fondazione banfi

VIII Edizione

SUMMER SCHOOL SANGUIS JOVIS

HERITAGE

Frontiera del valore tra terroir e storytelling

Il miglioramento genetico della vite e le applicazioni dell'RNAi

Prof. Gabriella De Lorenzis

Milano

gabriella.delorenzis@unimi.it

+39 02 50316565

DiSAA
DIPARTIMENTO di SCIENZE AGRARIE e AMBIENTALI

UNIVERSITAS STUDIORUM MEDIOLANENSIS

fondazione banfi
SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Il concetto di miglioramento genetico

Il miglioramento genetico delle piante è definito come la scienza che modifica le caratteristiche genetiche delle piante allo scopo di creare tipi vegetali desiderati, meglio adattati alla coltivazione, ad esempio con resa più elevata, resistenza alle malattie o agli stress abiotici.

È una scienza e un'arte che mira a migliorare le piante coltivate attraverso lo studio e l'applicazione di:

- genetica,
- agronomia,
- statistica,
- fisiologia vegetale,
- patologia vegetale,
- e altre scienze affini.

Perche' fare miglioramento genetico?

2030 Targets for sustaina

PESTICIDES

Reduce the overall use and risk of chemical and hazardous pesticides

NUTRIENT LOSSES

Reduce nutrient losses by 50% whilst retaining soil fertility, resulting in 20% less fertilisers

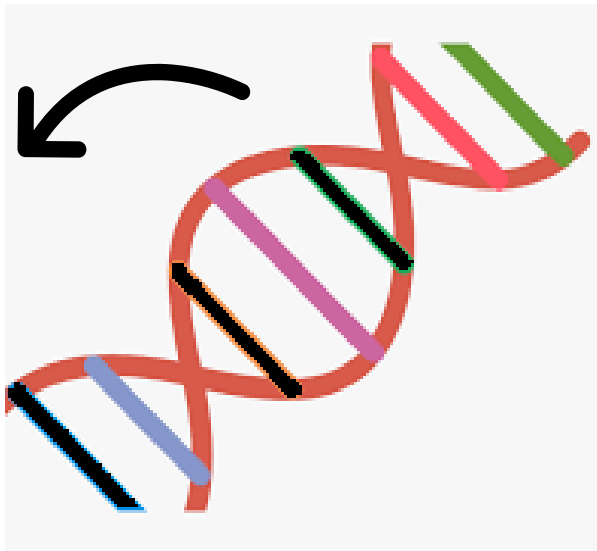
ANTIM

Reduce sales of antimicrobials for farmed animals and aquaculture

La strategia “Farm to Fork” è il cuore del European Green Deal che ha lo scopo di rendere il sistema alimentare giusto, sano e rispettoso dell'ambiente.

Il DNA: il libro di ogni organismo

Contiene tutte le istruzioni per costruire e far funzionare un essere vivente, come la vite



Come fare miglioramento genetico?

Breeding convenzionale

- Limitato agli incroci tra specie uguali o molto affini
- Nessuna garanzia di ottenere una combinazione genica specifica tra milioni di incroci
- I geni indesiderati possono essere trasferiti insieme a quelli desiderati
- Occorrono molti anni per ottenere i risultati sperati

Ingegneria genetica

- Permette il trasferimento diretto o la mutazione di uno o pochi geni
- Può avvenire in tempi più brevi rispetto al miglioramento convenzionale
- Possibilità di disattivare o eliminare geni specifici

Simili, ma differenti!

Quanto puo' durare un programma di MG?

Breeding convenzionale	Ingegneria genetica
Circa 20–25 anni per ottenere un nuovo genotipo	Di sicuro meno di 20–25 anni!
Meno di 20–25 anni, se si utilizzano marcatori per la selezione assistita (MAS)	In teoria, non più di 3 anni
Meno di 20–25 anni, se è disponibile materiale di pre-breeding	Dipende dall'efficienza di trasformazione e rigenerazione

Come si fa il miglioramento genetico tradizionale?

Si base sull'incrocio!

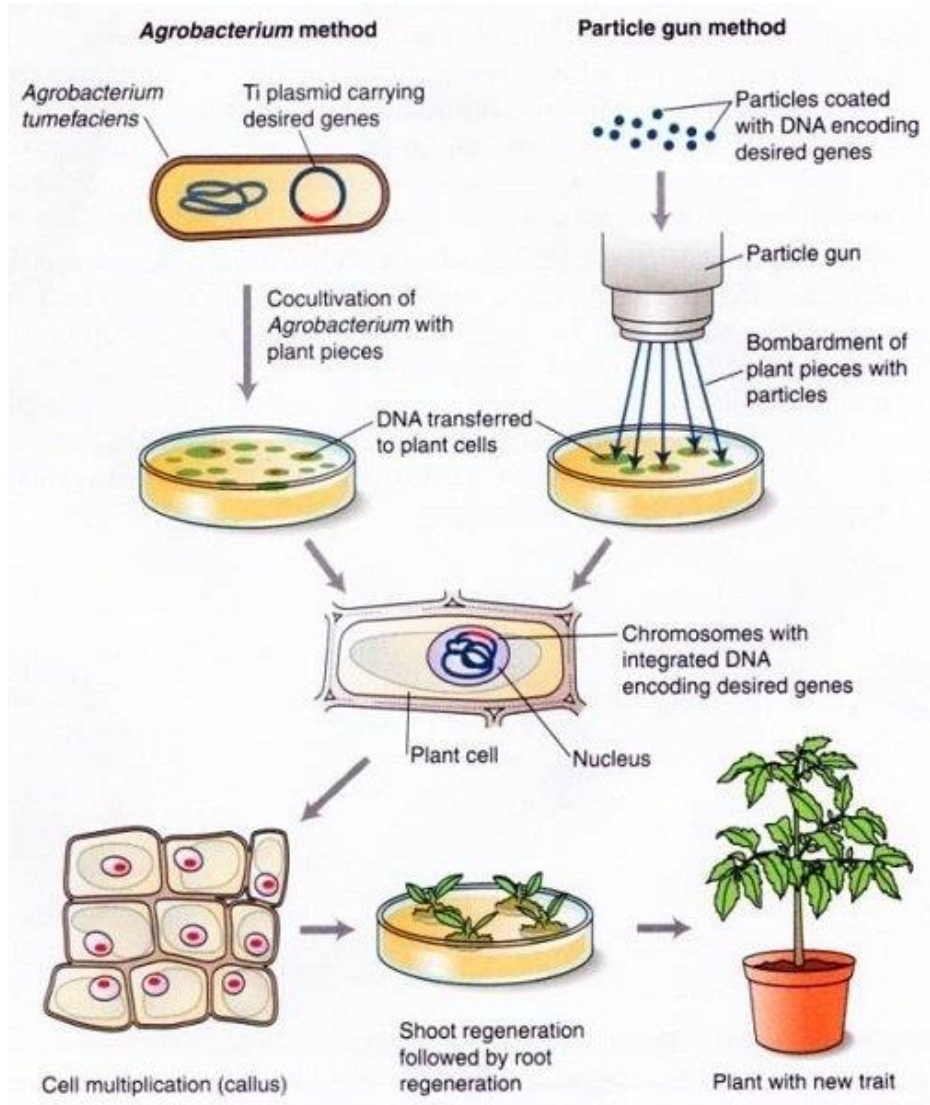
https://www.vinievitiresistenti.it/2021/02/01/come-nasce-una-varieta-resistente-piwi/

fondazione banfi
SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

Come si fa il miglioramento genetico non tradizionale?

Si base sulla trasformazione del DNA!

