



Fondata da Carlo Jucci
nel 1954

ORGANI SOCIALI
biennio 2019-2021

CONSIGLIO DIRETTIVO

Presidente

Mario Enrico Pè
Scuola Sup. Sant'Anna

Vicepresidente

Edgardo Filippone
Università di Napoli

Segretario

Daniele Rosellini
Università di Perugia

Consiglieri

Michela Janni
CNR, Bari

Angela Roberta
Lo Piero

Università di Catania

Gianpiero Marconi
Università di Perugia

Alessandro Tondelli
CREA, Fiorenzuola
d'Arda

Chiara Volpi
Enza Zaden Research

Sara Zenoni
Università di Verona

COLLEGIO PROBIVIRI

Michele Morgante
Mario Pezzotti
Fabio Veronesi

COLLEGIO SINDACALE

Stefano Pavan
Emanuela Pedrazzini
Silvio Salvi

La SIGA aderisce a:



Roma, 1 ottobre 2019

Alla Commissione Agricoltura e
produzione agroalimentare del Senato

Oggetto: Audizione della Società Italiana di Genetica Agraria sull'Affare Assegnato
n. 200, Nuove biotecnologie in agricoltura, 2 ottobre 2019

Si allega alla presente il testo dell'intervento del Dott. Teodoro Cardi, Direttore del
Centro di ricerca per l'orticoltura del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi
dell'economia agraria (CREA), in rappresentanza della Società Italiana di Genetica
Agraria.

Si allegano inoltre i documenti relativi all'audizione.

Distinti saluti.

Daniele Rosellini
Segretario
Società Italiana di Genetica Agraria



**Audizione della Società Italiana di Genetica Agraria presso la Commissione
Agricoltura e produzione agroalimentare del Senato**

**Affare assegnato n. 200 (affare sulla questione inerente alle nuove biotecnologie in
agricoltura)**

Roma, 2 ottobre 2019

La **Società Italiana di Genetica Agraria** (SIGA, www.geneticagraria.it/home.asp) ha lo scopo di promuovere e valorizzare gli studi nel campo della **Genetica Agraria**, della **Genomica**, del **Miglioramento Genetico** e delle **Biotecnologie** degli organismi di interesse agrario. Fondata nel 1954, conta quasi 300 ricercatori, in larghissima maggioranza afferenti alle Università e agli Enti pubblici di ricerca del settore. La SIGA aderisce, insieme ad altre 21 Società scientifiche, all'Associazione Italiana Società Scientifiche Agrarie (AISSA) e, insieme ad altre 13, alla Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV), per cui, **in relazione all'affare assegnato, rimandiamo, oltre ai documenti da noi presentati per la presente Audizione, anche a quelli già presentati nella seduta del 18/6 u.s., in cui sono stati consegnati i documenti della FISV alla cui stesura la Società ha partecipato attivamente.** La presente relazione, quindi, si concentrerà su alcuni punti più rilevanti e fornirà alcuni aggiornamenti. Come riportato nella documentazione già consegnata dopo l'audizione indicata, la SIGA ha aderito al documento europeo in cui diverse Società scientifiche, Enti di ricerca, Università e Associazioni varie chiedono alle Istituzioni politiche europee di **salvaguardare l'innovazione in agricoltura e biologia vegetale** (<http://www.vib.be/en/news/Pages/European-scientists-unite-to-safeguard-precision-breeding-for-sustainable-agriculture.aspx>).

La SIGA mantiene un forte legame tra l'avanzamento delle conoscenze scientifiche e l'implementazione delle innovazioni tecnologiche per il miglioramento genetico degli organismi di interesse agrario. Proprio in relazione all'argomento odierno, va ricordato che le cosiddette "nuove biotecnologie in agricoltura" derivano dalla scoperta di fenomeni diffusi in natura (per il genome editing i meccanismi di difesa dei batteri dai virus che li infettano). Infine, la Società ritiene che la conoscenza approfondita dei meccanismi biologici di base sia la migliore garanzia per sviluppare e controllare le nuove tecnologie applicate al miglioramento genetico degli organismi di interesse agrario.

In particolar modo nelle piante agrarie, a causa dei cambiamenti climatici, che stanno già determinando la comparsa di nuovi stress abiotici (siccità, inondazioni improvvise, elevate temperature) e biotici (ad es. l'insetto *Tuta absoluta* in pomodoro), della globalizzazione degli scambi commerciali, della necessità di uno sviluppo più sostenibile (*more with less*), ma anche delle sempre nuove esigenze dei cittadini e della segmentazione dei mercati, **sono oggi necessari metodi di**



miglioramento genetico veloci e precisi, che consentano di produrre sempre nuove varietà in tempi rapidi e in modo mirato.

Le cosiddette “Nuove biotecnologie in agricoltura” (*New Breeding Techniques, NBT*) sono degli strumenti importanti per affrontare efficientemente le sfide su citate. Va, però, considerato che esse sono un insieme di tecnologie diverse (1), che richiedono una valutazione separata. Inoltre, come ben illustrato nel documento citato, esse rappresentano l’evoluzione delle tecniche convenzionali di miglioramento genetico e delle tecniche “tradizionali” di ingegneria genetica, condividendo con entrambe gli obiettivi e superandone alcuni limiti. In questo testo ci riferiremo in particolar modo al *genome editing* basato sull’uso di nucleasi sito-specifiche, e più specificamente alla tecnologia CRISPR/Cas, che sicuramente rappresenta la tecnologia più innovativa e potente. Infatti, poter eseguire un miglioramento genetico mirato, intervenendo in maniera diretta sui geni responsabili dei caratteri d’interesse, è stato sempre un obiettivo prioritario dei ricercatori e dei *breeder*, ma è solo dal 2013, anno delle prime pubblicazioni in cui è stata riportata l’applicazione di CRISPR/Cas nelle piante, che è concretamente possibile farlo, con relativa semplicità, in specie vegetali diverse, così come testimoniato dall’esplosione delle applicazioni riportate nella letteratura scientifica (2).

Molti Paesi, tra cui Cina, Stati Uniti, Giappone, Francia, Germania, Regno Unito, stanno ampiamente investendo per l’applicazione di questa tecnologia per diversi scopi in agricoltura (3 - 6). Nonostante i minori investimenti, anche **la comunità scientifica italiana è attiva in questo settore.** Nell’ambito dell’ultimo Congresso della SIGA, che si è svolto a Napoli dal 10 al 13 settembre, si è tenuta una sessione sul “*Genome editing for crop improvement*” (*Genome editing* per il miglioramento delle piante coltivate), in cui sono state presentate da parte dei soci una ventina tra relazioni orali e poster. Esse hanno riguardato specie importanti per il nostro Paese (pomodoro, melanzana, grano, orzo, vite, basilico, kiwi, pesco) e obiettivi come il miglioramento della qualità e della resistenza a stress biotici e abiotici. Altri esempi dei lavori in corso nelle diverse Istituzioni di ricerca nazionali sono stati illustrati nel documento FISV “*Genome editing per l’agricoltura italiana*” inviato a codesta Commissione dopo l’audizione del 18 giugno e che qui, a ogni buon fine, si allega (all. 1). Infine, come riportato nell’audizione del CREA dello scorso 16 luglio, va menzionato il progetto “Biotech”, con il coordinamento e la partecipazione di varie unità operative di quell’Ente e il previsto coinvolgimento di diverse Istituzioni di ricerca nazionali. Come sottolineato in precedenti audizioni, **maggiori investimenti oggi nel *genome editing* servirebbero anche a valorizzare gli investimenti che il nostro Paese ha fatto negli anni passati per il sequenziamento dei genomi di molte specie tipiche o, comunque, importanti per la nostra agricoltura** (pomodoro, vite, frumento duro e tenero, melanzana, pesco, mandorlo).

L’agricoltura italiana è caratterizzata da un’ampia biodiversità con molteplici risorse genetiche locali. Queste, però, pur presentando caratteristiche qualitative di



rilievo, richiedono in diversi casi degli interventi migliorativi mirati per correggere alcuni difetti (tra cui, suscettibilità a molti patogeni, ridotta *shelf life*, inadeguatezza per l'industria di trasformazione alimentare, presenza di componenti antinutrizionali o allergeniche) e aumentare la sostenibilità della loro coltivazione. Per questi motivi appare particolarmente interessante la possibilità che il *genome editing*, eventualmente associato alla cisgenesi, offre per **intervenire in maniera mirata su uno o pochi caratteri, senza alterare l'assetto genetico generale e le caratteristiche alla base della tipicità (7, 8, all. 2)**. In Europa, la vite occupa il 3,3% dei terreni agricoli, ma utilizza il 65% dei fungicidi, cioè ca. 60000 tonnellate. E' evidente che la possibilità di usare la cisgenesi e/o il *genome editing* per indurre resistenza a oidio e peronospora nei vitigni coltivati nelle zone di elezione costituirebbe un'alternativa incommensurabilmente più salubre ed economica, restando del tutto inalterate le caratteristiche di pregio. Situazioni analoghe si hanno per altre colture arboree (es. il melo per la ticchiolatura) ed erbacee.

Le tecniche di *genome editing* possono essere applicate anche ai geni della domesticazione, responsabili della transizione dalle forme selvatiche a quelle coltivate (*de novo domestication*), sia in quelli di rusticità presenti nelle specie ancestrali e persi in quelle coltivate (*rewilding*), consentendo di **produrre varietà capaci di produzioni di buona quantità e qualità, ma allo stesso tempo più adatte a condizioni di coltivazione low input, migliorando la sostenibilità e aprendo nuove interessanti prospettive anche per l'agricoltura biologica**, se questa abbandonerà, auspicabilmente, il suo rifiuto ideologico verso le innovazioni genetiche (8, all. 2).

Un maggiore accesso alle nuove biotecnologie avrebbe sicuramente un impatto positivo sulle ditte sementiere nazionali, che sono generalmente piccole e spesso coinvolte nel miglioramento genetico di *specialty crops*, di genotipi locali o, comunque, di colture di diffusione relativamente limitata. Il loro potenziale per un'attività di R&S autonoma e competitiva è limitato e i costi previsti dall'attuale regolamentazione OGM (Dir. 2001/18/EC) assolutamente non sostenibili. Va anche sottolineato che **l'impossibilità di distinguere le mutazioni indotte mediante *genome editing* da quelle spontanee o indotte con altri metodi espone le ditte sementiere nazionali a una competizione potenzialmente non equa da parte delle imprese straniere che possono accedere a questa tecnologia**. Si ritiene quindi che una diversa regolamentazione sia indispensabile al fine di garantire l'accesso del settore sementiero nazionale alle possibilità che il *genome editing* e le altre nuove biotecnologie offrono. La collaborazione con un settore pubblico nazionale attivamente impegnato in attività di ricerca in questo settore aprirebbe ulteriori orizzonti di sviluppo nell'ambito di partenariati pubblico-privati.

Come discusso anche in altre sedi e riportato nelle precedenti audizioni, la mancanza di una regolamentazione chiara, proporzionata e flessibile per le diverse biotecnologie, oltre a non tutelare il settore della produzione sementiera, non tutela neanche il sistema ricerca nazionale, gli agricoltori e i consumatori. **In linea con il**



documento prodotto dal “Group Scientific Advisors” della Commissione Europea successivamente alla sentenza della Corte di Giustizia Europea del 25 luglio 2018 (9, all. 3), la SIGA ritiene indispensabile la revisione radicale della Direttiva in vigore, che è vecchia di quasi 20 anni, rigida e non predisposta per gli avanzamenti tecnologici. Si evidenzia, al contrario, la necessità di una normativa:

- a) in cui la valutazione del prodotto abbia uno spazio prioritario, non comprendendo perché prodotti identici abbiano profili di rischio diversi per l’ambiente o la salute umana in funzione della tecnologia impiegata per la loro produzione;
- b) in generale commisurata e proporzionata per le diverse tecnologie;
- c) flessibile e aperta alla valutazione delle nuove tecnologie, che, inevitabilmente, saranno sviluppate negli anni a venire.

A questo proposito, si riporta, a titolo di esempio, la proposta di alcune organizzazioni francesi di sementieri e produttori, che si ritiene soddisfatti i requisiti su indicati (10, all. 4).

