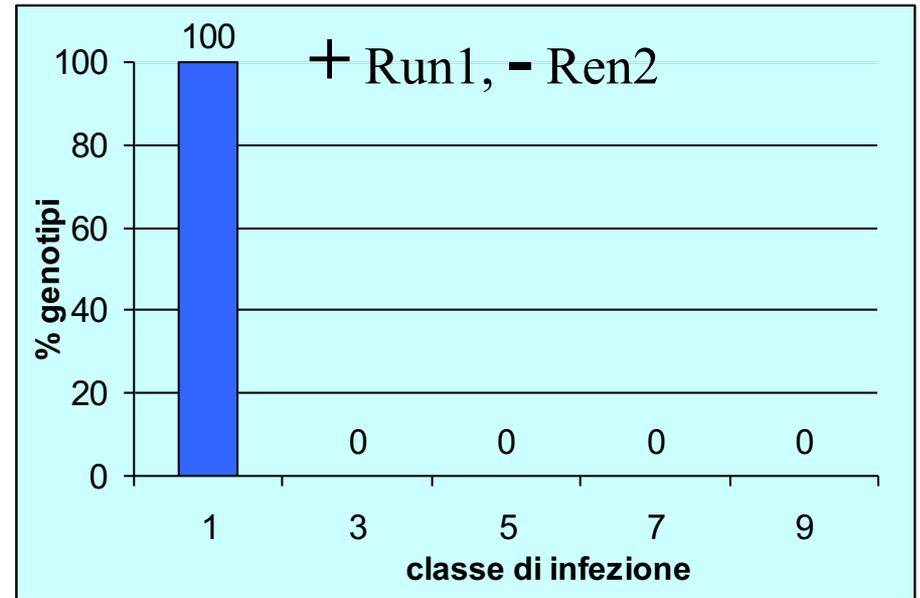
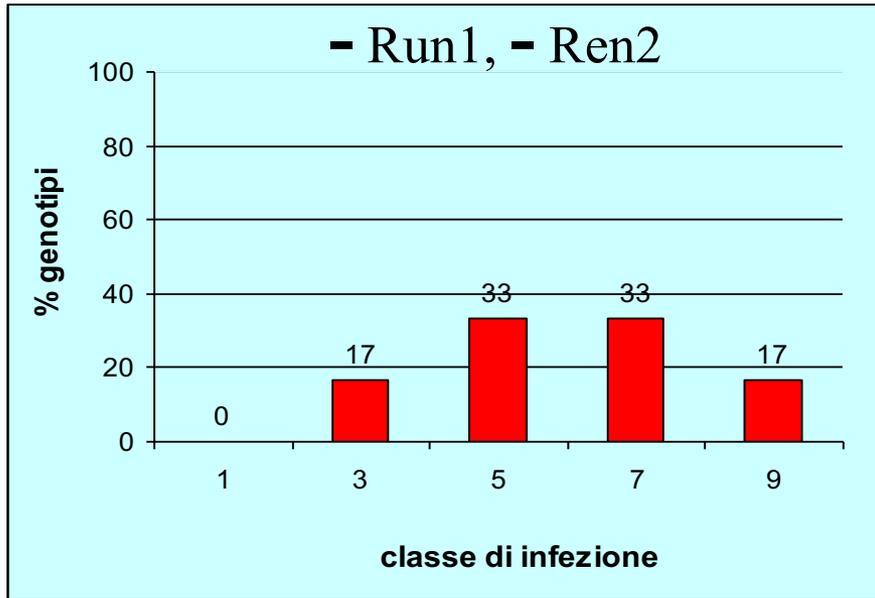
Distribuzione della resistenza in presenza di geni diversi (peronospora)



Effetto additivo della resistenza in presenza di geni diversi (oidio)



Distribuzione della resistenza in presenza di geni diversi (oidio)





Il miglioramento genetico:

- Un'attività pluriennale
- Impegnativa e costosa
- Come incrementare le probabilità di successo(?)

castrazione

impollinazione



copertura



Incroci controllati

Crescita di singoli semi e trapianto



Campi sperimentali

Esempio di piramidazione di resistenze, oltre 30 anni di lavoro(!)

Malaga seedling x **M. rotundifolia G 82** (2n=40)

F₁ NC 6-15

x Cabernet sauvignon

R₁ VRH 8628

x Grenache noir

Merlot noir

x **R₂ VRH 5-18-79**

R₃ VRH 1-82

x Aubin

R₄ VRH 3082-1-42

(Bouquet, A, 1996)

X

99-1

(Kozma jr., 1999)

V. amurensis x V. vinifera F₂ population (2n=38)

28/19

x Italia

Kunbarát

(Tamássy, Koleda, 1960)

x Traminer

SK 77-4/5

x

SK 86-2-293 x Riesling

SK 90-2-19

(Cindrić 1990)

SV 12375 x Bouvier

Bianca

(Csizmazia, Bereznai, 1963)



Il miglioramento genetico:

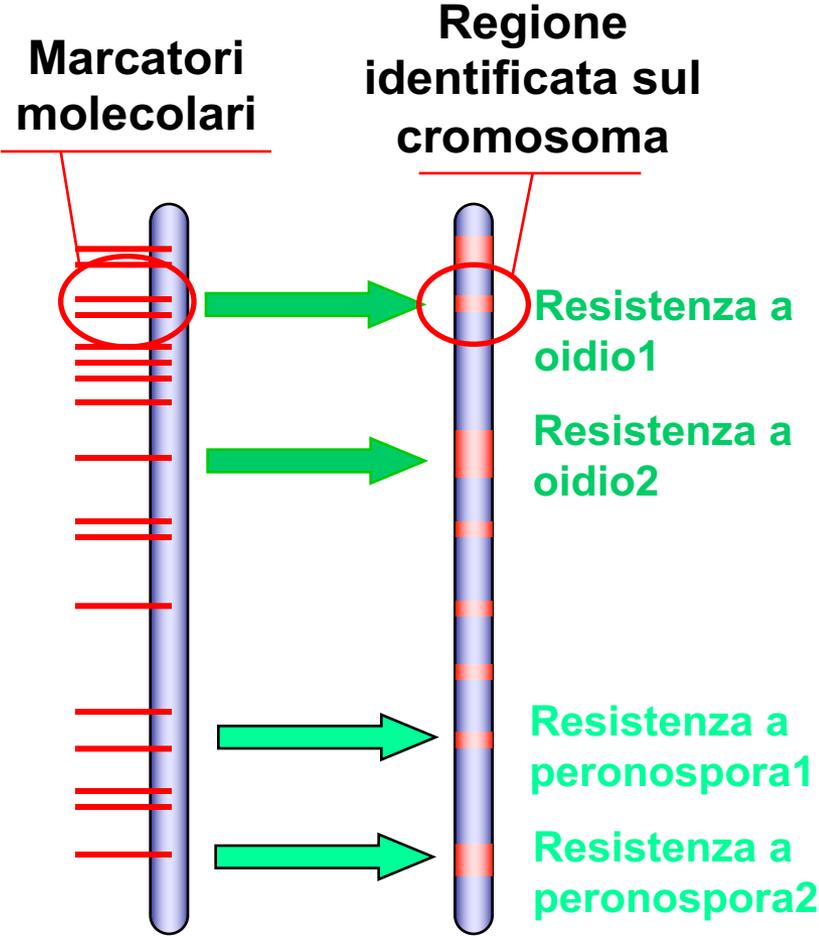
- Selezione assistita
- Identificazione di nuovi marcatori
- Piramidazione (concentrazione di più geni in un solo genotipo «élite»)

MAS, la selezione assistita dai marcatori introdotta in vari istituti italiani per:

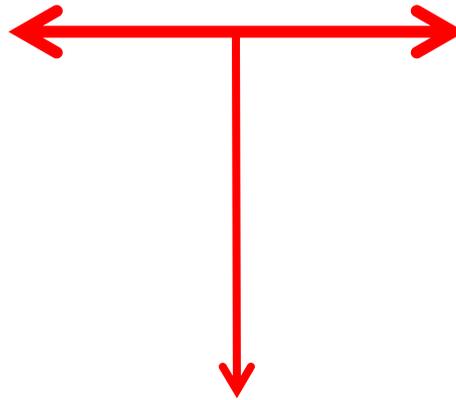
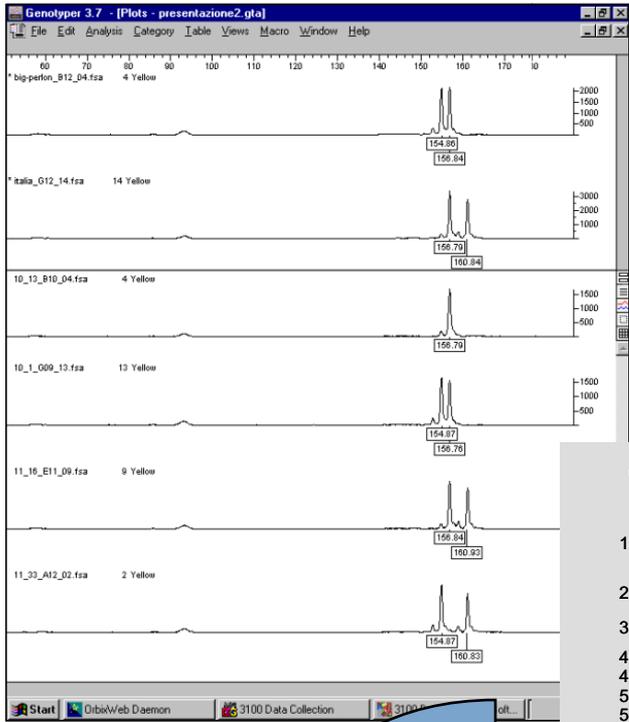
- Resistenza alla peronospora
- Epoca di maturazione
- Contenuto in terpeni
(aromi)
- Apirenia



Regione cromosomica responsabile della resistenza

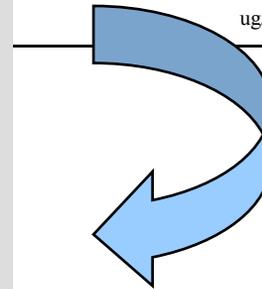
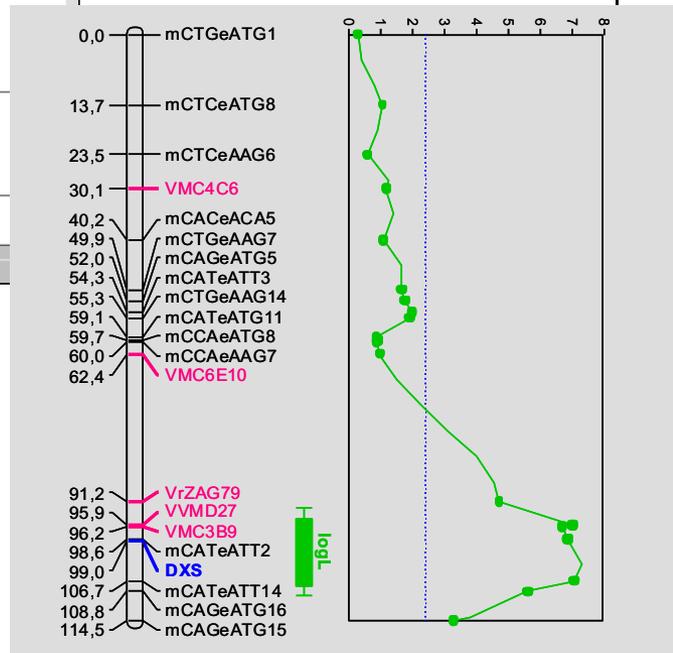
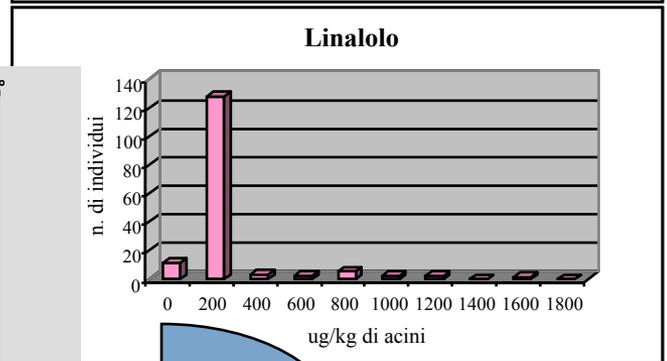
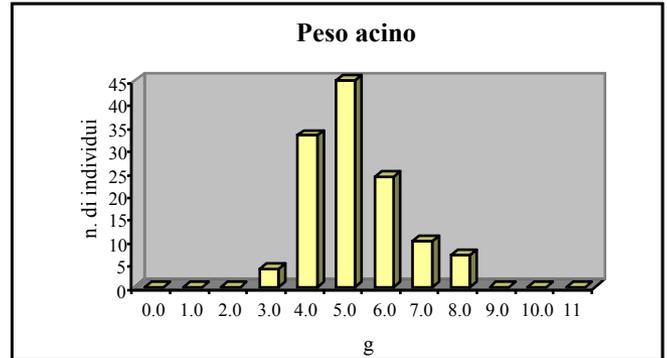


Dati genetici (segregazione marcatori)