Un protocollo non proprio semplicissimo

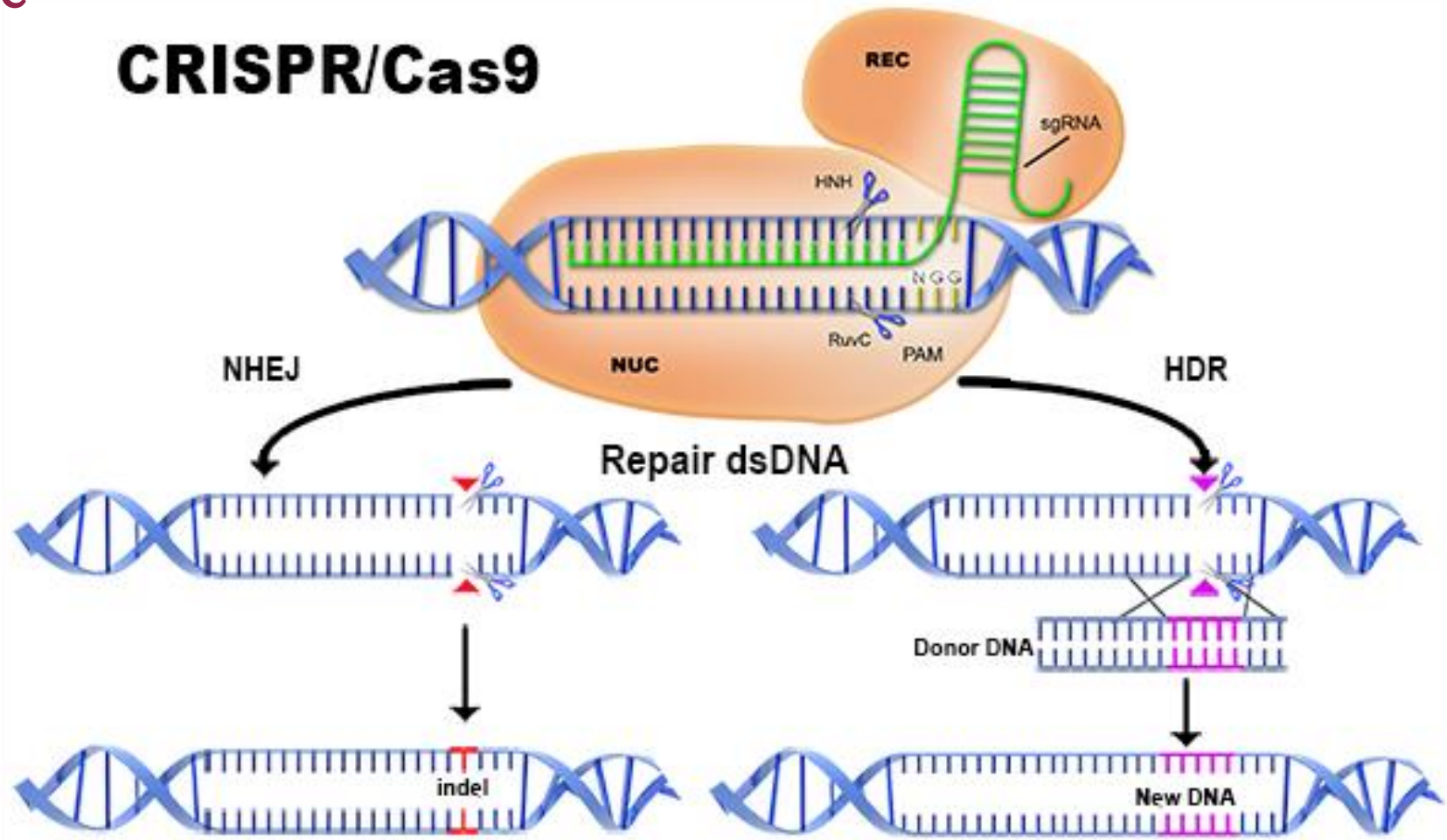


https://bch.cbd.int/images/ra_training_manual/module1/mod1fig3.jpg

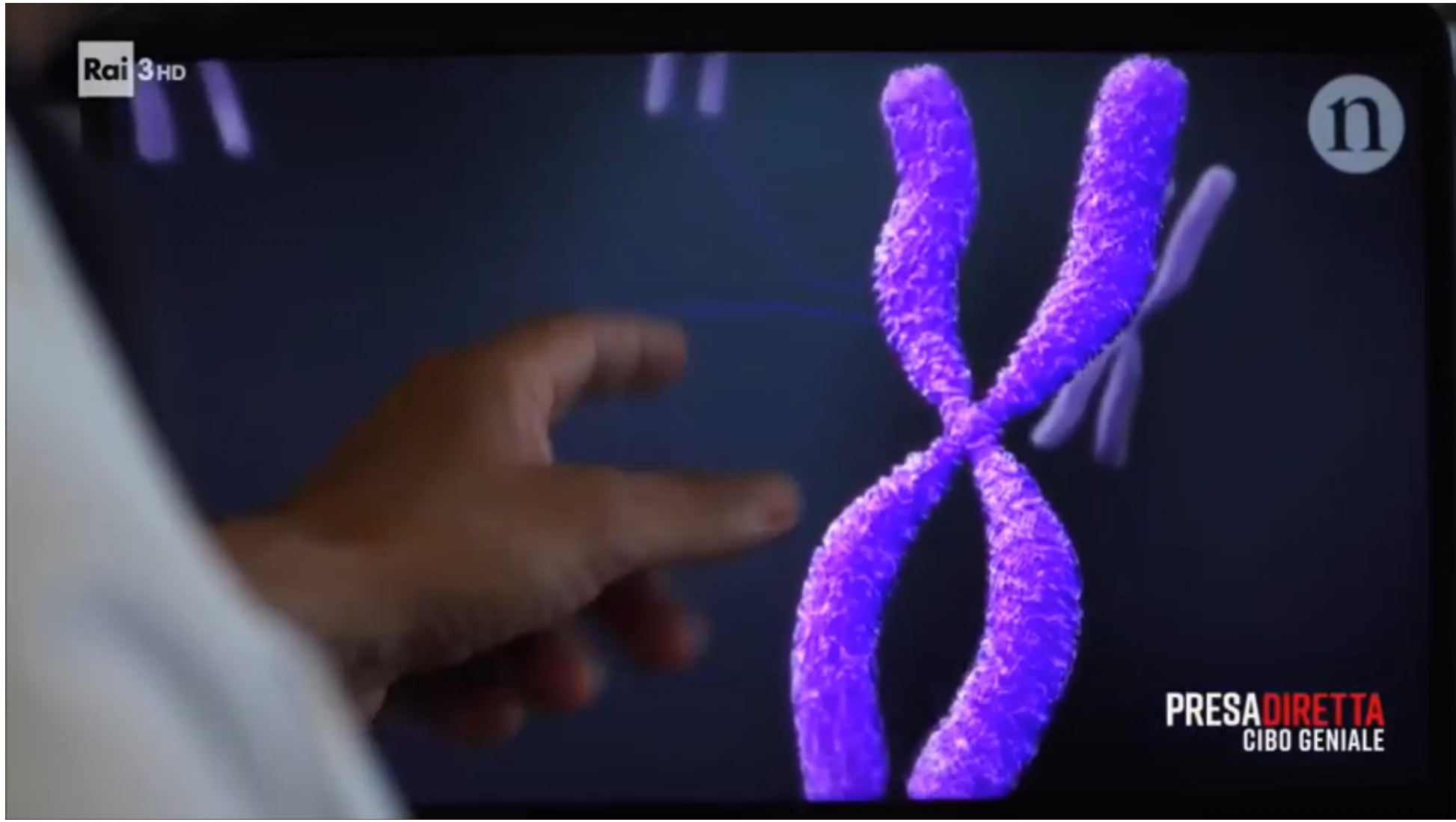
TEA: tecnologie di evoluzione assistita

La nuova frontiera del miglioramento genetico non tradizionale

Tramite le TEA (genome editing) è possibile disattivare uno specifico gene (**knock out; Non-homologous end joining**) o introdurre un gene esogeno in una cellula (**knock in; Homology directed repair**).



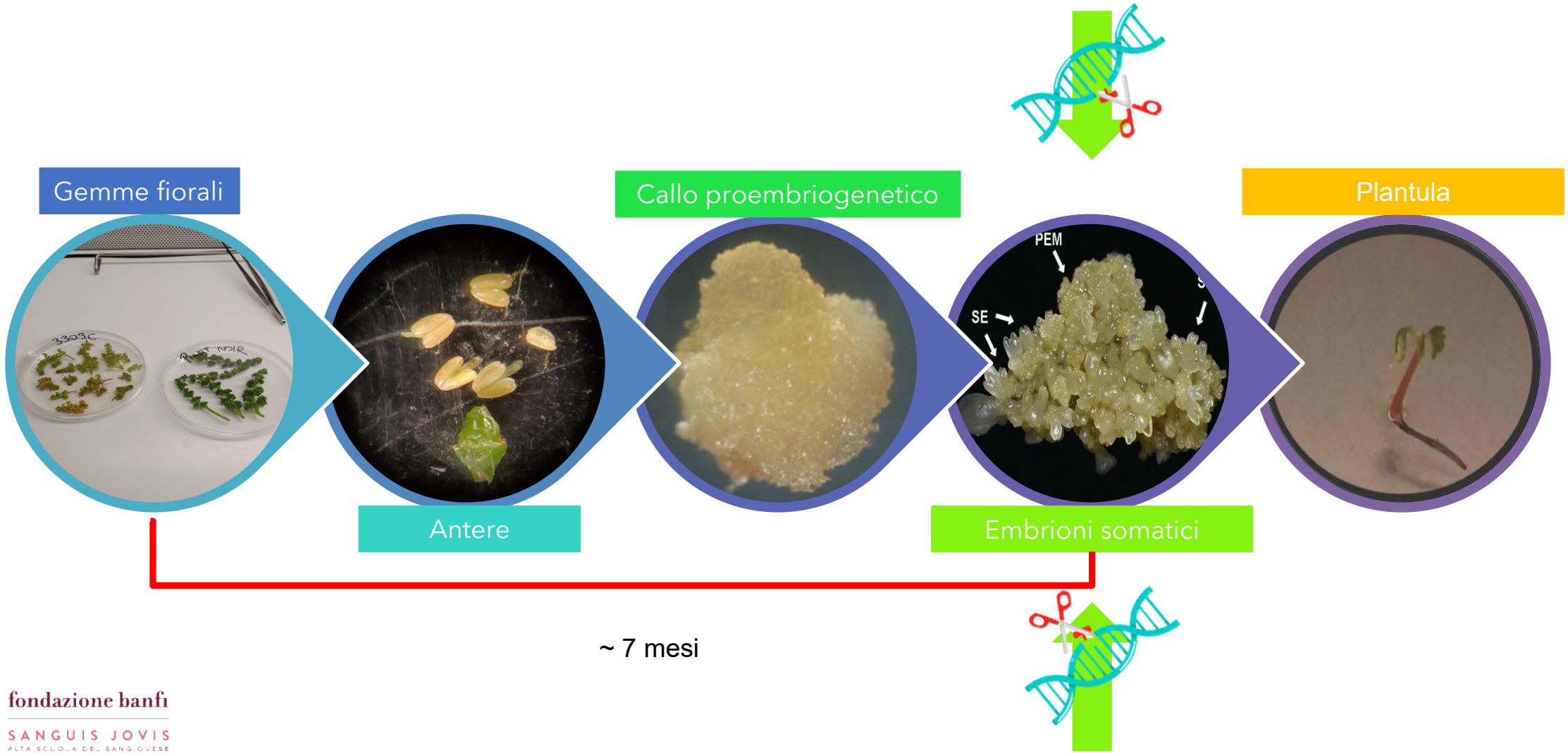
TEA: tecnologie di evoluzione assistita



Un premio Nobel

Emmanuelle Charpentier e Jennifer A. Doudna sono state premiate con il Nobel per la Chimica nel 2020

Come si fa il miglioramento genetico non tradizionale?



- **Decreto Legge Siccità**

Approvato il 30 Maggio 2023

I primi esempi in Italia di prove TEA in campo

RISO

Vittoria Brambilla
24 giu 2024 ·

Radio3 Scienza · Segui
24 giu 2024 ·

Dopo anni di studi, le prime piantine di riso hanno messo radici a maggio. Ma pochi giorni fa, il primo campo sperimentale coltivat… Altro...

Clizia Villano e 47 Condivisioni: 3

Mi piace Commenta Invia Condividi

Vittoria Brambilla
10 nov 2024 ·

Questa è la seconda sperimentazione di piante TEA in Italia, sono viti resistenti alla peronospora della bravissima Sara Zenoni dell' Università di Verona. Trapiantate in Valpolicella a settembre sono state coperte per ripararle dal freddo in attesa che ripartano in primavera. Ci piace questa Italia forte nella ricerca, nell' innovazione e capace di f… Altro...

Tu, Ignazio Verde Ragona e 117 Commenti: 6

VITE

Quando l’innovazione incontra il **RIFIUTO**

Quali geni editare?

	Varietà resistenti	Varietà suscettibili
Gene di resistenza		
Gene di suscettibilità		

Quali geni editare?

