

Genotipi resistenti allo stress idrico tramite le nuove tecnologie di miglioramento genetico

Leila Caramanico, Gabriella De Lorenzis, Osvaldo Failla, Lucio Brancadoro, Attilio Scienza

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione, Territorio e Agroenergia (DISAA), via Celoria 2, 20133, Milano, Italia

Introduzione

La viticoltura italiana ha origini molto antiche, risalenti al 4000 a.C. e al primo vino siciliano. Dapprima si diffuse nel Meridione - tanto che l'area oggi occupata dalla Calabria e dalla Basilicata era conosciuta come Enotria, ovvero Terra del Vino - poi nel resto della penisola italiana. Naturalmente nel corso del tempo il viticoltore ha dovuto fare i conti con il clima in cambiamento perpetuo al fine di selezionare e adattare la vite all'ambiente in cui crescere. Tuttavia, dal 1880 ad oggi si assiste ad un forte stravolgimento climatico che, secondo l'analisi dell'IPCC (Intergovernmental Panel On Climate Change), ha comportato un aumento della temperatura media di circa 0.8°C, destinato ad aumentare se non si interviene prontamente, fino alla desertificazione e alla degradazione del 90% della superficie terrestre nel 2050 (Joint Research Centre, JRC). L'individuazione di strategie di lungo termine, che migliorino l'adattamento e la resilienza della vite alle già mutate condizioni ambientali, è pertanto indispensabile. Tra queste, la selezione di nuovi portinnesti e di varietà resistenti allo stress idrico, tramite l'utilizzo dell'ingegneria genetica sta assumendo un ruolo sempre più determinante.

Attualmente la metodologia più avanzata deriva dallo studio dei CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*): brevi sequenze di DNA, identiche e ripetute nel genoma dei batteri e degli archei, rinvenibili nei virus. Tali sequenze permettono al batterio di riconoscere e distruggere il genoma virale, simile a quello che ha originato le CRISPR, come meccanismo di difesa immunitaria. Sulla base di questo approccio è stata sviluppata la tecnica CRISPR/Cas9 che consente di *editare* il *genoma* di un organismo, introducendo o eliminando geni dal suo DNA, in maniera efficace e puntuale, senza modificare il restante assetto genetico (es. la qualità delle uve, la produzione ecc). Essa si basa sull'introduzione di una gRNA (RNA guida), di circa 20 paia di basi nucleotidiche, complementare al gene di interesse, che, quando si lega ad esso, ne determina il taglio da parte dell'enzima endonucleasi (Cas9). Una volta tagliato, il DNA viene "ricucito" dai meccanismi di riparazione cellulari e risulta quindi mutato (Doudna and Charpentier, 2014)

Il gruppo di ricerca di viticoltura dell'Università degli Studi di Milano sta portando avanti un progetto di miglioramento genetico delle varietà, tra cui il Sangiovese, e dei portinnesti di vite per la resistenza allo stress idrico, utilizzando la tecnica CRISPR/Cas9, prendendo a modello il portinnesto M4 che è resistente allo stress idrico (Meggio et al., 2014). Quest'ultimo, insieme ad altri tre della "serie M" (M1, M2, M3), è il risultato di un'intensa attività di breeding, condotta dal gruppo di ricerca del DiSAA (UNIMI), che ha avuto inizio negli anni '80 ed è culminata nell'iscrizione dei quattro portinnesti-M nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite,

successivamente validati e caratterizzati verso lo stress idrico, salino e verso il calcare nell'ambito del progetto AgerSERRES. Da uno studio sul portinnesto M4 resistente alla carenza idrica, sono stati identificati dei geni, fattori putativi della resistenza. Tra questi, 4 geni della famiglia delle stilbene sintasi sono risultati sovraespressi, determinando nelle radici di M4 una maggiore sintesi di resveratrolo, potente antiossidante che contrasta l'azione dei ROS (specie reattive dell'ossigeno), dannosi per il funzionamento cellulare (Corso et al., 2015). Sulla base di tali evidenze si è deciso di fare l'analisi funzionale dei suddetti geni: se il loro silenziamento renderà M4 più o meno suscettibile, si potrà attribuirgli un ruolo preponderante nella capacità del portinnesto di tollerare maggiormente lo stress idrico. La sovraespressione di questi geni in portainnesti di vite e nella cultivar Sangiovese ci permetterà di aver un sistema portainnesto-innesto resistente allo stress idrico.

Metodologia

Tale progetto prevede di lavorare simultaneamente su due fronti: quello delle colture *in vitro* e quello della biologia molecolare. Per il primo, sono stati testati dei protocolli di micropropagazione di vite e di ottenimento di calli da gemme (ovvero cellule indifferenziate e totipotenti da trasformare geneticamente e da cui rigenerare piante ingegnerizzate), testando diverse tipologie di fitoregolatori. Per il secondo aspetto, si è provveduto ad implementare la tecnica di CRISPR/Cas9 passando per l'estrazione del DNA del Sangiovese e di alcuni portainnesti di vite (come M4), l'amplificazione e il sequenziamento dei 4 geni di interesse. Sul sequenziato sono stati identificati i gRNAs e si sta procedendo alla realizzazione del vettore CRISPR per la trasformazione, la cui efficacia verrà testata in transiente, sulle foglie di piante di vite ottenute dal vitro.