Nelle more dell’approvazione di una nuova Direttiva, si ritiene indispensabile sfruttare le possibilità che l’attuale regolamentazione prevede, aggiungendo, per analogia, il *genome editing* e la cisgenesi come ulteriori deroghe a quelle indicate nell’allegato 1B (la mutagenesi e l’ibridazione somatica tra linee parentali incrociabili anche sessualmente sono state esentate dall’applicazione di quanto previsto dalla Direttiva per gli OGM a causa della loro “lunga tradizione di sicurezza”). A questo proposito va, però, rimarcato che **quest’ultimo concetto è indefinito, dipende dalla metodologia utilizzata per individuare gli effetti e non garantisce di per sé la reale sicurezza dei consumatori**. E’ ormai acclarato che gli interventi di *genome editing* sono molto meno “invasivi” delle tecniche di mutagenesi e incrocio, mentre le tecnologie di risequenziamento e di analisi dell’espressione genica e/o del profilo metabolico consentono di valutare ad ampio spettro i prodotti biotecnologici, consentendo di evidenziare in breve tempo potenziali effetti non desiderati e quindi le possibili conseguenze dal punto di vista della “sicurezza”. Per tali motivi, si ribadisce che **è del tutto immotivato considerare “sicure” le nuove varietà prodotte con i metodi accettati dalla normativa vigente e non quelle, per molti aspetti simili, che potrebbero derivare da interventi mirati e per le quali sono possibili verifiche dettagliate**.

Una regolamentazione delle nuove biotecnologie più adeguata alle esigenze e meno genericamente restrittiva è anche necessaria per provare in campo i nuovi prodotti, prevedendo, con approccio graduale e flessibile, protocolli sperimentali diversi in funzione della modificazione apportata e della specie. **La valutazione in campo nelle nostre condizioni ambientali è, infatti, indispensabile per poter trarre le conclusioni rispetto al valore dei nuovi prodotti, e delle nuove tecnologie, per l’agricoltura italiana**.

Dott. Teodoro Cardi



Referenze bibliografiche

1. European Commission, Directorate-General for Research and Innovation 2017 Scientific Advice Mechanism (SAM), Independent Scientific Advice for Policy Making, High Level Group of Scientific Advisors, Explanatory Note 02, Brussels, 28 April 2017
https://ec.europa.eu/research/sam/pdf/topics/explanatory_note_new_techniques_agricultural_biotechnology.pdf
2. Cardi T., Stewart C. N. Jr. 2016 Progress of targeted genome modification approaches in higher plants. *Plant Cell Rep.* 35: 1401-1416 (DOI 10.1007/s00299-016-1975-1)
3. Ricroch A. 2019 Global developments of genome editing in agriculture. *Transgenic Res* 28: 45–52 (doi.org/10.1007/s11248-019-00133-6)
4. Nogué F. et al. 2019 Crop plants with improved culture and quality traits for food, feed and other uses. *Transgenic Res* 28: 65–73 (doi.org/10.1007/s11248-019-00135-4)
5. Cohen J 2019a China's CRISPR revolution. *Science* 365: 420-421 (DOI: 10.1126/science.365.6452.420)
6. Cohen J 2019b Fields of dream. *Science* 365: 422-425 (DOI: 10.1126/science.365.6452.422)
7. Cardi T. 2016 Cisgenesis and genome editing: combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding. *Plant Breed.* 135: 139–147 (doi:10.1111/pbr.12345)
8. Cardi T., Cattivelli L., Gentile A., Pisante M. 2018 Per rigenerare l'agricoltura serve il *genome editing*. *Terra e Vita* n. 34-2018: 76-78 (**all. 2**)
9. Directorate-General for Research and Innovation (European Commission), European Commission's Group of Chief Scientific Advisors 2018 A scientific perspective on the regulatory status of products derived from gene editing and the implications for the GMO Directive, pp. 8 (doi:10.2777/407732) (**all. 3**)
<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a9100d3c-4930-11e9-a8ed-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-94584603>
10. Cardi T. 2016 Genetica migliorata con Npbt. *Terra e Vita* n. 25-2016: 114-116 (**all. 4**)

All. 1 -4



Genome editing per l'agricoltura italiana

Esempi di progetti in corso



Roma, luglio 2019

Genome editing e agricoltura

Le tecnologie di *genome editing*, (note anche come *New Breeding Technologies*, NBT, se applicate alle piante per l'agricoltura) hanno aperto nuove importanti possibilità nel miglioramento genetico delle piante di interesse agrario.

A livello globale i progetti si possono dividere in svariati i filoni di ricerca, tenendo presente che le tecnologie sono in rapida evoluzione e dunque è possibile che le applicazioni aumenteranno:

1. Introduzione di caratteristiche favorevoli presenti in alcune varietà coltivate, ad es. la maggiore conservabilità dei prodotti o la resistenza ai parassiti, ma assenti in altre varietà tradizionali molto apprezzate per altre caratteristiche. Questo permette di evitare due problemi del miglioramento genetico classico tramite incroci: i tempi lunghi e/o la perdita dell'identità genetica delle varietà tradizionali.
2. Eliminazione di caratteristiche negative per la produzione o per l'alimentazione ma difficili o impossibili da eliminare tramite miglioramento genetico classico, ad esempio l'allergenicità.
3. Neo-domesticazione. Con questo termine si indica l'introduzione, in specie selvatiche, di mutazioni caratteristiche delle piante coltivate, che determinano, ad esempio, l'aumento della grandezza e del numero dei frutti, o la ritenzione dei semi maturi nella spiga. In tal modo specie selvatiche possono diventare economicamente coltivabili e aumentare la biodiversità coltivata fornendo prodotti con caratteristiche migliori per sapore, contenuto di sostanze nutritive, tolleranza a condizioni ambientali avverse, resistenza a particolari patogeni, ecc.
4. *Rewilding* delle specie coltivate. Consiste nella reintroduzione nelle piante coltivate di caratteri che sono andati persi durante la storia del miglioramento genetico, in particolare la tolleranza a stress ambientali. Sostanzialmente, si tratta del reciproco della neodomesticazione. Utilizzando le informazioni sui geni e le mutazioni coinvolte nell'espressione di questi caratteri nelle specie selvatiche imparentate, il genome editing consente di reintrodurre nelle specie coltivate, rapidamente e in maniera mirata, i caratteri di rusticità desiderati, preservando le caratteristiche utili per la coltivazione. Ciò è particolarmente importante in uno scenario di rapidi cambiamenti climatici, con conseguente comparsa di nuovi stress per le colture tradizionali.

Il quadro della ricerca in Italia

Di seguito riportiamo esempi sintetici di progetti di *genome editing* in atto nelle istituzioni pubbliche di ricerca italiane. Ricordiamo anche che l'editing è una tecnologia relativamente semplice, che non richiede grandi investimenti e quindi ideale per essere adeguatamente sfruttata sia dalla ricerca pubblica che dalle piccole imprese sementiere e vivaistiche che caratterizzano l'agricoltura italiana. Tali motivi inducono molti analisti a ritenere che il *genome editing* possa offrire notevoli opportunità per la creazione di *startup* innovative di cui tanto bisogno ha il nostro Paese.

Specie: Pomodoro

Solanum lycopersicum L.

CREA, Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo
Pontecagnano Faiano (SA)

Carattere ricercato

Resistenza a piante parassite (orobanche)



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Il pomodoro appartiene alla famiglia delle Solanacee ed è una specie molto importante per il *Made in Italy* agroalimentare, usato come prodotto fresco, coltivato in serra e in pieno campo, e per la trasformazione industriale, coltivato generalmente in pieno campo. Sono presenti moltissime varietà con svariate caratteristiche agronomiche della pianta e frutti con forme, colori e aspetti qualitativi diversi. Per la specie coltivata e quelle affini, sono inoltre disponibili considerevoli informazioni genetiche e genomiche che facilitano l'applicazione delle nuove tecnologie di miglioramento genetico.

Alcune specie di piante parassite appartenenti ai generi *Orobanche spp.* e *Phelipanche spp.* attaccano piante di interesse agrario. In pomodoro, la specie *Phelipanche ramosa* causa notevoli danni e nuove infestazioni stanno emergendo nei Paesi Europei (Francia, Spagna, Regno Unito, Italia). Il controllo chimico (es. trattamenti erbicidi nel terreno) e agronomico (rotazioni o allelopatia) dei parassiti è estremamente difficile per il fatto che i semi di queste specie parassite rimangono vitali nel terreno per oltre 15 anni; inoltre non sono note resistenze naturali in pomodoro o specie compatibili. Il danno per il pomodoro è intorno a decine di milioni di euro all'anno negli ultimi anni.

Strategia e stato attuale del progetto

L'attività di ricerca in corso si pone come obiettivo quello di utilizzare le tecniche di genome editing per creare piante di pomodoro in cui il corretto riconoscimento parassita-ospite sia bloccato per prevenire l'instaurarsi del parassitismo. Gli obiettivi ultimi della ricerca sono quindi l'aumento della potenzialità produttiva e la riduzione dell'uso di fitofarmaci

Nessuna varietà commerciale di pomodoro presenta il carattere di resistenza alle specie parassite. L'introduzione di tale resistenza in varietà commerciali presenterebbe quindi ovvi vantaggi in termini agronomici (coltivare terreni infestati prima abbandonati), economici (nessuna perdita produttiva, minori interventi agronomici e quindi riduzione dei costi) e ambientali.

Sono stati ottenuti i primi germogli da cui si otterranno piante che saranno sottoposte ad analisi genetica per verificare la presenza delle mutazioni nei geni desiderati. In caso positivo, verranno cercati nella generazione successiva individui con le mutazioni ma senza costruito transgenico.

Specie: Pomodoro

Solanum lycopersicum L.

CREA, Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo
Pontecagnano Faiano (SA)

CNR - Istituto di BioScienze e Biorisorse, Portici (NA)

Carattere ricercato

Tolleranza a stress da eccesso di sale nel terreno



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Condizioni ambientali sfavorevoli, quali ridotta disponibilità idrica, alta concentrazione di sale nel suolo e alte temperature, comportano spesso una riduzione della crescita e dello sviluppo. Nelle specie coltivate, tra cui il pomodoro, queste condizioni determinano una grave riduzione della produttività. Le piante rispondono normalmente allo stress modificando l'espressione dei propri geni, anche se non sempre l'attivazione è sufficientemente veloce da conferire resistenza. Scopo del progetto in questo caso è attivare le risposte naturali della pianta alle condizioni ambientali avverse utilizzando il genome editing, per ottenere piante più resistenti.

Strategia e stato attuale del progetto

L'aminoacido prolina agisce da osmoprotettore, per cui la modulazione del suo contenuto intracellulare è importante per prevenire lo stress osmotico. Mediante tecniche di genome editing in geni che controllano il catabolismo della prolina verrà inibita la sua degradazione e quindi favorito l'accumulo.

Sono stati ottenuti i costrutti per il genome editing ed essi sono stati utilizzati in esperimenti pilota per verificare la loro efficienza per l'induzione di mutazioni. Gli esperimenti per la produzione di germogli "editati" sono in corso e nella generazione successiva saranno selezionati individui con le mutazioni desiderate ma senza il costrutto transgenico utilizzato per la loro induzione.

Specie: Pomodoro

Solanum lycopersicum

CREA - Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo,
Monsampolo del Tronto (AP)

CREA - Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo,
Pontecagnano Faiano (SA)



Carattere ricercato

Aumento del grado Brix (zuccheri solubili) e della conservabilità dei frutti

Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Una delle principali sfide del miglioramento genetico del pomodoro è il miglioramento della qualità del frutto. Il grado Brix, o contenuto di Solidi Solubili, determinato principalmente dal contenuto in glucosio e fruttosio, è uno dei principali parametri qualitativi. L'ottenimento di varietà di pomodoro, destinate al mercato fresco o all'industria, aventi un elevato grado Brix rappresenta un risultato di grande importanza sia dal punto di vista economico, in quanto aumenta il valore commerciale del prodotto, sia qualitativo. L'elevato grado Brix è, infatti, anche espressione di un alto contenuto in sostanze aromatiche, un migliore contenuto vitaminico e una maggiore conservabilità del prodotto. L'impiego di tipologie di pomodoro espressione del territorio e della tipicità italiana rappresenta inoltre un valore aggiunto di fondamentale importanza sia per il miglioramento genetico sia per la valorizzazione del germoplasma di pomodoro.

Strategia e stato attuale del progetto

In specie selvatiche affini al pomodoro coltivato è stata identificata una mutazione in un gene che codifica per l'enzima invertasi che scompone il saccarosio in glucosio e fruttosio. In questo progetto ci si propone di applicare le tecniche di genome editing in pomodoro per riprodurre la mutazione in diversi genotipi di pomodoro da mensa e da industria, al fine di aumentare il contenuto in solidi solubili e quindi il grado Brix.