Wan et al. *Horticulture Research* (2020)7:116
https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8

Horticulture Research
www.nature.com/hortres

ARTICLE Open Access

CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VvMLO3* results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*)

Dong-Yan Wan[1,2], Ye Guo[1,2], Yuan Cheng[1,2], Yang Hu[1,2], Shunyuan Xiao[3], Yuejin Wang[1,2] and Yin

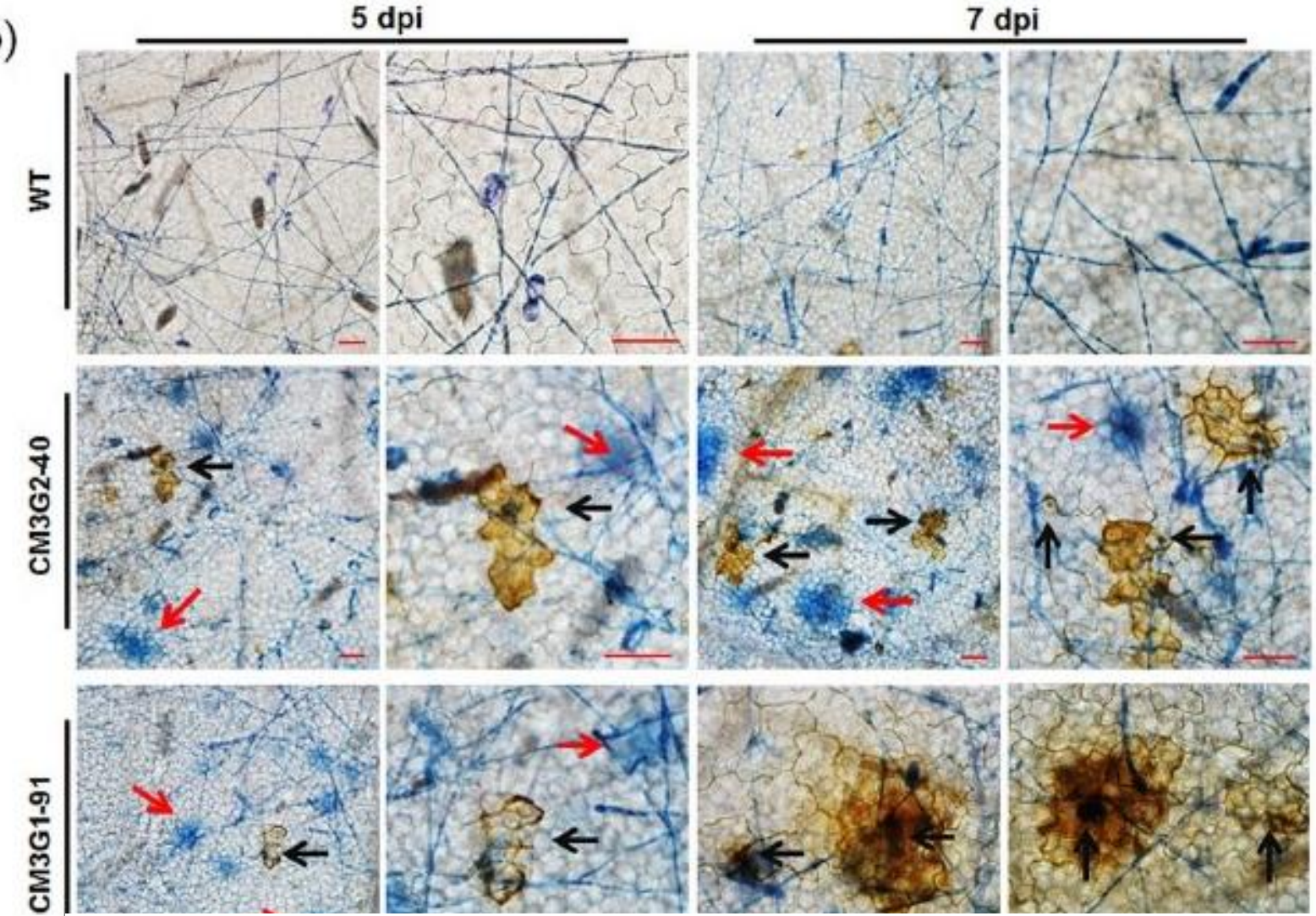
The grapevine cultivar Thompson Seedless is an ideal material for studying powdery mildew resistance in grapevine because it is amenable to transformation and susceptible to powdery mildew infection. There are 17 *VvMLO*s in Thompson Seedless. In this study, we used CRISPR/Cas9 technology to target two grapevine *MLO* genes, *VvMLO3* and *VvMLO4*, and obtained *VvMLO3*-edited grapevine lines with enhanced resistance to powdery mildew. Our work suggests that CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis is a valuable tool for generating disease-resistant grapevines.

Quali geni edit

CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VvMLO3* results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*)

Dong-Yan Wan[1,2], Ye Guo[1,2], Yuan Cheng[1,2], Yang Hu[1,2], Shunyuan Xiao[3], Yuejin Wang[1,2] and Ying-Qiang Wen[1,2]

e banfi
JOVIS
SANG OVESE



(see figure on previous page)

Fig. 6 *VvMLO3*-edited grapevine plants show infection-triggered cell death, H_2O_2 accumulation and CWAs. a The wild-type (WT) and two *VvMLO3*-edited heterozygous mutant grapevine lines grown under phytotron conditions for 6 months (bar = 10 cm). **b** Representative micrographs showing DAB- and trypan blue-stained epidermal cells of the WT and *VvMLO3*-edited lines at 5 or 7 dpi. Red arrowheads indicate trypan blue retention, and black arrowheads indicate H_2O_2 accumulation (bar = 50 μm). **c** Representative images showing a trypan blue-stained leaf section of WT or CM3G2-40 with a focus on either the epidermal layer or the mesophyll cell layer at 7 dpi (bars = 50 μm). **d** Histochemical analysis of infection-triggered CWAs of epidermal cells of the WT and the heterozygous CM3G2-40 mutant line at 7 dpi. Red arrowheads indicate haustoria (H), and black arrowheads indicate infection-triggered CWAs (bars = 50 μm).

Le limitazioni delle TEA

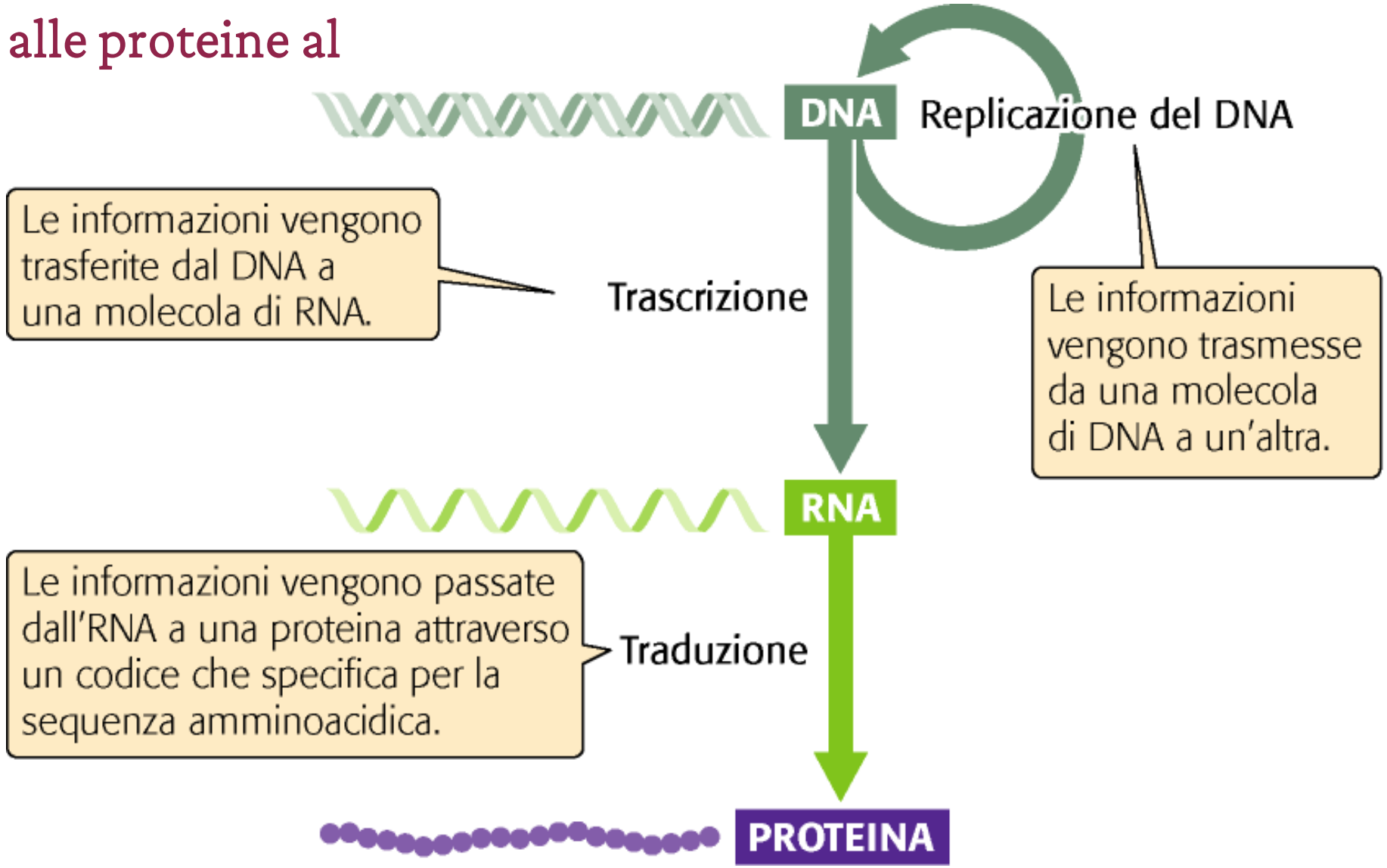
- La rigenerazione da cellule e/o tessuti modificati rappresenta ad oggi il PRINCIPALE COLLO DI BOTTIGLIA!
- L'efficienza di rigenerazione è cultivar specifica.
- Un protocollo di rigenerazione non può essere universale.
- Ad oggi non disponiamo di protocolli per la rigenerazione di tutte le principali varietà italiane.
- Per applicare le TEA abbiamo bisogno di conoscere i geni responsabili di un determinato carattere.
- Molti di questi geni ad oggi sono ancora sconosciuti.