QTLs

Dati fenotipici (segregazione del tratto)

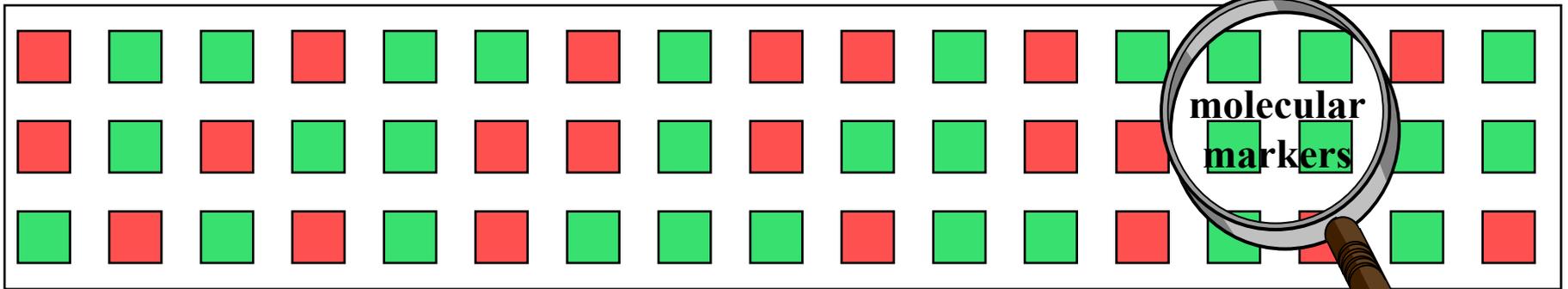


Resistenza (R1)

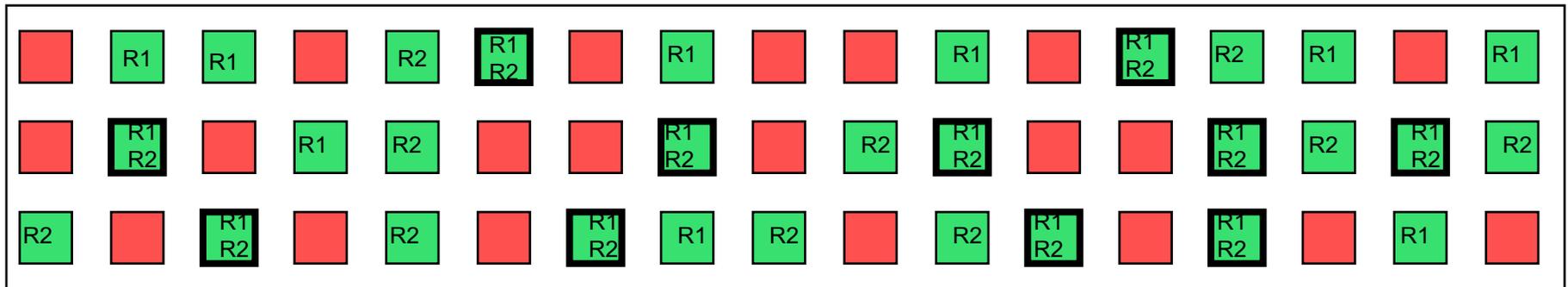
x

Resistenza (R2)

Selezione fenotipica res. all'oidio



Selezione genotipica (MAS)



Resistance gene to	markers			crosses		res. genotype
<i>Rpv1</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	VMC72 VVIb32	Syrah	x	28-8-78	28-8-78 <i>M. rotun</i>
<i>Rpv2</i>	<i>Plasmopara viticola</i>		Cabernet Sauvignon	x	8624	8624 <i>M. rotund</i>
<i>Rpv3</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	UDV-112	Regent	x	Lemberger	Regent
		VVIIn16	Chardonnay	x	Bianca	Bianca
		UDV-305				
		VMC/F2				
<i>Rpv4</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	VMC7h3 VMCNg2e2.1	Regent	x	Lemberger	Regent
<i>Rpv5</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	VVIo52b	Cabernet Sauvignon	x	Gloire de Montpellier	Gloire de Montpellier <i>V. riparia</i>
<i>Rpv6</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	VMC8G9	Cabernet Sauvignon	x	Gloire de Montpellier	Gloire de Montpellier <i>V. riparia</i>
<i>Rpv7</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	UDV-097	Chardonnay	x	Bianca	Bianca
<i>Rpv8</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	VMC1G3.2	Moscato Bianco	x	<i>V. riparia</i>	Wr63 <i>V. riparia</i>
<i>Rpv9</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	CCoAOMT	Moscato Bianco	x	<i>V. riparia</i>	Wr63 <i>V. riparia</i>
<i>Rpv10</i>	<i>Plasmopara viticola</i>					<i>V. amurensis</i>

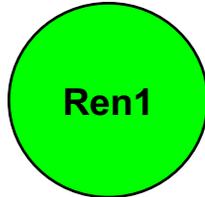
Resistance gene to markers crosses res. genotype

<i>Ren1</i>	<i>Erysiphe necator</i>	UDV-020	Nimrang	x	Kishmish vatkana	Kishmish vatkana
		VMC9h4-2				
		VMCNg4e10.1				
<i>Ren2</i>	<i>Erysiphe necator</i>	CS25	Horizon	x	Illinois 547-1	Illinois 547-1
<i>Ren3</i>	<i>Erysiphe necator</i>	UDV-015b	Regent	x	Lemberger	Regent
		VViv67				
<i>Ren4</i>						
<i>Run1</i>	<i>Erysiphe necator</i>	VMC1g3.2	VRH3082-1-42	x	Cabernet Sauvignon	VRH3082-1-42 <i>M. rotundifolia</i>
		VMC4f3.1				
<i>5-gt</i>	anthocyanin diglucosides	3,5-Gf09_01	Regent	x	Lemberger	Regent

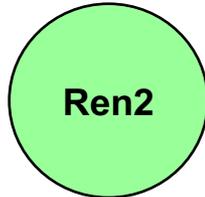
Numerosi i marcatori correlati alla resistenza, fonti di resistenza a:



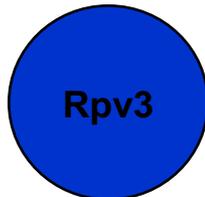
= resistance to oidium and peronospora in *Vitis muscadinia*



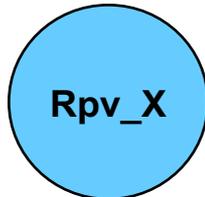
= resistance to oidium in „Kishmish vatkana“



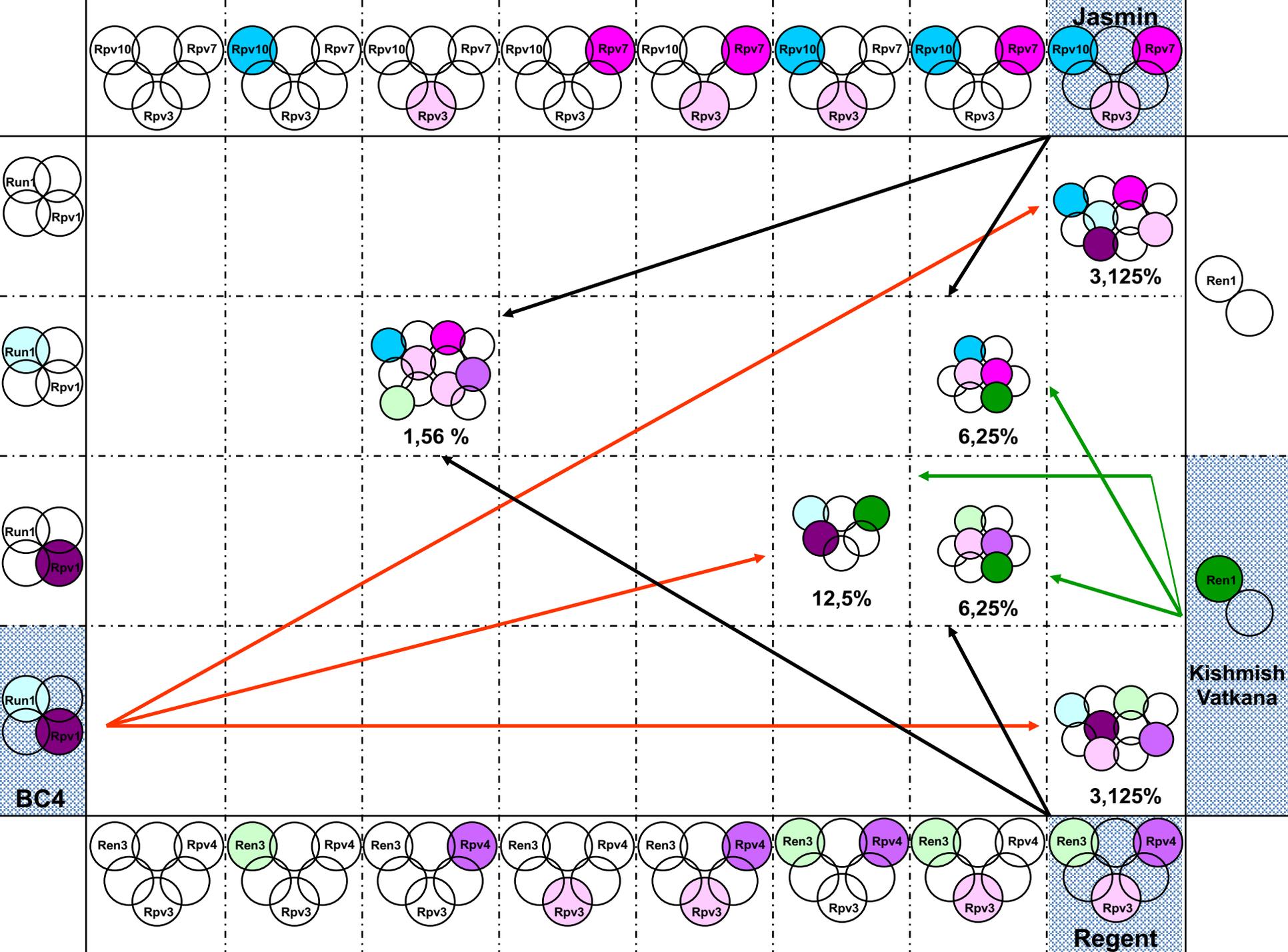
= resistance to oidium in „Regent“

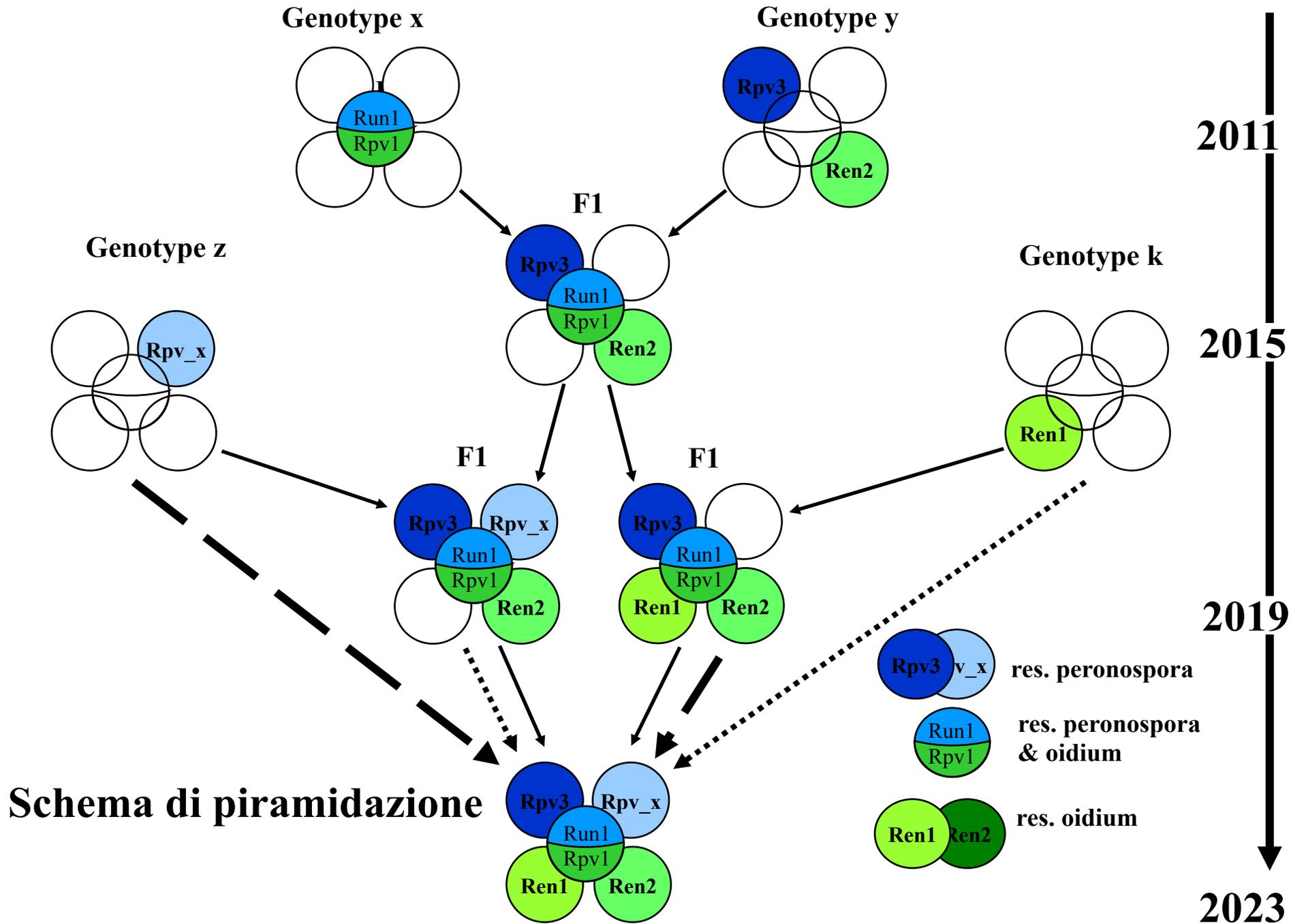


= resistance to peronospora in „Regent“



= resistance to peronospora in „Solaris“ (*Vitis amurensis*)