Sono perciò in corso gli esperimenti per riprodurre, mediante tecniche di gene editing, direttamente la mutazione nel gene presente nel pomodoro coltivato.

Specie: Frumento duro

Triticum durum

CREA-Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), sede di Foggia

Carattere ricercato

Riduzione dell'intolleranza al glutine



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Il frumento duro è la prima coltura erbacea d'Italia in termini di superficie coltivata. Le filiere agroindustriali generate dal frumento duro sono tra le più importanti del nostro Paese e, fra queste, la filiera della pasta genera un'importante voce di export alimentare. Insieme al pane, la pasta rappresenta uno dei principali prodotti alimentari contenenti glutine, un complesso di proteine, gliadine e glutenine, che conferisce agli impasti a base di farine e semole le caratteristiche proprietà visco-elastiche. In pazienti predisposti geneticamente, porzioni tossiche (epitopi) presenti nella frazione proteica del glutine rappresentata dalle gliadine sono in grado di innescare una reazione autoimmune tipica della celiachia, che induce gravi danni alla mucosa intestinale e che scatena sintomi sistemici tra cui problemi alla pelle, al fegato, al cervello, al cuore e ad altri organi. La celiachia è una delle malattie croniche più diffuse al mondo. L'unica strategia attualmente messa in atto per contrastare gli effetti nocivi di questa malattia consiste nella somministrazione di alimenti privi di glutine.

Gli approcci di miglioramento genetico per risolvere questo problema hanno finora riguardato principalmente il frumento tenero e sono stati finalizzati a disattivare i geni codificanti per alcune classi di gliadine in modo da impedire la sintesi delle corrispondenti proteine e di ridurre così la quantità di epitopi tossici. In alcuni casi questi approcci hanno consentito di abbassare l'indice di glutine e, quindi, il grado di tossicità degli sfarinati. Esso tuttavia resta ancora troppo elevato perché questi sfarinati si possano considerare idonei al consumo da parte di pazienti celiaci.

Strategia e stato attuale del progetto

Abbiamo isolato un gene che codifica per una w-secalina, una proteina di segale analoga alle gliadine del frumento, che contiene una porzione (il decapeptide costituito dagli aminoacidi QQPQRPPQPF) in grado di impedire, in biopsie intestinali di pazienti celiaci, l'attivazione della risposta immunitaria indotta dagli epitopi tossici delle gliadine. L'introduzione di questo decapeptide protettivo nei geni codificanti per le gliadine di frumento duro potrebbe offrire nuove strategie contro la celiachia.

Nell'ambito del progetto Wh-ITALY, è in atto una strategia di genome editing finalizzata a convertire alcuni degli epitopi tossici presenti nei geni endogeni delle gliadine del frumento duro in peptidi protettivi. Ciò al fine di raggiungere, nella frazione gliadinica, un rapporto tra numero di peptidi protettivi e numero di epitopi tossici tale da ottenere un'azione antagonista in grado di proteggere la mucosa intestinale dall'azione tossica della stessa frazione gliadinica. Recentemente il genoma di frumento duro è stato sequenziato in un progetto internazionale a guida Italiana e le sequenze dei geni codificanti per le gliadine sono note. Grazie a ciò sono stati avviati gli esperimenti finalizzati a modificare in maniera mirata questi geni mediante l'approccio di genome editing CRISPR/Cas9 al fine di ottenere nuovi genotipi di frumento duro caratterizzati da un glutine con elevate proprietà tecnologiche e bassa tossicità.

Specie: Orzo e Frumento duro

Hordeum vulgare

Triticum durum



Centro di Ricerca per la Genomica e la Bioinformatica
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria

Carattere ricercato

Incremento della produttività e della qualità

Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

L'orzo e il frumento sono tra le specie maggiormente coltivate al mondo. La domesticazione di queste specie è iniziata 10.000 anni fa nella Mezzaluna Fertile. Millenni di miglioramento ad opera dell'uomo hanno fatto sì che le varietà che coltiviamo al fine di produrre cibo abbiano caratteristiche differenti rispetto ai progenitori tali da rendere orzo e frumento tra i cereali fondamentali nella dieta di molte popolazioni. In particolare, il frumento duro rappresenta uno dei simboli del *Made in Italy*, e l'Italia ne è un importante produttore a livello globale, seppur non autosufficiente.

Nel 2019 l'estensione della superficie italiana coltivata a frumento duro è diminuita e si prevede un ulteriore calo di produttività causato da stress biotici e abiotici (patogeni e condizioni ambientali avverse). Un ulteriore aspetto che vincola il nostro Paese all'importazione è la necessità di utilizzare frumento duro di buona qualità nell'industria pastaia.

Strategia e stato attuale del progetto

L'obiettivo principale del progetto prevede di incrementare resa e qualità nel frumento duro. Si tratta di un obiettivo ambizioso in cui si attendono risultati intermedi a breve termine e risultati definitivi a lungo termine. Sono state quindi attuate diverse strategie che permettessero di operare su più livelli.

In questo progetto, l'orzo è stato scelto come specie modello in cui indagare e dissezionare i meccanismi molecolari che regolano il riempimento del seme durante le fasi precoci della maturazione. L'orzo è infatti una specie con un genoma più piccolo e più semplice da manipolare rispetto a frumento. Grazie alla disponibilità della sequenza del genoma di orzo, è stato possibile identificare i membri di una delle famiglie geniche che regolano il trasporto degli zuccheri nel seme. La tecnologia CRISPR/Cas9 ci ha quindi permesso di inattivarli per capire come funzionano. Questo risultato rappresenta uno dei risultati intermedi della ricerca di base e serve a capire come funziona un gene nel sistema pianta e come quindi modularne l'attività per aumentare la performance della pianta durante la crescita.

Parallelamente alla ricerca nella specie modello, il progetto sta operando direttamente sul frumento duro. Sono stati selezionati geni già studiati nel riso che agiscono come freni molecolari durante le fasi di determinazione del numero di semi e della dimensione del seme. Anche in questo caso si sta sfruttando la tecnologia CRISPR/Cas9 per ridurre l'attività di alcuni dei geni, rilasciando così i freni molecolari che limitano alcune fasi dell'accrescimento.

Specie: Vite

Vitis vinifera

Università degli studi di Verona

CREA Conegliano Veneto

Università degli studi di Udine

Fondazione Mach

Caratteristica desiderata

Resistenza a peronospora ed oidio



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

La vite europea (*Vitis vinifera sativa*) appartiene al genere *Vitis*, famiglia delle Vitaceae, è la specie frutticola più coltivata al mondo. I suoi frutti, chiamati bacche, vengono raccolti principalmente per la vinificazione (68%) ma anche per fornire uva da tavola fresca (30%), uvetta (2%) e prodotti minori, come succo d'uva, gelatina, etanolo, aceto, olio di semi d'uva, acido tartarico e fertilizzanti. L'Italia, insieme a Francia e Spagna, è tra i principali paesi produttori di vino e uva da tavola al mondo. L'Italia, con i suoi 350 vitigni locali, possiede il più ampio patrimonio genetico di *Vitis vinifera*, da cui si ricava una produzione molto differenziata e tipica. Nel 2007 la decifrazione del suo genoma ha aperto la strada per la applicazione delle nuove tecniche di miglioramento

L'oidio e la peronospora sono i maggiori patogeni fungini che attaccano la vite. Le vigne coprono solo il 3% della superficie agricola dell'Unione europea, ma sono responsabili per il 65% del consumo di prodotti antifungini, principalmente contro oidio e peronospora. I trattamenti presentano un costo e un danno ambientale, oltre che un aggravio per gli agricoltori in termini di tempo.

Strategia e stato attuale del progetto

Mediante genome editing si ottengono mutazioni specifiche nella sequenza di una serie di geni responsabili della sensibilità della vite ai due patogeni fungini, producendo così la pianta di vite insensibile alla malattia. Risultati simili sono impossibili da ottenere attraverso tecniche di incrocio e selezione. L'obiettivo è quello di produrre le varietà elite, costituenti il nostro patrimonio genetico, immuni da malattie fungine e rendere la viticoltura più sostenibile sia dal punto di vista ambientale che da quello economico.

Sono stati identificati i geni e messe a punto le condizioni sperimentali per operare sulle varietà di viti locali attraverso alcune metodologie disponibili solo presso i laboratori italiani

Specie: Vite

Vitis vinifera – Varietà da tavola

Università degli studi di Verona

CREA Conegliano Veneto

Università degli studi di Udine

Fondazione Mach

Caratteristica desiderata

Uve da tavola apirene (senza semi)



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Le varietà di vite apirene sono apprezzate dai consumatori e per questo hanno un valore di mercato superiore. Le varietà apirene sono quasi solamente americane, spagnole e israeliane, su cui gli italiani pagano royalties.

Riprodurre il carattere in varietà italiane (come ad esempio l'uva Italia, prodotto tipico e orgoglio italiano, ma che possiede semi di grosse dimensioni) sarebbe una grande opportunità per espandere il loro mercato. Dal punto di vista genetico è già conosciuto il gene (un fattore di trascrizione) che regola la formazione del seme. Mutazioni in questo gene bloccherebbero lo sviluppo del seme rendendo la varietà apirena.

Strategia e stato attuale del progetto

I costrutti genici per la mutazione del gene citato sono in fase avanzata di preparazione. Le piante mutate ottenute entreranno in produzione entro i tre anni successivi. La durata del procedimento è simile a quella richiesta con un incrocio tra varietà con semi e senza semi, tuttavia utilizzando il genome editing si mantiene l'identità della varietà, il che è impossibile con i metodi di miglioramento genetico convenzionali.

Specie: Riso

Oryza sativa ssp. *japonica*

Dipartimento di Bioscienze
Università degli Studi di Milano

Carattere ricercato

Ottimizzazione del tempo di fioritura per l'agricoltura italiana



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Il riso (*Oryza sativa*) è uno dei grandi attori della storia dell'agricoltura mondiale. Si è diffuso come alimento fondamentale prima in Asia e poi nel resto del mondo: oggi il riso è superato solo dalla canna da zucchero e dal mais in termini di produzione globale. Per ragioni storiche, ambientali e culturali, i grandi produttori globali di riso si trovano in Asia, ma l'Italia è il primo produttore europeo e uno dei primi dieci esportatori mondiali e la qualità delle varietà coltivate in Italia è famosa nel mondo.

Il riso è stato domesticato nelle aree tropicali dell'Asia orientale, in climi caldi nei quali l'assenza di una stagione veramente fredda consente un ciclo di coltivazione lungo. Fra le innumerevoli varietà di riso coltivate nelle aree tropicali e subtropicali si trovano caratteristiche di grande interesse agronomico anche per l'Italia, fra cui la resistenza ad alcuni patogeni fungini, l'aroma (ad esempio nei risi Basmati) e la produttività.

In Italia, il riso è soprattutto coltivato nel nord, in regioni con clima continentale, nel periodo caldo di maggio-settembre. Le varietà coltivate in Italia da secoli hanno accumulato mutazioni che ne anticipano la fioritura consentendo la produzione di seme nei nostri ambienti. Il risultato è che, quando coltivate in Italia, le varietà tropicali, che non hanno tali mutazioni, sono spesso molto poco produttive perché hanno un ciclo culturale troppo lungo: quando il seme si sta ancora sviluppando, i primi freddi autunnali impediscono la maturazione.

La maggior parte dei geni che regolano il periodo di fioritura è ora conosciuta. Le mutazioni di tali geni accelerano o ritardano l'inizio della fioritura.

Strategia e stato attuale del progetto

Un obiettivo principale è adattare velocemente varietà tropicali pregiate alla coltivazione nei nostri climi, accelerandone la fioritura e quindi accorciando il ciclo culturale, aumentando in tal modo la biodiversità a disposizione degli agricoltori italiani, anche per lo sviluppo di nuove varietà. Un secondo obiettivo è ritardare la fioritura in varietà pregiate (nostrane o tropicali) per aumentarne la produttività in climi caldi.

Sono già state identificate mutazioni naturali o indotte in passato tramite mutagenesi casuale (chimica o per radiazioni ad alta energia) in geni che regolano la fioritura. Alcune di queste mutazioni sono state identificate in varietà commerciali italiane. L'introduzione di tali mutazioni in altre varietà di interesse, italiane o tropicali è in corso tramite tecnologie CRISPR/Cas9 di genome editing.