Mi
arrendo

Ci sono altre tecniche..
Mi arrendo

Il flusso dell'informazione genica

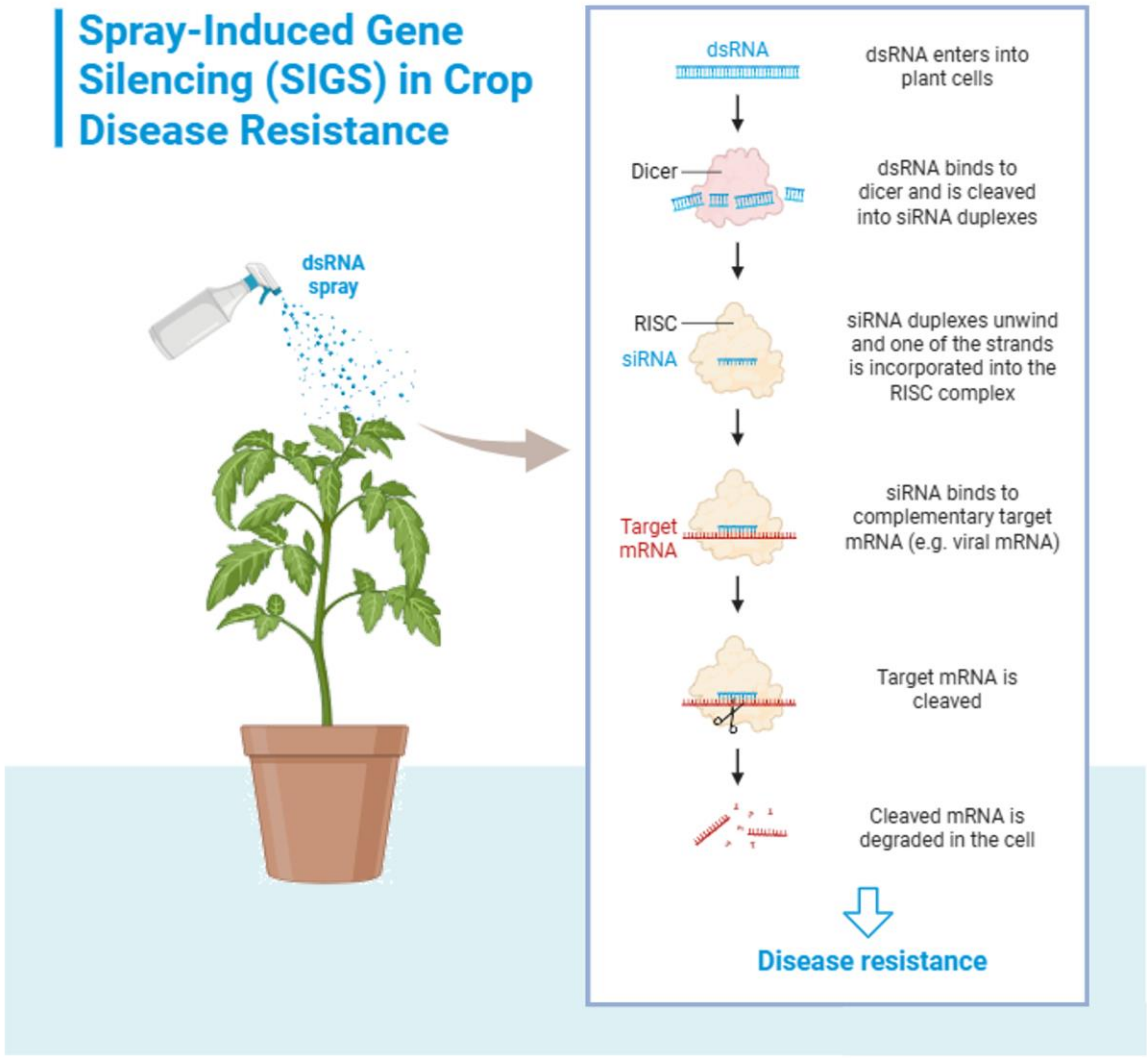
Dal DNA alle proteine al fenotipo

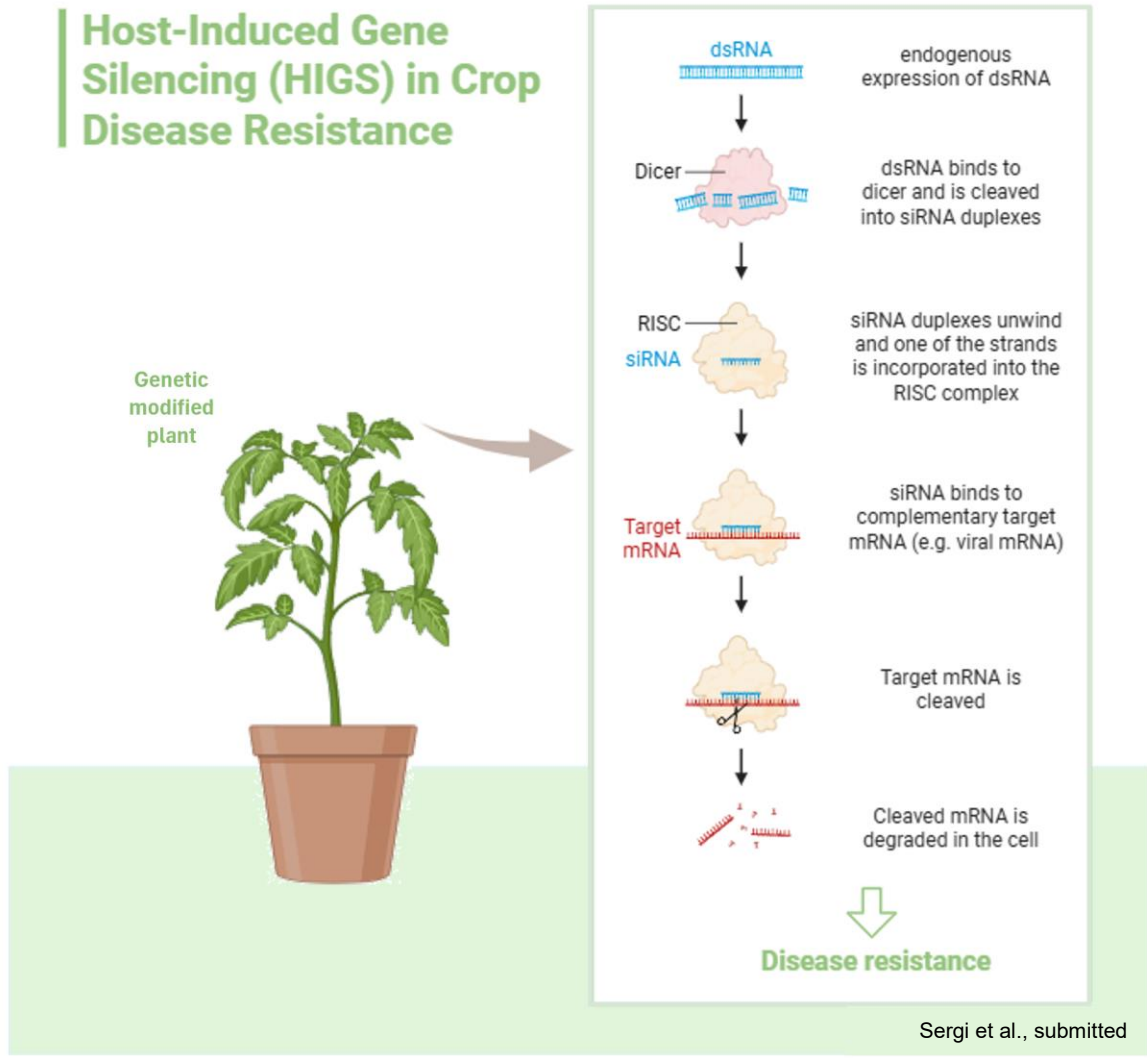


E' possibile modificare il flusso dell'informazione genica?

- Agendo sulle molecole di RNA attraverso l'**RNA interference** (RNAi).
- E' un meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA (**dsRNA**) sono in grado di interferire (spegnere) con l'espressione genica.
- E' un processo di silenziamento genico post trascrizionale.
- Questi frammenti di RNA sono complementari all'RNA espresso dalla cellula (gene target).
- **Il dsRNA può essere prodotto dalla pianta modificata geneticamente oppure applicato per via esogena.**

Il meccanismo dell'RNAi





Sergi et al., submitted

Applicazione esogena del dsRNA

fondazione banfi
SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGUE OVESE

Quali geni disattivare con l'RNAi?

	Varietà resistenti	Varietà suscettibili
Gene di resistenza		
Gene di suscettibilità		

Varieta' georgiane resistenti a P. viticola

Vitis 55, 121–128 (2016) DOI: 10.5073/vitis.2016.55.121-128

Evidence of resistance to the downy mildew agent *Plasmopara viticola* in the Georgian *Vitis vinifera* germplasm

S. L. Toffolatti[1], G. Maddalena[1], D. Salomoni[1], D. Maghradze[2], P. A. Bianco[1] and O. Failla[1]

[1]Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy
[2]Scientific – Research Center of Agriculture, Tbilisi, Georgia

Vitis 54 (Special Issue), 193–196 (2015)

Screening of Georgian grapevine germplasm for susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*)

N. Bitsadze[1], M. Aznarashvili[1], A. Vercesi[2], R. Chipashvili[1], O. Failla[2] and D. Maghradze[1]

[1] Institute of Horticulture, Viticulture and Oenology, Agricultural University of Georgia, Tbilisi, Georgia
[2] Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, University of Milan, Milano, Italy

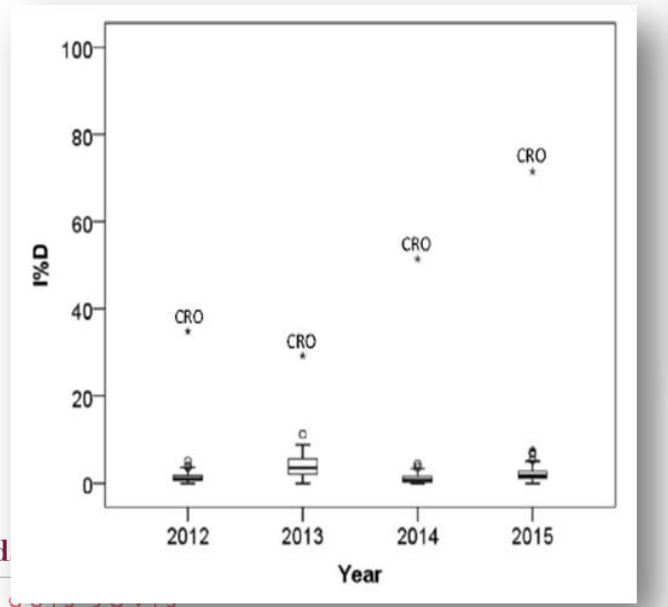


Table 3

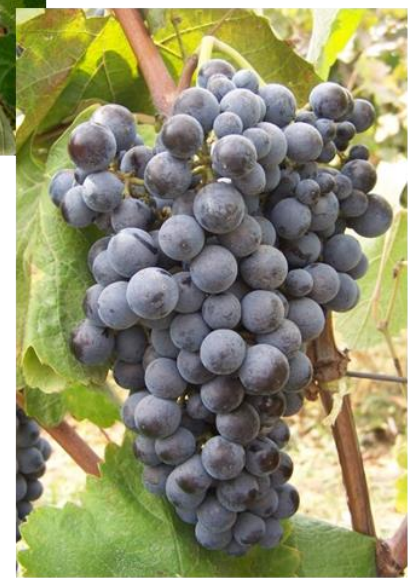
Average values of sporangiax10^3/cm^{-2} of the accessions and results of statistical analysis*

Accession	Sporangia/cm^2
N21F - Buza	1.2 a
L22A - Mgaloblishvili	1.5 ab
M22F - Jani Bakhvis	2.2 abc
L23A - Khushia Shavi	2.3 abc
M22E - Kamuri Shavi	2.4 abcd
N23E - Imeruli Shavi	2.6 abcd
M24C - Argvetula	3.2 abcd
O22B - Ubakluri	3.3 abcd
L23F - Vertkvitchalis Shavi	3.9 abcd
N24F - Acharuli Tetri	7.3 bcd
O23D - Didshavi	18.7 cd
L22B - Marguli Sapere	25.9 d

*Mean values within the column followed by the same letter are not significantly different at 0.05 significance level.