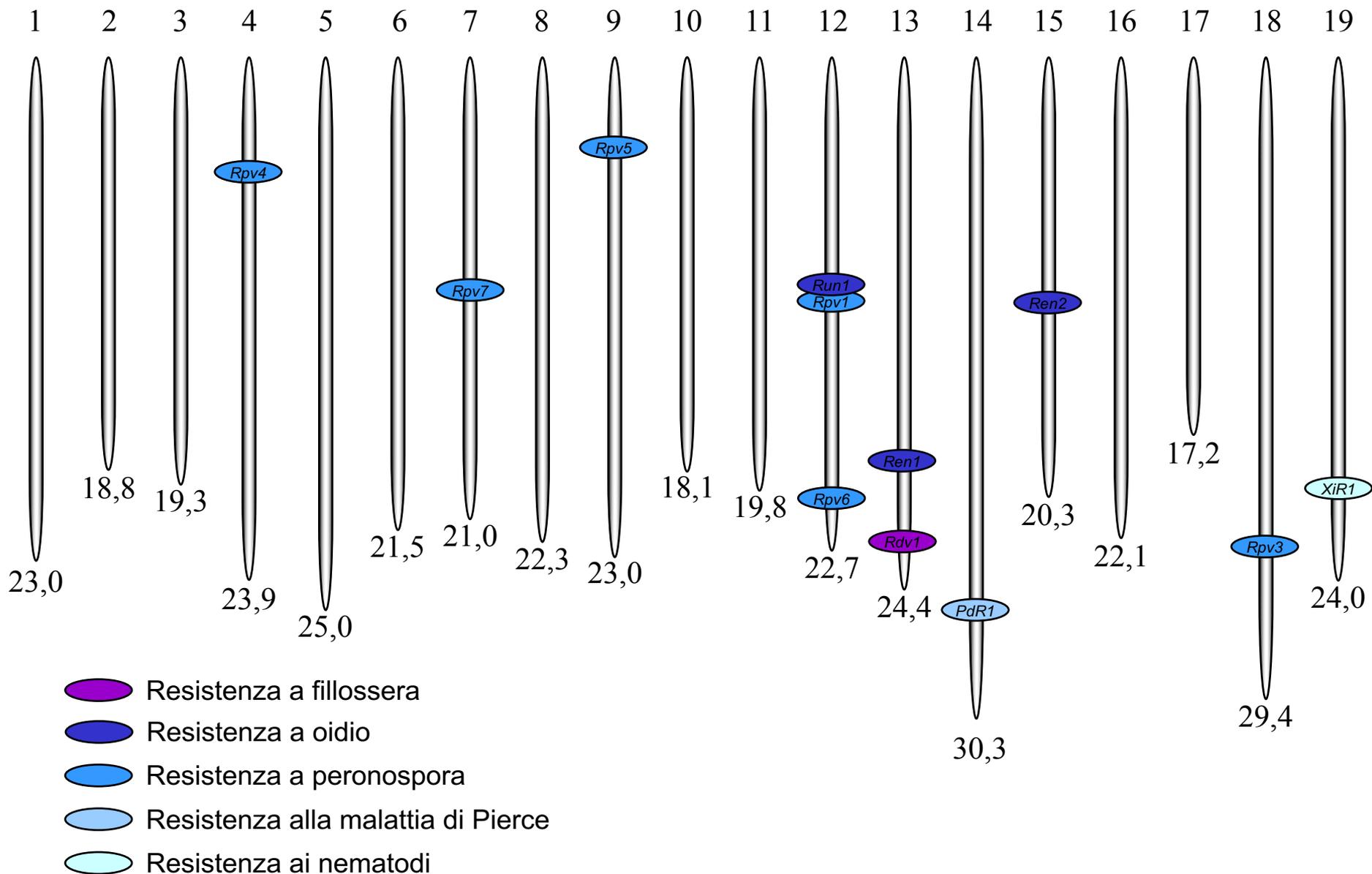


Situazione alla Fondazione E.Mach

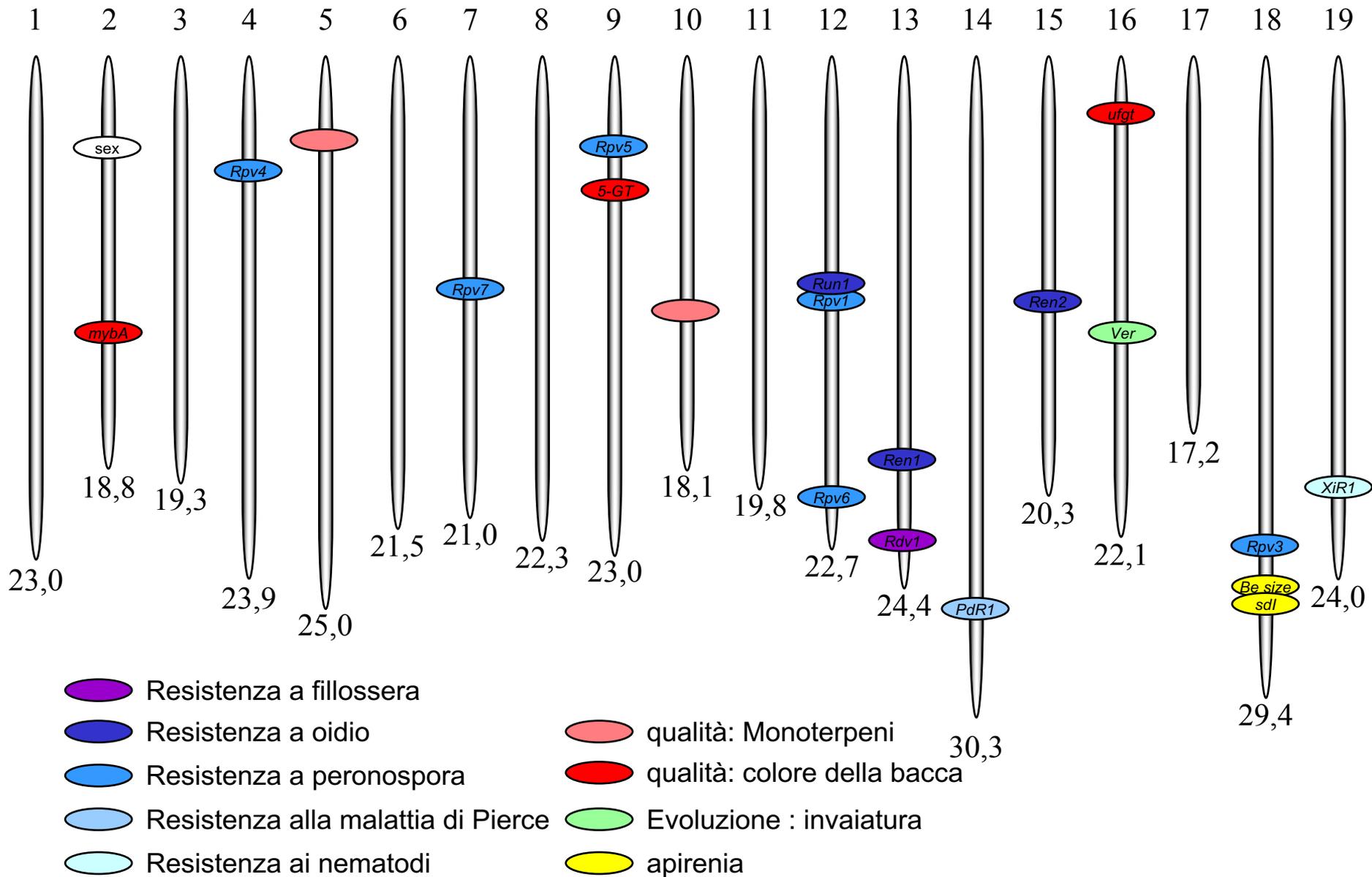
- **Semi:** nel 2011/14 sono stati effettuati 73 incroci che hanno dato origine a circa 86.000 semi in fase di germinazione
- **Semenzali in tunnel:** circa 2.500

Percentuale di danno	Numero di piante
0 peronospora e 0 oidio	260
10% peronospora e 0 oidio	468
15% peronospora e 0-1 oidio	953

Regioni cromosomiche più significative per resistenze



Tratti di resistenza in vite combinati con tratti qualitativi





Il miglioramento genetico:

- Nuove tecnologie abilitanti
- Screening rapido per nuove resistenze
- Strade alternative alla MAS