I mutanti di uno dei geni sono già disponibili e sono in sperimentazione in serra e potrebbero essere provati in campo fin dalla stagione 2019. Piante mutanti di prima generazione per un altro gene sono al momento in serra. Infine, per un terzo gene, i costrutti per l'editing sono pronti per essere inseriti in varietà tropicali di tipo aromatico per accelerarne fioritura e ciclo.

Specie: Camelina

Camelina sativa

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)
Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria
Milano

Carattere ricercato

Riduzione di composti antinutrizionali nei mangimi



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Camelina sativa è una oleaginosa appartenente alla famiglia delle *Brassicaceae*, la stessa famiglia della colza. È una pianta in grado di adattarsi a diversi ambienti e di crescere in terreni marginali e poco fertili. Camelina ha un seme ricco in olio (35-40%) composto principalmente da omega-3 e proteine (20-25%) di buona qualità. Fino al 1940 camelina è stata ampiamente coltivata in diversi paesi dell'Europa, ma in seguito abbandonata a favore di specie più redditizie. L'interesse per camelina è però in rapido aumento, per i bassi input agronomici necessari alla sua coltivazione rispetto ad altre oleaginose e il suo utilizzo, sia per la produzione di biocarburanti sia per il settore zootecnico nella preparazione dei mangimi. In particolare, l'introduzione nella dieta delle galline ovaiole permette di aumentare il contenuto in Omega-3 e composti antiossidanti nelle uova.

Alcuni studi recenti stanno dimostrando che l'inserimento di pannello di camelina nei mangimi, attualmente ammesso per il 10%, potrebbe essere portato al 20% ed oltre se si riuscisse a ridurre il contenuto dei glucosinolati (composti antinutrizionali il cui catabolismo produce metaboliti tossici) presenti nei semi. La riduzione del contenuto in glucosinolati mediante miglioramento genetico classico (per incroci fra diverse varietà) è piuttosto complicato e lungo. Infatti la via biosintetica dei glucosinolati è molto complessa (sono coinvolti più di 50 geni diversi) e non è facile trovare tipi di camelina con basso contenuto di glucosinolati.

Strategia e stato attuale del progetto

I geni responsabili del trasporto di sostanze dalle foglie al seme possono essere utili per ridurre la presenza di fattori antinutrizionali nei semi. In particolare, l'inattivazione di un gene identificato nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* riduce fortemente l'accumulo dei glucosinolati nel seme di *Arabidopsis*.

Camelina è una pianta alloesaploide, e quindi possiede sei copie del gene in questione, che devono essere inattivate contemporaneamente: un risultato molto difficile da ottenere, ma reso molto più facile utilizzando genome editing mediante CRISPR/Cas9. Utilizzando questa tecnologia, dopo diversi cicli di screening sono state individuate piante che mostrano l'inattivazione di tutte e sei le copie del gene. I semi saranno ora analizzati per valutare il contenuto in glucosinolati.

GENETICA Le nuove tecniche (Nbt) hanno potenzialità enormi

di Teodoro Cardì¹, Luigi Cattivelli², Alessandra Gentile³, Michele Pisante⁴

Per rigenerare l'agricoltura serve il genome editing

L'innovazione non va fermata per legge. E i pregiudizi vanno superati. Anche il settore primario italiano potrebbe giovarsene

È di questi giorni la pubblicazione di tre articoli scientifici che hanno avuto una vasta eco sulla stampa. Sulla rivista *Nature Biotechnology*, Zsögön *et al.* e Li *et al.* hanno utilizzato la tecnologia del **genome editing** per indurre mutazioni mirate in alcuni geni coinvolti nel processo di domesticazione in pomodoro. Durante la domesticazione delle specie coltivate, infatti, molti caratteri tipici dei progenitori selvatici sono stati oggetto di mutazioni spontanee successivamente selezionate da parte degli agricoltori. I geni che a seguito di mutazioni hanno trasformato specie selvatiche in

specie coltivate, sono comuni a molte delle piante usate nella moderna agricoltura e sono spesso indicati collettivamente come "**domestication syndrome**". La specie selvatica *Solanum pimpinellifolium*, imparentata con il pomodoro coltivato, presenta molte caratteristiche utili (tolleranza a salinità, resistenza a malattie, alto contenuto di sostanze ad elevato valore nutrizionale e organolettico), ma ha frutti molto piccoli, bassa produttività, sensibilità al fotoperiodo e altre caratteristiche agronomiche non compatibili con la sua coltivazione diretta.

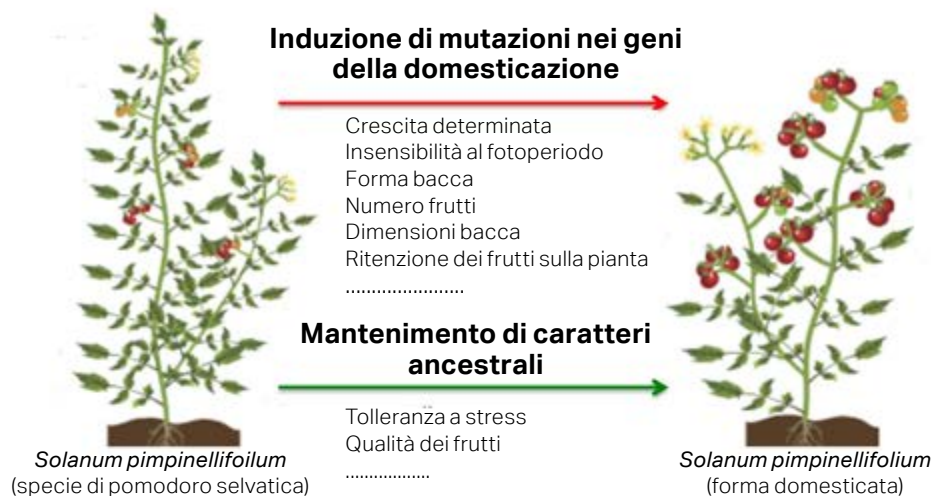
Mutazioni positive

Con un approccio chiamato **de novo domestication**, gli autori hanno indotto nella specie selvatica le stesse mutazioni responsabili, nel corso dell'evoluzione, della comparsa dei caratteri agronomicamente utili in quella coltivata, ottenendo in una sola generazione piante che presentavano frutti più grandi e qualitativamente migliori, nonché tolleranza a diversi stress. Sulla base delle conoscenze dei geni coinvolti nella domesticazione delle piante coltivate, lo stesso approccio può da subito essere impiegato per altre colture d'interesse agrario, oppure in specie con caratteristiche potenzialmente utili, ma con altre che non ne rendono possibile la coltivazione.

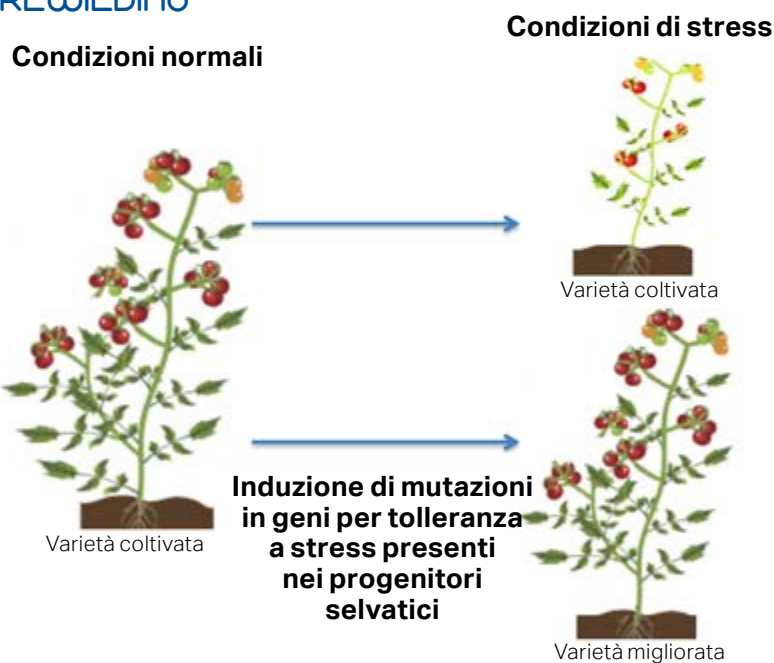
Nel terzo lavoro, pubblicato su *Nature Plants*, Lemmon e collaboratori hanno applicato, utilizzando le conoscenze genomiche del pomodoro, il **genome editing** per aumentare la grandezza dei frutti e il numero di fiori, modificare la forma della pianta e introdurre altre caratteristiche desiderate nella specie *Physalis pruinosa*, anch'essa appartenente alle Solanacee, rendendola



A. DOMESTICAZIONE DE NOVO



B. REWILDING



C. CORREZIONE DI DIFETTI



fig. 1 Applicazione del genome editing per:
 A. Rendere coltivabili le specie selvatiche imparentate alle coltivate
 B. Re-introdurre nelle specie coltivate le mutazioni per tolleranza a stress presenti nei progenitori selvatici
 C. Correggere in maniera mirata i difetti presenti nelle varietà tradizionali.
 Modificata da Li et al. 2018
 doi:10.1038/nbt.4273

UN GLOSSARIO DA CONOSCERE

De novo domestication

Domesticazione indotta nelle specie selvatiche imparentate a quelle coltivate, attraverso l'induzione mirata di mutazioni nei geni che regolano i caratteri che distinguono le forme selvatiche da quelle coltivate (es dimensione del frutto/seme, perdita della capacità di disperdere i semi). Come risultato, in alcuni casi le specie selvatiche possono anch'esse essere coltivate come tali.

Domesticazione. Processo regolato dall'uomo che ha portato nel tempo alla selezione di piante adatte alla coltivazione per l'alimentazione e altri usi.

Fenotipo

Il complesso delle caratteristiche visibili e misurabili di un organismo, prodotto dall'interazione dei geni tra loro e con l'ambiente.

Genoma

Insieme dei geni e dell'informazione genetica funzionale di un organismo.

Genome editing

Insieme di tecnologie che consentono, sulla base delle conoscenze del genoma, di indurre mutazioni mirate simili a quelle che avvengono spontaneamente in natura.

Rewilding

Letteralmente "rinselvatichimento", processo inverso alla "domesticazione". Attraverso il trasferimento o l'induzione mirata di mutazioni nei geni che codificano per tolleranza a stress o altri caratteri presenti nelle specie selvatiche imparentate a quelle coltivate, si rendono queste ultime più rustiche e capaci di sopravvivere e produrre in condizioni sfavorevoli.

Rigenerazione in vitro

Tecniche diverse che consentono, partendo da frammenti di tessuti vegetali e su substrati con composizione definita, la produzione di nuove piantine.

così più idonea alla coltivazione.

I risultati dei tre lavori citati sono difficilmente ottenibili con le tecniche convenzionali di miglioramento genetico basate su incroci ripetuti e la selezione delle piante migliori.

Rewilding delle specie coltivate

Ma le tecniche di *genome editing* (fig. 1) possono essere usate anche per il *rewilding* delle specie coltivate, cioè per reintrodurre in esse quei caratteri non selezionati dagli agricoltori che sono andati persi durante la domesticazione, essendo non più utili in ambienti di coltivazione ad alto *input*, come la tolleranza a stress abiotici e biotici. Utilizzando le informazioni sui geni e le mutazioni coinvolte nell'espressione di questi caratteri nelle specie selvatiche imparentate, le nuove tecniche di miglioramento genetico (Npbt) consentono di reintrodurre nelle specie coltivate, rapidamente e in maniera mirata, i caratteri di rusticità desiderati, preservando le caratteristiche utili per la coltivazione. Ciò è particolarmente importante in uno scenario di rapidi cambiamenti climatici, con conseguente comparsa di nuovi stress per le colture tradizionali.

Oltre che attraverso gli approcci finalizzati alla *de novo domestication* o al *rewilding*, le tecniche per il *genome editing* hanno un'enorme potenzialità per valorizzare anche la diversità genetica presente nelle risorse genetiche locali, consentendo di correggere in maniera mirata i difetti presenti in ecotipi e varietà locali, spesso responsabili del loro abbandono da parte degli agricoltori, con interventi genetici simili a quelli che avvengono naturalmente e limitati, lasciando quindi inalterata la totalità del genoma e le caratteristiche fenotipiche di pregio.