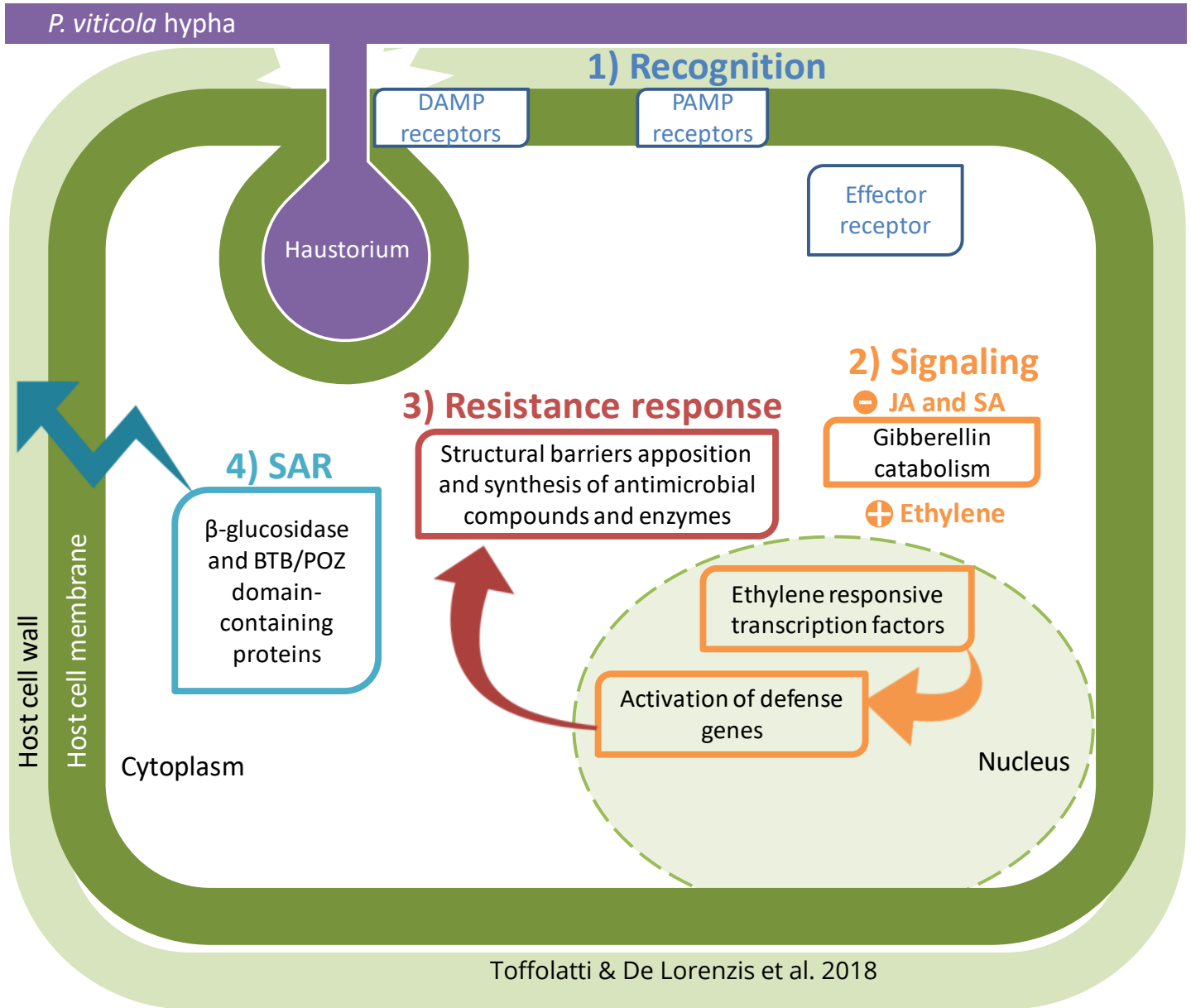
Riduzione incidenza della malattia e sporulazione

Mgaloblishvili



Mgaloblishvili versus P. viticola

- Riconoscimento del patogeno
- Trasduzione del segnale basato sull'etilene
- Risposta di resistenza basata sulla sintesi di composti antimicrobici ed enzimi che degradano la parete fungina e rinforzo della parete cellulare della cellula



Toffolatti & De Lorenzis et al. 2018

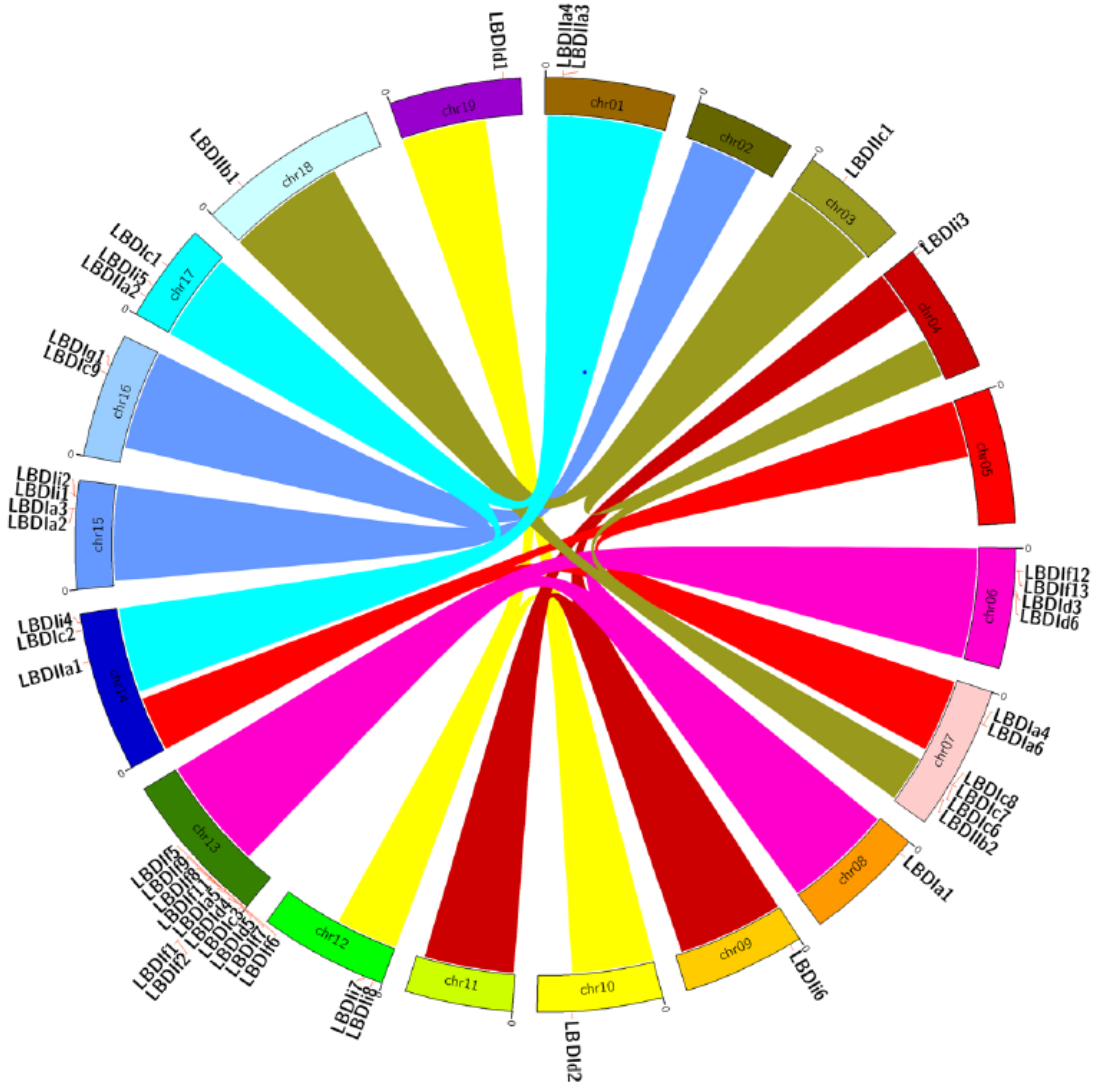
Il gene VvLBDIf7

	Varietà resistenti	Varietà suscettibili
Gene di resistenza	✓	✗
Gene di suscettibilità	✗	✓
LOB domain-containing Protein (LBD)	Mgaloblishvili ✗	Pinot noir ✓

fondazione banfi
SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGUE OVESE

Toffolatti & De Lorenzis et al. 2020

La famiglia genica degli LBD



50 genes in *Vitis vinifera*

Photomorphogenesis

Lateral organ development

Hormones response

Metabolism regulation

Heading date

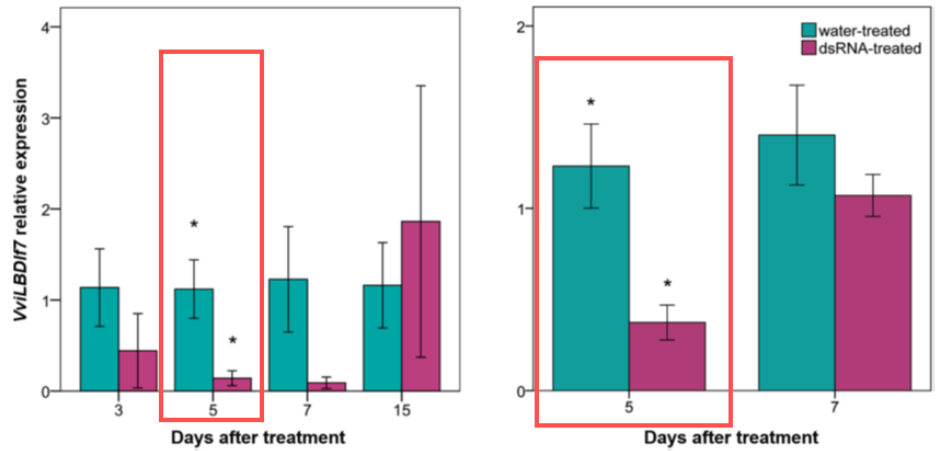
Abiotic stress resistance

Pathogen resistance

In alcune specie, come *Citrus* e *Arabidopsis* sono stati già validati come geni di suscettibilità