Bassa patogenicità

Bronner



Tecnica di screening rapido

Cabernet Carbon



Aromera



Johanniter



MW 14

Alta suscettibilità

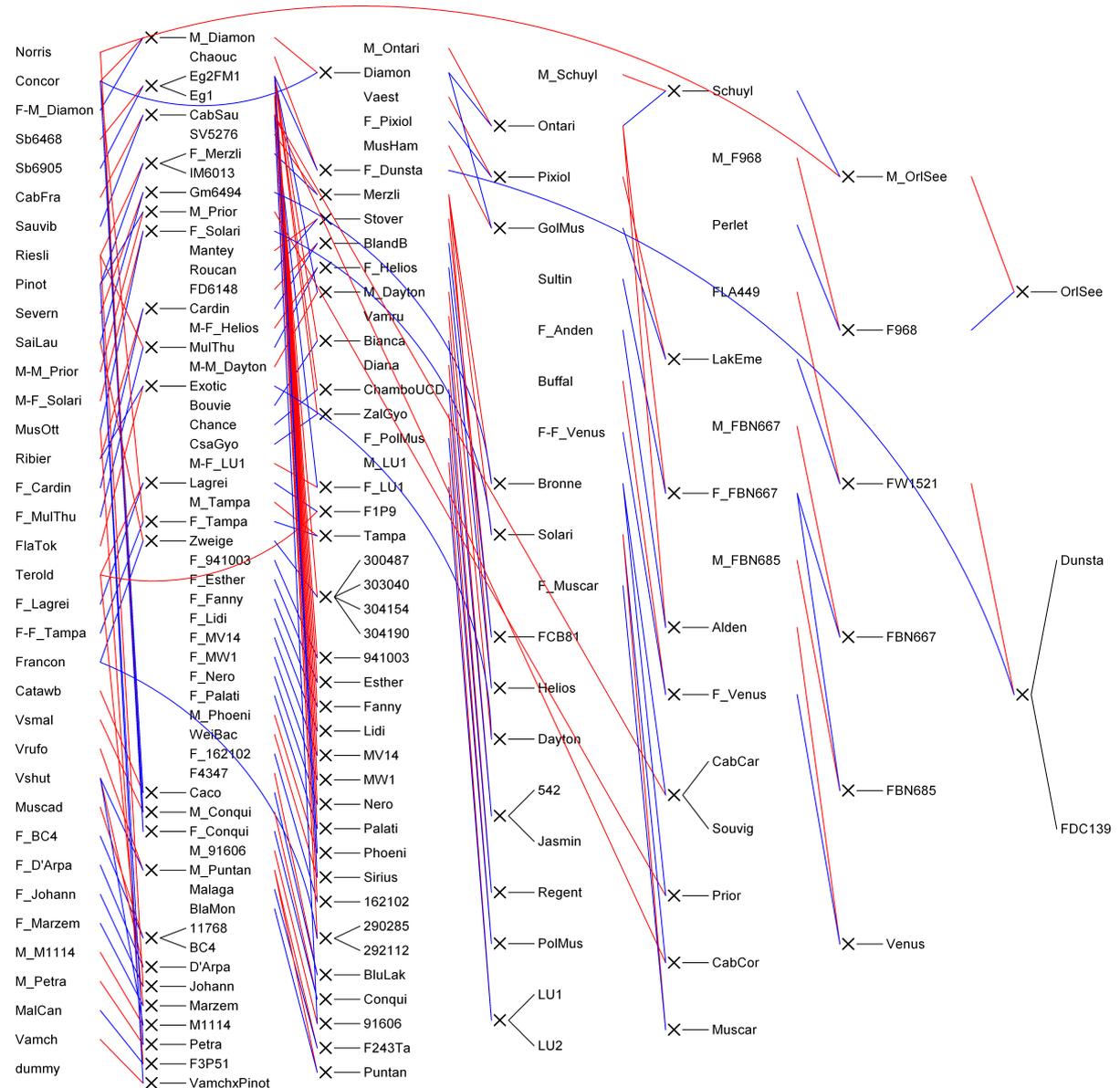


Phoenix



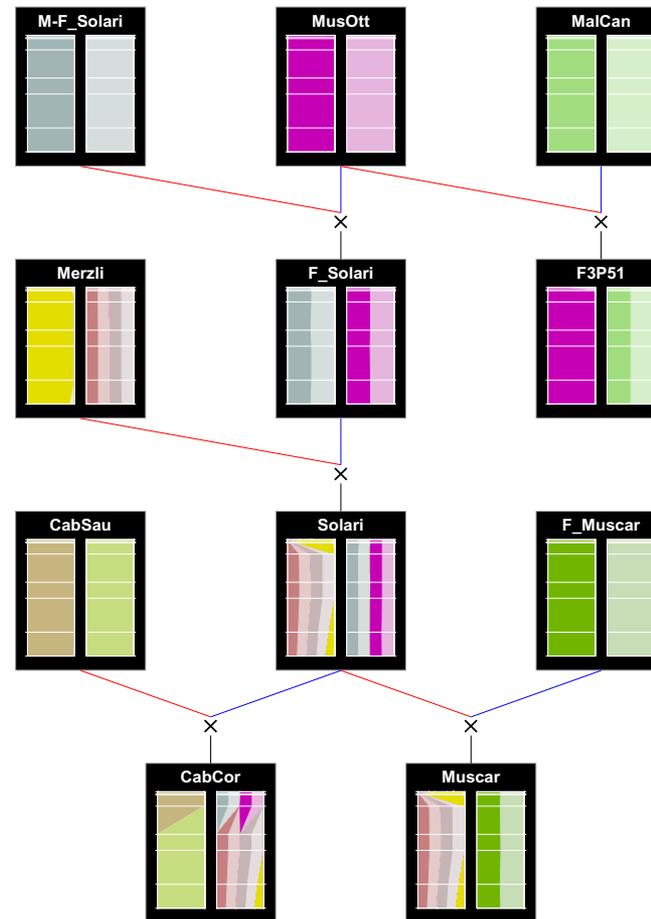
Pedigree based analysis PBA

- migliore combinazione allelica
- Breeding value
- Diverse origini di resistenza
- Incremento dell'efficienza di breeding

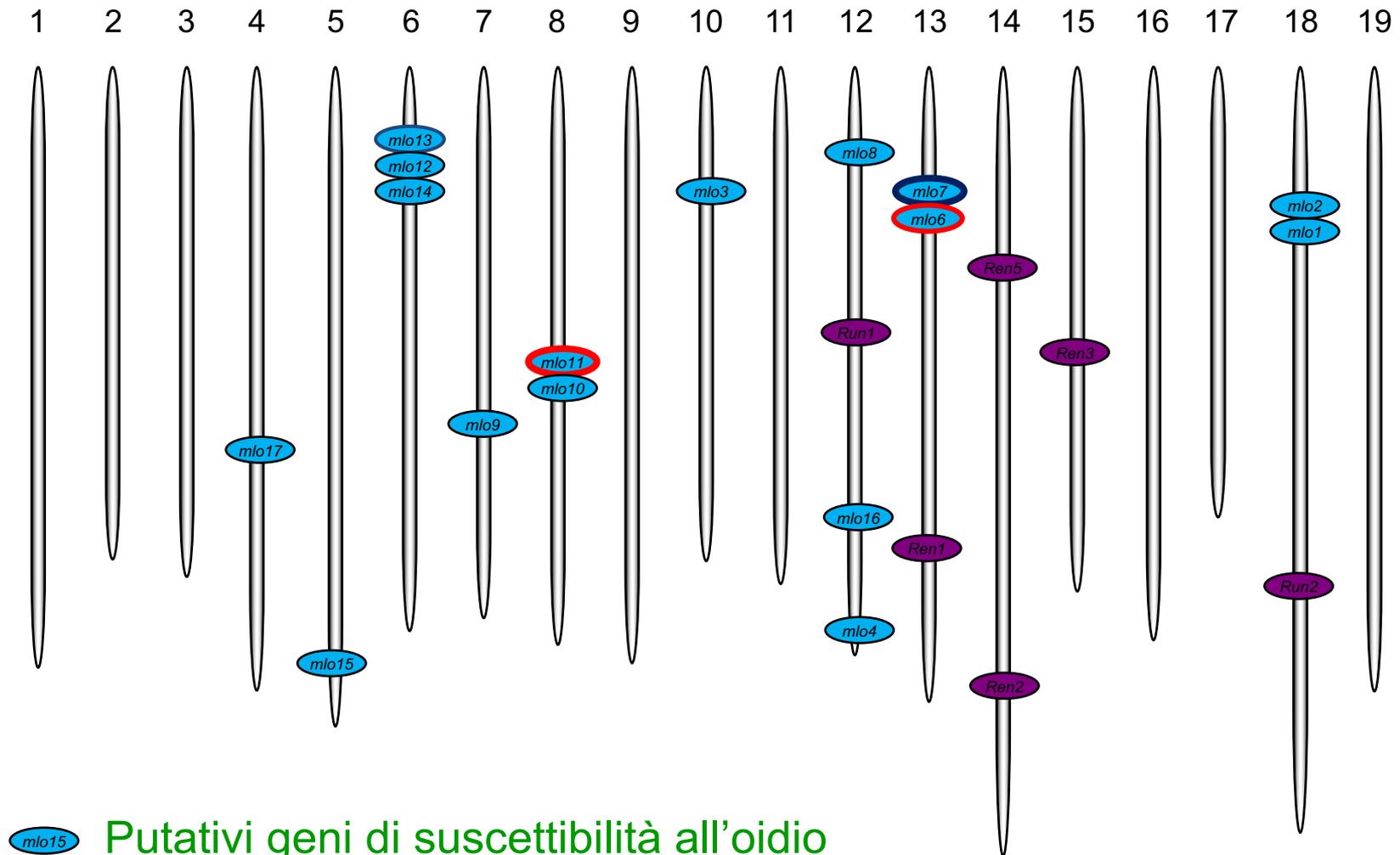




***PBA, Pedigree
Based Analysis:
Identification of
the chromosomal
interval which
associate with the
Vitis species***



Dal genoma della vite: identificazione di possibili geni di suscettibilità

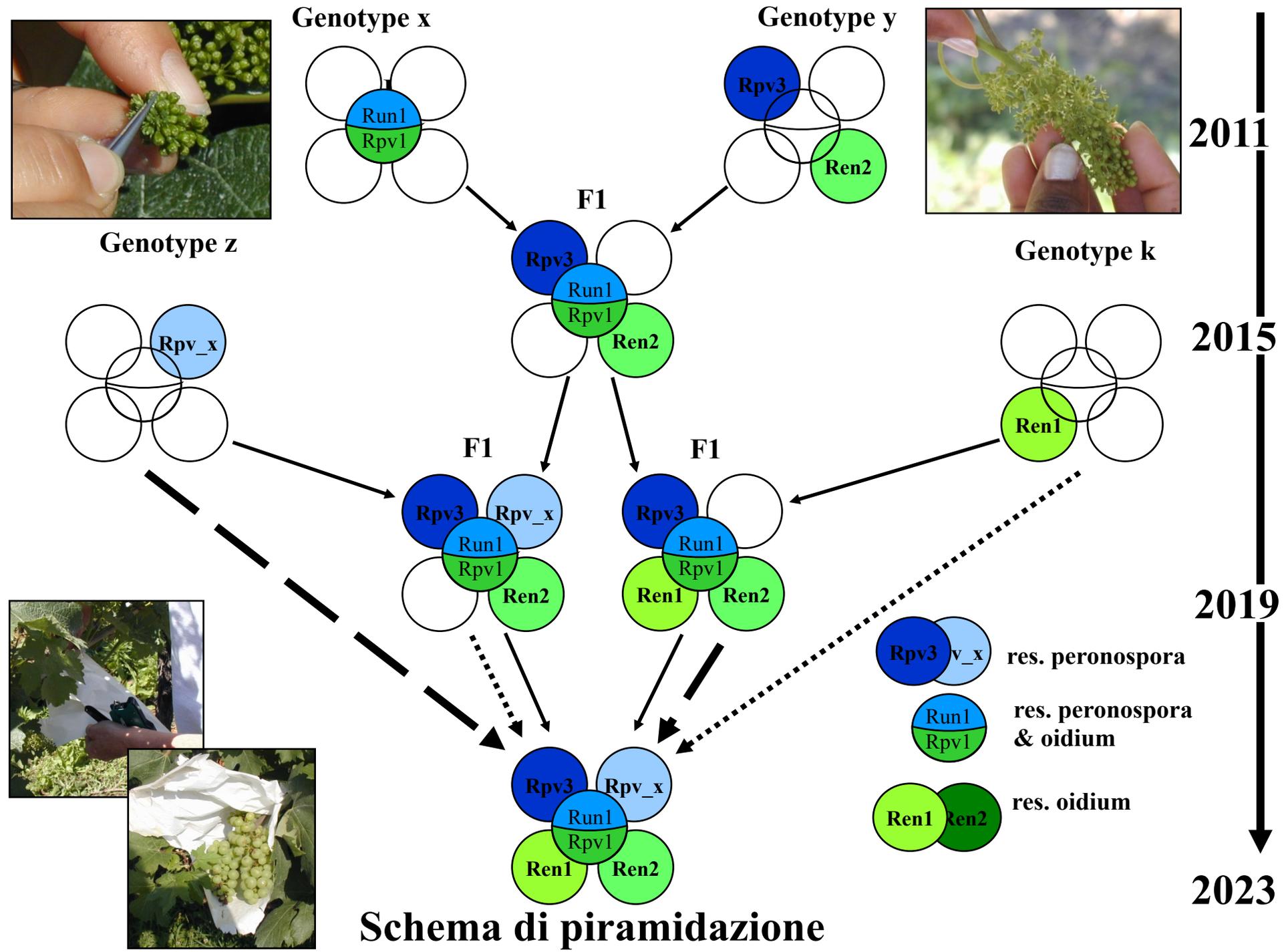


 Putativi geni di suscettibilità all'oidio

 Geni di resistenza alla peronospora e oidio già identificati

Resistenze a peronospora e oidio (x incrocio convenzionale alla F. Mach)

<i>Genotipi con diversi gradi di resistenza</i>	200
Piantine sottoposte a screening (2009-11)	14.000
Piantine sottoposte a screening (2011-13)	18.000
Grappoli per piramidazione (2014)	98
Grappoli nuove resistenze (2014)	223
Grappoli per incroci per nuovi caratteri (2014)	59
Grappoli per uve da tavola (2014)	46
...2015	
...2016	
...2017	

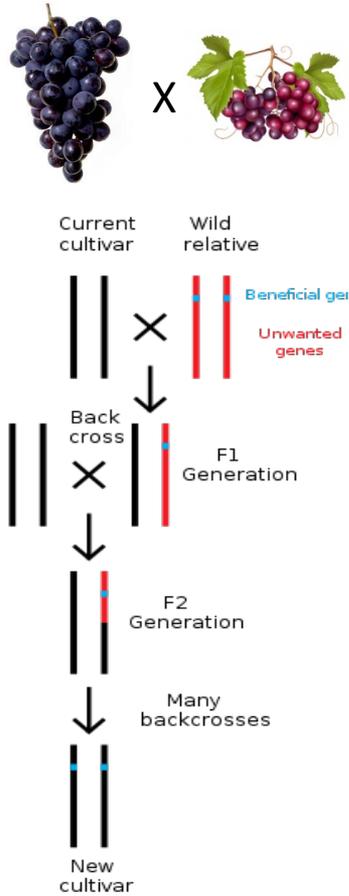




***Modificare le varietà esistenti:
È possibile senza produrre OGM?***



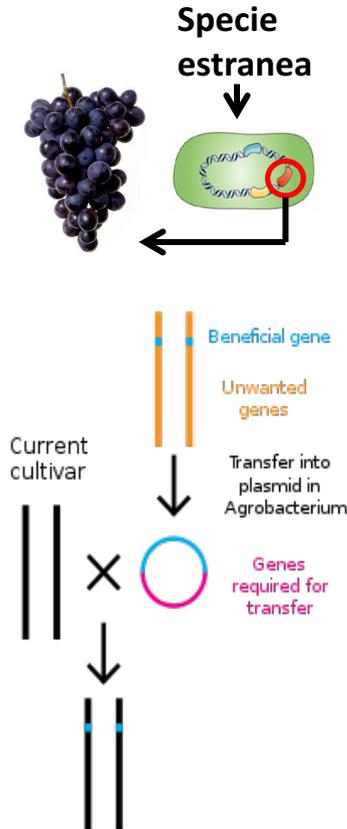
Incrocio Convenzionale



12-15 anni

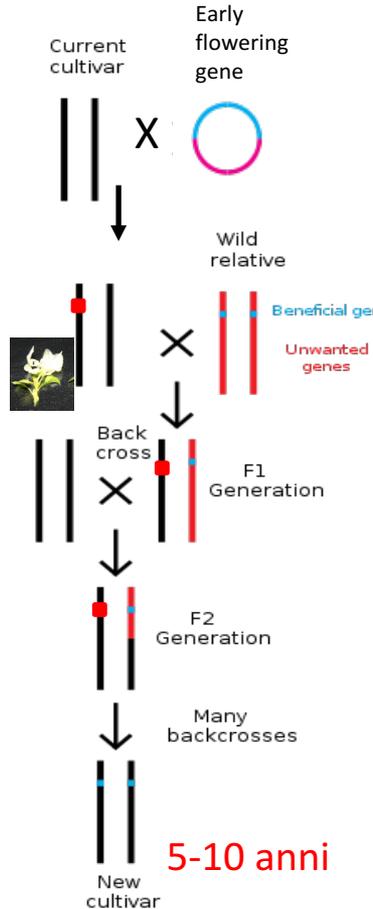
Modifica Genetica

Trangenesi



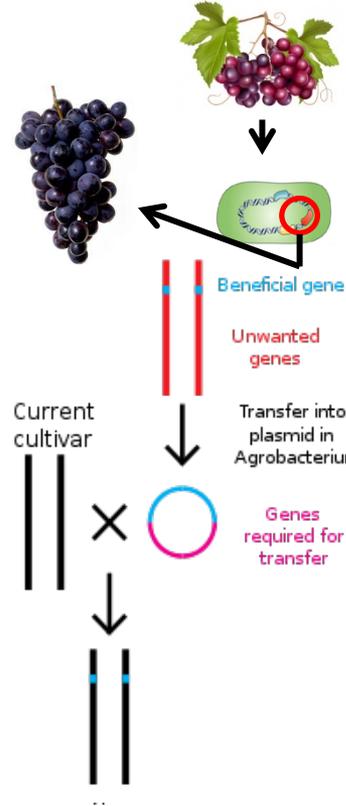
3 anni

Fast Breeding (processo transgenico)



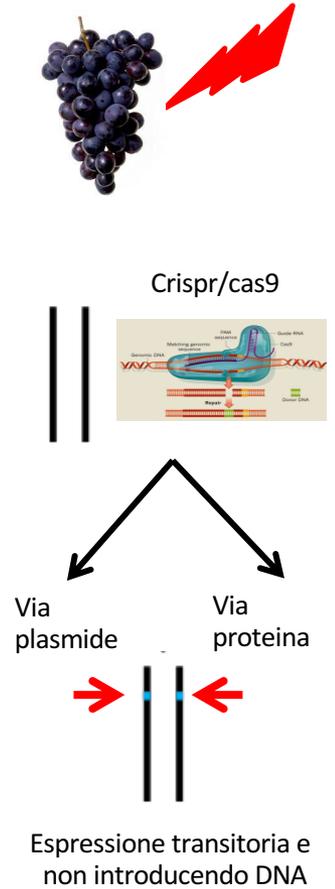
5-10 anni

Cisgenesis

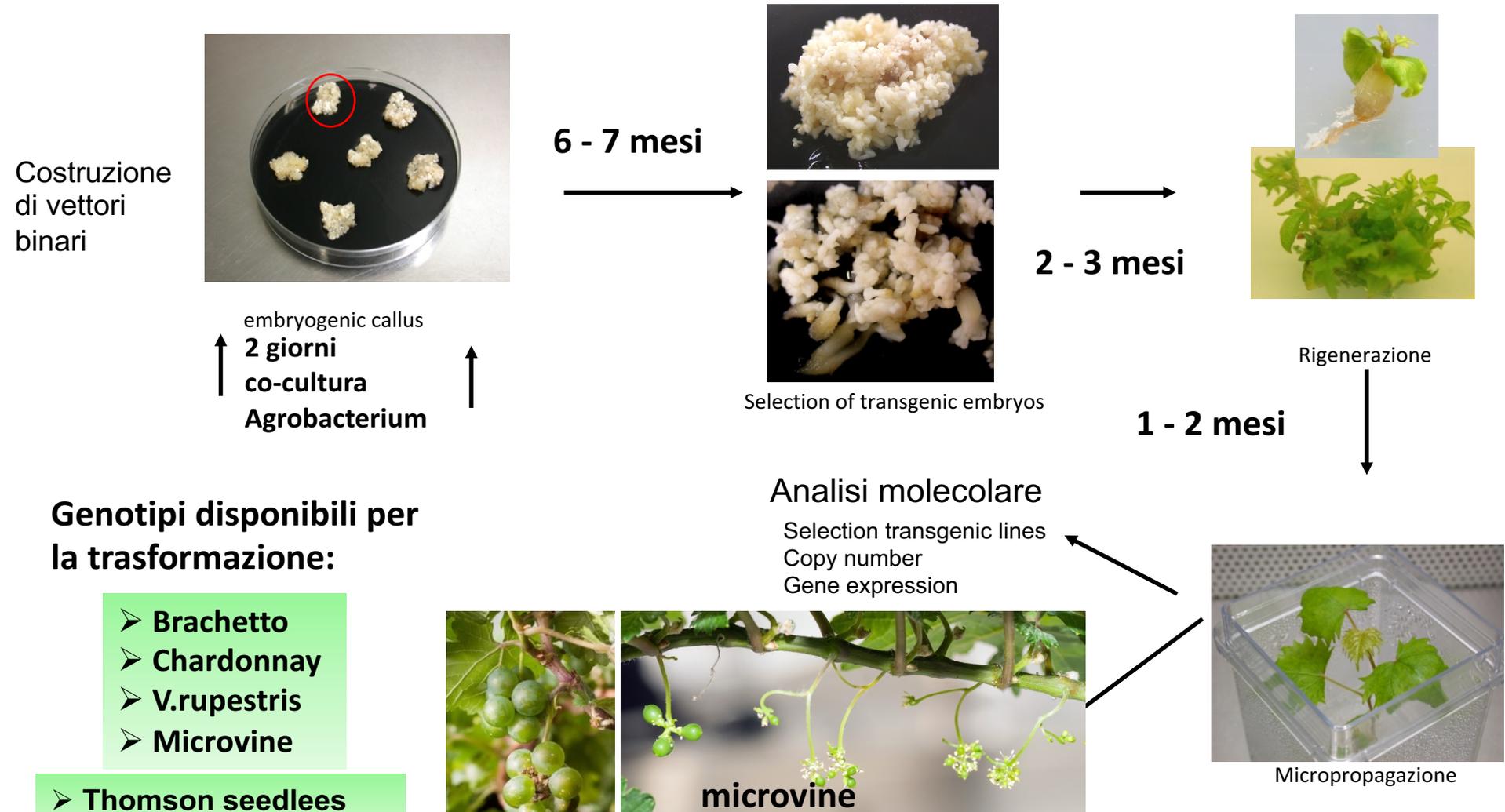


3 anni

Genome Editing (mutagenesi)



3 anni





Riguardo agli organismi geneticamente modificati la Direttiva 2001/18/EC recita all'articolo 2:

«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.

...



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 (non-sessualmente compatibili).

.....

Allegato I B

TECNICHE DI CUI ALL'ARTICOLO 3

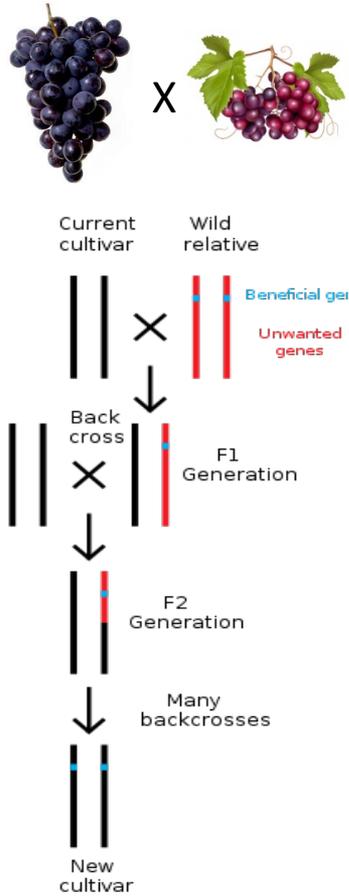
Le tecniche o i metodi di modificazione genetica che implicano l'esclusione degli organismi dal campo di applicazione della presente direttiva, a condizione che non comportino l'impiego di molecole di acido nucleico ricombinante o di organismi geneticamente modificati diversi da quelli prodotti mediante 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 (sessualmente compatibili).

Sono OGM

NON-Sono OGM

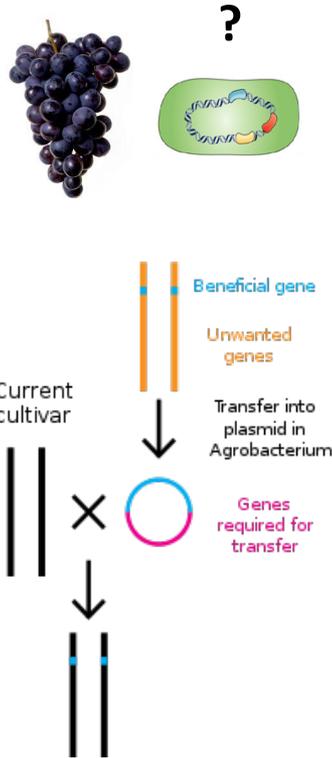
Incrocio Convenzionale



Modifica Genetica

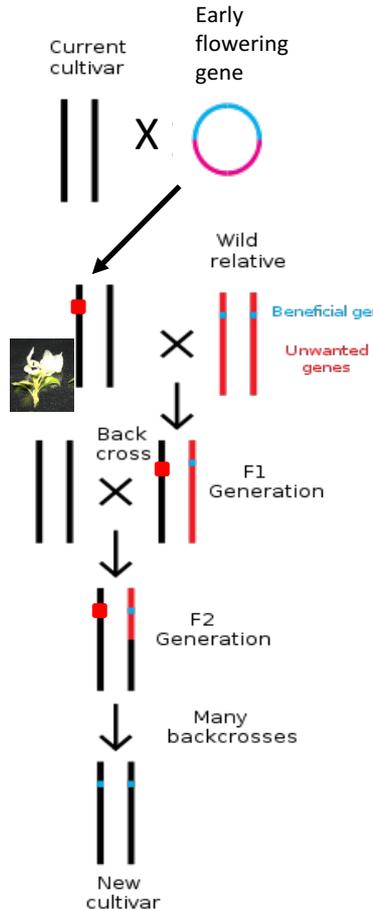
OGM

Trangenesi



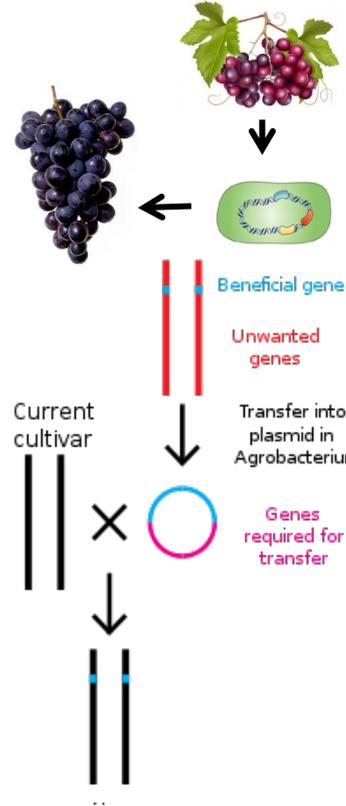
OGM

Fast Breeding (processo transgenico)



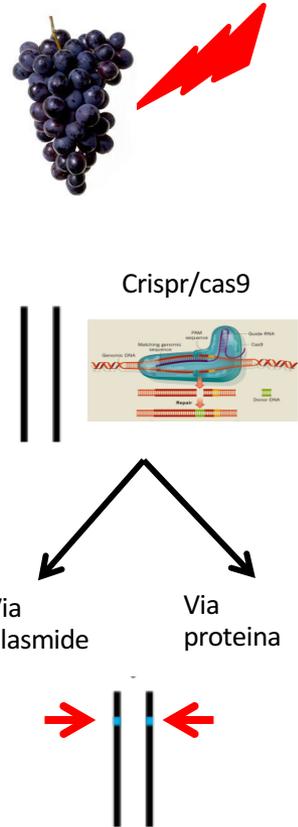
OGM(?)

Cisgenesis



EU 18/2001: Mutagenesi Non è OGM

Genome Editing Non OGM (?)

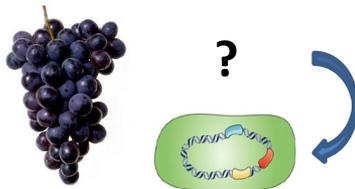




In base all'origine del DNA che può essere trasferito si distinguono però diversi prodotti:

- **DNA transgenico**, quando il DNA trasferito appartiene a una specie che **non può** essere **incrociata** (sessualmente incompatibile) con l'organismo ricevente;

transgenesi



cisgenesi



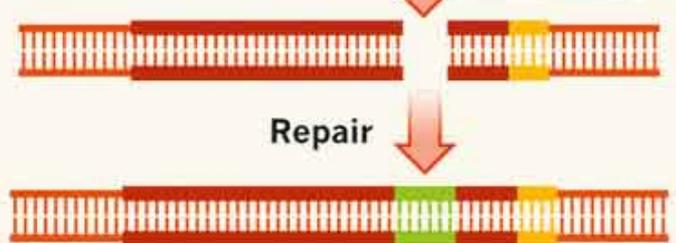
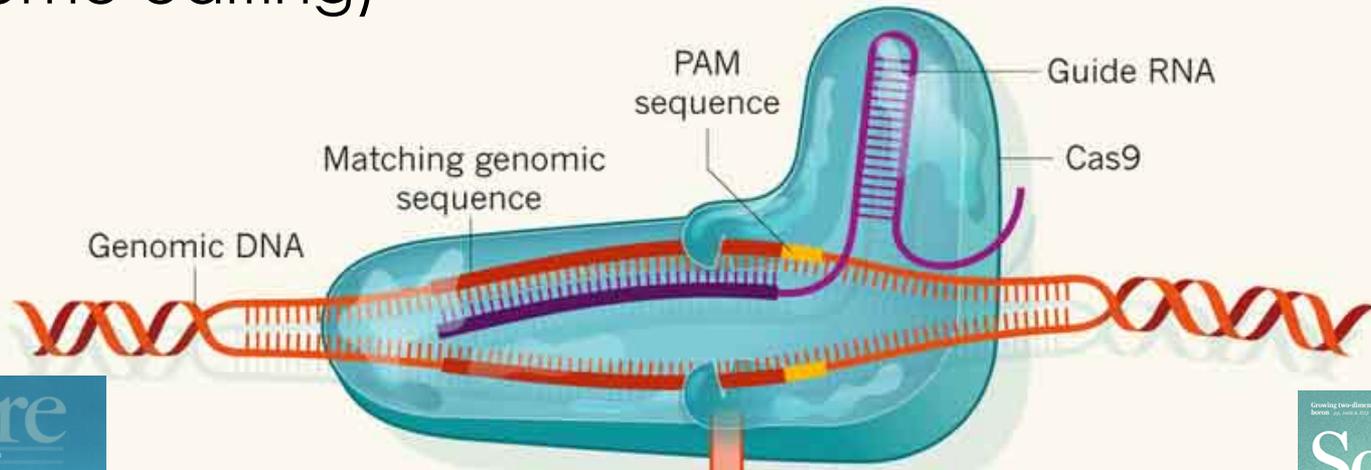
- **DNA cisgenico**, quando **tutta la sequenza del DNA** appartiene alla specie ricevente o ad una affine sessualmente, **sia nella sequenza codificante che in quella regolatrice**.



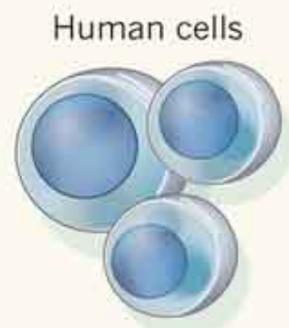
Il genome editing: le tre vie



La proteina CRISPR/Cas9: la rivoluzione biotecnologica (genome editing)



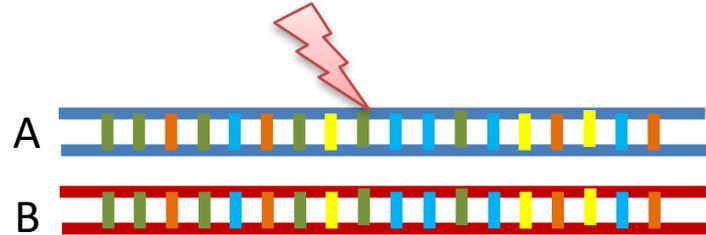
Targeted genome editing



Meccanismi di riparazione del DNA **naturalmente** presenti nella cellula

Stimolo esterno

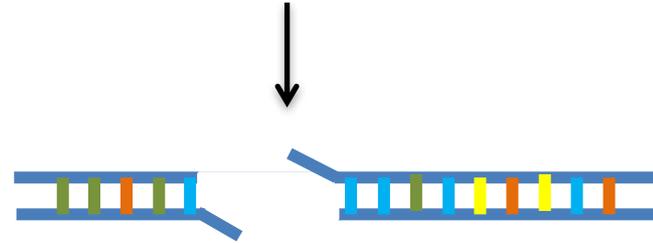
Radiazioni ionizzanti



Stimolo interno

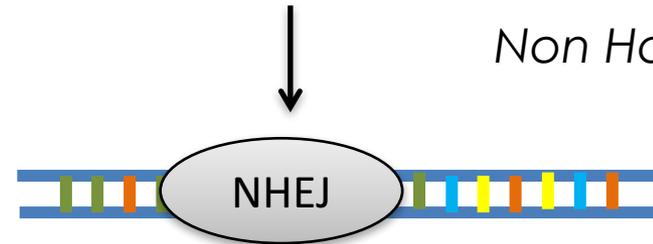
Stress nei cromosomi,
Replicazione del DNA,
DNA crossing over,
Radicali liberi dell'O₂

Double Strand Break
Rottura del doppio filamento
(DSB)

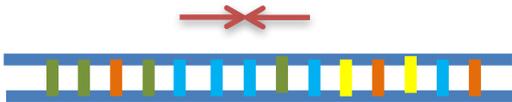


Non Homologous End Joining

DNA riparazione
(error prone)

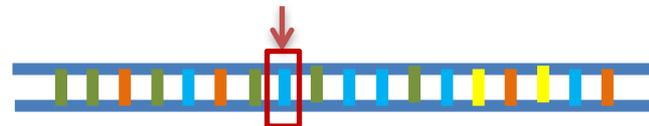


Delezione



Mutagenesi

Mutazione
puntiforme

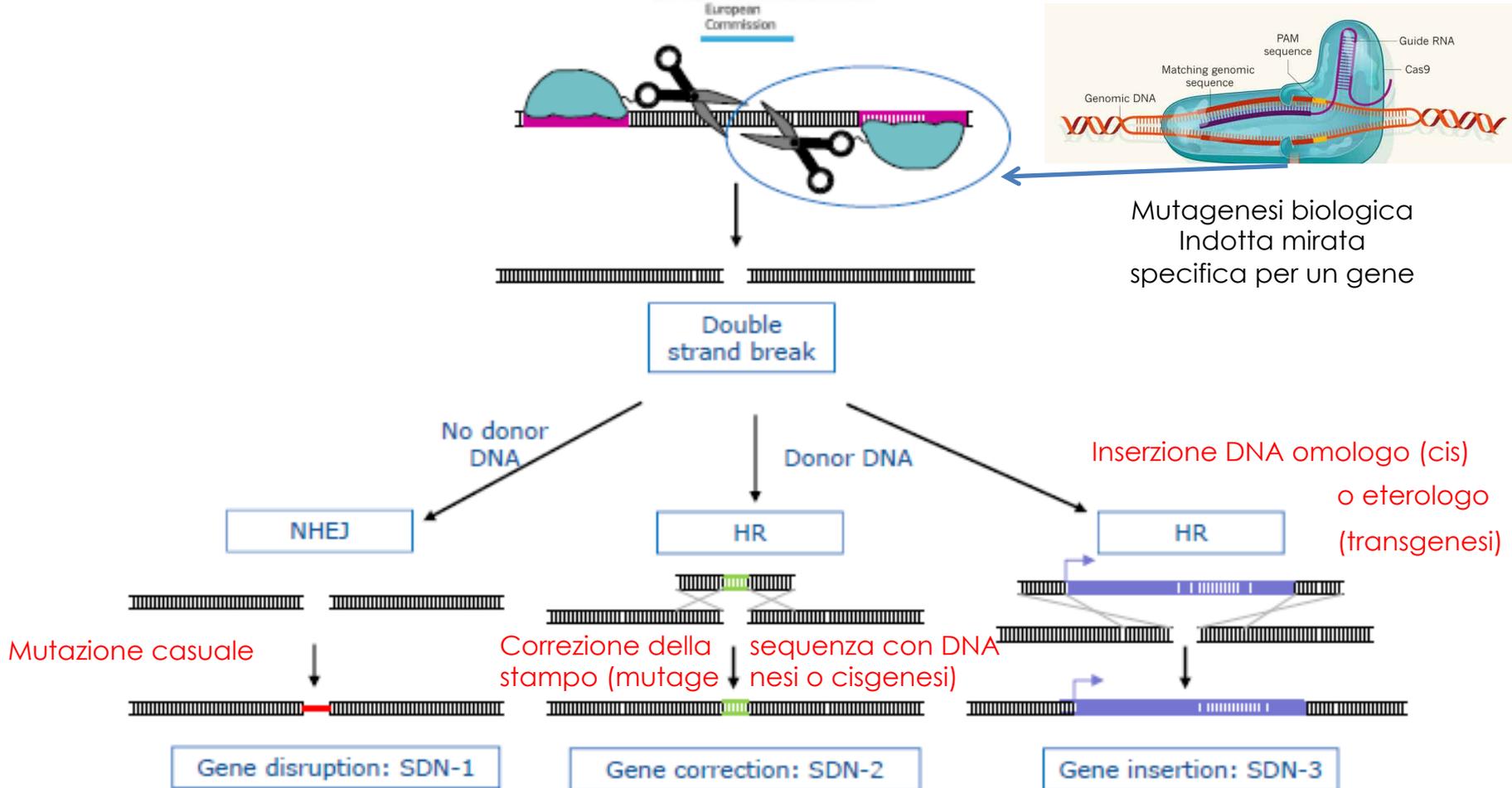


Mutagenesi

Inserzione



Transgenesi o cisgenesi



Ingegnerizzando il genoma, è possibile prima determinare la sequenza del DNA e la modifica desiderata nella varietà coltivata e poi introdurre la variante genetica nel sito desiderato precisamente e rapidamente.



Mutagenesi fisica, chimica e ...biologica





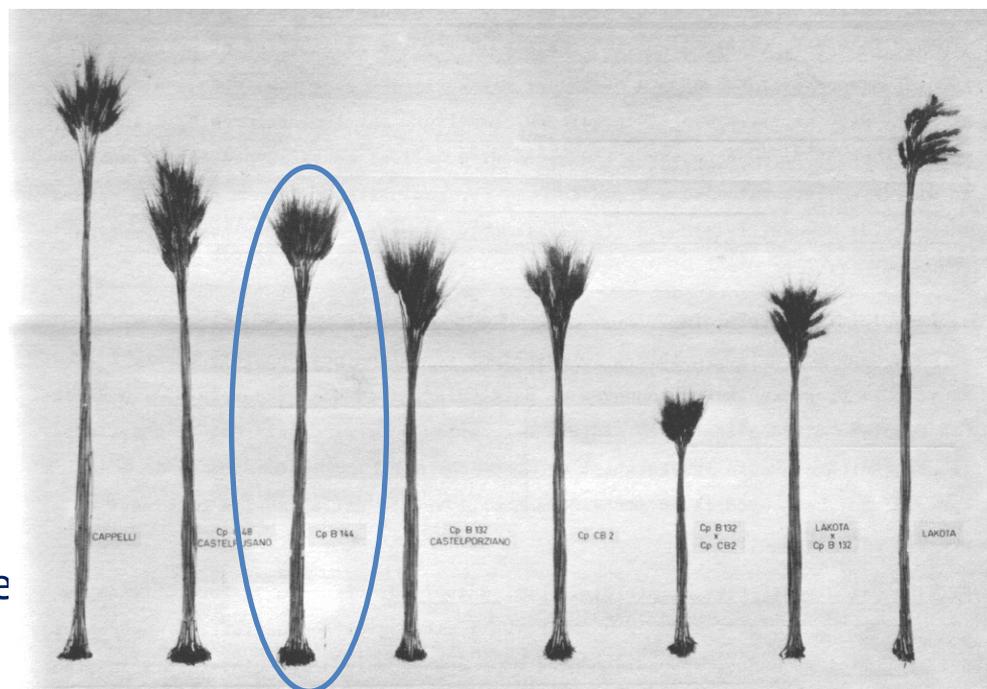
Mutagenesi chimica o fisica

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.

Questo incremento è in parte fondato sull'utilizzo di **mutageni chimici e fisici (raggio ionizzanti)** ed il conseguente incremento della variabilità genetica (biodiversità)

Alcuni importanti mutanti di frumento duro prodotti in Italia mediante mutagenesi con **radiazioni ionizzanti**.

Il **CP B144** è stato utilizzato per ottenere il **Creso** (fonte ENEA)





Varietà mutate ottenute in numerose specie di uso agricolo: il CRESO

Il **CRESO** proviene dall'incrocio di un frumento duro del CIMMYT con una linea mutante (**Cp B144**) indotta da una **irradiazione combinata di neutroni e raggi gamma** nel frumento duro Cappelli, entrambi a paglia corta, e ottenuto da Alessandro Bozzini e Carlo Mosconi all'interno del gruppo di genetisti del Centro della Casaccia dell'ENEA (Bagnara, D'Amato, Rossi, Scarascia Mugnozza ed altri).

La sua principale caratteristica è quella di avere una taglia ridotta (70-80 centimetri) rispetto ai frumenti duri esistenti all'epoca (130-150 cm), che ha reso la cultivar molto resistente all'allettamento.

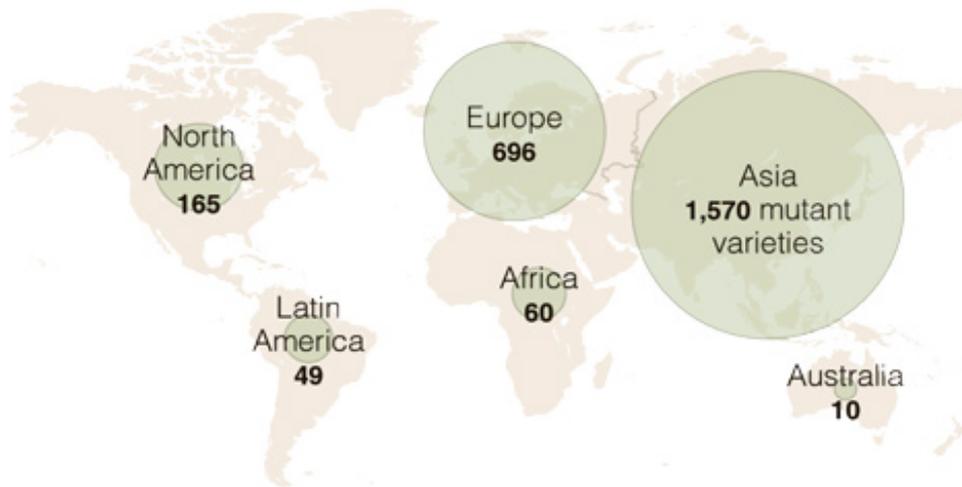
Iscritto al registro delle varietà nel 1974, **CRESO** ebbe immediata e ampia diffusione e negli anni '80 e '90 ha rappresentato oltre il 50% della produzione di frumento duro in Italia

È stato utilizzato ampiamente in tutto in programmi di miglioramento genetico in tutto il mondo dalla Cina all'Australia, all'Argentina, agli USA, al Canada e presso i grandi Centri di Ricerca Internazionali (CIMMYT, ICARDA, CSIRO, ecc.)

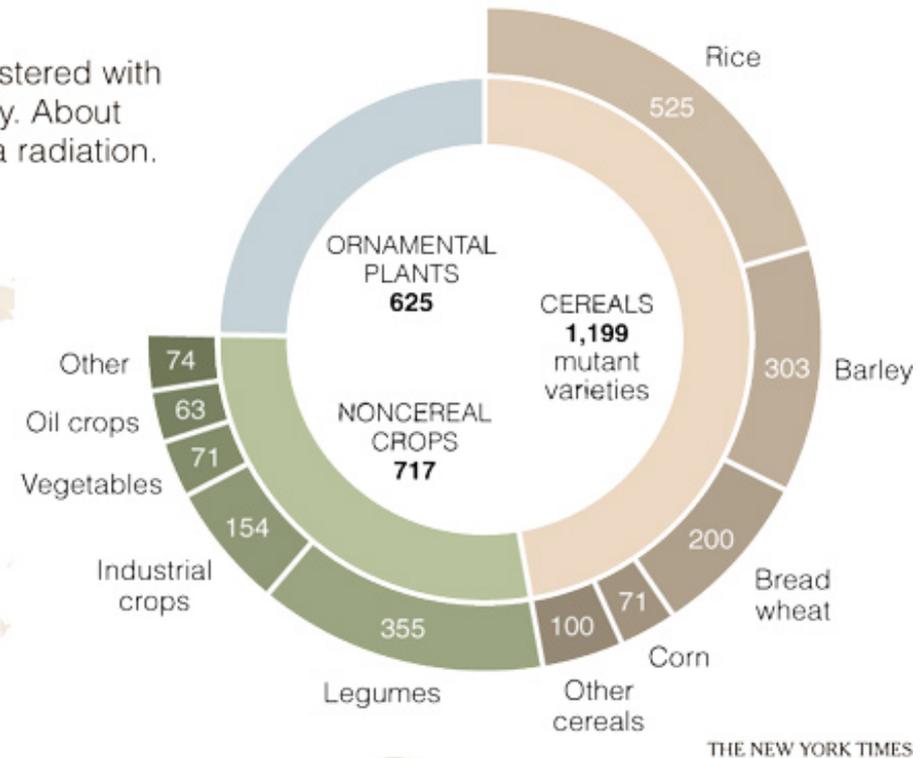
Varietà mutate ottenute in numerose specie di uso agricolo: **2500 varietà coltivate di cereali, industriali e ornamentali**

Here to Stay

More than 2,500 mutant crop varieties have been officially registered with the United Nations and the International Atomic Energy Agency. About three-quarters of the varieties were directly induced by gamma radiation.



Source: F.A.O./I.A.E.A. Mutant Variety Database



Il pompelmo rosa
È un agrume ottenuto per mutagenesi





Resistenza vs. suscettibilità



L'approccio empirico. Oidio

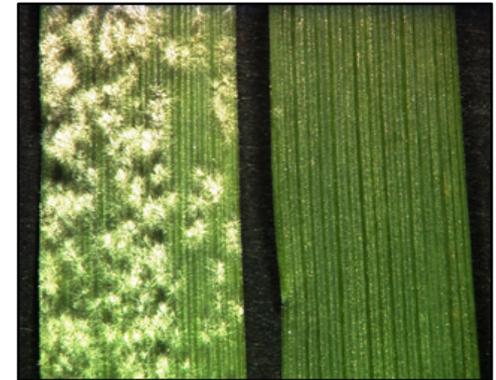
Nella seconda metà del 1800 compaiono nel Trentino nuove e gravi malattie della Vite: fillossera, peronospora e oidio. L'attacco di oidio fu particolarmente grave, tanto che nel 1859 minacciava la sopravvivenza della coltura. Un giardiniere francese già nel 1852 aveva osservato che trattando le foglie con zolfo si controllava la diffusione dell'oidio. Una **soluzione empirica** ma efficace: nasceva così la fitoiatria. Ludwig Von Comini si prodigò per introdurre in Trentino la sulfurazione, superando, in questo, l'opposizione contadina.



Resistenza e suscettibilità. Oidio in orzo

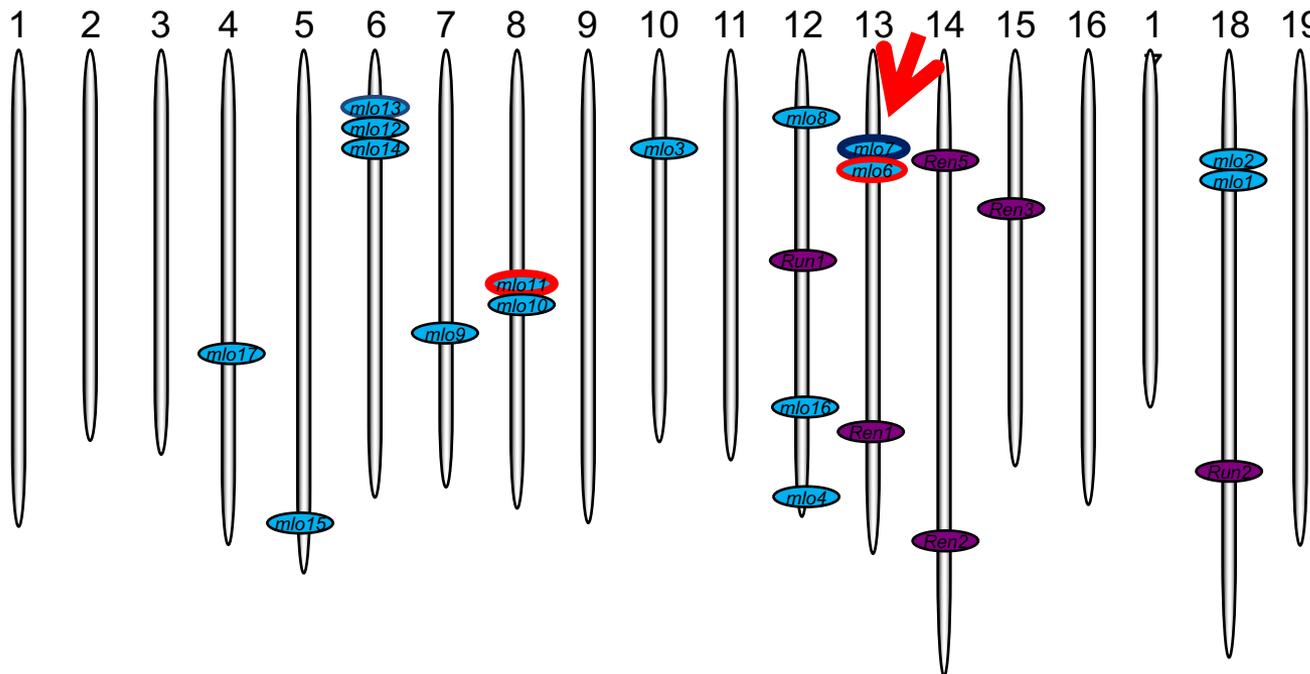
Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G.,
 Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T.,
 Diergaarde, P., Gronendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F.,
 Schulze-Lefert, P. (1997)

The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant
 pathogen resistance. Cell 88: 695-705



Orzo *Mlo* vs. *mlo*

Mlo gene family in grapevine – distribution along the 19 chromosomes



Brachetto vite suscettibile

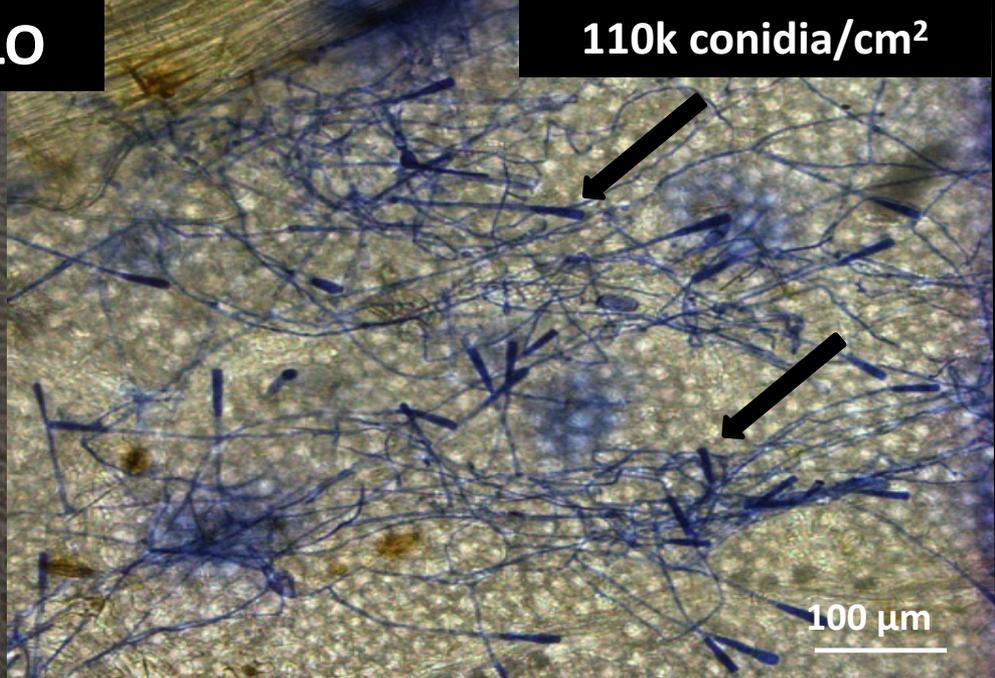


Brachetto-*mlo07* mutato

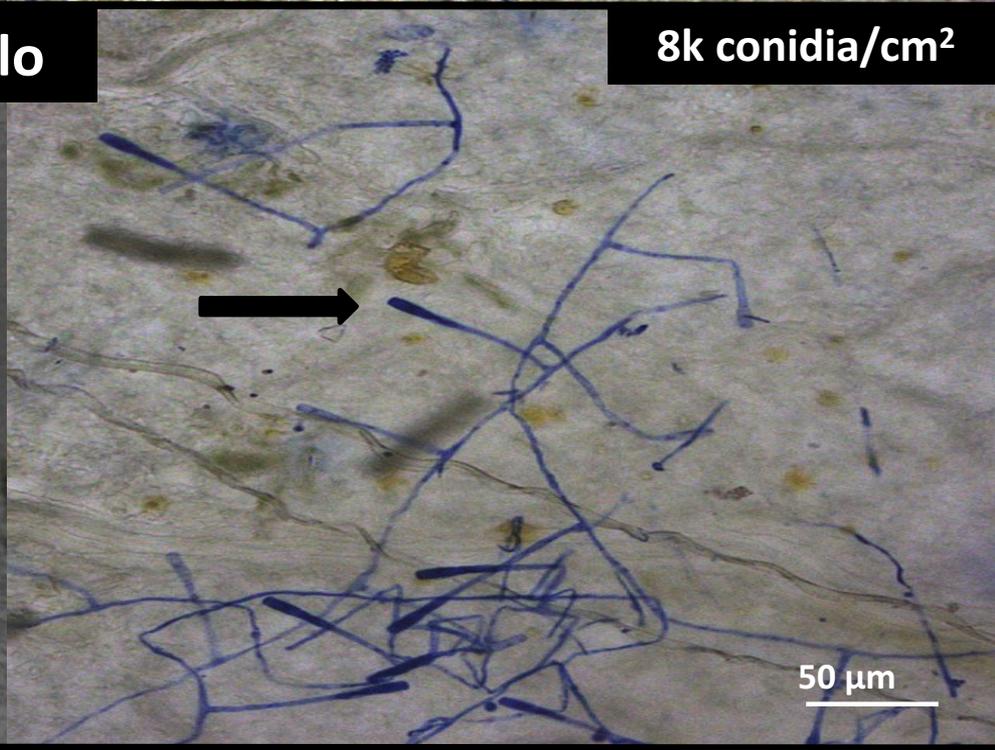
Geni *mlo*-like in vite, esiste funzione simile come in orzo?



MLO

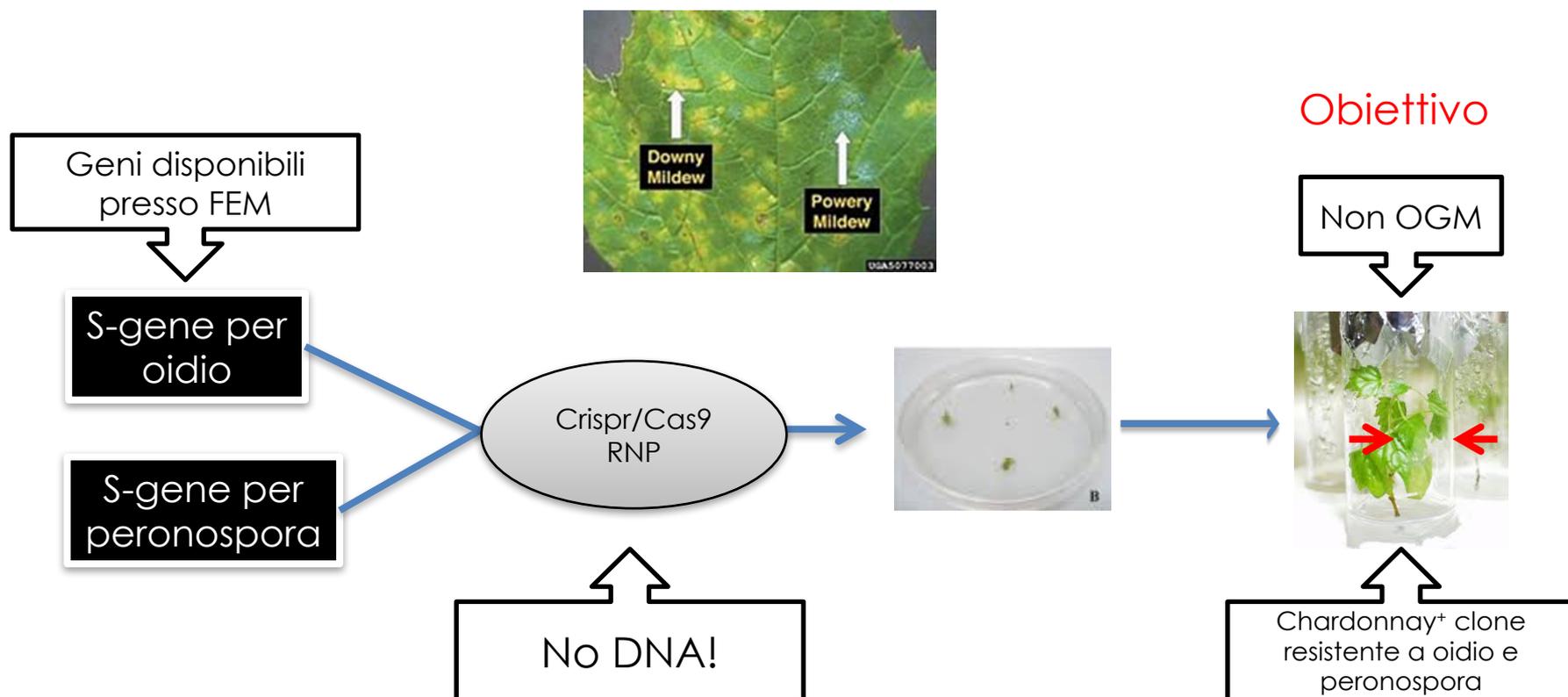


mlo



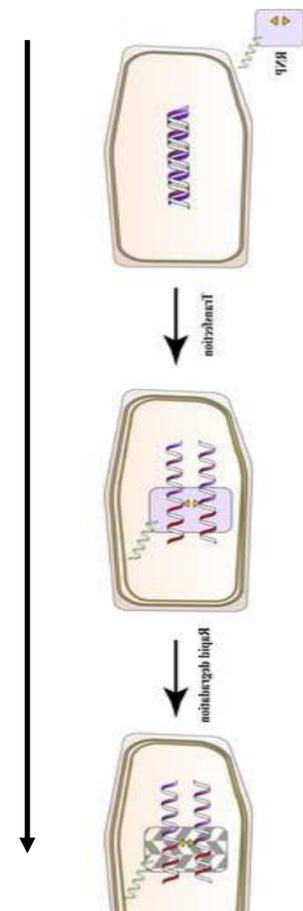
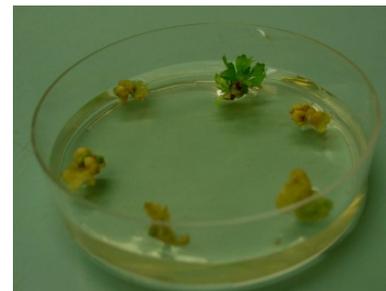
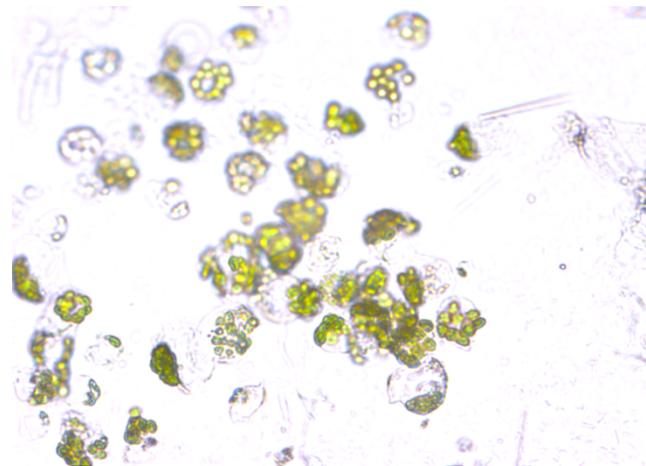
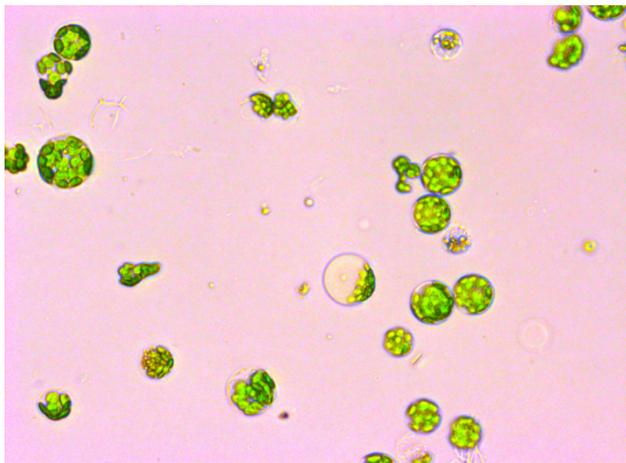
Progetto Chardonnay⁺ (con due ditte private)

- 76.000 tonnellate di fungicidi sono usati annualmente in vite in Europa
- 53.000 tonnellate (76%) per una spesa di circa €164m per anno.
- Nonostante i trattamenti diffusi si ha comunque una perdita del 2% di prodotto in Europa per anno (300M €)





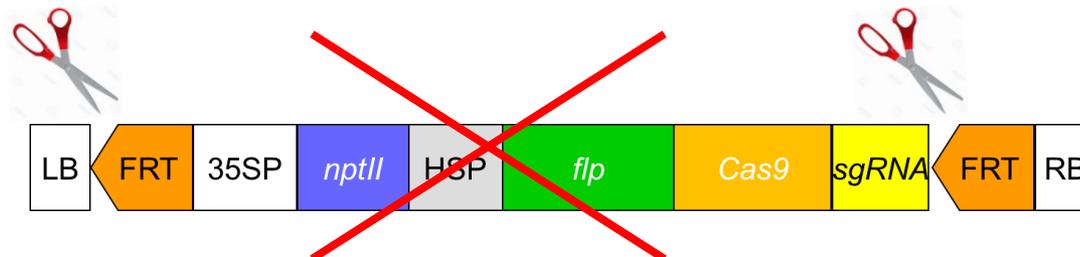
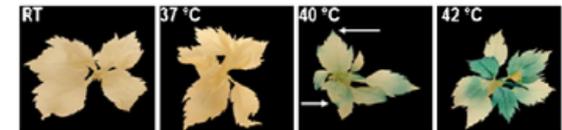
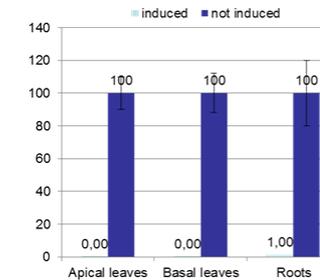
RNA guide + Cas9
endonuclease protein





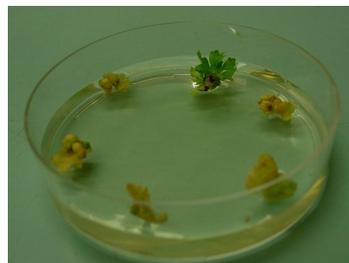
Vector = pB-Npt-Hsp-Flp-Gus (Herzog et al. 2012, Gene 498:41-49)

TOTAL REMOVAL OF *NPTII* FROM THE PLANT TISSUES ALSO IN THE PROPAGATED MATERIAL (Dalla Costa et al. 2016, PCTOC 124:471-481)



knock-out of pathogen susceptibility genes followed by CRISPR-Cas9 excision

Kanamycin
selection





Perchè è necessario oggi un adeguamento della 18/2001

NON ricadono nella definizione vigente di OGM:

- Piante dove è stato eliminato il DNA transgenico (ma rimane solo il DNA cis-genico)
- Piante dove è stato eliminato il transgene CRISPR/Cas9 per realizzare il genome editing (ma resta il DNA editato) o è stato utilizzato in forma transiente
- Piante dove è stato eliminato il gene «early flowering» (senza che nessuna traccia di DNA transgenico sia identificabile perchè non c'è)
- Piante dove non è stato inserito alcun DNA esogeno ma si è editato il DNA già presente nel patrimonio genetico della pianta

Dal Corriere Imprese del 16/11/2015 in una intervista al Ministro Martina sulle nuove tecnologie (NBT) il Presidente della Coldiretti Emilia Romagna Mario Tonello dichiara: “La Coldiretti è sempre stata contro gli OGM come tecnologia ingegneristica che porta all’omologazione dei prodotti di qualità....
...Siamo favorevoli allo sviluppo del Genome Editing e della cis-genesi che non hanno niente a che fare con l’ingegneria transgenica. È chiaro che anche per queste nuove tecnologie occorre un approccio di precauzione...”

The Swedish Board of Agriculture the 17th of November 2015 dichiara quale primo organismo europeo:

“ CRISPR-Cas9 mutants **don’t fall under** the European GMO definition...”

Alla **Svezia** hanno dato seguito nel 2016-17 poi la **Germania, l’Olanda, le Fiandre, la Spagna...**



BIOTECHNOLOGY

Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation

A fungus engineered using CRISPR-Cas9 can be cultivated without oversight.

BY EMILY WALTZ

The US Department of Agriculture (USDA) will not regulate a mushroom that has been genetically modified with the gene-editing tool CRISPR-Cas9, the agency has confirmed. The long-awaited decision means that the mushroom can be cultivated and sold without passing through the agency's regulatory process — making it the first CRISPR-edited organism to receive green light from the US government.

"The research community will be happy with the news," says Cairns, a biologist at the Chinese Academy of Agricultural Sciences Institute of Genetics and Developmental Biology in Beijing, who is involved in developing the mushroom. "I'm confident we'll see more CRISPR-edited crops coming outside of regulatory oversight."

Yinong Li, a plant pathologist at Pennsylvania State University (Penn State) in University Park, engineered the fungus — the common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) — to resist browning. The effect is achieved by targeting the family of genes that encodes polyphenol oxidase (PPO), an enzyme that causes browning. By deleting just a handful of genes in the mushroom's genome,



The common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) has been modified to resist browning.

IN FOCUS NEWS

Primi champignons editati in commercio

Primo mais editato in commercio

CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation

In an effort to catch up with technology, the **White House** has ordered the USDA, the FDA and the EPA to update the system, known as the Coordinated Framework for the Regulation of Biotechnology (*Nat. Biotechnol.* 33, 1221–1222, 2015).

The agencies enlisted help from a committee convened by the US National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. The committee will attempt to predict **“the likely future products of biotech over the next 5–10 years”**



Si ringraziano:

Marco Stefanini

Silvia Vezzulli

Roberto Viola

Mickael Malnoy

Stefano Pessina

***e i molti amici della F. Mach,
Geilweilerhof (D), Pecs(H), UniUD,...***