Primi risultati

Propagazione in vitro. Testando diversi mezzi di propagazione *in vitro*, differenti per tipologia e concentrazione di nutrienti e di regolatori di crescita (ormoni), quali auxine e citochinine, si è riusciti ad identificare quello che più si adatta alla propagazione *in vitro* di Sangiovese ed M4. Le migliori performance di crescita e radicazione si sono ottenute propagando le microtalee di entrambi i genotipi per 10 giorni in un mezzo per la promozione delle radici a base MS (Murashige and Skoog), mezza forza, con l'aggiunta di IBA (acido indolbutirrico, 0.1 mg/l) e BAP (6-benzilaminopurina, 0.5 mg/l), e successivamente il trasferimento in un mezzo di propagazione *hormone-free*, a base MS per circa 3 mesi. Il Sangiovese ha avuto una velocità di allungamento del germoglio pari a 3.3 cm/mese, mentre le prime radici si sono sviluppate dopo circa 2 settimane dal trasferimento delle microtalee dal mezzo di radicazione a quello di propagazione (Figura 1). Il portainnesto M4 ha mostrato una velocità di accrescimento del germoglio più lenta rispetto a quella del Sangiovese, pari a 2.9 cm/mese, ma uno sviluppo radicale più veloce. Infatti, dopo sette giorni dal trasferimento delle microtalee dal mezzo di radicazione a quello di propagazione sono apparsi i primi abbozzi radicali.



Figura 1 Piante di Sangiovese propagate *in vitro* nel mezzo di crescita a base MS privo di ormoni, dopo essere state mantenute per 10 giorni nel mezzo di radicazione contenente IBA e BAP.

Embriogenesi somatica. Gli embrioni somatici sono stati ottenuti da gemme di viti Sangiovese e M4 cresciute *in vitro*. Le gemme, selezionate con l'aiuto di un microscopio, sono state suddivise in due categorie: "chiuse", provviste di perule, ed "aperte", di cui è stato prelevato il cono vegetativo. Le gemme, sia chiuse che aperte, sono state poste su due distinti mezzi di pro-embriogenesi: il primo (BI), contenente gli ormoni 2,4-D (acido 2,4-diclorofenossiacetico), NAA (acido naftalenacetico) e BAP (6-benzilaminopurina), in concentrazione pari a 5 mM; il secondo (NB2) composto da 2,4-D (5mM) e BAP (1mM). Dopo 60 giorni, intervallati da una subcoltura nel mezzo di partenza, i calli pro-embriogenici sono stati spostati in un unico mezzo di embriogenesi (GISCA), comprendente NOA (acido β -naftossiacetico) e BAP in concentrazione di 10 mM e 1 mM, rispettivamente. I parametri valutati sono stati: la percentuale di superficie dell'espianto trasformata in callo, il colore e la consistenza. Entrambi i genotipi esaminati, hanno presentato una buona attitudine a formare callo pro-embriogenico ed embriogenico. Le gemme chiuse hanno risposto più favorevolmente alla callogenesi rispetto alle gemme aperte, trasformandosi in tempi più rapidi e presentando una percentuale di superficie evoluta in callo maggiore. Inoltre, il mezzo BI è stato considerato più appropriato del mezzo NB2, per la più veloce induzione alla callogenesi e per la maggiore qualità dei calli formati (di color crema e compatti).

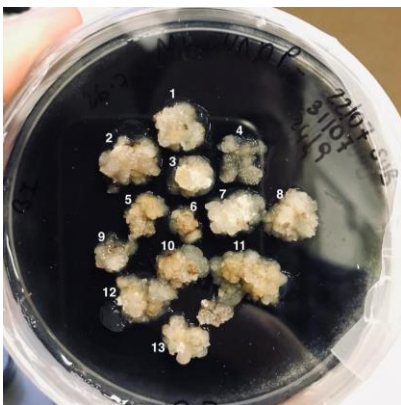


Figura 2 Calli embriogenici di Sangiovese nel mezzo (GISCA), derivati dal mezzo di pro-embriogenesi BI

Analisi delle stilbene sintasi. Le sequenze delle 4 stilbene sintasi (VvSTS 16, 18, 27 e 29) sono state ottenute tramite costruzione di primer specifici per ogni sequenza, amplificazione delle sequenze tramite PCR (Polymerase Chain Reaction), purificazione dei prodotti di PCR e sequenziamento degli amplificati tramite tecnologia Sanger. Le sequenze di Sangiovese e M4 sono state allineate ed hanno evidenziato un'omologia di

allineamento pari a circa il 90%, sulla base della sequenza nucleotidica. Confrontando la sequenza amminoacidica, la percentuale di omologia si aggira intorno al 95%. Le sequenze amminoacidiche che mostrano maggiore omologia tra Sangiovese e M4 sono quelle del gene VvSTS18 (99%), mentre quelle che sono risultate più differenti sono quelle del gene VvSTS27 (95%). La maggior parte dei polimorfismi erano di tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) e localizzati principalmente nelle regioni non codificanti. Sulla base di queste sequenze sono stati progettati i gRNA per il silenziamento dei geni delle stilbene sintasi.

Bibliografia

- Corso, M., Vannozzi, A., Maza, E., Vitulo, N., Meggio, F., Pitacco, A., Telatin, A., D'Angelo, M., Feltrin, E., Negri, A.S., Prinsi, B., Valle, G., Ramina, A., Bouzayen, M., Bonghi, C., Lucchin, M., 2015. Comprehensive transcript profiling of two grapevine rootstock genotypes contrasting in drought susceptibility links the phenylpropanoid pathway to enhanced tolerance. *J. Exp. Bot.* 66, 5739–5752. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv274>
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-.). 346. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Meggio, F., Prinsi, B., Negri, A.S., Simone Di Lorenzo, G., Lucchini, G., Pitacco, A., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M., Espen, L., 2014. Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 310–323. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12071>