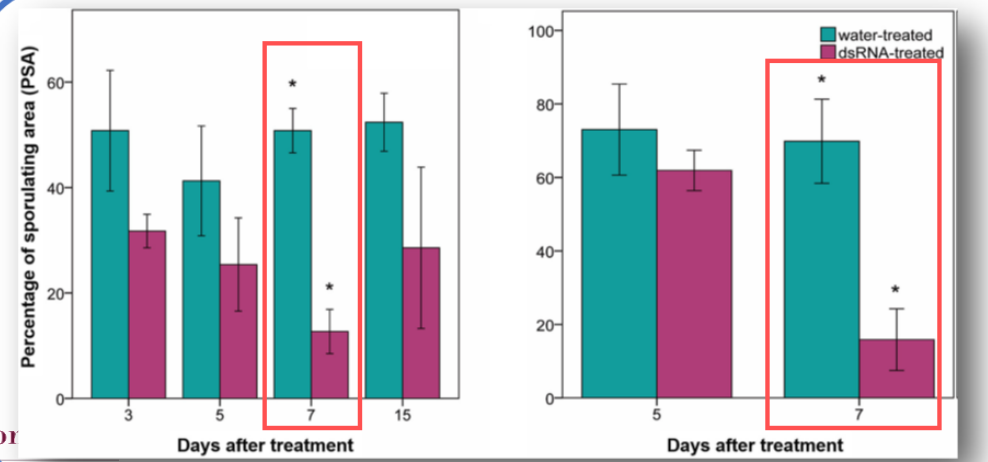
Grimplet et al. 2017

Il silenziamento del gene VvLBDIf7 con dsRNA



L'espressione del gene VvLBDIf7 è ridotta a cinque giorni dopo il trattamento con dsRNA

Effetto del dsRNA sulla pianta

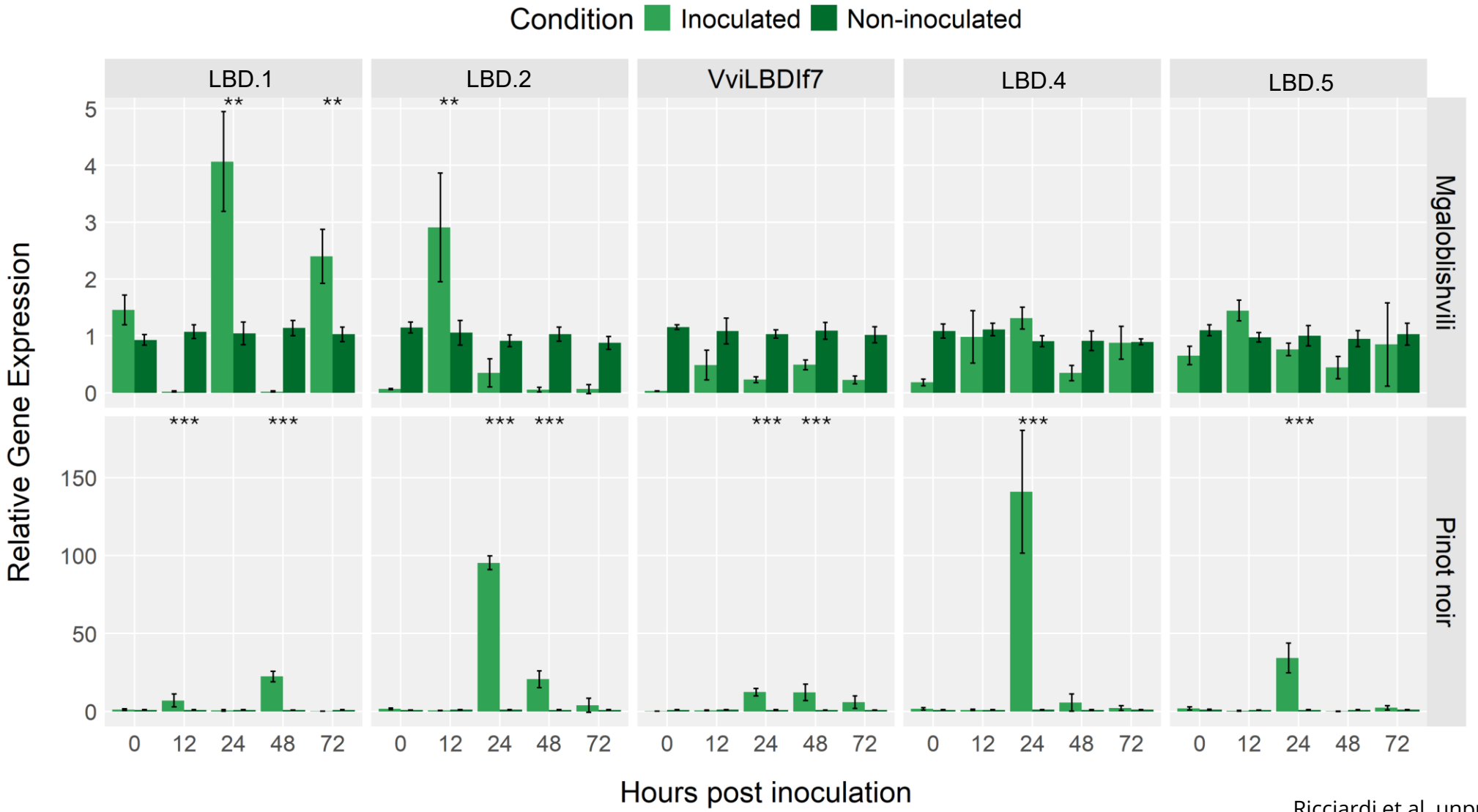


La sporulazione di *P. viticola* è ridotta a sette giorni dopo il trattamento con dsRNA

Effetto del dsRNA sul patogeno

Marcianò & Ricciardi et al. 2021

Nuovi potenziali target LBD



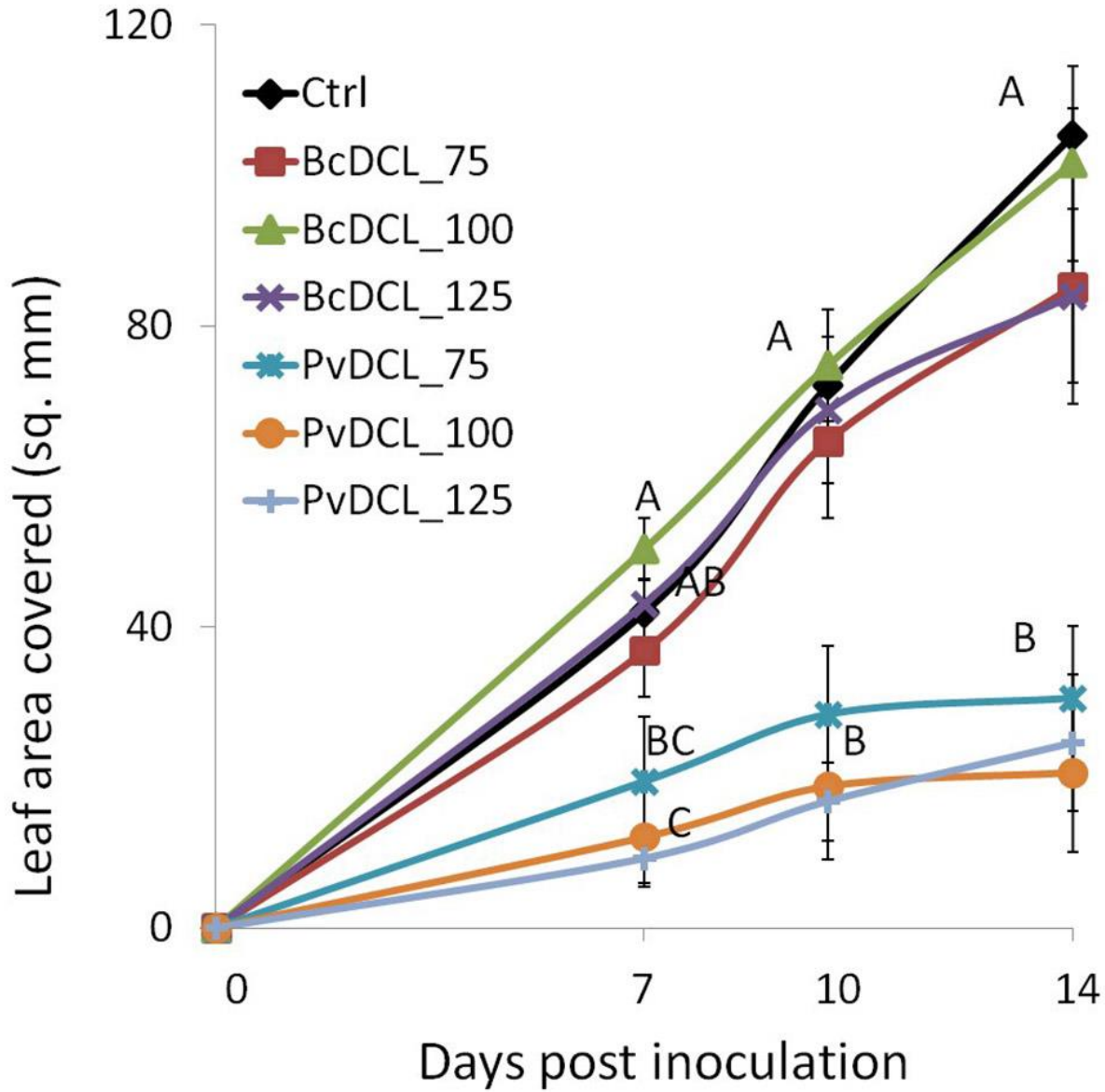
Ricciardi et al. unpublished

Mahari Haile et al. 2021

dsRNA versus P. viticola

Geni target del patogeno

- dsRNA che ha come target il gene PvDCL1/2 applicato esternamente su foglie di vite staccate dalla pianta e inoculate con *P. viticola*.
- Progressione della malattia di *P. viticola* espressa come area fogliare coperta fino a 14 dpi (giorni dopo l'inoculazione).
- Le foglie sono state trattate con 50 ml di acqua (Ctrl) o dsRNA [75, 100 o 125 ng ml-1 di dsRNA diBcDCL1/2 (BcDCL_75/100/125) e PvDCL1/2 (PvDCL_75/100/125)] prima di essere inoculate con 7,5 ml di una soluzione di sporangi 1 x 10^5 ml-1.