Nuove prospettive

La possibilità di intervenire in maniera rapida e precisa sulle specie d'interesse agrario apre molte prospettive per una produzione agricola attenta alla salvaguardia delle risorse naturali e più in generale alla tutela dell'ambiente e alla bellezza del paesaggio, in grado di aumentare la produttività e la sostenibilità delle filiere agroalimentari, soprattutto in considerazione dei cambiamenti climatici in atto e della diversificazione dei gusti e delle abitudini alimentari. Oltre che per l'agricoltura convenzionale, l'adozione delle nuove tecnologie potrebbe avere un impatto positivo su quella biolo-

gica, che soffre di un deficit produttivo e della mancanza di varietà adatte a coltivazioni con basso *input*. Su questa possibilità si è aperto un vasto dibattito con opinioni contrastanti, sebbene le recenti posizioni di chiusura delle associazioni di agricoltura biologica non solo verso le nuove tecnologie, ma anche verso quelle più tradizionali integrate da anni nel miglioramento genetico, potrebbero procrastinare il superamento del regime in deroga per l'utilizzazione delle sementi.

Supporto alla sicurezza

Le nuove tecnologie di miglioramento genetico, in particolare quelle per il *genome editing* basate su Crispr/Cas, possono avere molteplici applicazioni con risvolti positivi sulla qualità delle produzioni alimentari, la sostenibilità dei sistemi colturali, la sicurezza per i consumatori.

Tale sviluppo deve basarsi sull'acquisizione di conoscenze e lo sviluppo di strumenti genomici e biotecnologici, tra cui protocolli efficienti di rigenerazione *in vitro*, in specie e varietà diverse. Il nostro Paese ha investito molto negli ultimi anni nel sequenziamento dei genomi di diverse specie d'interesse agrario tipiche del *made in Italy* e adesso potrebbe raccogliere i frutti, con effetti positivi per la ricerca, per lo sviluppo delle imprese sementiere e vivaistiche nazionali, per gli agricoltori, che potrebbero avvantaggiarsi per primi di una tecnologia relativamente semplice ed economica e dei prodotti da essa derivati. È quindi altamente auspicabile che la ricerca in questo settore venga adeguatamente sostenuta, consentendo, nel rispetto della normativa vigente e di un approccio basato sulle conoscenze scientifiche, la sperimentazione anche fuori dai laboratori.

Rispetto al passato, infatti, sono disponibili efficienti tecnologie non solo per indurre nuova variabilità genetica in maniera più precisa e prevedibile che nei prodotti da incrocio o mutagenesi tradizionalmente accettati, ma anche per controllare il risultato e le conseguenze di tali interventi.

L'errore della Corte di Giustizia

Di recente, la Corte di Giustizia Europea ha equiparato, al contrario di quanto raccomandato da molti ricercatori ed Accademie scientifiche, gli approcci di *genome editing* a quelli utilizzati per la produzione degli organismi transgenici ai sensi della Direttiva EU 2001/18.

Ciò avrà un effetto negativo sullo svilup-

po commerciale e tecnologico in Europa nel campo dell'innovazione genetica, ma è auspicabile che la ricerca non si fermi.

È altresì auspicabile che la succitata Direttiva, vecchia di quasi vent'anni, sia rivista in modo che la valutazione del prodotto sia preponderante rispetto a quella del processo utilizzato, considerando allo stesso tempo il veloce sviluppo di nuove tecnologie che, come accaduto più volte nella storia, possono far cambiare completamente prospettiva. ■

¹Crea Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pontecagnano Faiano (Sa)

²Crea Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica, Fiorenzuola d'Arda (Pc)

³Università degli Studi di Catania

⁴Università degli Studi di Teramo

PER INFORMAZIONI

Genome editing e De novo domestication

Lemmon et al. 2018 doi.org/10.1038/s41477-018-0259-x

Li et al. 2018 [doi:10.1038/nbt.4273](https://doi.org/10.1038/nbt.4273)

Meyer et al. 2013 [doi:10.1038/nrg3605](https://doi.org/10.1038/nrg3605)

Østerberg et al. 2017 dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.004

Swinnen et al. 2016 dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.014

Zsögön et al. 2017 dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.12.012

Zsögön et al. 2018 [doi:10.1038/nbt.4272](https://doi.org/10.1038/nbt.4272)

Genome editing e Rewilding

Palmgren et al. 2015 dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.003

Genome editing e Risorse genetiche locali

Cardi 2016 [doi:10.1111/pbr.12345](https://doi.org/10.1111/pbr.12345)

Genome editing e Agricoltura biologica

Andersen et al. 2015 dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.011

Ryffel [doi:10.3390/su9030392](https://doi.org/10.3390/su9030392)

www.ask-force.org/web/Organotransgenic/Maurin-Niglli-CRISPR-Great-Potential-TAZ-20160406.pdf

www.iFoam.bio/sites/default/files/position_paper_v01_web_0.pdf

Sentenza Corte di Giustizia Europea

terroevita.edagricole.it/featured/genome-editing-tutti-sconfitti-dalla-sentenza-ue/

www.informatoreagrarario.it/2018/08/29/ogm-non-ogm-danni-sentenza/

La posizione delle società scientifiche

di **Gennaro Ciliberto¹, Marco Marchetti², Mario Pezzotti³, Andrea Schubert⁴**



Gli scienziati europei si uniscono a proteggere l'utilizzo del miglioramento genetico di precisione per un'agricoltura sostenibile. Autorevoli scienziati di più di 75 centri e istituti europei attivi nella ricerca sulle piante e le scienze della vita, tra cui anche la Federazione Italiana Scienze della Vita (www.fisv.org) e l'Associazione Italiana Società Scientifiche Agrarie (www.aissa.it) hanno sottoscritto un documento che chiede con urgenza ai responsabili politici europei di salvaguardare l'innovazione in agricoltura e biologia vegetale.

Il documento è di pubblico accesso qui: <http://www.vib.be/en/news/Pages/European-scientists-unite-to-safeguard-precision-breeding-for-sustainable-agriculture.aspx> ed è aperto ad ulteriori adesioni.

Gli scienziati di Austria, Belgio, Bulgaria, Cipro, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Italia, Lituania, Olanda, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Repubblica Ceca, Slovacchia, Spagna, Svezia e Ungheria sono profondamente sconcertati e preoccupati a seguito della recente decisione della Corte di Giustizia Europea riguardo le tecniche moderne di editing dei genomi, che potrebbe di fatto condurre alla messa al bando delle nuove tecnologie di miglioramento genetico delle piante. Come risultato, gli agricoltori europei sarebbero privati di una nuova ge-

nerazione di varietà vegetali più resistenti ai climi avversi e più nutrienti, necessarie per rispondere alle attuali sfide ecologiche e sociali. Questo documento si affianca alle numerose prese di posizione di singoli Istituti di ricerca che sono apparsi nell'ultimo anno su quest'argomento, a riprova del grande consenso presente nella comunità scientifica accademica e delle conseguenze

negative della decisione della Corte.

Per secoli, il miglioramento dei raccolti è stato ottenuto con le tecnologie tradizionali di incroci e selezioni che hanno cambiato il patrimonio genetico delle piante. Le tecnologie innovative che oggi sono state sviluppate non sono altro che il passo successivo per ottenere ulteriori miglioramenti con efficienza e precisione molto più elevate.

I metodi innovativi di miglioramento genetico sono necessari per affrontare le sfide dei cambiamenti climatici. L'agricoltura nutre il mondo. Il collasso dei sistemi alimentari è uno dei maggiori rischi dei cambiamenti climatici. Il successo dell'agricoltura di domani ha bisogno di raccolti che siano in grado di meglio sopportare rapidi cambiamenti ambientali avversi, quali ad esempio l'estrema siccità che ha recentemente colpito l'Europa. Una delle svolte scientifiche più recenti in questo senso è il miglioramento genetico di precisione basato sull'editing dei genomi. L'editing può adattare i raccolti a ciascuna area coltivata in base ai fattori ambientali specifici di quella regione, e può essere usato per migliorarne il valore nutrizionale e la digeribilità, nonché ridurre il contenuto di componenti anti-nutrizionali e allergeni e l'utilizzo di sostanze chimiche nelle coltivazioni.

I ricercatori europei si uniscono per chiedere di agire. Una regolamentazione molto restrittiva dei metodi innovativi di miglioramento genetico ha molteplici conseguenze. Gli ostacoli legislativi fermeranno l'innovazione europea in agricoltura basata sul miglioramento di precisione, minacciando fortemente il progresso verso un'agricoltura sostenibile, la competitività globale delle varietà di raccolti europee e delle imprese che operano nel miglioramento genetico. L'impatto negativo sulla nostra società e la nostra economia potrebbe essere molto forte.

Per proteggere l'innovazione dell'agricoltura europea, i firmatari del documento chiedono cambiamenti legislativi che usino la scienza come criterio principale per valutare ogni nuova varietà di piante.

Dirk Inzé, Direttore scientifico del Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB, Belgio, www.vib.be) e uno dei promotori del documento ha affermato: "Il sostegno che per quest'iniziativa abbiamo ricevuto da parte degli studiosi delle piante di tutta Europa è stato entusiasmante sin dall'inizio. Ciò mostra l'attuale divisione che minaccia il nostro continente: come autorevoli ricercatori abbiamo il dovere di fornire soluzioni innovative e sostenibili per l'agricoltura, ma siamo bloccati da un sistema di regolamentazioni superato, che non rispetta il progredire delle conoscenze scientifiche. Con la nostra iniziativa speriamo di stimolare nell'Unione Europea decisioni politiche basate sull'evidenza, una linea di condotta cruciale per le nostre vite."

¹Presidente, Federazione Italiana Scienze della Vita

²Presidente, Associazione Italiana Società Scientifiche Agrarie

³Presidente, Società Italiana di Genetica Agraria

⁴Presidente, Società Italiana di Biologia Vegetale



Statement by the Group of Chief Scientific Advisors

A Scientific Perspective on the Regulatory Status of Products Derived from Gene Editing and the Implications for the GMO Directive

On 25 July 2018, the Court of Justice of the European Union ('the Court') decided that organisms obtained by the new techniques of directed mutagenesis are genetically modified organisms (GMOs), within the meaning of the Directive 2001/18/EC on the release of genetically modified organisms into the environment ('GMO Directive')^{1,2}, and that they are subject to the obligations laid down by the GMO Directive.

New techniques of directed mutagenesis include gene editing such as CRISPR/Cas9 methodologies. The legal status of the products of such techniques was uncertain, because it was unclear whether they fell within the scope of the GMO Directive.

These techniques enable the development of a wide range of agricultural applications and the ethical, legal, social and economic issues of their use are discussed intensively. The European Commission's Group of Chief Scientific Advisors (the 'Chief Scientific Advisors')³ recognises the complex nature of these debates, which touch upon people's beliefs, values, and concerns, as well as the underpinning science.

The mandate of the Chief Scientific Advisors is to provide scientific advice to the European Commission. Therefore, following our explanatory note on 'New Techniques in Agricultural

Biotechnology' (SAM, 2017a), we have examined the GMO Directive taking into account current knowledge and scientific evidence.

1. The Ruling of the Court of Justice

On request by the French *Conseil d'État*, the Court was asked to determine whether organisms obtained by mutagenesis⁴ should be considered GMOs and which of those organisms are exempt according to the provisions of the GMO Directive. In particular, the Court was asked to determine whether organisms obtained by new directed mutagenesis techniques are exempt from the obligations imposed by the GMO Directive, as are those obtained by conventional, random mutagenesis techniques that existed before the adoption of the Directive, or are regulated like those obtained by established techniques of genetic modification (ETGM).

The Court declared that organisms produced by directed mutagenesis techniques/methods should be considered GMOs within the meaning of the GMO Directive and subject to the relevant requirements. In this regard, the Court concluded that only organisms obtained by means of techniques/methods of mutagenesis, which have conventionally been used in a number of

¹ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32001L0018>

² <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>

³ <https://ec.europa.eu/research/sam/index.cfm?pg=hlg>

⁴ Mutagenesis encompasses both random mutagenesis and directed mutagenesis. Random mutagenesis is also often referred to as 'conventional mutagenesis' or 'traditional mutagenesis', whereas 'directed mutagenesis', 'site-directed mutagenesis' or 'precision mutagenesis' are often used as synonyms for 'targeted mutagenesis'. The Court used the term 'directed mutagenesis'.

applications and have a long safety record, are exempt. The Court also considered that ‘risks linked to the use of those new techniques/methods of mutagenesis might prove to be similar to those which result from the production and release of a GMO through transgenesis’⁵. The Court further reasoned that these new techniques ‘make it possible to produce genetically modified varieties at a rate and in quantities quite unlike those resulting from the application of conventional methods of random mutagenesis’.