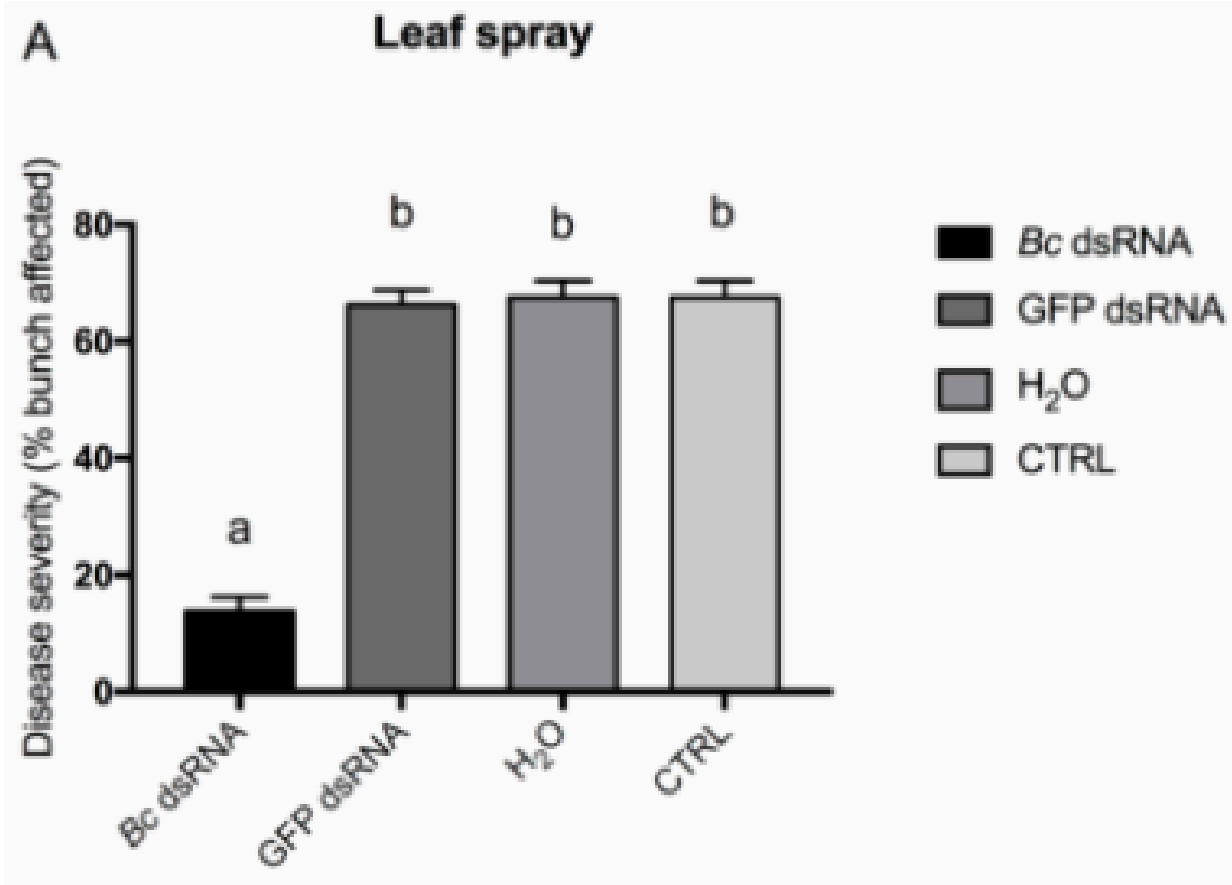


fondazione banfi
SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGUE

dsRNA versus Botrytis cinerea

Geni target del patogeno

- Geni: BcCYP51, Bcchs1, and BcEF2, siti d'azion dei fungicidi
- Varietà: Moscato
- Riduzione dell'incidenza della malattia in campioni trattati con Bc dsRNA



Nerva et al. 2020

Non solo avversita' biotiche: dsRNA versus stress idrico

- Gene: VvGST40, glutatione S-transferase (responsabile dell'aumento dell'ABA)
- Varietà: Chardonnay
- Una volta reidratate, le piante trattate con dsRNA VvGST40 si sono riprese completamente, mostrando un fenotipo simile alle piante non stressate, senza alcun danno evidente dovuto alle condizioni di siccità applicate

Nerva et al. 2021

Ottimizzazioni dell'uso del dsRNA

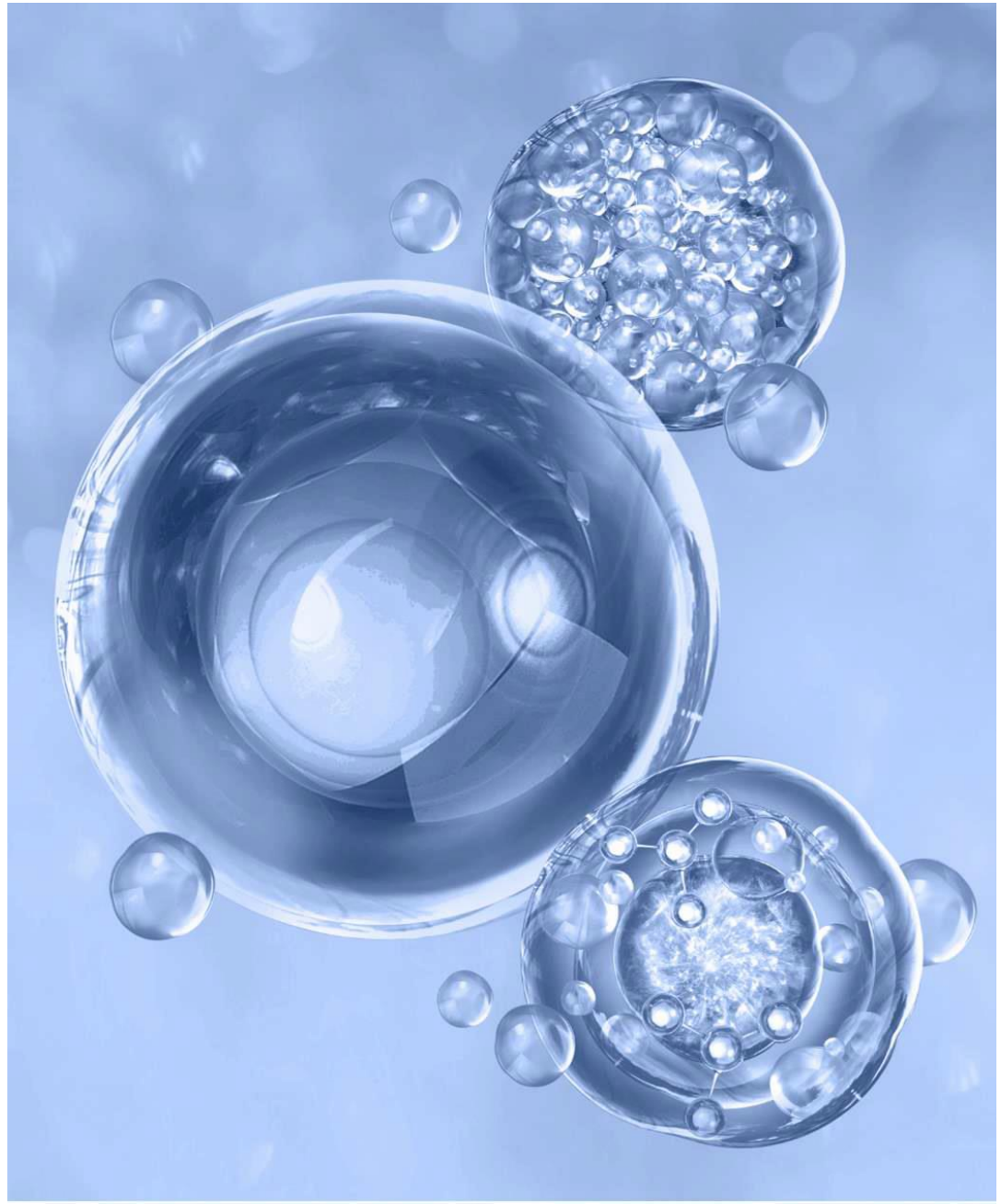
Concentrazione, lunghezza e sequenza delle molecole di dsRNA

Formulazioni che dovrebbe prevenire la degradazione del dsRNA e consentirne l'assorbimento nelle cellule

Strategia di erogazione (bassa o alta pressione)

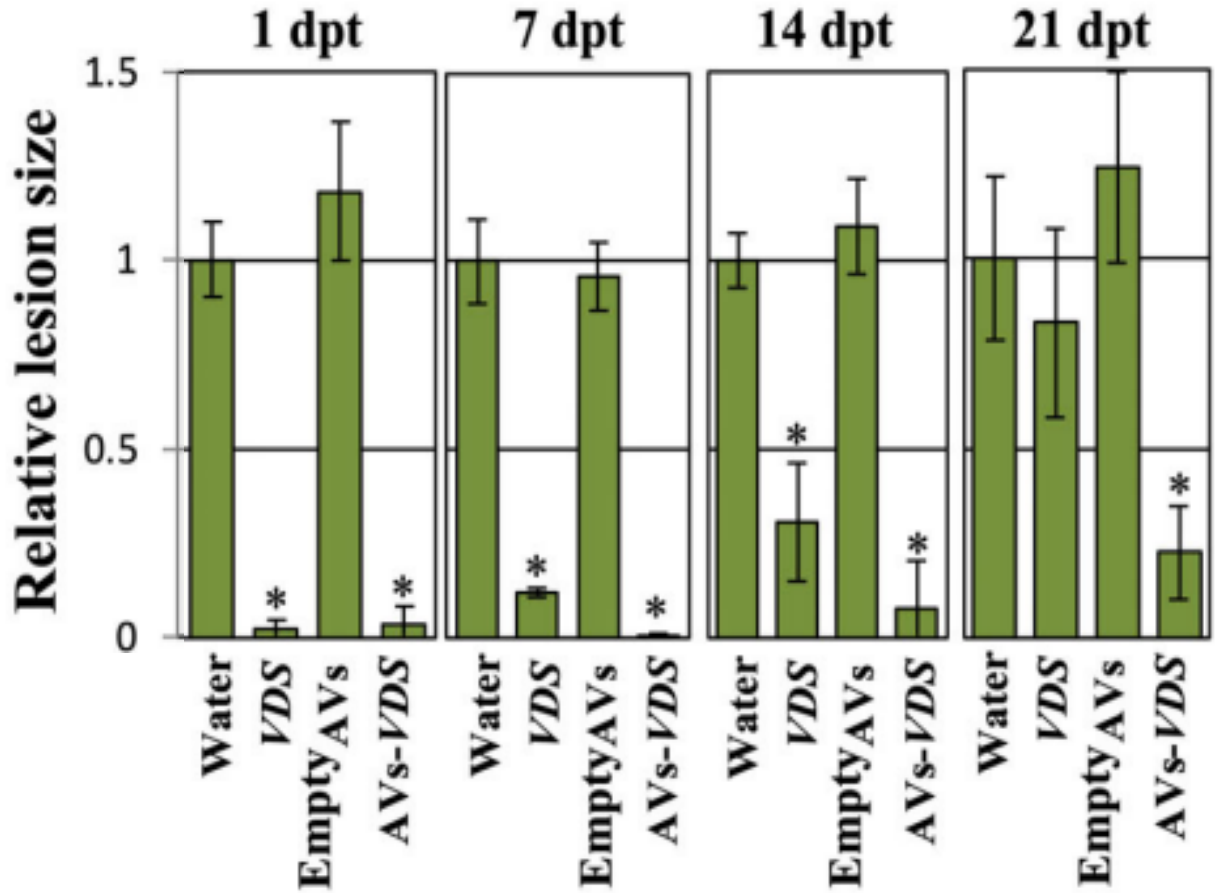
Le vescicole extracellulari

- Le vescicole extracellulari (EV) sono nanoparticelle naturali che trasportano e distribuiscono varie molecole bioattive
- Le EV possono attraversare le barriere tissutali
- Le EV hanno versatilità nel caricamento
- Rilasciano facilmente il carico all'interno della cellula
- Sono estratte da scarti vegetali o da alghe (https://www.evebiofactory.com/)



dsRNA+nanovescicole versus B. cinerea

- Utilizzo di nanovescicole artificiali (AV).
- Il trattamento con AV-dsRNA fornisce una protezione prolungata contro *B. cinerea* nelle foglie di vite.
- Le foglie sono state pretrattate con dsRNA nudo o caricato sulle AV, per 1, 7, 14 e 21 giorni, quindi inoculate con *B. cinerea*.
- Sono state misurate le dimensioni relative delle lesioni sulle foglie.

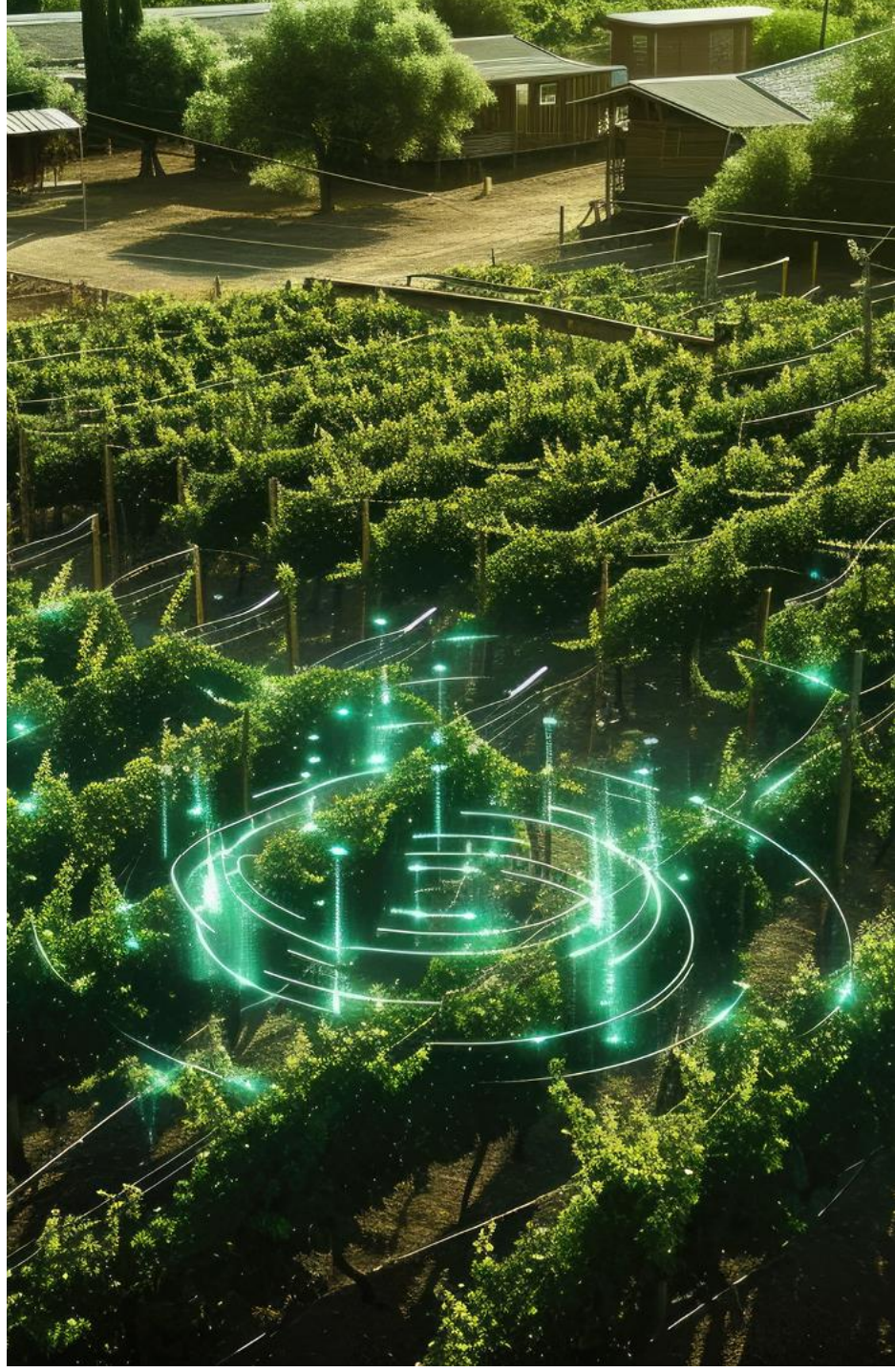


Qiao et al. 2023

dsRNA e agrofarmaci a confronto

Il dsRNA rappresenta una tecnologia innovativa e più sostenibile rispetto agli agrofarmaci chimici tradizionali. Offre **maggiore specificità e sicurezza per l'ambiente e la salute umana**, ma la sua applicazione è ancora in fase di sviluppo. Gli agrofarmaci rimangono ampiamente utilizzati, ma il loro impatto ambientale e il rischio di resistenza rappresentano sfide crescenti per l'agricoltura moderna.

- L'RNAi è altamente specifico: il dsRNA è progettato per colpire un gene specifico, riducendo l'effetto su organismi non target.
- I dsRNA non si accumulano nell'ambiente e non lasciano residui chimici, riducendo così l'inquinamento.
- La regolamentazione sui dsRNA è ancora in fase di sviluppo in molti Paesi.
- Gli agrofarmaci hanno un ampio spettro d'azione e possono colpire diversi tipi di organismi, incluse specie non target.
- Gli agrofarmaci possono lasciare residui chimici, con effetti a lungo termine su ecosistemi e salute umana.
- Il numero di principi attivi consentiti dalla legge si riduce sempre di più.

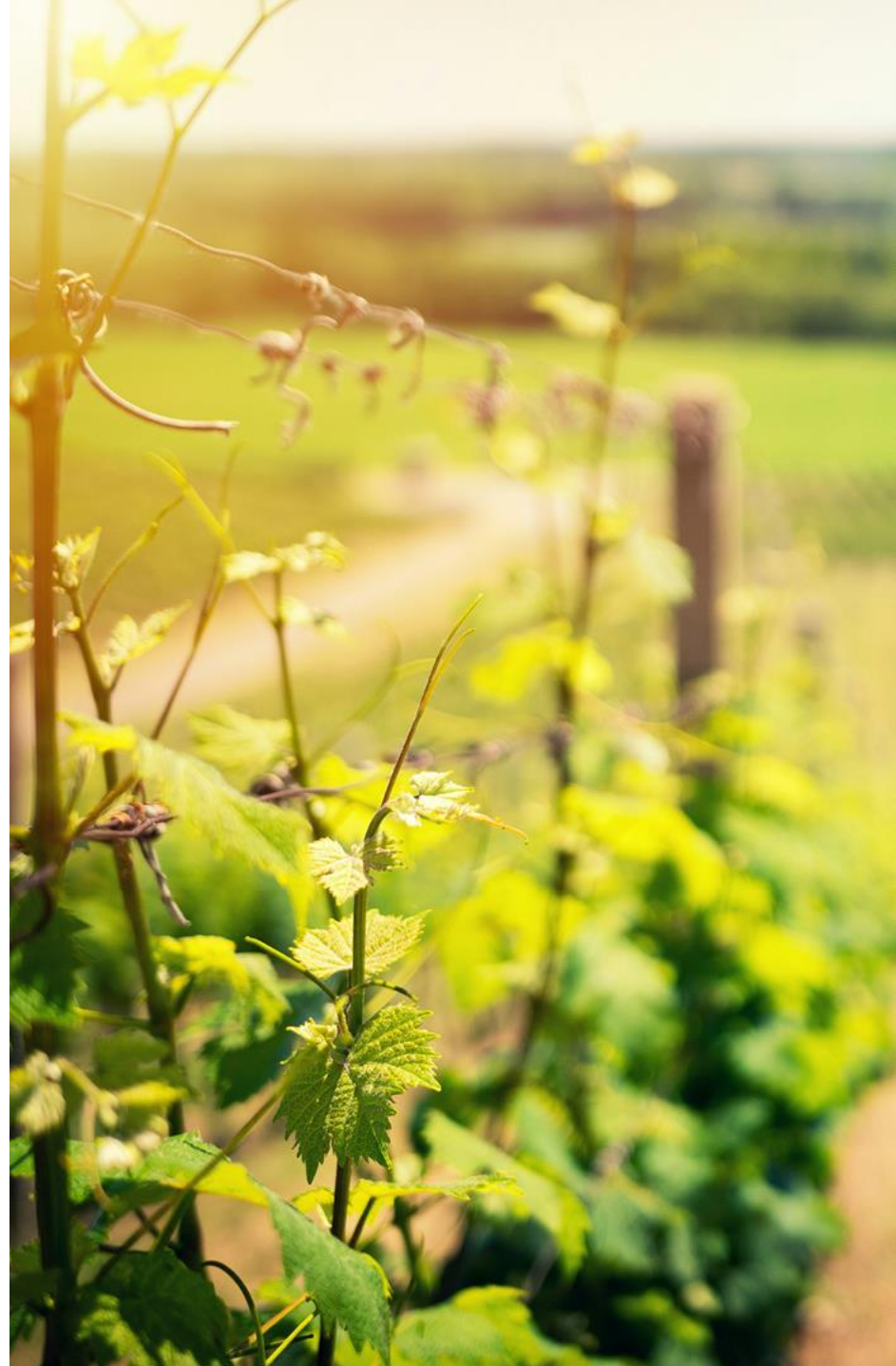


Take home messages

TEA e dsRNA esogeno sono opportunità per una viticoltura più sostenibile e competitiva

Abbiamo l'esigenza di trovare nuovi target per TEA e dsRNA

TEA e RNAi sono tecnologie giovani. Abbiamo margini di miglioramento



fondazione banfi
SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

Milano

gabriella.delorenzis@unimi.it

+39 02 50316565

fondazione banfi
SANGUIS JOVIS
ALTA SCUOLA DEL SANGIOVESE

fondazionebanfi.it