New techniques resulting in directed mutagenesis can alter a DNA sequence precisely at one or more targeted positions in the genome. For an overview of different types of gene editing see our explanatory note on ‘New Techniques in Agricultural Biotechnology’ (SAM, 2017a) including a description of the CRISPR/Cas9 system (Jinek et al., 2012). Random mutagenesis, which has been used extensively in plant breeding since the 1960s (SAM, 2017a), alters an organism’s genome at multiple positions in a non-targeted way by treatment with a chemical mutagen or irradiation. ETGM, which have been used in agriculture since the 1980s, can be used to introduce DNA sequences from other organisms.

The background for the Court ruling was an action brought before the French *Conseil d’État* by the French agricultural union *Confédération Paysanne* together with eight other associations. This action contested the French legislation according to which organisms obtained by mutagenesis are not, in principle, considered as being the result of genetic modification, and asked for a ban on the cultivation

⁵ The term ‘transgenesis’ is often used to refer to the introduction of a gene or genes from a distinct species into a cell or an organism, but can also be interpreted in a broader sense to refer to the introduction of an exogenous gene or genes into cells or organisms leading to the transmission of the input gene (transgene) to successive generations. This can include the introduction of (a) gene(s) from the same or a sexually compatible species. The present statement collectively refers to these techniques as established techniques of genetic modification (ETGM).

and marketing of herbicide-tolerant oilseed rape varieties obtained by mutagenesis. The claimants argued that such herbicide-resistant seed varieties pose a risk to the environment and health.

2. Issues and questions arising from the ruling and the application of the GMO Directive

The GMO Directive states that ‘the regulatory framework for biotechnology should be reviewed so as to identify the feasibility of improving the consistency and efficiency of that framework’ (Recital 63). As detailed below, in view of the Court’s ruling, it becomes evident that new scientific knowledge and recent technical developments have made the GMO Directive no longer fit for purpose. Moreover, the GMO Directive gives rise to more general problems, in particular with regard to the definition of GMOs in the context of naturally occurring mutations, safety considerations, as well as detection and identification.

2.1. Definition of GMOs in the context of naturally occurring mutations

The definition of GMOs contained in the GMO Directive dates back to 1990. According to this definition, a GMO is ‘an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination’.⁶ In the light of current scientific knowledge, it is worth reflecting whether the concept of ‘naturalness’ is useful when deciding on regulatory requirements for organisms with an altered genome.

Mutations occur naturally without human intervention (SAM 2017a). They arise spontaneously

⁶ https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:303dd4fa-07a8-4d20-86a8-0baaf0518d22.0004.02/DOC_1&format=PDF

during cell division or are triggered by environmental factors such as ultraviolet light or viral infections, and can be either neutral, harmful or confer a competitive advantage to the organism. This is the underlying mechanism of natural evolution. From the time of the adoption of the GMO Directive until now, owing to progress in analytical methods, extensive scientific evidence has been accumulated on spontaneously occurring genetic alterations. These include point mutations (changes within a single letter in the genomic DNA), insertions, deletions and rearrangements of the genome, as well as the acquisition of exogenous genetic material across species or even kingdoms (e.g. (Kyndt et al., 2015)). Therefore, if referred to in the legislation, the concept of ‘naturalness’ should be based on current scientific evidence of what indeed occurs naturally, without any human intervention, in organisms and in their DNA.

2.2 Safety considerations

Changes introduced by random mutagenesis are usually more drastic than those resulting from gene editing techniques, and include not only numerous point mutations, but also deletions and major rearrangements of genome fragments. The resulting mutant organisms (in this case plants) require lengthy screening of the organisms’ characteristics to identify the few mutants that carry a novel desirable feature and do not present any unwanted features. Despite this lengthy screening process, the ultimately selected end products are likely to carry additional mutations beyond the ones resulting in the desired trait, each of which can be considered to be an ‘unintended effect’⁷. Such unintended effects

⁷ As explained on page 32 of the Explanatory Note on ‘New Techniques in Agricultural Biotechnology’ (SAM, 2017a) two different types of unintended effects can occur during breeding: (1) unintended changes and (2) unintended effects of the intended changes. Random mutagenesis results in numerous unintended changes. In the case of gene editing, the unintended changes are often referred to as ‘off-target effects’.

can be harmful, neutral or beneficial with respect to the final product.

In 2001, when the Directive 2001/18/EC was adopted, gene editing technologies were not yet being applied to agricultural organisms. For example, the CRISPR/Cas9 system was first described only in 2012 (Jinek et al., 2012). Gene editing techniques can produce specific alterations at precise locations in the genome ranging from point mutations through to the targeted deletion or insertion of a gene, of parts of a gene or of other functional DNA sequences. Because of their precision, these gene editing techniques produce fewer unintended effects (Khandagale & Nadaf, 2016; SAM, 2017a) than random mutagenesis techniques. In addition, the end product is better characterised with respect to specific mutation(s) in the targeted position(s).

Because unintended effects will occur less frequently in gene edited products, these products are potentially safer than the products of random mutagenesis⁸. Recently more progress has been made to further increase the efficiency and precision, and thus the safety of the gene-editing techniques (Yin, Gao, & Qiu, 2017).

The Court has argued that new varieties can be produced at a much higher rate and in larger quantities by the directed mutagenesis techniques than by conventional methods of random mutagenesis. Targeted mutagenesis is more efficient than random mutagenesis or other conventional breeding techniques, and can speed up the process of generating desired varieties. However, the greater precision of the directed mutagenesis techniques,

⁸ As emphasised in the explanatory note on ‘New Techniques in Agricultural Biotechnology’ (SAM, 2017a) the frequency of unintended effects does not allow direct conclusions regarding safety to be drawn as unintended effects can be neutral, harmful or beneficial. They therefore need to be assessed case by case. However, the occurrence of unintended effects is often raised in public discussions in relation to concerns about the safety of gene editing products. In general, the precision of the gene editing methods is expected to reduce some sources of unintended effects. Therefore, they have the potential to produce fewer possibly harmful unintended effects at product level.

which enable better control of the product's characteristics, is a much more important factor to consider in safety deliberations than the rate at which products are generated.

In addition, gene editing techniques result in fewer intermediate and unwanted 'varieties' compared to random mutagenesis techniques.

The GMO Directive refers to both the process used in genetic engineering and the product resulting from the use of such techniques (Abbott, 2015), but it is often interpreted as being based only on the production technique rather than the characteristics of the resulting product (Sprink, Eriksson, Schiemann, & Hartung, 2016). An example of this is the consideration of the 'long safety record' of random mutagenesis which is introduced by Recital 17 of the GMO Directive as a criterion for deciding whether products generated with different techniques of genetic modification are exempt from its obligations or not. In scientific terms what is more relevant is, whether or not the products have a long safety record, rather than the techniques used to generate them.

In that context, it is important to recognise that the concerns put forward by the *Confédération Paysanne* about the risk of herbicide resistant seed varieties to the environment and health are not addressed by subjecting organisms produced by directed mutagenesis to the obligations of the GMO Directive. This is because herbicide resistant seed varieties can in principle be produced by all mutagenic procedures including ETGM, new directed mutagenesis techniques, random mutagenesis, as well as other conventional breeding methods. It is not primarily the modified crop that constitutes the potential ecological risk, but rather the use of the herbicide and the overall production system associated with herbicide use (Bioökonomierat, 2018). To answer the question whether herbicide resistant seed varieties constitute a risk to health

and environment, **the features of the final product itself must be examined regardless of the underlying technique used to generate that product.**

As described in our explanatory note (SAM, 2017a), the safety of an organism is determined by multiple factors such as the specific characteristics of the organism, the environment in which it is cultivated, the agricultural practices used, and exposure to human beings and animals rather than by the technique used for its production. Hence, the risks of a product are determined by these factors and therefore logically should be assessed in the same way independently of whether they are produced by conventional breeding techniques, random or directed mutagenesis, or by ETGM. Consequently, the current approach does not properly respect the motivation behind the precautionary principle of ensuring product safety. From the above it follows that the regulatory framework for GMOs should put much more emphasis on the features of the end product, rather than on the production technique. As long as this is not the case, situations can arise where two products are identical, but because of different methods used in their production, they would have to meet completely different regulatory requirements

2.3 Detection and identification issues

The ability of gene editing techniques to precisely introduce mutations identical to those originating spontaneously or through random mutagenesis has important consequences for the detection of gene edited products, as described in our explanatory note (SAM, 2017a). Depending on the mutation type and the context in which it is used, it will be difficult and sometimes impossible for applicants to provide a detection method for gene edited products which will meet regulatory requirements (Casacuberta & Puigdomènech, 2018), for instance in the case of point mutations.

Detection becomes even more difficult when there is no prior knowledge concerning the organism under investigation, whether authorised or not, in particular regarding the introduced genetic changes and/ or a suitable detection method (SAM, 2017a). Competent authorities will be faced with such circumstances, for instance, when organisms arrive on the EU market, which have been authorised under regulatory systems outside the EU with differing regulatory requirements. There can be no analytical approach for detecting and quantifying all possible gene edited products. Therefore it cannot be excluded that products obtained by directed mutagenesis will enter the European market undetected. It will be impossible to identify whether the mutations have occurred spontaneously or were introduced by human intervention, or to attribute them to a specific technique such as random mutagenesis or directed mutagenesis, particularly given that in some cases the final product will be identical to that generated by other procedures (Sprink et al., 2016). However, as mentioned before, the safety of a product is determined by its characteristics and not by the way it was generated. **Therefore, the impossibility of distinguishing between spontaneously occurring mutations and different types of human interventions is a major issue from a regulatory point of view.**

A document, currently under preparation by the European Network of GMO Laboratories together with the European Commission's Joint Research Centre, will look in more detail at the issues related to detection, identification and quantification than we do here.

3. Possible consequences

The ruling of the Court can be expected to have important consequences for European citizens – both consumers and farmers. It may also have impacts on international trade and cooperation with developing countries, and very likely, also on the EU

research and innovation landscape. The consequences need to be analysed and discussed elsewhere, as this statement focusses on scientific issues related to the application of the GMO Directive to the new directed mutagenesis techniques, but we make some comments here to inform those discussions.

In legal terms, products of gene editing can be authorised in the EU according to the GMO Directive. However, meeting the obligations of the GMO Directive implies cost- and labour-intensive pre-market evaluations and a long duration of the approval process, which are difficult and onerous to bear, particularly by small and medium enterprises⁹. This may diminish incentives for investment, negatively affect research and innovation in this field, and limit the commercialisation of gene edited products (Bioökonomierat, 2018; Georges & Ray, 2017).

In addition, the obligations, imposed by the GMO Directive, on traceability and labelling of GMOs entering the European market will be very difficult to implement and control due to issues related to the detection, identification and quantification of gene edited products described above (section 2.3). This will become more difficult when exporting countries start to market varieties that they have already decided not to regulate. An example is the case of gene edited mushrooms developed to have a reduced tendency to brown¹⁰ (Georges & Ray, 2017; Waltz, 2016).

Environmental applications of gene editing technologies could enable novel approaches to conservation, bioremediation, the control of invasive species, and the protection of biodiversity (Shukla-Jones, Friedrichs, & Winickoff, 2018). Hindering EU

⁹ For a description of the length and cost of the regulatory process, see for instance (Bioökonomierat, 2018; Callaway, 2018; Stokstad, 2018).

¹⁰ USDA. Reply to Request for Confirmation that Transgene-Free, CRISPR-Edited Mushroom Is Not a Regulated Article 2016. https://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/15-321-01_air_response_signed.pdf

progress in this field may prevent the use of gene editing technologies for environmental applications as well as for sustainable food production¹¹, including the reduction of food scarcity in developing countries. Lost opportunities could include producing plants with resistance to pests and diseases, reducing the use of pesticides and fertilizers, generating resilience to harsh weather conditions, or enhancing nutrients in foods (Haque et al., 2018; Georges & Ray, 2017; Palmgren et al., 2015). Several gene edited crops and horticultural plants with novel features, such as healthier nutrient composition, are already in development which have the potential to provide immediate direct benefits to the consumer (for an overview of applications of gene editing in crops, vegetables and fruit see e.g. Khandagale & Nadaf, 2016; Modrzejewski, Hartung, Sprink, Krause, & Kohl, 2018; Modrzejewski, Hartung, Sprink, Krause, Kohl, et al., 2018).

It is a concern that countries in the developing world exporting feed and food to the EU might not benefit from gene edited crops if they follow the EU authorisation practices, as some of them currently do. No single breeding technique alone can provide a magic bullet for solving the problem of unsustainable food production and food scarcity in the world. However, gene-editing has the potential to contribute to food security, which is particularly relevant given the growing world population and climate change (Haque et al., 2018; Jones, 2015). In view of the above, we make some proposals regarding the way forward in the following section

4. Further reflections and proposals

There is danger that unless the EU improves the regulatory environment for products of gene-editing, it will be left behind in this field, which could also diminish EU influence on ongoing debates at the international level with respect to specific

applications and regulatory processes. Further research and innovation in this area will help better understanding of possible risks and benefits for society, the environment, agriculture and the economy. There is a need to improve EU GMO legislation to be clear, evidence-based, implementable, proportionate and flexible enough to cope with future advances in science and technology in this area. To achieve this, **we recommend revising the existing GMO Directive to reflect current knowledge and scientific evidence, in particular on gene editing and established techniques of genetic modification.** This should be done **with reference to other legislation relevant to food safety and environmental protection.**

We acknowledge that there are strongly held views in the debate regarding the regulation of GMOs, based on a range of differing underlying values, ethical, legal and social issues, and that may lead to other options being preferred. In this context, it should be noted that the European Commission has requested further guidance by the European Group on Ethics in Science and New Technologies (EGE) on ethical issues raised by such technologies.

Moreover, **it is essential to promote a broad dialogue with relevant stakeholders, and the public at large.** Indeed, we have already urged that a more general inclusive discussion should be initiated on how we want our food to be produced in Europe (SAM, 2017b, 2018). Any change to the existing GMO legislation should make use of new, participatory forms of social dialogue (Bioökonomierat, 2018). In doing so, it is important to take account of the highest possible protection of health and environment and the creation of a favourable regulatory environment for innovation, so that society can benefit from new science and technology.

In addition, we conclude that there is a need for robust and independent evidence to be provided in a systematic and transparent way to the Court when

¹¹ One of the Sustainable Development Goals (SDGs) to which the EU has subscribed

dealing with complex scientific issues. Factors other than scientific evidence are and should be considered in policy-making as well as in jurisdiction. However, when reasons other than scientific evidence inform decision making, such as those based on ethical, legal, social and economic considerations, these should be clearly identified and communicated as such in a transparent way. At the same time, relevant and robust scientific evidence should be provided to inform decision-making and good regulation. This is essential to generate good policy and regulation, to maintain public trust in science, and to reduce the potential reputational risk to the EU, if it appears that the EU is not employing the best scientific evidence to generate good public policy. We stand ready to provide further scientific advice to the European Commission on the subjects outlined above should the College of Commissioners wish to have such advice.

Glossary

CRISPR/Cas9 - the abbreviation for 'clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9'. It is one of the most popular gene editing techniques and is derived from bacteria.

Directed mutagenesis – also referred to as 'targeted' or 'site-directed' or 'precision mutagenesis'; introduces one or several deliberate change(s) in the genome directed at a specific site. Includes gene-editing techniques such as CRISPR/ Cas9.

DNA - Abbreviation for deoxyribonucleic acid. DNA is a biological polymer that constitutes the genetic material of all known organisms, some organelles (including mitochondria and chloroplasts) and some viruses. In cells, DNA usually occurs in the form of a double helix formed by very long complementary strands arranged in an antiparallel way.

End product – In the context of this statement: the final organism obtained by a breeding technique, such as a crop plant as opposed to intermediate products which are obtained as an intermediate step in the production of an end product.

Established Techniques of Genetic Modifications (ETGM) - Techniques for the production of transgenic organisms comprising the introduction of an exogenous gene or genes into cells, which leads to the transmission of the input gene (transgene) to successive generations.

Exogenous – Produced outside of; originating from, or due to, external causes.

Gene editing - also called genome editing, is a group of mutation technologies that allow modification of genetic information by adding, removing, or altering DNA sequences at a specific location in the genome in a targeted way.

Genotype - The genotype corresponds to the DNA sequence of a cell, and therefore of an organism or individual, which determines, together with epigenetic and environmental factors, stable and heritable characteristics (phenotype) specific for that cell/organism/individual.

GMO - is the acronym for Genetically Modified Organism. According to EU legislation, it means an organism, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination.

Off-target mutation - Any change in the genome with respect to a defined wild type, made to a genetic sequence in another location than the desired target. Off target mutations can occur in sequences identical or similar to the target. These mutations can be silent (i.e. cannot be associated with any change in phenotype), either because the DNA sequence affected is in the non-coding part of the genome, or because the specific change does not alter the function of a coding sequence.

Phenotype - The visible appearance of an organism (with respect to one or more traits) which reflects the interaction of a given genotype with a given environment. See: genotype.

Point mutation - a mutation affecting only one nucleotide (building blocks of DNA) in a DNA sequence.

Mutagenesis - is a process by which the genetic information of an organism is changed resulting in (a) mutation(s). Random mutagenesis techniques are based on using irradiation or chemical treatment of organisms or cells to generate random mutations. Directed mutagenesis techniques, including genome editing, allow for making site-specific mutations in a targeted manner.

Random mutagenesis – also referred to as 'conventional' or 'traditional mutagenesis'; refers to the process of introducing mutations to organisms in a random fashion and thus is non-specific. Random mutagenesis involves exposing organisms to a mutagen for a period of time and selecting for the organisms with the desired features. The mutagens can be either physical mutagens like UV radiation or chemical mutagens like alkylating agents.

References

- Abbott, A. (2015). Europe's genetically edited plants stuck in legal limbo. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/528319a>
- Bioökonomierat. (2018). *Genome editing : Europe needs new genetic engineering legislation*. Berlin. Retrieved from http://biooekonomierat.de/fileadmin/Publikationen/berichte/BOER-Memo_Genome-Editing_ENG.pdf
- Callaway, E. (2018). CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union. *Nature*, 2016. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05814-6>
- Casacuberta, J. M., & Puigdomènech, P. (2018). Proportionate and scientifically sound risk assessment of gene-edited plants. *EMBO Reports*, 19(10), e46907.

- <https://doi.org/10.15252/embr.201846907>
- Georges, F., & Ray, H. (2017). Genome editing of crops: A renewed opportunity for food security. *GM Crops and Food*, 8(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1080/21645698.2016.1270489>
- Haque, E., Taniguchi, H., Hassan, M. M., Bhowmik, P., Karim, M. R., Śmiech, M., ... Islam, T. (2018). Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges. *Frontiers in Plant Science*, 9(May), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00617>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(August), 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jones, H. D. (2015). Regulatory uncertainty over genome editing. *NATURE PLANTS*, 1(January), 2014–2016.
<https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2014.11>
- Khandagale, K., & Nadaf, A. (2016). Genome editing for targeted improvement of plants. *Plant Biotechnology Reports*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11816-016-0417-4>
- Kyndt, T., Quispe, D., Zhai, H., Jarret, R., Ghislain, M., Liu, Q., ... Kreuze, J. F. (2015). *The genome of cultivated sweet potato contains Agrobacterium T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 112). <https://doi.org/10.1073/pnas.1419685112>
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., & Kohl, C. (2018). Übersicht über Nutz- und Zierpflanzen , die mittels neuer molekular- biologischer Techniken für die Bereiche Ernährung , Landwirtschaft und Gartenbau erzeugt wurden Julius Kühn-Institut Institut für die Sicherheit Biotechnologischer Verfahren bei Pflanzen, 1–33.
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., Schiemann, J., & Wilhelm, R. (2018). What is the available evidence for the application of genome editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: A systematic map protocol. *Environmental Evidence*, 7(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/s13750-018-0130-6>
- Palmgren, M. G., Edenbrandt, A. K., Vedel, S. E., Andersen, M., Landes, X., Østerberg, J. T., ... Pagh, P. (2015). Are we ready for back-to-nature crop breeding? *Trends in Plant Science*, 20(3), 155–164.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.003>
- SAM. (2017a). *New Techniques in Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.2777/17902>
- SAM. (2017b). *Food from the Oceans*. <https://doi.org/10.2777/067256>
<https://doi.org/doi:10.26356/foodfromtheoceans>
- SAM. (2018). *Plant Protection Products*. <https://doi.org/10.2777/71851>
<https://doi.org/10.26356/plantprotectionproducts>
- Shukla-Jones, A., Friedrichs, S., & Winickoff, D. (2018). *Gene editing in an international context: Scientific, economic and social issues across sectors*. (OECD Publishing, Ed.) (OECD). Paris.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1787/38a54acb-en>
- Sprink, T., Eriksson, D., Schiemann, J., & Hartung, F. (2016). Regulatory hurdles for genome editing: process- vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Reports*, 35(7), 1493–1506.
<https://doi.org/10.1007/s00299-016-1990-2>
- Stokstad, E. (2018, July 25). European court ruling raises hurdles for CRISPR crops.
<https://doi.org/10.1126/science.aau8986>
- Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 532(September), 293.
<https://doi.org/10.1038/nature.2016.19754>
- Yin, K., Gao, C., & Qiu, J.-L. (2017). Progress and prospects in plant genome editing. *Nature Plants*, 3(8), 17107.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2017.107>

Contacts

E-mail: ec-sam@ec.europa.eu

SAM website: ec.europa.eu/research/sam

PRINT

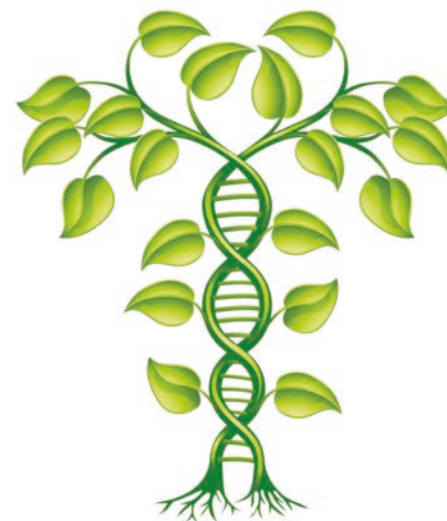
ISBN 978-92-79-97282-9
Doi 10.2777/10874
KI-06-18-301-EN-C

PDF

ISBN 978-92-79-97286-7
Doi 10.2777/407732
KI-06-18-301-EN-N

RICERCA Dalla cisgenesi al reverse breeding

di Teodoro Cardi



Genetica migliorata con le Npbt

Le nuove tecniche aprono prospettive inaspettate

Le nuove tecniche di miglioramento genetico (*New Plant Breeding Techniques, Npbt*) includono diverse tecnologie (ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/plant_breeding/index_en.htm), accomunate dall'obiettivo di aumentare l'efficienza del miglioramento genetico, soprattutto quando le tecniche convenzionali non sono applicabili o lo sono con molta difficoltà. Il miglioramento genetico tradizionale, basato sull'incrocio e la selezione fenotipica, è stato nel tempo integrato con la mutagenesi artificiale, l'ibridazione somatica, la coltura di embrioni, la

produzione di aploidi, la selezione assistita con marcatori molecolari, tecnologie che hanno consentito di indurre nuova variabilità genetica, superare le barriere all'incrocio, aumentare l'efficienza della selezione. I prodotti delle Npbt rappresentano un'interessante evoluzione, in termini di precisione e prevedibilità del risultato, rispetto sia a queste tecnologie sia alle piante Gm (comunemente chiamate con il termine generico Ogm) "di prima generazione". In base al livello di modificazione genetica indotta, le Npbt sono state recentemente raggruppate in tre classi, a seconda che le piante prodotte: a) contengano nuovi frammenti di Dna, b) contengano piccole modificazioni del proprio Dna, c) non contengano modificazioni del Dna (Schaart, et al. 2016) (vedi tabella). Alcune di queste tecnologie sono state già

discusse in questa rivista (vedi *Terra e Vita* n. 21/2015, 22/2015 e 25/2015).

Se da un lato è auspicabile che tutti i nuovi materiali genetici, inclusi gli Ogm, possano essere valutati in prove sperimentali anche in campo, e adottati nella pratica comune quando i risultati di tale sperimentazione non abbiano evidenziato effetti negativi per la salute e l'ambiente, dall'altro è oggi augurabile che i prodotti delle Npbt non siano equiparati agli Ogm nel quadro dell'attuale regolamentazione (a questo proposito si veda il recente documento congiunto della Società Italiana di Genetica Agraria e della Società Italiana di Biologia Vegetale: www.geneticagraria.it/attachment/SocietaScuolaRicerca/NBT_SIBV-SIGA.pdf). In diversi Paesi, ma soprattutto nell'Ue, la percezione da parte dell'opinione pubblica degli Ogm come un rischio

Breve descrizione delle Nuove tecniche di miglioramento genetico applicate alle piante (Npbt)

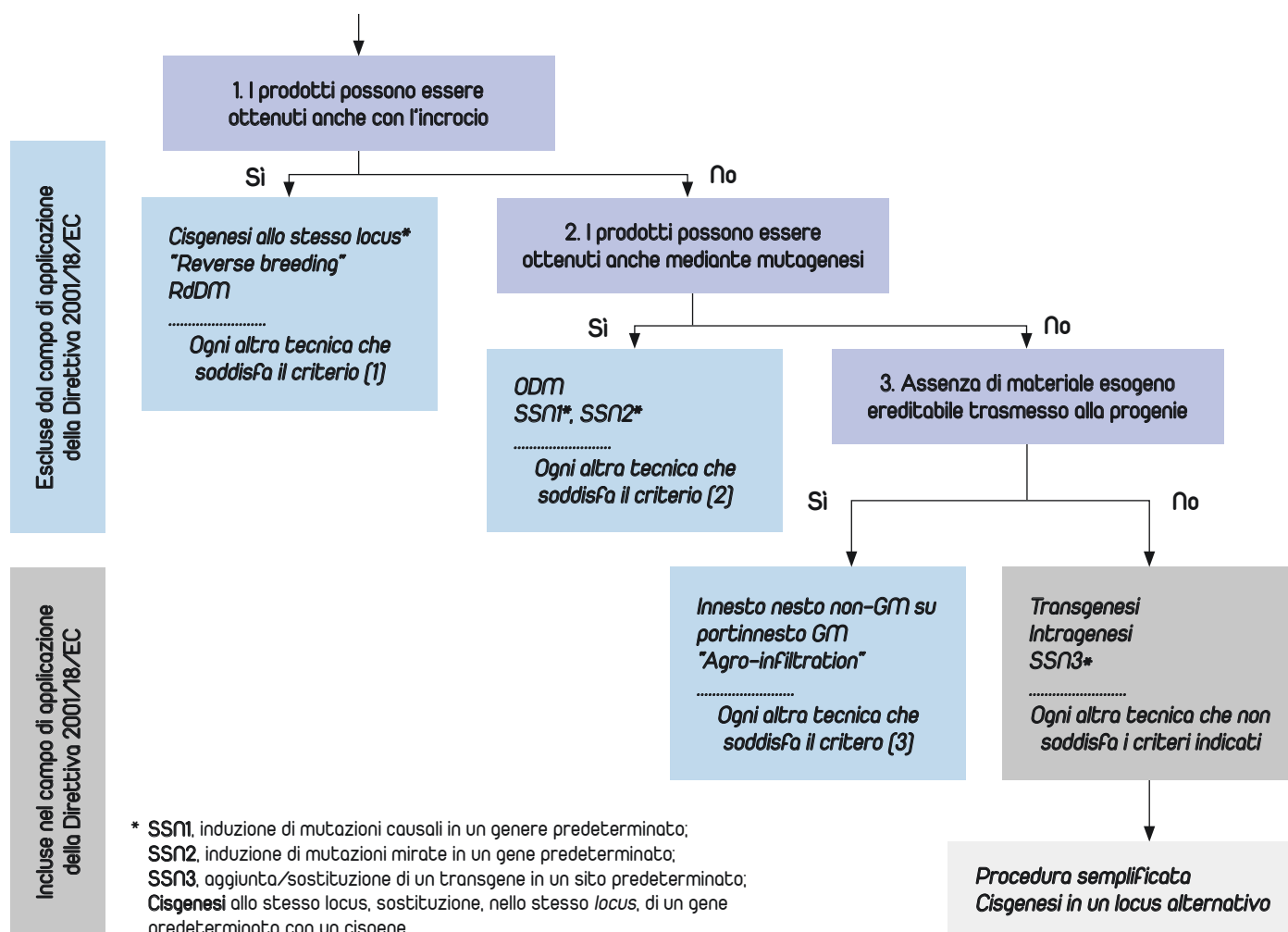
Per confronto, sono riportate anche le principali caratteristiche della transgenesi convenzionale

Tecnica	Descrizione
Npbt^a	
Cisgenesi e Intragenesi	Utilizzando le attuali tecniche di trasformazione e partendo da genotipi diversi della stessa specie o di specie sessualmente compatibili, viene trasferito l'intero gene con le proprie sequenze regolatrici e nel normale orientamento (cisgenesi), oppure un "nuovo" gene in cui sono state combinate diverse sequenze codificanti e regolatrici, nello stesso o in orientamento opposto rispetto a quello originale (intragenesi).
Reverse breeding	Partendo da un ibrido, si ottengono progenie omozigoti ed uniformi, in seguito all'inibizione della ricombinazione meiotica e al riassortimento e raddoppiamento dei cromosomi.
Agro-infiltration	Mediante Agrobatterio, si ottiene l'espressione temporanea di geni esogeni, non integrati stabilmente nel genoma, in particolari tessuti della pianta ospite.
Innesto su portinnesto Gm	Un nesto non modificato geneticamente, quindi privo del gene esogeno, è innestato su un portinnesto Gm.
Rna-dependent Dna methylation (RdDM)	Silenziamento ereditabile dell'espressione di un gene endogeno, a seguito della metilazione di una parte della sequenza, che rimane inalterata (modificazione epigenetica).
Oligonucleotide-mediated mutagenesis (Odm)	L'introduzione temporanea di una corta sequenza di Dna (oligonucleotide) induce una mutazione puntiforme nella sequenza del gene endogeno (es. sostituzione di una base).
Site-specific nucleases (SSN)	Usando enzimi specifici (nucleasi) e sistemi diversi per il riconoscimento della sequenza <i>target</i> , si inducono tagli nel doppio filamento di Dna in regioni predeterminate del genoma, i quali vengono successivamente corretti, determinando piccole modificazioni della sequenza di un gene o la sua sostituzione.
Transgenesi	Mediante tecniche diverse, possono essere trasferiti geni anche tra specie evolutivamente molto distanti. I transgeni possono essere ingegnerizzati con sequenze regolatrici che inducono la loro espressione in particolari tessuti o stadi di sviluppo della pianta modificata o in particolari condizioni ambientali. Con le tecniche generalmente utilizzate non è possibile predeterminare il numero di copie dei transgeni trasferiti e il sito d'inserzione nel genoma.

^a La Commissione europea ha incluso tra le Npbt anche la Genomica sintetica (ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/plant_breeding/index_en.htm), ma qui non è stata considerata in quanto non ci sono sinora esempi nelle piante.

Schema proposto da alcune Organizzazioni Francesi di sementieri e di produttori*

* per valutare la possibile esclusione o inclusione delle diverse NPBT nel campo di applicazione della Direttiva 2001/18/EC (modificato da www.actu-environnement.com/media/pdf/news-26203-avis-cees.pdf).



per l'ambiente e/o per la salute umana hanno infatti portato a un appesantimento della regolamentazione per il loro trasferimento in campo e la commercializzazione. Ciò ha determinato l'innalzamento dei costi per le numerose verifiche *a priori*, oggi sostenibili quasi esclusivamente da poche grandi multinazionali e per colture a grande diffusione mondiale, con conseguenze negative per la piccola e media industria sementiera e, in particolar modo nel nostro Paese, un forte rallentamento della ricerca e un blocco di fatto della sperimentazione in campo.

Secondo la normativa vigente (Direttiva 2001/18/EC) un "organismo geneticamente modificato (Ogm)" è "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", escludendo però "la mutagenesi" e "la fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali". Si è attualmente in attesa di un parere legale da parte della Commissione europea riguardo la domanda se le Npbt debbano essere considerate al pari delle tecnologie di prima generazione per la produzione di Ogm ed essere sottoposte a quanto specificato nella Direttiva 2001/18 e nei documenti da essa derivati, oppure essere esentate seguendo l'approccio già adottato per la mutagenesi e l'ibridazione somatica tra specie sessualmente compatibili. Tale decisione avrà effetti notevoli sia sulla sperimentazione che sull'adozione di queste tecniche da parte delle imprese euro-

pee. Per quanto illustrato sopra è importante, però, non considerare le diverse Npbt come un *unicum*; infatti, pur essendo accomunate dal fatto che rispondono a molte delle obiezioni e dubbi verso gli Ogm, esse includono una varietà di tecnologie e di modificazioni finali ottenute.

Tra i diversi documenti prodotti su questo argomento negli ultimi tempi, appare interessante l'approccio metodologico proposto da alcune Associazioni di produttori e di sementieri all'"Haut Conseil des Biotechnologies" Francese (HCB 2016) (vedi figura). Sulla base dei criteri già contenuti nella Direttiva 2001/18, lo schema propone di escludere dalla regolamentazione Ogm le tecnologie i cui prodotti possano essere in teoria ottenuti anche mediante incrocio (es. il trasferimento di un cisgene nello >>>>

stesso sito del gene endogeno che si vuole sostituire) o mutagenesi (es. uso di corte sequenze di Dna e nucleasi per modifiche limitate della sequenza nucleotidica) o quando essi non contengano materiale ereditario esogeno trasmissibile alle progenie (es. innesto non-Gm su portinnesto Gm o Agro-infiltrazione). Questa proposta appare ragionevole e sostanzialmente rispettosa del quadro normativo attuale. Inoltre, distingue le diverse Npbt, evidenziandone le somiglianze con approcci già consolidati e accettati dall'opinione pubblica. Infine, dà un quadro di riferimento generale e uno strumento di valutazione aperto a futuri sviluppi tecnologici, superando l'impasse determinata oggi dalla rigidità della Direttiva in vigore, che si basa su ragionamenti e tecnologie destinate nel tempo a diventare obsolete. Altri sistemi per la regolamentazione delle NPBT, anch'essi caratterizzati da una maggiore semplicità e flessibilità rispetto alla normativa in vigore in Europa, sono stati recentemente proposti e discussi (Sprink, et al. 2016).

Queste posizioni sono in larga parte condivise da diverse Organizzazioni, quali ad esempio la European Academies Science Advisory Council (EASAC 2015), l'European Seed Association (ESA 2015), l'European Plant Science Organization (EPSO 2016).



Sono invece osteggiate da Greenpeace e altre organizzazioni ambientaliste (Greenpeace 2015) o l'International Foundation for Organic Agriculture (IFOAM 2015), sebbene i potenziali vantaggi che l'agricoltura biologica potrebbe ricavare dall'applicazione delle NPBT siano stati di recente evidenziati in alcuni studi (Andersen, et al. 2015; Palmgren, et al. 2015) e in un'intervista al Direttore del Research Institute of Organic Agriculture (FiBL) (Niggli 2016). La situazione nei Paesi extra Europei è illustrata in articoli recenti (Lusser and Davies 2013; Sprink, et al. 2016). Data l'importanza delle nuove tecnologie

per lo sviluppo dell'agricoltura e l'industria sementiera europee, nonché per l'avanzamento scientifico e tecnologico del nostro e degli altri Paesi dell'Ue, è auspicabile che il dibattito su queste tecnologie sia ampio, ma aperto all'innovazione, la quale deve basarsi sui risultati di evidenze sperimentali che valutino sia i potenziali rischi sia i potenziali vantaggi per l'agricoltura, la salute e l'ambiente. È quindi importante che la Commissione Europea si esprima al più presto e in maniera chiara. **n**

**Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (Crea), Centro di Ricerca per l'Orticoltura, Pontecagnano (Sa) Socio della Società Italiana di Genetica Agraria (Siga)*

Ringraziamenti

Si ringraziano A. Vitale (Consiglio Nazionale delle Ricerche-Milano), R. Tuberosa (Università di Bologna) e D. Rosellini (Università degli Studi di Perugia) per la revisione critica del manoscritto. La bibliografia può essere richiesta all'autore (teodoro.cardi@crea.gov.it). Il contenuto dell'articolo riflette le opinioni personali dell'autore e non necessariamente quelle del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria.