

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e
Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Tecnologie per l'Evoluzione Assistita (TEA): breeding
cisgenico ed editing genomico per il miglioramento
genetico delle specie vegetali agro-alimentari

Relatore

Prof. Margherita Lucchin

Laureando

Andrea Perlotto

Matricola n. 1178178

ANNO ACCADEMICO 2019 – 2020

INDICE GENERALE

1. INTRODUZIONE.....	7
1.1 ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICATO: DEFINIZIONE GIURIDICA E SCIENTIFICA.....	8
1.2 CENNI STORICI	8
1.3 PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE: OBIETTIVI ED APPLICAZIONI.....	11
1.4 DIFFUSIONE DELLE COLTURE GENETICAMENTE MODIFICATE.....	14
1.4.1 SUPERFICI.....	15
1.4.2 PAESI DI COLTIVAZIONE	16
1.4.3 UNIONE EUROPEA.....	17
1.4.4 PRINCIPALI COLTURE GM.....	21
1.4.5 CARATTERI TRANSGENICI INTRODOTTI.....	23
1.4.6 CARATTERISTICHE E DIFFUSIONE GLOBALE.....	25
2. METODI DI TRASFORMAZIONE GENETICA	31
2.1 TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE.....	31
2.2 DUPLICAZIONE DEL DNA ESOGENO: COSTRUTTO E VETTORI DI CLONAGGIO.....	34
2.3 VETTORI DI CLONAGGIO: I PLASMIDI.....	36
2.4 VETTORI DI CLONAGGIO: DERIVATI DA BATTERIOFAGI E COSMIDI	37
2.5 VETTORI DI CLONAGGIO: CROMOSOMI ARTIFICIALI DI LIEVITO (YAC) E DI BATTERI (BAC).....	38
3. TRASFERIMENTO DEL DNA ESOGENO.....	39
3.1 TRASFERIMENTO GENETICO DIRETTO: METODI FISICI E CHIMICI.....	39
3.2 TRASFERIMENTO GENETICO MEDIATO: VIRUS E AGROBATTERI.....	41
4. TECNOLOGIE PER L'EVOLUZIONE ASSISTITA (TEA): INTRODUZIONE E DEFINIZIONE.....	45
5. CISGENESI.....	47
5.1 CONFRONTO TRA CISGENESI E MIGLIORAMENTO GENETICO CONVENZIONALE.....	49
5.1.1 <i>LINKAGE DRAG</i>	49
5.1.2 MANTENIMENTO DEL GENOTIPO ORIGINARIO DELLE VARIETÀ DI <i>ELITE</i>	50
5.1.3 TEMPISTICHE E COSTI.....	50
5.2 CONFRONTO TRA CISGENESI E TRANSGENESI.....	51
5.2.1 TIPOLOGIA DEI CARATTERI TRASFERITI.....	51
5.2.2 LEGISLAZIONE E OPINIONE PUBBLICA.....	51
5.2.3 TEMPISTICHE E COSTI PER L'AUTORIZZAZIONE ALLA COLTIVAZIONE	51

5.3 LIMITI CISGENESI.....	52
5.4 INTRAGENESI.....	53
5.4.1 CONFRONTO TRA INTRAGENESI E CISGENESI.....	54
5.5 PRESENZA DI SEQUENZE NON VEGETALI NELL'INSERTO (T-DNA E P-DNA).....	55
5.4 APPLICAZIONI PRATICHE DI CISGENESI ED INTRAGENESI.....	57
5.4.1 PATATA	57
5.4.2 MELO	60
5.5 NORMATIVA IN UNIONE EUROPEA E CISGENESI.....	62
5.6 CISGENESI E CITTADINI EUROPEI.....	63
6. EDITING GENOMICO.....	67
6.1 MECCANISMI DI RIPARAZIONE E RICOMBINAZIONE DEL DNA: NHEJ E HDR.....	67
6.2 MEGANUCLEASI (MN)	70
6.3 NUCLEASI A DITO DI ZINCO – <i>ZINC FINGER NUCLEASE</i> (ZFN).....	71
6.4 <i>TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASE</i> (TALEN).....	74
6.5 CRISPR/Cas9.....	77
6.5.1 INTRODUZIONE E CENNI STORICI.....	77
6.5.2 STRUTTURA DEL LOCUS CRISPR	78
6.5.3 CLASSIFICAZIONE DEI SISTEMI CRISPR/Cas.....	79
6.5.4 MECCANISMO D'AZIONE NEI SISTEMI CRISPR/Cas DI TIPO II	79
6.5.4.1 INTEGRAZIONE DELLA SEQUENZA VIRALE NEL LOCUS CRISPR.....	79
6.5.4.2 BIOSINTESI DEL TRASCritto DI DNA.....	80
6.5.4.3 DEGRADAZIONE DEL DNA TARGET ESOGENO.....	80
6.5.4.4 LA PROTEINA Cas9	81
6.5.5 VANTAGGI E SVANTAGGI DEL SISTEMA CRISPR/Cas9: CONFRONTO CON ZFN E TALEN....	84
6.5.6 APPLICAZIONI PRATICHE DEL SISTEMA CRISPR/Cas9.....	85
6.5.6.1 VITE.....	85
6.5.6.2 MAIS	87
6.6 IDENTIFICAZIONE DI ORGANISMI MODIFICATI TRAMITE EDITING GENOMICO.....	89
6.7 DIFFUSIONE DELLE COLTURE OTTENUTE MEDIANTE EDITING GENOMICO.....	90
6.8 NORMATIVA IN UNIONE EUROPEA ED EDITING GENOMICO.....	90
7. CONSIDERAZIONI FINALI: PROSPETTIVE FUTURE DELLE TEA.....	91
8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	93

RIASSUNTO

A partire dalla coltivazione in pieno campo delle prime varietà transgeniche, nel 1996, l'incremento delle superfici interessate dalle colture geneticamente modificate (GM) è stato costante negli anni.

Attualmente le tecniche di transgenesi, hanno portato all'ottenimento di numerose varietà GM per molte delle specie coltivate.

Tuttavia, in tempi recenti, si è assistito alla messa a punto di nuovi metodi per la modifica mirata dei genomi vegetali, denominati Tecnologie per l'Evoluzione Assistita: cisgenesi ed editing genomico.

Questo lavoro, a partire da un'introduzione generale riguardante le varietà GM attualmente coltivate, approfondisce le tecnologie di cisgenesi ed editing genomico. Vengono analizzate le principali caratteristiche che differenziano queste tecniche dalla transgenesi, la loro situazione legale nell'Unione Europea, lo stato di avanzamento dei nuovi prodotti con alcuni esempi applicativi relativi a colture agro-alimentari.

ABSTRACT

Starting from open field cultivation of the first transgenic varieties, in 1996, the increase of the areas devoted to genetically modified (GM) crops has been constant over the years.

Currently, the transgenesis techniques have led to the development of numerous GM varieties for many of the cultivated species.

However, in recent times, we've seen the development of new methods for the targeted modification of plant genomes, called New Breeding Techniques: cisgenesis and genome editing. This work, starting from a general introduction concerning the GM varieties currently grown, explores the technologies of cisgenesis and genome editing. The main characteristics that differentiate these techniques from transgenesis are analyzed, as well as their legal framework within the European Union and the progress of new products with some application examples relating to agro-food crops.

1. INTRODUZIONE

A partire dagli albori dell'agricoltura durante il periodo Neolitico, l'uomo è alla continua ricerca di metodi per incrementare le rese agricole.

Tutti gli innumerevoli sforzi e scoperte scientifiche avvenute nel corso della storia dell'agricoltura, dall'invenzione dell'aratro all'utilizzo delle prime molecole chimiche, hanno avuto un solo obiettivo principale: garantire cibo sufficiente per la sopravvivenza del genere umano. Solamente a partire dagli anni '60 del secolo scorso, con i primi surplus produttivi e i primi fenomeni di inquinamento ambientale dovuti, talvolta, ad una malagestione dei prodotti chimici, si è affermato un nuovo fabbisogno: la qualità delle produzioni alimentari.

In questo complesso binomio dato da quantità e qualità dei prodotti alimentari, si va ad interporre forse la scoperta scientifica più importante, nella storia dell'agricoltura recente: la possibilità di modifica artificiale dei genomi vegetali. Sebbene tale processo, mediato dall'uomo in maniera più o meno consapevole, sia una pratica iniziata nel Neolitico con la domesticazione delle specie vegetali selvatiche, è solo a partire dal secolo scorso che si è riusciti ad intervenire in maniera più precisa a carico dei genomi vegetali. In pochi decenni si è passati dall'identificazione della struttura a doppia elica della molecola di DNA, alla successiva capacità di sequenziamento, fino ad arrivare alla facoltà di modificarne la sequenza.

A partire poi dall'identificazione degli enzimi di restrizione negli anni '70, si è sviluppata la possibilità di intervenire sulla struttura del DNA, introducendo o silenziando l'espressione di determinati geni, modificandone quindi la manifestazione fenotipica.

Questo lavoro vuole analizzare, a partire dai già affermati metodi di modificazione genetica, le più recenti tecniche che hanno come obiettivo la modifica mirata dei genomi delle colture agro-alimentari, denominate *Tecnologie per l'Evoluzione Assistita* (TEA), in lingua inglese *New Breeding Techniques* (NBT). L'obiettivo è di esaminare tali innovazioni non solo dal punto di vista tecnico, ma soprattutto di valutarne gli effetti sulla produzione agroalimentare e delle implicazioni sulla sostenibilità ambientale.

1.1 ORGANISMO GENETICAMENTE MODIFICATO: DEFINIZIONE GIURIDICA E SCIENTIFICA

La definizione giuridica di organismo geneticamente modificato (OGM), all'interno dell'Unione europea, è data dall'articolo 2 della direttiva 2001/18/CE del 12/03/2001, che esprime quanto segue: "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".

Dal punto di vista scientifico si definisce OGM un organismo vivente che possiede un patrimonio genetico modificato tramite la tecnologia del DNA ricombinante, che comporta l'aggiunta, l'eliminazione, la modifica di componenti genici. (FAO, 2011. <http://www.fao.org/biotech>)

La tecnologia del DNA ricombinante sfrutta la capacità di determinati enzimi di restrizione (o desossiribonucleasi II) di tagliare la molecola di DNA e successivamente di unirli, grazie agli enzimi ligasi, anche con molecole non derivanti dallo stesso organismo. Questo è reso possibile dalla prerogativa di "universalità del codice genetico", per cui una determinata sequenza di DNA codifica esattamente per lo stesso prodotto genico in qualsiasi organismo.

In particolare viene definito transgene la sequenza di DNA esogeno che viene inserito artificialmente nel genoma dell'organismo ospite, mediante tecniche di ingegneria genetica. Il transgene, rispetto al DNA originario che si vuole modificare, può derivare da una specie vegetale differente o anche da un organismo appartenente a un differente regno (es: batterio).

Questa porzione di DNA esogeno, per garantire il successo nell'ottenimento dell'organismo geneticamente modificato, deve venire integrata nei cromosomi dell'ospite per garantire la sua corretta replicazione, la sua corretta espressione fenotipica e la trasmissione ai discendenti. (Clark et al., 1993)

1.2 CENNI STORICI

Gli interventi di modifica del genoma sono una tecnologia relativamente recente.

Il punto di partenza di tutti i successivi studi e scoperte nell'ambito dell'ingegneria genetica si devono a Paul Berg, che nel 1972 presso l'Università di Stanford, costituì *in vitro* la prima molecola di DNA ricombinante. (Jackson et al., 1972)

L'anno successivo ci fu la creazione del primo organismo geneticamente modificato moderno: Herb Boyer (Università della California) e Stanley Cohen (Università di Stanford), sfruttando un

plasmide, elemento genetico circolare autoreplicante presente nei batteri, riuscirono a trasferire un gene di rana (*Xenopus laevis* Daudin) nel batterio *Escherichia coli*. (Cohen et al., 1973)

A partire dalla fine degli anni '70 del secolo scorso, con l'inizio della manipolazione del genoma degli organismi pluricellulari, si gettano le basi per la produzione su larga scala delle piante transgeniche. Questo è potuto accadere grazie alla scoperta che il batterio *Agrobacterium tumefaciens* (nome scientifico aggiornato: *Rhizobium radiobacter*) (Kuykendall et al., 2001), agente vettore del cancro del colletto, poteva essere sfruttato per il trasferimento e l'integrazione di geni esogeni nelle cellule vegetali. (Chilton et al., 1982) In particolare tale batterio, in natura, può trasferire un segmento di DNA (T-DNA) alle cellule vegetali, integrandosi e ricombinando il DNA delle cellule stesse. In periodi successivi, vennero poi ideati ulteriori metodi per il trasferimento diretto del DNA esogeno all'interno delle cellule, mediante elettroporazione, microiniezione e con sistema biolistico.

Le prime piante transgeniche prodotte con successo furono opera di quattro differenti gruppi di ricerca, negli anni 1980-1982. Il gruppo di ricerca dell'Università di Gent (Belgio), guidato da Jeff Schell e Marc Van Montagu, aveva ottenuto piante di tabacco resistenti alla kanamicina (sostanza antibiotica). (Hernalsteens et al., 1980) La stessa resistenza venne prodotta dai ricercatori dell'Università di Saint Louis (USA), guidati da Mary-Dell Chilton. (Bevan et al., 1983) Il gruppo guidato da John Kemp e Timothy Hall, dell'Università del Wisconsin (USA), riuscì a trasferire un gene di fagiolo, codificante per la glicoproteina faseolina, all'interno di una pianta di girasole. (Murai et al., 1983) Risultati analoghi furono ottenuti anche dai ricercatori dell'azienda Monsanto Company, Robert Fraley, Stephen Rogers e Robert Horsh, che riuscirono a produrre piante di pisello resistenti alla kanamicina. (Fraley et al., 1983) Tutte queste ricerche avvennero principalmente a carico di piante modello, ma in poco tempo gli studi si spostarono su piante di interesse agrario, con lo scopo di migliorare le caratteristiche agronomiche e commerciali.

In Cina avvenne la prima coltivazione su larga scala di una coltura transgenica: nel 1992 venne introdotta una varietà di tabacco resistente a *Cucumber mosaic virus* (CMV). (James, 1997)

Per il primo prodotto vegetale modificato geneticamente, autorizzato per il consumo umano, bisogna invece attendere il 1994. La varietà di pomodoro denominata Flavr Savr™, commercializzata negli USA, si poneva l'obiettivo di aumentare la conservabilità del prodotto e la stabilità delle caratteristiche organolettiche, grazie all'interferenza con l'attività dell'enzima poligalatturonasi (PG), che svolge un ruolo essenziale nei processi di maturazione della frutta.

Questo enzima, normalmente degrada le pectine nelle pareti cellulari e provoca l'ammorbidimento dei frutti, ciò causa una minore *shelf-life* del prodotto, rendendolo più suscettibile a danni meccanici e ad essere attaccato da infezioni fungine. (Vessey, 2002) L'obbiettivo è stato raggiunto mediante l'inserimento di un gene antisenso, che blocca l'attività dell'enzima in questione. In particolare, questa tecnologia, porta all'annullamento dell'attività di un determinato gene (*loss of function*) sfruttando l'azione dell'RNA antisenso (asRNA), molecola di RNA non codificante composta da 19-23 nucleotidi, complementare all'RNA messaggero (mRNA), con cui si lega. Questa interazione tra asRNA e mRNA porta all'interferenza nei processi di trascrizione e alla successiva repressione della sintesi proteica. L'ibridazione tra asRNA e mRNA porta alla formazione di una molecola instabile di RNA a doppio filamento, destinata a subire una rapida degradazione nella cellula. (Xu et al., 2018)

Nel caso del pomodoro Flavr Savr™ quindi, tale intervento ha portato ad un'azione inibitrice nei confronti della sintesi dell'enzima poligalatturonasi.

Successivamente, si sono sviluppate varietà transgeniche di tutte le principali colture agrarie: soia, mais, cotone, riso oltre ai già citati pomodoro e tabacco.

I caratteri interessati dal trasferimento genico sono aumentati nel tempo, ed interessano oggi non solo caratteristiche agronomiche, ma anche proprietà qualitative e di controllo dello sviluppo del sistema riproduttivo della pianta. Quest'ultima caratteristica ha assunto notevole importanza, con la possibilità di trasmettere geni che inducono la sterilità maschile o femminile. Questo porta un notevole vantaggio in numerosi ambiti applicativi: l'introduzione della maschiosterilità è sfruttata per la costituzione di varietà ibride, grazie all'ottenimento di linee esclusivamente femminili, evitando quindi il ricorso a costosi interventi manuali o meccanici di castrazione, nelle specie vegetali ermafrodite. (Wu et al., 2016) La maschiosterilità si può inoltre sfruttare per il contenimento della diffusione dei transgeni. La sterilità femminile garantisce anche una maggiore durata del periodo di fioritura, caratteristica che interessa le specie coltivate per scopi ornamentali. Un'ulteriore applicazione è l'induzione alla partenocarpia, cioè lo sviluppo del frutto privo di semi a causa della mancata fecondazione, caratteristica ricercata in frutticoltura ed orticoltura, in quanto permette la produzione di frutti anche in presenza di condizioni ambientali avverse per la fecondazione e l'allegagione. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

Successivamente alla diffusione su scala globale e in maniera preponderante di queste tecnologie, i legislatori nazionali e l'opinione pubblica hanno cominciato a interessarsi in maniera

crescente a queste nuove tecnologie ed ai prodotti ottenuti. Se, come vedremo in maniera più approfondita in seguito, in alcuni Stati l'opinione pubblica ed il legislatore nazionale accettano, senza o con limitate rimostranze, i prodotti ottenuti da tali tecniche, in altri Paesi tali piante sono maggiormente osteggiate e la loro diffusione è fortemente limitata se non assente.

1.3 PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE: OBIETTIVI ED APPLICAZIONE

Durante il corso di tutta la storia dell'agricoltura, l'uomo ha sempre cercato di favorire e coltivare le piante agrarie che più rispondevano alle caratteristiche desiderate.

Successivamente alla scoperta della trasmissione dei caratteri in maniera ereditaria, grazie agli studi compiuti da Gregor Mendel, la capacità di sviluppare nuove varietà con le caratteristiche desiderate, andò aumentando. Gli studi sugli incroci di individui con caratteristiche superiori andò crescendo sempre più, fino ad arrivare alle scoperte del secolo scorso, grazie principalmente alle attività di Nazareno Strampelli e Norman Borlaug. (Vergauwen e De Smet, 2017)

Gli obiettivi del miglioramento genetico convenzionale e di quello molecolare sono i medesimi: ottenere varietà di specie coltivate con caratteristiche superiori, sfruttando la variabilità genetica esistente, mediante il trasferimento di caratteri che apportano le caratteristiche desiderate.

Ovviamente, la differenza risiede nella diversa maniera in cui avviene tale trasferimento. Se nel miglioramento genetico convenzionale si sfruttano i fenomeni di ricombinazione genetica, dati dalla riproduzione sessuata, nel miglioramento basato su tecniche molecolari si mira ad ottimizzare questi processi, utilizzando anche geni esogeni.

Per convenzione possiamo distinguere le piante geneticamente modificate (PGM) in tre differenti tipologie:

- PGM di I generazione: obiettivo è aumentare la produttività, la resistenza a stress abiotici e biotici, facilitare le operazioni colturali-agronomiche, ridurre i costi.
- PGM di II generazione: obiettivo è incrementare la qualità del prodotto finale, anche per renderlo idoneo ad utilizzi industriali diversi.
- PGM di III generazione: obiettivo è creare piante con nuove proprietà, capaci di produrre metaboliti nuovi, utilizzabili in ambito farmacologico, come vitamine, vaccini, ormoni, enzimi terapeutici, componenti del sangue, o anche industriali, ad esempio bioplastiche.

Nelle PGM di I generazione la resistenza ad erbicidi non selettivi e insetti, principalmente lepidotteri, sono le caratteristiche maggiormente ricercate nelle varietà transgeniche di soia (*Glycine max* L.), mais (*Zea mays* L.), colza (*Brassica napus* L.), cotone (*Gossypium* spp.). (Bonny, 2015) (Talakayala et al., 2020)

La tolleranza ad alcuni virus è stata introdotta in varietà di patata (*Solanum tuberosum* L.), bietola (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.), pomodoro (*Lycopersicon esculentum* L.) e tabacco (*Nicotiana* spp.), (ISAAA, 2017) come il ritardo della maturazione in pomodoro (Vessey, 2002) e la maschio-sterilità, per agevolare la produzione di varietà ibride di colza (*Brassica napus* L.). (ISAAA, 2017)

Tra le varietà maggiormente diffuse di PGM di I generazione è doveroso ricordare il mais e cotone *Bt*, resistenti a lepidotteri grazie all'inserimento di un gene derivante dal batterio *Bacillus thuringiensis*, e la varietà di soia RR® (*Roundup Ready*), resistente all'erbicida non selettivo glifosate. (ISAAA, 2017) (Bonny, 2015)

Le PGM di II generazione hanno comportato interventi per modificare gli aspetti di tipo qualitativo del prodotto finale. I principali caratteri d'intervento, sperimentati in pieno campo, sono riportati in Tabella 1. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

Tabella 1 - Principali caratteri modificati in PGM di II generazione.

CARATTERE MODIFICATO	SPECIE VEGETALE
Composizione dell'amido	Patata, pisello, frumento, mais
Composizione zuccheri	Bietola, cicoria
Composizione dell'olio	Colza, girasole
Sintesi del glicogene	Patata
Sintesi della lignina	Pioppo, betulla, festuca, tabacco
Contenuto β -carotene (provitamina A)	Riso
Digeribilità del foraggio	Erba medica, mais
Colore e morfologia florale	Petunia, viola, crisantemo

Le PGM con caratteristiche più innovative sono senz'altro le PGM di III generazione, tuttora in fase sperimentale. In questo caso le piante acquisiscono il ruolo di bioreattori, cioè organismi sfruttabili per generare reazioni biologiche, finalizzate alla sintesi di prodotti specifici per la terapia medica nell'uomo e negli animali.

Le sostanze prodotte da questa tipologia di piante consistono principalmente in anticorpi (immunoglobine) e vaccini (proteine immunogene). (Barcaccia e Falcinelli, 2019) Si tratta, al momento attuale, di realizzazioni di tipo sperimentale, non ancora pronte per un impiego in campo su base produttiva anche perché, in molti casi, il livello di espressione in pianta dei transgeni non è sufficiente a rendere economicamente vantaggiosa tale produzione.

Studi, riguardanti la produzione di anticorpi in PGM, sono stati effettuati a carico del batterio *Streptococcus mutans*, responsabile della carie dentale, sfruttando piante di tabacco, grazie all'introduzione nelle cellule vegetali di anticorpi *Guy's 13*, provenienti da cellule di topo. (Ma et al., 1995)

Per contrastare invece la trasmissione del virus *Herpes simplex virus 2* (HSV-2), vettore della malattia dell'herpes genitale, si è fatto ricorso a piante di soia, nelle cui cellule è stata rilevata la medesima capacità presente nelle cellule dei mammiferi, di esprimere anticorpi monoclonali (Mab) con azione terapeutica nei confronti di HSV-2. (Zeitlin et al., 1998)

Altre ricerche sono poi state svolte a carico delle PGM sullo sviluppo di anticorpi contro antigeni tumorali.

La sintesi di vaccini, mediante piante PGM, potrebbe essere agevolata dal fatto che la somministrazione per via orale (ingestione) è una via più pratica e meno dispendiosa rispetto alle iniezioni. Il principio è di sintetizzare nei tessuti vegetali le proteine immunogene di determinati patogeni, per somministrarle poi come alimento a uomini e animali, garantendone l'immunizzazione. (Figura 1) (Arntzen et al., 2005)



Figura 1 - Foglie di piante liofilizzate contenenti antigeni vaccinali, preparate per il consumo umano in capsule di gelatina.

È chiaro che un impiego diretto di questo tipo pone molti problemi, ancora non risolti, relativi al controllo del dosaggio del principio attivo che dev'essere somministrato.

La scelta della specie vegetale influenza il tipo di prodotto da usare come alimento. Inizialmente sono state sfruttate quelle specie più facilmente trasformabili, come pomodoro, tabacco, patata. I semi di cereali però sono ritenuti più adatti in quanto, grazie al loro elevato contenuto di proteine solubili, garantiscono una maggiore conservazione nel tempo. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

Tra le principali malattie virali che attaccano l'uomo, che si è cercato di contrastare mediante questa tecnologia, troviamo il virus dell'epatite B (*Hepatitis B virus*) mediante il trasferimento del gene *HBsAg* in tabacco, patata, pomodoro, banana (Guan et al., 2010); il virus della rabbia (*Rabies lyssavirus*) grazie all'espressione della proteina ricombinante *rgp-rtxB*, derivante dalla glicoproteina della rabbia (RGP) e dalla catena B della tossina della ricina (RTB) in pomodoro (Singh et al., 2015); il virus del colera (*Vibrio cholerae*) grazie allo sviluppo di una sub-unità B della tossina del colera (MucoRice-CTB) in riso (Kashima et al., 2016).

1.4 DIFFUSIONE DELLE COLTURE GENETICAMENTE MODIFICATE

Nota: tutti i dati presenti nei seguenti paragrafi sono estrapolati dagli studi dell'ISAAA (*International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*), associazione internazionale *nonprofit* che si pone come obiettivo quello di condividere informazioni e conoscenze, per alleviare la fame nei Paesi in via di sviluppo, con particolare interesse riguardo le varietà biotecnologiche. (James, 2001)

Dove non diversamente specificato i dati fanno riferimento al *Brief 53* (anno 2017), ovvero l'ultimo report annuale disponibile integralmente, con cui l'ISAAA aggiorna lo stato di diffusione delle varietà GM in tutti i Paesi del mondo. (ISAAA, 2017)

Solo informazioni parziali sono disponibili riguardo l'anno 2018. (ISAAA, 2018)

Il *brief* dell'anno 2019 è al momento non disponibile, presumibilmente a causa di un ritardo dovuto alla pandemia da COVID-19.

1.4.1 SUPERFICI

La coltivazione di piante transgeniche è oggi una pratica consolidata in molti Paesi, riguardante numerose specie vegetali di interesse agrario.

L'aumento di superficie interessata da tali piante è in costante ascesa, a partire dal 1996, anno in cui è iniziata la coltivazione estensiva in pieno campo. (Tabella 2)

Tabella 2 - Superficie globale destinata a colture GM, 1996-2018. (ISAAA, 2018)

Anno	Ettari (milioni)	Anno	Ettari (milioni)	Anno	Ettari (milioni)	Anno	Ettari (milioni)
1996	1,7	2002	58,7	2008	125,0	2014	181,5
1997	11,0	2003	67,7	2009	134,0	2015	179,7
1998	27,8	2004	81,0	2010	148,0	2016	185,1
1999	39,9	2005	90,0	2011	160,0	2017	189,8
2000	44,2	2006	102,0	2012	170,3	2018	191,7
2001	52,6	2007	114,3	2013	175,2	Tot.	2.531,2

Attualmente le superfici interessate da colture agrarie GM si attestano a 191,7 milioni di ettari, coltivati da 17 milioni di agricoltori, distribuiti in 26 Paesi del mondo. (ISAAA, 2018)

Aspetto interessante riguardante la distribuzione delle superfici è lo sviluppo tecnologico dei vari comparti primari nazionali, che sfruttano tali tecnologie. Se la scoperta e le prime commercializzazioni di tali piante sono state appannaggio di economie più sviluppate, a partire dal 2012 i Paesi in via di sviluppo hanno superato, in termini di superficie, le nazioni industrializzate. (Figura 2) In particolare la distribuzione delle colture GM interessa soli 5 Paesi industrializzati, che coltivano il 46% (88,6 milioni di ha) della superficie totale complessiva a colture GM, e ben 21 Paesi in via di sviluppo, con il restante 54% (103,1 milioni di ha) di superficie (Figura 3). Questo dimostra la relativa facilità di gestione delle coltivazioni transgeniche, che non richiedono costosi input energetici esterni o complesse conoscenze tecnico-scientifiche da parte dei coltivatori, e dimostrano concretamente uno degli obiettivi principali che la loro creazione ha cercato di raggiungere: la facilità di gestione e la riduzione dei costi di produzione, evitando la riduzione delle rese, a parità di superficie.

Questo è pienamente dimostrato dal costante aumento di superfici, principalmente in Paesi dove i coltivatori hanno scarsa possibilità economica e strutturale di assicurarsi input energetici esterni.

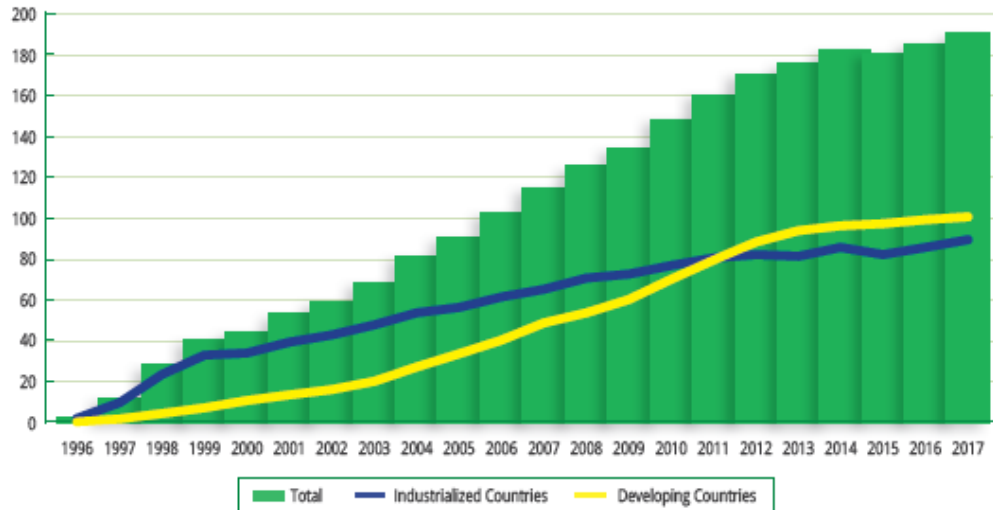


Figura 2 - Superficie globale destinata a colture GM, 1996-2017: Paesi industrializzati ed in via di sviluppo (milioni di ettari).

Anche se permangono dubbi sulla coltivazione delle piante transgeniche in molti Paesi del mondo, la crescita su scala globale delle superfici a colture GM è prevista in aumento, nei prossimi anni. Questo grazie anche alla costante diffusione nei Paesi in via di sviluppo, dove permangono problemi legati alla malnutrizione, in cui i benefici collegati ad una maggiore produttività sono considerati prioritari. (ISAAA, 2018)

1.4.2 PAESI DI COLTIVAZIONE

Tra le nazioni con una maggiore superficie dedicata a colture GM troviamo principalmente Paesi del continente americano, con gli USA stabilmente ai vertici della classifica da quando è iniziata la commercializzazione di piante GM.

Importante diffusione è presente in Asia.

La coltivazione in Oceania è rappresentata dalla sola Australia.

Nel continente africano la coltivazione di piante GM è presente in Sud Africa e, in maniera più marginale, Sudan. (Figura 3) È di questi giorni la notizia che il Kenya sta avviando la coltivazione su larga scala di cotone *Bt*. (ISAAA, 2020)

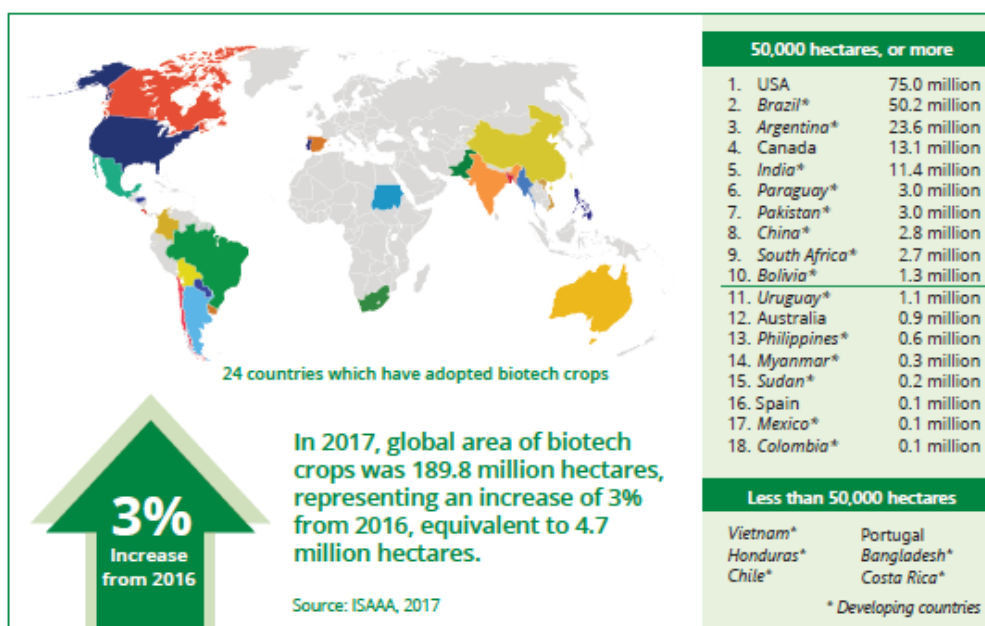


Figura 3 - Superficie globale destinata a colture GM per Paese, 2017 (ettari).

1.4.3 UNIONE EUROPEA

La diffusione delle piante GM in Europa, a differenza di tutti gli altri continenti, è molto limitata. Questo è dovuto principalmente ad aspetti legislativi dati dall'intervento dell'Unione europea, ma anche a un diffuso scetticismo da parte dei consumatori nei confronti delle colture GM. (Woźniak et. al., 2020)

In Unione Europea, tutte le decisioni riguardanti le tecnologie di ingegneria genetica, sono sottoposte al principio di precauzione. Tale principio implica una condotta cautelativa, nei confronti delle decisioni politiche riguardanti aspetti scientifici ritenuti controversi.

La procedura per ottenere la registrazione da parte delle autorità competenti, per la coltivazione o l'importazione di varietà transgeniche, è regolata dalla Direttiva 2001/18/EC, relativa al rilascio deliberato di OGM nell'ambiente, seguita dal Regolamento (EC) 1829/2003, relativo agli alimenti e mangimi modificati geneticamente.

Sottostando a queste normative, i soggetti richiedenti il rilascio dell'autorizzazione riguardante la varietà transgenica desiderata, devono inoltrare una dettagliata valutazione dei rischi (*risk assessment*) all'autorità nazionale competente del singolo Paese membro, in cui viene effettuata la richiesta. Questi, dopo averla valutata, la invierà all'agenzia comunitaria competente: l'EFSA (*European Food Safety Authority*).

La successiva valutazione da parte dell'agenzia si dividerà in quattro fasi: identificazione dei pericoli, caratterizzazione dei pericoli, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione dei rischi.

Successivamente all'esaminazione da parte dell'agenzia, l'opinione scientifica a carico della varietà GM considerata viene inoltrato alla Commissione europea, che provvederà a esaminarla. L'eventuale proposta di autorizzazione verrà quindi valutata da un comitato composto da rappresentanti di tutti i Paesi membri, lo *Standing Committee on the Food Chain (SCFCAH)*. Se dalla votazione dello SCFCAH, che deve essere a maggioranza qualificata, dovesse risultare parere negativo o nessun parere, la Commissione europea rielabora la sua proposta di approvazione e la ripresenta allo SCFCAH, o alla Commissione d'Appello (*Appeal Committee*), un ulteriore livello di rappresentanza dei Paesi membri, per una decisione sempre a maggioranza qualificata. Tale commissione può rifiutare l'approvazione oppure esprimere "nessun parere", in questo caso la Commissione europea può prendere una decisione, ovvero l'autorizzazione sarà concessa.

L'autorizzazione può essere rilasciata solo per uno scopo preciso, riguardo una determinata varietà, cioè "coltivazione", "alimenti e/o mangimi", "scopi industriali" o un insieme di più motivazioni tra le precedenti.

A seguito di una decisione favorevole, i singoli Paesi membri possono richiedere l'esclusione del proprio territorio nazionale, nei confronti della varietà transgenica autorizzata. La durata dell'autorizzazione è di 10 anni, al termine della quale bisognerà presentare una nuova ed aggiornata valutazione dei rischi.

Al 2015 le autorizzazioni rilasciate hanno riguardato per il 97% le motivazioni "alimenti e/o mangimi" e "scopi industriali". (Smart et al., 2017)

Tra le varietà autorizzate dalla Commissione europea, con uno o più dei precedenti scopi di utilizzo, troviamo varietà transgeniche di cotone, mais, soia, barbabietola da zucchero, colza.

In contrasto a ciò, molti Paesi membri tra cui l'Italia, hanno vietato la coltivazione delle varietà autorizzate, sul proprio territorio nazionale.

Attualmente, l'unica varietà GM coltivata su superfici considerevoli per scopo non sperimentale, è rappresentata dalla varietà transgenica di mais MON810. Questa varietà, la cui autorizzazione scadrà nel 2027, è caratterizzata dalla resistenza a piralide (*Ostrinia nubilialis* Hübner), mediante l'inserimento del transgene *cry1A (b)*, derivato dal batterio *Bacillus thuringiensis*.

Tale varietà è coltivata attualmente solo in due Paesi membri dell'Unione, Spagna e Portogallo, e in superfici molto limitate. La Repubblica Ceca aveva iniziato la coltivazione di mais GM nel 2005, ma a partire dagli anni seguenti le superfici sono andate in continua diminuzione, fino ad arrivare allo stop della coltivazione nel 2017.

Sempre in Repubblica Ceca era iniziata nel 2010 la coltivazione della varietà GM di patata Amflora®, resistente agli antibiotici. La coltivazione è terminata nel 2012, in seguito al trasferimento negli USA del comparto ricerche dell'azienda tedesca BASF, in conseguenza alla politica non favorevole da parte dell'Unione Europea.

La Slovacchia è stato un altro Paese che ha aperto la possibilità alla coltivazione di piante GM. Nel 2006 è iniziata la semina della varietà di mais MON810, fino ad arrivare a un'estensione massima di 1900 ha nel 2008. Attualmente la coltivazione di tale varietà è cessata, a seguito delle difficoltà da parte degli agricoltori di rispettare le stringenti norme di rendicontazione che regolano le produzioni GM.

È importante considerare che la quasi totalità del mais GM coltivato in Repubblica Ceca e Slovacchia aveva come scopo la trasformazione in biocarburanti o mangime per allevamenti. A seguito dello stop alla coltivazione in territorio nazionale, le ditte importatrici hanno ripreso ad acquistare mais GM proveniente dal mercato estero, con conseguente danno economico causato agli agricoltori locali.

Il maggiore produttore di colture transgeniche all'interno dell'Unione Europea è la Spagna.

La coltivazione di mais GM è iniziata nel 1998 e persiste tuttora, anche se con superfici altalenanti. Al 2017 la superficie risulta essere di 124 227 ha. (Tabella 3)

Tabella 3 – Superfici destinate a mais GM in Spagna per regione, 2013-2017 (ettari).

Regione	2013	2014	2015	2016	2017
Aragona	54 451	54 041	42 612	46 546	49 608
Catalogna	33 996	36 381	30 790	41 567	39 092
Estremadura	16 979	13 815	9 827	15 039	13 976
Navarra	7 013	7 264	6 621	8 066	7 778
Castiglia-La Mancia	8 766	7 973	5 734	5 932	5 069
Andalusia	12 862	10 692	11 471	10 919	8 013
Altri*	2 895	1 371	695	1 011	691
Totale	136 962	131 538	107 749	129 081	124 227

* Castiglia e León, Comunità di Madrid, Comunità Valenciana, Baleari, La Rioja, Comunità di Murcia, Canarie.

Al 2017 in Spagna erano numerose le varietà transgeniche oggetto di studio in campo, per soli fini scientifici, tra cui: frumento (tolleranza ad erbicida glufosinate e stress idrici), colza (durata della fioritura), tabacco (produzione di biomassa), patata e mais (aumento del contenuto di amido).

Il Portogallo nel 2005 è stato il secondo Paese europeo ad aver autorizzato la coltivazione di varietà GM per uso alimentare. Attualmente le superfici sono in diminuzione, dopo aver raggiunto uno sviluppo massimo nel 2012, anche se nel 2017 si è verificato un leggero aumento rispetto all'anno precedente. (Tabella 4)

Tabella 4 – Superfici destinate a mais GM in Portogallo per regione, 2013-2017 (ettari).

Regione	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nord	165	85	78	60	100	46
Centro	774	853	933	1 013	1 485	1 609
Lisbona	2 322	2 215	2 074	2 002	2 138	2 466
Alentejo	5 796	5 041	5 457	4 942	3 346	3 187
Algarve	13	8	0	0	0	0
Azzorre	208	0	0	0	0	0
Totale	9 278	8 202	5 542	8 017	7 069	7 308

Questa riduzione di superfici è avvenuta in seguito alla decisione di alcune industrie alimentari locali di non utilizzare prodotti derivanti da colture GM, per motivi puramente commerciali.

Attualmente le regioni in cui la coltivazione di mais MON810 è ancora diffusa sono quelle centrali del Paese (Centro, Lisbona, Antelejo), dove è più forte la pressione della piralide del mais. La coltivazione di tale mais nella regione del Nord è stata quasi completamente abbandonata in quanto, a causa del clima più freddo, la pressione da parte del parassita è minore.

Un altro aspetto che favorisce la coltivazione nelle regioni centrali è la dimensione delle aziende. Per rispettare i regolamenti comunitari le coltivazioni transgeniche devono essere separate dalle varietà convenzionali da debita distanza. Questo risulta più facile nelle regioni centrali, dove la dimensione media delle aziende agricole è maggiore che nel resto del Paese.

1.4.4 PRINCIPALI COLTURE GM

Sono quattro le colture che rappresentano il 99% delle PGM coltivate su scala globale: mais, soia, colza, cotone.

In alcune specie vegetali, facendo riferimento alle superfici totali di coltivazione su scala globale, le varietà GM hanno un'incidenza significativa. In particolare, nel caso di soia e cotone, le varietà GM sono coltivate in superfici maggiori rispetto alle varietà convenzionali. Considerando invece mais e colza, le varietà transgeniche risultano essere una minoranza, sempre nei confronti delle varietà convenzionali. (Figura 4)

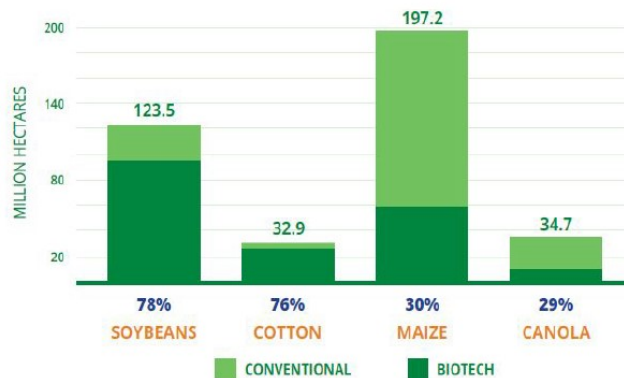


Figura 4 – Tasso di diffusione globale (%) delle quattro principali colture GM, rispetto alle rispettive varietà convenzionali, 2018. (ISAAA, 2018)

In particolare, nel caso di cotone e soia, questo è dovuto al fatto che i principali Paesi produttori sono nazioni in cui l'utilizzo di varietà GM è permesso e frequente: USA, India e Pakistan per il cotone e Brasile, Argentina e USA per la soia.

L'incremento esponenziale di soia GM (Figura 5) è dovuto principalmente all'aumento dell'utilizzo di questa coltura negli USA e Brasile, per la produzione di biocarburanti e come alimento negli allevamenti, il che ha comportato uno sviluppo notevole delle superfici.

Anche la produzione di mais GM è in aumento, anche se in maniera più altalenante in tempi recenti, e con una riduzione media dell'1% a partire dal 2016. (Figura 5) Questo principalmente a causa di condizioni metereologiche e di mercato avverse in Sud America, che hanno comportato una riduzione generale della semina di mais, anche convenzionale. (ISAAA, 2017) È atteso però un recupero delle superfici dovuto all'aumento globale della richiesta di carne, e di conseguenza di mais insilato come alimento per bovini, ma anche a causa della destinazione per produzione di etanolo negli USA e in Brasile. (Xanat et al., 2018)

In Africa le varietà di mais tolleranti gli stress idrici, con incremento delle caratteristiche di *Water Use Efficiency* (WUE), stanno portando ad un aumento delle superfici. In particolare notevoli sviluppi sono legati al programma WEMA (*Water Efficient Maize for Africa*). Questo progetto, supportato da vari stati africani, associazioni di ricerca e aziende private, si è posto l'obiettivo di selezionare varietà tolleranti la siccità, che garantiscano un aumento delle rese anche se sottoposte a stress idrico. Tali PGM, con aumentato WUE, sono state ottenute mediante l'utilizzo del transgene *CspB*, originario dalla proteina B del batterio *Bacillus subtilis*, già utilizzato nella varietà di mais transgenico MON87460. (Adebayo e Sebeta, 2020) (African Centre for Biodiversity, 2019)

L'aumento delle superfici globali a cotone transgenico (Figura 5) sono date principalmente dall'aumento di valore di mercato, che tale coltura ha avuto negli ultimi anni. Questo ha comportato un'elevata richiesta di cotone da parte delle aziende tessili dei Paesi europei e Giappone, Stati in cui la presenza di tale coltura è praticamente assente. L'approvvigionamento avviene spesso da nazioni in cui la coltivazione di PGM è concessa, a differenza di Unione Europea e Giappone, in cui la quasi totalità delle varietà coltivate è di origine transgenica. (Xanat et al., 2018) Significativo è il dato del Sud Africa, che nell'anno 2017 ha aumentato le superfici a cotone GM del 315%, rispetto l'anno precedente.

Riguardo la coltivazione di colza GM, i maggiori Paesi produttori sono USA, Canada e Australia. L'aumento delle superfici (Figura 5) è dato principalmente dall'incremento in queste nazioni dell'utilizzo di olio di colza per la produzione di biodiesel. (Xanat et al., 2018)

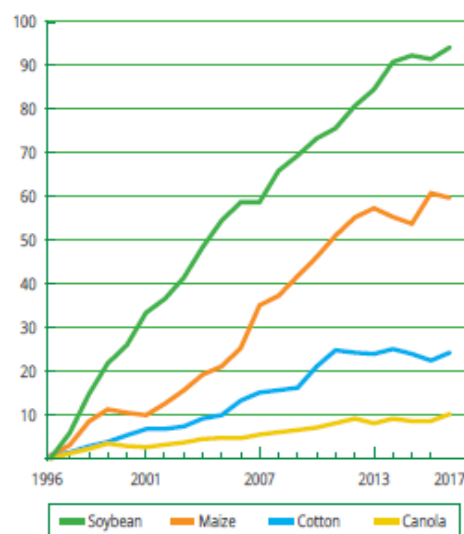


Figura 5 – Superficie globale destinata a colture GM per coltura, 1996-2017 (milioni di ettari).

1.4.5 CARATTERI TRANSGENICI INTRODOTTI

Un fattore importante da considerare, strettamente collegato alla diffusione delle colture GM, sono le tipologie di stress, in particolare biotici, che si cerca di contrastare. Le resistenze e gli areali geografici di coltivazione si influenzano reciprocamente, facendo variare enormemente la distribuzione delle varietà: alcune resistenze che non hanno importanza in determinati Paesi, a causa del clima o della situazione pedologica, la assumono invece in differenti areali.

A partire dalle prime varietà transgeniche si è cercato, come caratteristiche di resistenza principali, quelle nei confronti di erbicidi (HT – *Herbicide tolerant*) ed insetti (IR – *Insect resistant*). Nei primi anni di sviluppo la ricerca si è principalmente concentrata su questi due aspetti singolarmente, solo successivamente si è cominciato a considerare l'importanza della piramidizzazione genetica (*Stacked Traits*). (Figura 6)

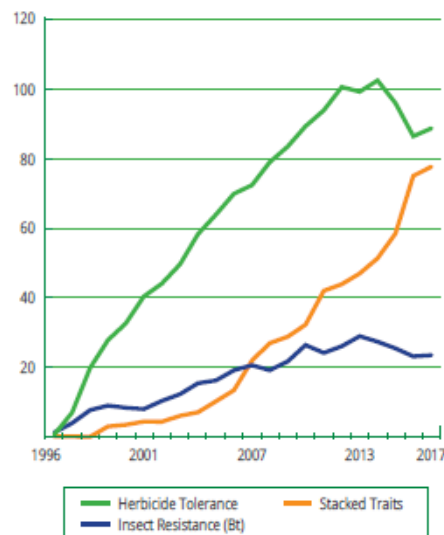


Figura 6 - Superficie globale destinata a colture GM per caratteristica, 1996-2017 (milioni di ettari).

Attualmente i fenomeni di piramidizzazione più ricercati sono a carico dei geni *Bt*, per la resistenza agli insetti. (Figura 7) Tali geni, originari del batterio *Bacillus thuringiensis*, portano alla formazione di endotossine proteiche, che causano una lisi cellulare mediante la formazione di canali selettivi per i cationi, a livello dell'epitelio intestinale, portando alla morte dell'insetto. Questo effetto tossico non avviene a carico dei sistemi digerenti dei mammiferi e degli uccelli, in quanto per la manifestazione della tossicità è richiesto un ambiente alcalino, situazione che si manifesta solamente nell'apparato digerente degli insetti. (Grochulski et al., 1995)

Varie tipologie di transgeni *Bt* sono utilizzati nelle PGM IR per indurre resistenza, principalmente nei confronti di lepidotteri e coleotteri, ma anche ditteri. I principali sono *Cry* e *Cyt*. (Tabashnik et al., 2013)

Un'ulteriore tipologia di resistenza, obiettivo di piramidizzazione, è quella legata ai geni che codificano per la tolleranza agli erbicidi. Questo aspetto risulta fondamentale in quanto, sulla rotazione dei differenti meccanismi di azione (MOA), si basa il principale metodo per evitare l'insorgere di fenomeni di resistenza nei confronti delle molecole chimiche.

Le strategie di resistenza a carico degli erbicidi sono principalmente tre: alterazione del sito d'azione, variazione nel processo di traslocazione e/o compartimentazione, cambiamento della velocità del metabolismo dell'erbicida. (Bøhn e Lövei Bohn, 2017) La maggior parte delle PGM HT coltivate, sono resistenti all'azione dell'erbicida non selettivo glifosate, sfruttando l'azione del transgene *epsps*. Questo ha comportato un notevole aumento nell'utilizzo di tale prodotto, con un relativo incremento dei fenomeni di resistenza, considerando che al 2016 il 56% dell'utilizzo globale di tale erbicida era destinato a colture GM HT. (Benbrook, 2016)

Altri geni utilizzati per l'ottenimento di varietà HT sono il gene *pat*, che conferisce tolleranza all'erbicida glufosinate-ammonio, il gene *aad-1* per 2,4-D (acido 2,4-diclorofenossiacetico) e AOPP (aryloxyphenoxypropionato), il gene *gm-hra* per inibitori dell'ALS (acetolattasi sintasi), il gene *DMO* per dicamba. (Commissione europea. 2020. https://ec.europa.eu/info/index_en)

È facilmente intuibile il motivo della rapida diffusione di varietà GM che presentano caratteristiche multi-geniche: la capacità di prevenire fenomeni di resistenza da parte di insetti ed infestanti, in combinazione con la possibilità di utilizzo di prodotti chimici con diversi meccanismi d'azione, garantiscono un notevole vantaggio per gli operatori.

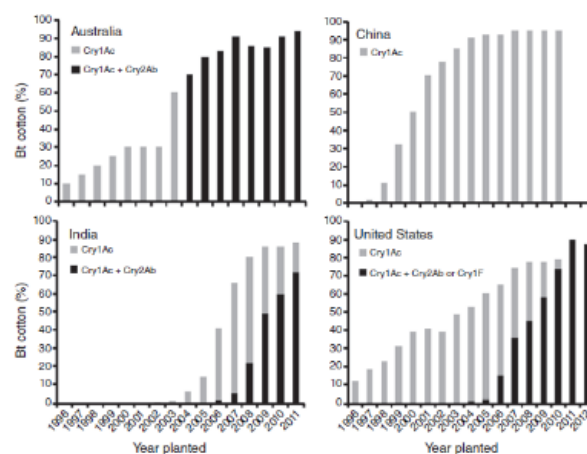


Figura 7 – Cotone *Bt*: espressione di una tossina *Bt* (grigio) o di due tossine *Bt* (nero) in quattro Paesi, 1996-2011. (Tabashnik et al., 2013)

1.4.6 CARATTERISTICHE E DIFFUSIONE GLOBALE

Al 2020, su scala globale, risultavano autorizzate alla coltivazione 32 specie vegetali GM, per un totale di 526 caratteri transgenici indotti. (ISAAA database. 2020. GM Approval Database. Consultato il 03 Nov. 2020, <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>)

Di seguito vengono discusse solamente le specie agro-alimentari GM con maggiore diffusione globale o che presentano caratteristiche transgeniche innovative e/o di recente acquisizione.

- **SOIA** (*Glycine max* L.): la principale caratteristica è rappresentata dalla resistenza ad erbicidi, con 69,3 milioni di ettari, principalmente nei confronti di glifosate (varietà RR® - *Roundup ready*) e dicamba.

Seconda per diffusione è la resistenza multipla ad erbicidi ed insetti, rappresentata dalla cultivar Intacta™, con 26,6 milioni di ettari. Tale varietà manifesta resistenza combinata nei confronti dell'erbicida glifosate, grazie all'espressione di geni *epsps*, e nei confronti dei lepidotteri defogliatori, grazie alla presenza di tossine derivanti da geni *Bt*.

Tra le altre caratteristiche ricercate troviamo l'aumento del contenuto di acido oleico e la conseguente riduzione di acido linoleico, mediante l'utilizzo della tecnologia dell'*RNA interference* (RNAi), sfruttando geni *fad2* e *fatb*, che bloccano l'allungamento della catena degli acidi grassi.

L'RNAi è un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS), indotto dalla formazione nella cellula di una molecola di RNA a doppio filamento, in grado di interferire e spegnere l'espressione genica. Questo avviene grazie all'azione di degradazione del mRNA (RNA messaggero) complementare, ed alla successiva diminuzione della proteina da esso codificata. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

- **MAIS** (*Zea mays* L.): le principali varietà presentano in maniera combinata le caratteristiche IR e HT, con 47,8 milioni di ettari su scala globale.

Le varietà tolleranti gli erbicidi, principalmente glifosate, dicamba, glufosinate-ammonio, sono rappresentate da 5,6 milioni di ettari.

Le varietà di mais *Bt*, con sole caratteristiche IR, in passato rappresentavano la quasi totalità del mais GM coltivato. Oggi invece occupano minori superfici, con un'estensione di 5,5 milioni di ettari.

Sono inoltre presenti, anche in superfici minori, varietà di mais tolleranti la siccità. Le varietà di mais Genuity® e DroughtGuard™ (MON87470) sono state rilasciate nel 2013 negli Stati Uniti, garantendo maggiore tolleranza agli stress idrici, grazie all'espressione del gene che codifica per la proteina CspB. (Kumar et al., 2020)

- **COTONE** (*Gossypium* spp.): le varietà più diffuse presentano caratteristiche IR, con 18,14 milioni di ettari. Seguono poi le varietà con resistenza multipla HT/IR con 5,97 milioni di ettari. Infine le varietà tolleranti gli erbicidi, con 757 000 ettari.

Sia per le varietà a resistenza multipla HT/IR che esclusivamente HT, la principale resistenza è ricercata nei confronti dell'erbicida glifosate, grazie all'espressione di geni *epsps*.

- **COLZA** (*Brassica napus* L.): le varietà più diffuse presentano tolleranza ad erbicidi, principalmente glifosate grazie ai geni *epsps* e all'enzima *glyphosate oxidase* (GOX). (EFSA. 2020. <https://www.efsa.europa.eu/en>) Ulteriori caratteristiche HT sono espresse nei confronti di glufosinate-ammonio, grazie a geni *pat*.

Un ulteriore aspetto ricercato è la possibilità di controllo del sistema riproduttivo, per facilitare l'ottenimento di varietà ibride. In particolare mediante l'introduzione della ribonucleasi *Barnase*, derivante dal batterio *Bacillus amyloliquefaciens*, che codifica per la distruzione del tappeto delle antere causando maschiosterilità, a causa della mancata produzione di polline. La fertilità può essere ristorata mediante l'utilizzo di una proteina, denominata *Barstar*, che legandosi alla ribonucleasi ne inibisce l'attività. (Mariani et al., 1992)

La varietà di recente introduzione DHA (acido docosaesaenoico), approvata nel 2018 in Nuova Zelanda, Australia e USA, aggiunge alle caratteristiche HT un maggior contenuto di acido oleico.

L'estensione globale di colza GM, sommando le differenti caratteristiche delle varietà transgeniche, è di 10,1 milioni di ettari.

- **ERBA MEDICA** (*Medicago sativa* L.): la resistenza più diffusa è quella nei confronti dell'erbicida glifosate, con la varietà RR® (*Roundup ready*), con una superficie di 1,14 milioni di ettari.

La recente varietà HarvXtra™ (inizio coltivazione in pieno campo nel 2016) sta avendo diffusione sempre maggiore, grazie alle caratteristiche di incremento delle rese (+15-20%), minore contenuto di lignina e quindi migliori caratteristiche di digeribilità nel campo della nutrizione animale. Attualmente la superficie globale coltivata, in USA e Canada, risulta essere di 124.000 ettari.

- **PATATA** (*Solanum tuberosum* L.): è coltivata la varietà di patata GM Innate®, divisa in generazione 1 e 2, coltivata esclusivamente negli USA.

La generazione 1 garantisce una minore produzione dell'amminoacido asparagina, responsabile della sintesi di acrilammide, cioè l'ammide dell'acido acrilico. Questa sostanza tossica, che si forma durante la fase di cottura ad alte temperature, è nociva per la salute umana in quanto classificata come potenzialmente cancerogena. In questa varietà la produzione di acrilammide risulta ridotta del 58-72%. Questo risultato è stato ottenuto mediante la tecnologia dell'RNA *interference*, silenziando il gene responsabile della sintesi dell'asparagina, cioè *ASn1* (*asparagina sintetasi-1*).

Nei confronti di tale varietà è stato inoltre ottenuto un ritardo nei processi di imbrunimento, mediante il silenziamento del gene che codifica per l'enzima *PPO* (*polifenol-ossidasi*).

Tale enzima catalizza l'ossidazione dei polifenoli in chinoni, che causano l'imbrunimento di frutta e verdura. Come per il gene *ASn1*, anche l'enzima *PPO* è stato silenziato mediante la tecnologia dell'RNAi. (Waltz, 2015) La superficie di coltivazione della generazione 1 è di 800 ettari.

Nella generazione 2 invece, sono presenti geni che garantiscono resistenza al patogeno *Alternaria solani* (alternaria della patata e del pomodoro). La superficie di coltivazione della generazione 2 è di 900 ettari.

Tutti i geni utilizzati per la sintesi della varietà Innate®, sono originari da piante di patata. (Rosenberg, 2015) Di conseguenza, tale varietà, risulta essere di origine cisgenica.

- **MELO** (*Malus domestica* Borck): la varietà GM di melo Arctic® è coltivata negli Stati Uniti su una superficie di 240 ettari, con caratteristica di rallentamento nell'imbrunitura dei frutti. Tale varietà, ottenuta a partire dalle cultivar Granny Smith e Golden Delicious e successivamente Fuji, è stata autorizzata al consumo umano dalle autorità competenti

nel 2015 negli USA (FDA – US Food and Drugs Administration) e nel 2017 in Canada (Canadian Food Inspection Agency), risultando in commercio a partire dal 2019. (Smith, 2020)

Nella varietà Arctic®, come per la varietà GM di patata Innate®, l'enzima PPO è stato silenziato mediante la tecnologia dell'RNAi, grazie all'inserimento del transgene pGAS. Esso ha portato alla riduzione dell'espressione dei geni PPO2, GPO3, APO5 e pSR7, che controllano i processi di imbrunimento. (Figura 8) L'inserimento del transgene è avvenuto con metodo mediato da *Agrobacterium tumefaciens*. (Firko, 2016)



Figura 8 – Varietà di mela transgenica Arctic®: rallentamento del processo di imbrunimento a seguito del silenziamento dell'enzima PPO. (OSF, 2020)

- **ALTRE COLTURE:** particolare importanza assume la coltivazione di barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*), con superfici di 506 000 ettari, ripartiti tra USA e Canada, con caratteristiche di resistenza all'erbicida glifosate, grazie a geni *epsps*.
Sempre negli USA sono coltivate varietà GM di zucca (*Cucurbita* spp.) con superficie di 1000 ettari, con resistenza multipla a virusi. La resistenza si manifesta nei confronti di *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Watermelon mosaic virus* (WMV). Questo è stato possibile mediante l'utilizzo del gene che codifica per la manifestazione della proteina *cp*, componente del capsido virale.
Varietà di papaya (*Carica papaya* L.) resistenti al virus PRSV (*Papaya ringspot virus*), sono coltivate su 1000 ettari, nelle isole Hawaii.
La varietà di ananas (*Ananas comosus* L.) Pinkglow™, con aumentato contenuto del carotenoide licopene grazie alla tecnologia del RNAi, presenta un particolare colore rosa della polpa. (Figura 9) Essa è coltivata in Costa Rica su una superficie di 21,7 ettari.

In Indonesia è presente dal 2013, su una superficie di 1240 ettari, una varietà GM di canna da zucchero (*Saccharum officinarum* L.) tollerante la siccità. Questa caratteristica è data dall'espressione del gene *betA*, derivante dai batteri *Escherichia coli* e *Rhizobium meliloti*. Tale gene codifica per l'enzima colina-deidrogenasi, che catalizza la formazione del composto osmoprotettore trimetilglicina (TMG), che aiuta l'adattamento allo stress idrico stabilizzando gli enzimi e le strutture proteiche e mantenendo l'integrità della membrana cellulare durante le condizioni di stress. Questa varietà transgenica può resistere in situazione di siccità più di 36 giorni, producendo un contenuto di zuccheri maggiore del 10-30%, rispetto alle varietà convenzionali sottoposte al medesimo stress. (Kumar et al., 2020)



Figura 9 – Varietà di ananas transgenica Pinkglow™: l'aumentato contenuto del carotenoide licopene garantisce alla polpa un colore rosa. (Dal Monte Foods, 2020)

2. METODI DI TRASFORMAZIONE GENETICA

2.1 TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

Tutti gli avanzamenti sulla possibilità di modifica delle molecole di DNA si devono alla fondamentale scoperta di enzimi di origine batterica, in grado di tagliare in maniera specifica le molecole di DNA che possono poi venire saldate da enzimi ligasi.

In particolare gli enzimi in grado di tagliare il DNA sono definiti nucleasi, con l'azione di frammentazione che prende il nome di restrizione. Essi sono in grado di rompere i legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti in corrispondenza di specifiche sequenze, causando la creazione di frammenti polinucleotidici di differenti dimensioni.

Gli enzimi nucleasi sono differenziati in due categorie, in base alla posizione del taglio della molecola di DNA. Se esso avviene nella parte centrale della molecola si definiscono endonucleasi, mentre se avviene nei punti terminali si definiscono esonucleasi. Nell'ingegneria genetica le esonucleasi ricoprono scarsa importanza, in conseguenza alla loro azione a carico dei nucleotidi presenti in posizione terminale, nella molecola di DNA.

Le nucleasi più importanti sono quindi le endonucleasi di restrizione, perché in grado di effettuare la loro azione sia su molecole lineari che circolari di DNA. L'azione avviene a carico solamente di molecole di acido nucleico a doppio filamento e in determinati punti, dove avviene il riconoscimento di una specifica sequenza di basi azotate, che varia in base all'enzima impiegato. Sono definiti ligasi invece quegli enzimi che ricongiungono la molecola di DNA a seguito del taglio, cioè sono in grado di catalizzare la formazione di legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti di diversa origine, causandone la loro unione. Tale fenomeno è definito ligazione. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

L'identificazione di questi enzimi avvenne in seguito alla scoperta che alcuni batteri, come sistema di difesa dai virus, degradavano il DNA virale estraneo grazie a enzimi autoprodotti. Gli enzimi di restrizione sono in grado di distinguere i filamenti estranei dal DNA batterico, poiché quest'ultimo, in corrispondenza delle sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione, viene metilato. Il processo di metilazione agisce come un primitivo sistema immunitario, nei confronti del DNA batterico. Questo in quanto l'azione dell'enzima metilasi garantisce l'integrità del genoma ospite nei confronti delle attività delle endonucleasi.

L'azione protettiva di tale enzima si manifesta mediante la formazione di un legame da parte di un gruppo metile (-CH₃) con una base azotata, citosina od adenina. (Blow et al., 2016) (Figura 10)

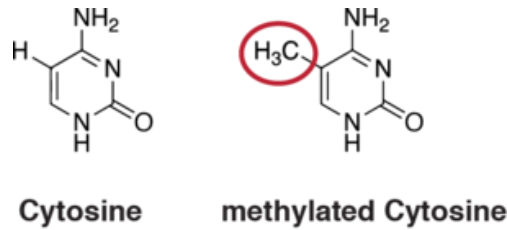


Figura 10 – Metilazione di una molecola di citosina: formazione di un legame con un gruppo metile (CH₃).

Ad oggi sono conosciuti più di 400 enzimi di restrizione (Roberts et al., 2015), ognuno dei quali è capace di riconoscere ed effettuare un taglio della molecola in corrispondenza di una determinata sequenza nucleotidica. Per convenzione ogni enzima acquisisce il nome del batterio da cui deriva, nelle prime tre lettere, seguite poi da un numero romano. (Tabella 5)

Tabella 5 – Nomenclatura dell'enzima di restrizione *EcoRI*.

ABBREVIAZIONE	SIGNIFICATO	SPIEGAZIONE
<i>E</i>	<i>Escherichia</i>	Genere
<i>Co</i>	<i>coli</i>	Specie
<i>R</i>	RY13	Ceppo
<i>I</i>	Prima identificazione	Ordine di identificazione nel batterio

Ciasun enzima riconosce una sequenza specifica nel DNA formata da 4 o 6 coppie di basi azotate, raramente 5 o 8, denominata “palindromo”, in quanto aventi simmetria binaria. Questo comporta che la sequenza è la medesima per entrambi i filamenti di DNA, quando letta in direzione 5' → 3'.

Un'ulteriore differenziazione degli enzimi di restrizione è data dalla modalità in cui viene tagliata la sequenza di riconoscimento. Se le endonucleasi producono dei frammenti di restrizione con estremità piatte si parla di *blunt ends*, mentre se tali frammenti hanno estremità esposte ci si riferisce a *sticky ends*. (Figura 11)



Figura 11 – Frammenti di restrizione *blunt ends* (sinistra) e *sticky ends* (destra).

Le estremità *sticky ends* si formano in quanto il taglio della sequenza può avvenire in maniera asimmetrica verso il 5' oppure verso il 3', generando quindi frammenti di restrizione con un'estremità sporgente di 2-4 nucleotidi rispetto all'altra. Le endonucleasi che generano *sticky ends* sono quelle maggiormente utilizzate nel clonaggio dei frammenti di restrizione. Attraverso l'azione della ligasi è infatti possibile saldare tra loro due frammenti di restrizione con estremità complementari, grazie alla formazione di un legame fosfodiesterico, catalizzato da tale enzima. Anche i frammenti di restrizione con estremità piatte possono venire saldate tra loro, ma utilizzando concentrazioni più elevate dell'enzima ligasi. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

Grazie alla loro specificità, questi enzimi, permettono l'ottenimento della frammentazione di una singola molecola, come un plasmide, o di un intero genoma, in maniera riproducibile.

Ogni endonucleasi genera frammenti di restrizione con estremità complementari, caratteristica che permette di sfruttare questi enzimi per l'assemblaggio di una molecola di DNA ricombinante, ottenuta dall'unione di frammenti provenienti da organismi diversi. (Figura 12)

La possibilità di tagliare ed unire in maniera artificiale e controllata delle sequenze di DNA, derivanti da organismi diversi (transgene), garantisce la tecnologia di base su cui si sviluppano tutte le successive tecniche di trasformazione genetica.

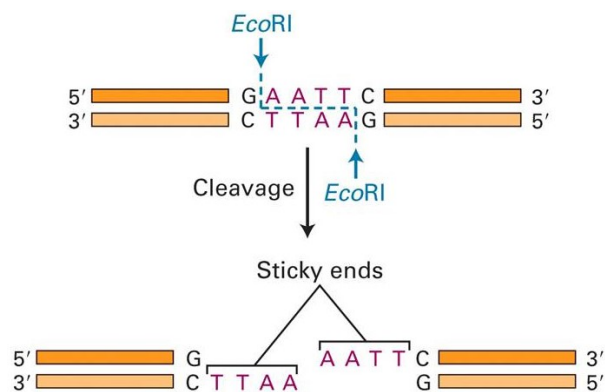


Figura 12 – Azione dell'endonucleasi *EcoRI*: formazione di *sticky ends* composte da 4 nucleotidi.

2.2 DUPLICAZIONE DEL DNA ESOGENO: COSTRUTTO E VETTORI DI CLONAGGIO

La tecnologia del DNA ricombinante ha permesso lo sviluppo dell'ingegneria genetica, grazie alla possibilità di intervento selettivo a carico delle molecole di DNA.

Un aspetto fondamentale, in questa tecnologia, è la possibilità di ottenere numerose copie del DNA di interesse, per essere successivamente trasferito nell'organismo ospite. Questo avviene grazie ai vettori di clonaggio.

Un vettore di clonaggio è una molecola di DNA a doppia elica, in cui è possibile inserire un frammento di DNA esogeno (costrutto), sfruttando la tecnologia del DNA ricombinante. (Figura 13) Tale vettore può replicarsi autonomamente in una cellula ospite.

Il costrutto di DNA oggetto di inserzione è formato, oltre che dal gene esogeno d'interesse, da due specifiche sequenze nucleotidiche: promotore e terminatore. Tali sequenze delimitano a monte ed a valle il gene. (Figura 14)

Il promotore è la regione di DNA a monte del gene da trasferire, dove si lega l'RNA polimerasi per iniziare la trascrizione. Ha lunghezza compresa tra 100 e 1000 pb, generalmente 200 bp. (Watson et al., 2015)

Il terminatore invece è la regione di DNA a valle della sequenza codificante, che costituisce il punto di arresto della trascrizione. In corrispondenza del terminatore il complesso enzimatico dell'RNA polimerasi si dissocia dal DNA, rilasciando così l'RNA sintetizzato. (Liu, 2013)

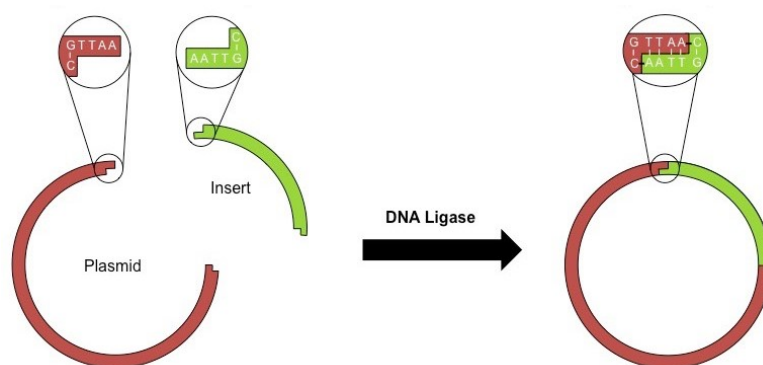


Figura 13 – Il costrutto di DNA esogeno (*insert*) è trasferito all'interno del vettore di clonaggio (*plasmid*), sfruttando la tecnologia del DNA ricombinante. L'azione di ligazione, tra il plasmide ed il costrutto, avviene a carico di due estremità complementari del tipo *sticky ends*.

Per verificare l'integrazione del DNA esogeno nell'organismo ospite, senza dover attendere lo sviluppo completo dell'individuo e la conseguente espressione fenotipica, si ricorre all'inserimento nel costrutto di un gene marcatore (gene *reporter*). (Figura 14)

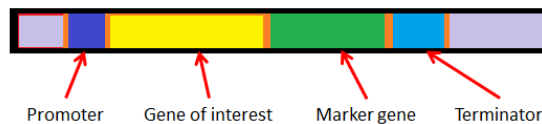


Figura 14 – Sequenza del costrutto di DNA, allestito per l'inserimento nel vettore di clonaggio.

Il gene marcatore permette di osservare facilmente, durante le prime fasi di rigenerazione *in vitro*, in quali cellule/plantule il DNA esogeno è presente e correttamente integrato. Tale operazione è facilmente verificabile, sottoponendo gli individui oggetto di studio all'azione delle sostanze per cui tale gene codifica la resistenza.

Nella costruzione del costrutto, solitamente viene incluso un segmento di DNA che codifica per una regione di collegamento polipeptidica flessibile, in modo che il gene *reporter* ed il gene d'interesse interferiscano l'uno con l'altro solo in minima parte. (Liu, 2013)

Le caratteristiche fondamentali, che un vettore di clonaggio deve quindi possedere, sono la presenza di uno o più siti di restrizione (*polylinker*), in cui avviene l'inserimento del DNA esogeno d'interesse, deve possedere la capacità di replicarsi in un organismo ospite ed essere fornito di uno o più geni marcatori selezionabili (geni *reporter*), che garantiscano il riconoscimento delle cellule contenenti i vettori. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

I vettori di clonaggio disponibili, si differenziano in base alle dimensioni dei frammenti di DNA da replicare. I primi vettori utilizzati sono stati i plasmidi batterici, per il clonaggio di frammenti di DNA di dimensioni modeste (fino a 10 kb). La necessità di trattare frammenti più lunghi ha portato alla sintesi di vettori di clonaggio quali i cosmidi, derivati dal batteriofago λ (lambda), ed in grado di clonare frammenti lunghi fino a 44 kb.

I cromosomi artificiali di lievito (YAC – *Yeast Artificial Chromosomes*) sono invece vettori che permettono di lavorare con sequenze maggiori di 100 kb. (Murray e Szostak, 1983)

I vettori di più recente scoperta invece, risultano essere i cromosomi artificiali batterici (BAC – *Bacterial Artificial Chromosomes*), con capacità di utilizzare frammenti di DNA anche maggiori di 300 kb. (Shizuya e Kouros-Mehr, 2001)

2.3 VETTORI DI CLONAGGIO: I PLASMIDI

I plasmidi sono elementi genetici extracromosomici, formati da molecole circolari di DNA a doppio filamento, in grado di replicarsi in maniera autonoma nella cellula batterica.

Una caratteristica fondamentale è la presenza di una sequenza di origine (*ori*), necessaria per la propria replicazione. Questo permette al plasmide di duplicarsi in maniera indipendente dal DNA cromosomico. Anche se costituiscono una piccola parte del DNA batterico, nella maggior parte dei casi inferiore all'1-2%, (Roberts et al., 2008) contengono geni che codificano per importanti informazioni, come numerose malattie delle piante.

L'utilizzo dei batteri come vettori di clonaggio, sfrutta la loro capacità di incorporare nel proprio genoma frammenti di DNA esogeno, presenti nell'ambiente extracellulare, mediante processi di ricombinazione omologa. Questa caratteristica viene definita trasformazione batterica. (Johnston et al., 2014)

I vettori attualmente utilizzati, nelle tecniche di modificazione genetica, derivano dall'ingegnerizzazione dei plasmidi naturali, principalmente di *Escherichia coli*. (Galata et al., 2019) Comunque, anche se derivanti da organismi diversi, i plasmidi presentano caratteristiche comuni. In particolare le dimensioni sono limitate (minori di 75 kbp in *E. coli*) per garantire una migliore stabilità del plasmide stesso, c'è la presenza di una sequenza di origine (*ori*) che avvia la duplicazione autonoma del plasmide all'interno della cellula, la presenza di una regione con i siti di restrizione (*polylinker*) che consentono l'inserimento del DNA esogeno da trasferire, infine la presenza di uno o più geni marcatori (*reporter*).

Attualmente, tra i geni marcatori più utilizzati nell'ambito dell'ingegneria genetica vegetale, troviamo quelli che codificano per le resistenze agli antibiotici, come tetraciclina (*tet^R*), cloramfenicolo (*cm^R*), kanamicina (*kan^R*) e ampicillina (*amp^R*), con quest'ultimo attualmente più utilizzato. (Brown, 2016)

Il DNA plasmidico può essere inserito nelle cellule batteriche *in vitro*, mediante assunzione diretta dal terreno di coltura, attraverso i pori della membrana plasmatica.

Mediante questi vettori, possono essere inseriti nel genoma della pianta ospite frammenti di DNA esogeno fino a 10 kb.

I plasmidi si replicano in maniera efficiente in cellule batteriche, meno negli eucarioti.

I plasmidi sono attualmente il metodo più utilizzato per la sintesi delle PGM. Tra gli enzimi di restrizione più utilizzati per questi vettori troviamo *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *SmaI*, *HindIII*, *SphI* e *Sall*. (Figura 15) (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

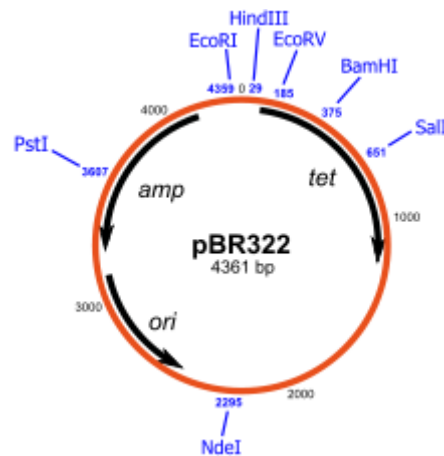


Figura 15 – Rappresentazione schematica del vettore plasmidico pBR322, uno dei primi utilizzati nella tecnologia del DNA ricombinante, originario di *Escherichia coli*. I siti di restrizione sono indicati in colore blu. (Balbas et al., 1986)

2.4 VETTORI DI CLONAGGIO: DERIVATI DA BATTERIOFAGI E COSMIDI

Per non compromettere la stabilità dei plasmidi, essi non possono essere caricati con frammenti di DNA esogeno troppo grandi. Per permettere quindi la clonazione di molecole di DNA con dimensioni maggiori sono stati ideati dei vettori a partire dal batteriofago λ , virus che infetta le cellule del batterio *Escherichia coli*.

Il genoma di λ è composto da una molecola lineare di DNA a doppio filamento lunga 48,5 kb, ma una parte della sequenza può essere rimossa, in quanto essa codifica soltanto per l'integrazione del fago nel cromosoma di *Escherichia coli*. Quindi la rimozione non influenza la capacità di λ di infettare le cellule batteriche e di promuovere la sintesi di nuove particelle fagiche. (Preston, 2003)

Tale rimozione avviene a carico della parte centrale del vettore, dividendo così il batteriofago in braccio destro e braccio sinistro, diviso dalla regione centrale *polylinker*, in cui sono presenti i siti di restrizione. La dimensione massima dei frammenti di DNA esogeno che possono essere clonati, in seguito alla rimozione della regione centrale, è di 18 kb.

Esistono due tipologie di vettori derivati dal batteriofago λ : i vettori di inserzione ed i vettori di sostituzione.

Nei vettori di inserzione il braccio destro e sinistro sono separati dal sito di restrizione. Invece nei vettori di sostituzione tra il braccio destro e sinistro è presente anche un frammento di riempimento, che viene eliminato e sostituito con il DNA esogeno. In entrambi i casi dovrà esserci l'azione di una endonucleasi a carico sia del DNA esogeno, che del vettore stesso, per predisporre entrambi alla successiva ligazione. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

Ulteriori vettori risultano essere i cosmidi, che manifestano caratteristiche riconducibili sia ai plasmidi che ai fagi. Oltre alla regione *polylinker* e al gene marcatore presentano una sequenza *ori*, per la sua replicazione in *Escherichia coli*, ed un sito *cos* derivato dal batteriofago λ , che permette la circolarizzazione della molecola. (Figura 17)

Il cosmide quindi presenta la capacità del batteriofago di accettare frammenti di DNA più lunghi rispetto ai plasmidi, fino a 44 kb, oltre alla capacità di replicarsi in maniera indipendente dal cromosoma ospite, tipica dei plasmidi. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

2.5 VETTORI DI CLONAGGIO: CROMOSOMI ARTIFICIALI DI LIEVITO (YAC) E DI BATTERI (BAC)

Un'ulteriore tecnologia di clonaggio, per incrementare ulteriormente le dimensioni del DNA esogeno da inserire nel vettore, è rappresentato dai cromosomi artificiali di lievito (YAC – *Yeast Artificial Chromosome*) e dai cromosomi artificiali batterici (BAC - *Bacterial Artificial Chromosome*).

Gli YAC, propagati esclusivamente nel batterio *Saccharomyces cerevisiae*, permettono di clonare in maniera ottimale, cioè senza perdite o riarrangiamenti del DNA esogeno, frammenti di DNA di dimensioni fino a 100 kb. Essi non sono basati su plasmidi o virus, ma su cromosomi artificiali. (Murray e Szostak, 1983)

I vettori BAC invece si sviluppano a carico del plasmide della fertilità (*F*) di *Escherichia coli*. È stato sfruttato questo plasmide in quanto relativamente grande, e quindi in grado di garantire una maggiore stabilità e possibilità di accettare inserti di DNA esogeno di dimensioni maggiori, rispetto ai normali plasmidi.

I vettori BAC sono in grado di clonare frammenti di lunghezza fino a 350 kb. (Shizuya e Kouros-Mehr, 2001)

3. TRASFERIMENTO DEL DNA ESOGENO

Successivamente alla costituzione di molecole di DNA chimeriche, contenenti il transgene d'interesse, e l'utilizzo dei vettori di clonaggio per la loro replicazione, avviene il trasferimento del materiale genetico esogeno, all'interno dell'organismo ospite, utilizzando espianti colturali *in vitro*. La PGM verrà quindi rigenerata a partire da espianti cellulari, in cui è stato trasferito il transgene. Questo può avvenire utilizzando sia cellule integre (espianti e calli), ma anche cellule senza parete cellulare (protoplasti).

Questa fase sfrutta la totipotenza delle cellule vegetali, cioè la capacità, anche di una singola cellula, di dedifferenziarsi e rigenerare un organismo completo. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

Il trasferimento del materiale genetico esogeno può avvenire in due modalità differenti: in maniera diretta o mediata.

3.1 TRASFERIMENTO GENETICO DIRETTO: METODI FISICI E CHIMICI

I metodi chimico-fisici utilizzati per trasferire i transgeni in maniera diretta sono essenzialmente quattro: l'elettroporazione, la microiniezione, la fusione dei protoplasti e il metodo biolistico (bombardamento).

Lo scopo finale, medesimo per tutti i differenti metodi di trasferimento, è che il transgene possa essere correttamente integrato nel genoma dell'organismo vegetale e successivamente espresso fenotipicamente.

L'elettroporazione sfrutta degli impulsi elettrici, che generano dei pori momentanei nella membrana citoplasmatica, attraverso i quali il DNA può penetrare nella cellula. I parametri di elettroporazione vengono influenzati variando l'intensità del campo elettrico e la durata del trattamento. Così facendo è possibile ottimizzare l'azione in base al tipo di cellula interessata (cellule dello stoma, antere, zigote, embrione maturo/immaturo, mesofillo, nodi del meristema). L'intensità dell'impulso ($V\text{ cm}^{-1}$) varia poi in base alla specie vegetale trattata, in quanto ognuna possiede un range ottimale. Bisogna porre particolare attenzione ad un impiego adeguato degli impulsi elettrici, in quanto l'utilizzo di intensità troppo elevate, nel campo elettrico, può portare a un eccessivo surriscaldamento delle cellule trattate, che ne causerà la morte. (Ozyigit, 2020)

La microiniezione sfrutta invece un micromanipolatore, mediante il quale la soluzione contenente il transgene è iniettata direttamente nel nucleo di cellule integre (di espianti, calli, embrioni somatici). (Masani et al., 2014)

Il metodo della fusione dei protoplasti (cellule vegetali private della parete cellulare grazie a trattamenti chimici o enzimatici), consiste nella fusione dei nuclei di due diverse cellule, provenienti da organismi diversi, possibile grazie all'assenza della parete cellulare. Ciò avviene sfruttando l'utilizzo di impulsi elettrici, che portano alla fusione delle due cellule e dei rispettivi nuclei. Questo garantirà quindi la presenza di materiale genetico derivante da due differenti cellule, nel medesimo citoplasma. La cellula ottenuta da questo procedimento è definita eterocarionte, da cui si procederà poi a rigenerare un individuo completo. (Wang et al., 2012)

Il metodo biolistico invece, ideato nel 1987 da John C. Sanford e Theodore M. Klein dell'Università di Cornell (USA) (Klein et al., 1987), risulta essere il più utilizzato tra i metodi diretti di trasferimento, sfruttato soprattutto a carico delle specie monocotiledoni. Viene utilizzato un particolare acceleratore di particelle, mediante il quale sono sparati all'interno della cellula dei microproiettili di oro o tungsteno, dal diametro molto piccolo (0,5-1 μm). Questi proiettili sono rivestiti dal DNA che si vuole integrare all'interno della cellula, precipitato sulla superficie dei proiettili. Successivamente alla penetrazione all'interno del citoplasma, e quindi nel nucleo, il DNA esogeno è in grado di integrarsi stabilmente con quello originario della cellula, anche se con un'efficienza non molto elevata.

Questo metodo è stato impiegato con successo nelle più importanti colture agrarie, come mais, frumento, riso e orzo, ma anche a carico delle conifere o di altre monocotiledoni, specie per le quali il metodo mediato da *Agrobacterium tumefaciens* non è attuabile. (Liu et al., 2019a) (Masani et al., 2014) Un vantaggio di questa tecnologia è sicuramente l'ampio spettro di applicabilità: tutte le specie vegetali sono trattabili, in quanto non sussiste il problema derivato dalla manipolazione dei protoplasti.

Altra caratteristica interessante è la possibilità di intervenire a carico del DNA plastidiale, mediante il bombardamento dei tessuti fogliari. Questo permette di risolvere i problemi derivanti dalla diffusione dei transgeni, in quanto i cloroplasti sono ereditati quasi esclusivamente per via materna. L'espressione del carattere risulterà molto alta in quanto la concentrazione dei cloroplasti nelle cellule è elevata, inoltre generalmente non sussistono problematiche dovute al silenziamento genico, in quanto il DNA esogeno è integrato in una specifica regione del DNA del cloroplasto, attraverso un evento di ricombinazione omologa. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

3.2 TRASFERIMENTO GENICO MEDIATO: VIRUS E AGROBATTERI

I metodi di trasferimento mediato prevedono l'utilizzo delle capacità naturali di virus e agrobatteri, di penetrare all'interno delle cellule vegetali.

Il transgene, previo clonaggio negli appositi vettori, viene inserito entro virioni o plasmidi (vettori di trasformazione), ottenendo così il trasferimento mediato da un batterio o da un virus.

Il trasferimento mediato da virus fitopatogeni deve il suo utilizzo alla capacità di tali virus di replicare i propri acidi nucleici all'interno delle cellule vegetali. Essi sono in grado di diffondersi rapidamente nei tessuti della pianta ospite, mediante il passaggio attraverso i plasmodesmi.

I virus utilizzati in questa tecnica sono sia a singola elica di RNA che a doppia elica di DNA. (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

Il genoma dei virus utilizzati per il trasferimento genetico sarà composto da tre elementi fondamentali: i geni per la replicazione del materiale genetico (*replicase*), il gene per il movimento nell'organismo ospite (*movement gene*) ed il gene per la sintesi della proteina di rivestimento del capsido (*coat protein gene*). A questi tre elementi si andrà ad aggiungere il transgene d'interesse. (Figura 16)

L'utilizzo dei virus fitopatogeni come vettori comporta però anche delle limitazioni: in particolare tali entità biologiche hanno un'elevata espressione, grazie alla loro rapida diffusione nell'organismo, ma non integrano il DNA all'interno dei cromosomi dell'ospite. Questo comporta un'espressione del transgene che viene definita transiente, poiché la pianta risulta essere solo un ospite temporaneo e la modificazione data dal transgene avviene totalmente a carico del solo genoma virale.

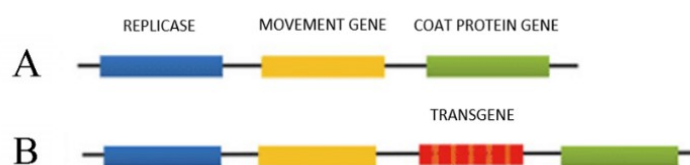


Figura 16 – Rappresentazione schematica di un genoma virale, vettore modello per l'espressione transiente di un gene esogeno in un organismo vegetale. A: elementi di un genoma virale. B: costrutto virale con transgene.

Gli agenti virali maggiormente utilizzati in questa tecnologia sono il virus del mosaico del tabacco (TMV – *Tobacco Mosaic Virus*) e il virus del mosaico del cavolfiore (CaMV – *Cauliflower Mosaic Virus*). (Abrahamian et al., 2020)

La trasformazione transiente viene quindi utilizzata solamente a scopo di ricerca per verificare, ad esempio, la funzionalità del promotore o il compartimento cellulare in cui il transgene viene espresso.

Nel trasferimento mediato da agrobatteri si sfrutta principalmente l'azione di *Agrobacterium tumefaciens*, vettore della patologia del cancro del colletto e *Agrobacterium rhizogenes*, vettore della malattia *hairy roots*.

Entrambi i batteri sono caratterizzati dal possedere un plasmide, di oltre 200 kb di lunghezza, che in seguito all'infezione della pianta ospite, replica e integra all'interno delle cellule infette un tratto del proprio DNA. Questa piccola porzione di acido nucleico viene definita T-DNA ed è contenuta all'interno del plasmide Ti (*Tumor inducing*) nell'*A. tumefaciens* e nel plasmide Ri (*Root inducing plasmid*) nell'*A. rhizogenes*. (Hwang et al., 2015) All'interno della regione del T-DNA, di lunghezza di 12-24 kb, risiedono i geni delle rispettive patogenesi, che vengono trasferiti ed integrati nel DNA cromosomico dell'ospite, a seguito dell'infezione da parte del batterio. Questo causerà il manifestarsi della malattia. La regione del plasmide che compone il T-DNA è contenuta all'interno di due sequenze di bordo, di 25 pb ciascuna, definite *left border* (LB) e *right border* (RB), fondamentali per la sua escisione ed integrazione nel DNA nella cellula ospite. Nella zona di T-DNA, delimitata da LB e RB, sono presenti le informazioni genetiche che portano alla sintesi di auxine (*iaa*) e citochinine (*ipt*) in *A. tumefaciens*, la cui espressione causa uno sviluppo cellulare abnorme, che porta alla formazione dei tumori.

In *A. rhizogenes* invece, la presenza delle citochinine è sostituita da geni *rol* (*root loci*), che portano allo sviluppo accentuato di radici avventizie.

In entrambi gli agrobatteri sono poi presenti geni che codificano per la sintesi di opine, composti prodotti dalle cellule tumorali, per condensazione di un amminoacido con uno zucchero, necessari per lo sviluppo dell'agrobatterio.

Esternamente al T-DNA è poi presente una sequenza *ori*, per garantire al plasmide un mantenimento stabile nelle cellule batteriche in fase di divisione, ed una sequenza *vir*, che include i geni della virulenza e la sequenza preposta alla funzione di coniugazione. (Figura 17) In particolare, sono le proteine codificate dai geni *vir* a riconoscere la pianta ospite, trasferire e integrare il T-DNA nel DNA cromosomico della cellula, aspetto fondamentale in quanto i geni *vir* sono esterni alla regione del T-DNA. (Figura 18)

Solo successivamente all'integrazione nel DNA cromosomico della cellula vegetale, i prodotti genici causeranno il manifestarsi della malattia. (Christie e Gordon, 2014)

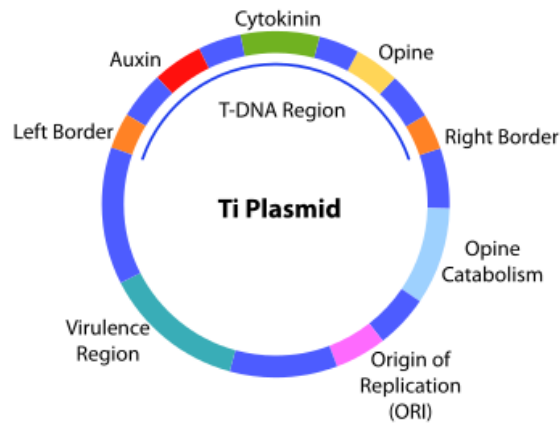


Figura 17 – Plasmide Ti: particolare della suddivisione nelle varie zone di codificazione



Figura 18 – Particolare del plasmide Ti: gli operoni che compongono la regione vir. (Cooley et al., 1991)

Grazie alla scoperta di queste attività, da parte del batterio e del suo T-DNA, si è provveduto a modificare i plasmidi Ti, in modo che non trasferissero l'informazione genetica riguardante lo sviluppo del tumore del colletto, ma il transgene di interesse. Si fa quindi riferimento a plasmidi definiti disarmati, cioè privati dei geni responsabili della sintesi della patologia.

Riguardo i plasmidi Ri invece, non è stato necessario questo passaggio, in quanto risulta possibile la rigenerazione di tessuti transgenici con sviluppo di radici avventizie.

Infine, oltre all'inserimento di un gene marcatore, sono stati rimossi i tratti genetici che codificano per informazioni non funzionali allo scopo di vettore del plasmide, come la sintesi delle opine. (Hwang et al., 2015)

L'utilizzo dei plasmidi disarmati, per il trasferimento dei transgeni nelle piante, prevede quindi che venga inserito nei plasmidi Ti e Ri il gene esogeno d'interesse, clonato in *Escherichia coli* ed inserito nell'agrobatterio mediante processo di coniugazione.

Il trasferimento mediato da agrobatteri è utilizzato maggiormente a carico delle specie dicotiledoni, erbacee e arboree. Questo in quanto le specie monocotiledoni producono speciali sostanze chimiche che agiscono da inibitori naturali, sfavorendo quindi l'azione nei loro confronti degli agrobatteri.

Ad esempio in mais, specie monocotiledone resistente alla trasformazione mediata da *A. tumefaciens*, vengono prodotti metaboliti come 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (*DIM-BOA*) e 2-hydroxy-4,7-dimethoxybenzoxazin-3-one (*MDI-BOA*), che inibiscono l'attività dell'agrobatterio, anche in presenza di segnali che ne inducono lo sviluppo. (Hwang et al., 2015)

Attualmente, nei metodi di trasferimento mediati da agrobatteri, il ricorso ad *A. tumefaciens* è più frequente in ambito applicativo, rispetto ad *A. rhizogenes*.

La principale limitazione, nei confronti del metodo mediato da *A. rhizogenes*, è la presenza del transgene limitata alle radici avventizie, che si vengono a formare in seguito all'infezione da parte del patogeno. Questo comporta quindi la necessità di rigenerazione della pianta transgenica, a partire dalle cellule radicali. Il ricorso ad *A. rhizogenes* ha comunque degli aspetti positivi, in quanto la rapida formazione delle radici avventizie, grazie ai geni *rol* presenti nel plasmide Ri, svolgono il compito di marcatori morfologici, indicando la corretta integrazione del DNA esogeno nell'ospite, senza ricorrere all'uso di antibiotici. L'utilizzo di *A. rhizogenes* è preferito quindi nel caso in cui è la radice l'organo interessato dal trasferimento del DNA esogeno, in quanto la rigenerazione della pianta non è necessaria e quindi il procedimento risulta più veloce e meno costoso. Questo vettore viene quindi sfruttato principalmente per geni che codificano la manifestazione fenotipica, di un carattere a livello radicale. (Bahramnejad et al., 2019) (Fernández-Piñán et al., 2019)

4. TECNOLOGIE PER L'EVOLUZIONE ASSISTITA: INTRODUZIONE E DEFINIZIONE

A partire dalle prime manipolazioni in laboratorio a carico di piante modello, passando per le coltivazioni in pieno campo e su ampie superfici, le tecniche di ingegneria genetica si sono evolute sempre più.

Come analizzato in precedenza, a livello globale l'utilizzo di varietà transgeniche è in crescente aumento negli anni, così come la tipologia di informazioni genetiche che si cerca di trasferire.

Già dai primi anni di sviluppo di queste tecnologie, sono però sorti forti dubbi e preoccupazioni, riguardo l'utilizzo di informazioni genetiche non derivanti dal mondo vegetale. Queste perplessità riguardano sia la salubrità di tali prodotti, sia aspetti ecologici ed etici.

Tali preoccupazioni sono ad oggi fortemente diffuse soprattutto nei Paesi europei, Italia inclusa, fattore che contribuisce alla diffusione molto limitata di tali piante nel comparto agricolo del Vecchio continente. (Lucht, 2015)

È però indubbio che nei prossimi anni l'agricoltura dovrà confrontarsi con numerose sfide, dall'aumento della popolazione globale, ai cambiamenti climatici, alla richiesta da parte dei consumatori di prodotti di elevata qualità. Tutti aspetti che sono imprescindibili dalle applicazioni delle tecniche di miglioramento genetico in campo agrario.

In questo contesto si inseriscono le scoperte degli ultimi anni, in cui si è arrivati a ideare nuove vie di miglioramento genetico delle piante agro-alimentari: il breeding cisgenico e l'editing genomico. Queste tecniche, che vengono incluse entrambe nella definizione di *Tecnologie per l'Evoluzione Assistita* (acronimo TEA), rappresentano le più recenti scoperte nel campo della modificazione genetica a carico delle specie vegetali. (SIGA, 2020)

Breeding cisgenico ed editing genomico hanno l'obiettivo di facilitare i processi adattativi, che hanno gli stessi esiti di quelli che possono verificarsi con le mutazioni spontanee, mediante l'incrocio tra varietà della stessa specie o tra specie sessualmente compatibili.

Tali tecniche garantiscono cambiamenti genetici mirati e sostanzialmente mimano un processo evolutivo basato sulle mutazioni.

5. CISGENESI

Il termine “cisgenesi” è stato ideato nel 2006 dai ricercatori Henk J. Schouten, Frans A. Krens ed Evert Jacobsen, dell’Università di Wageningen (Paesi Bassi). (Schouten et al., 2006)

Per definizione la cisgenesi viene indicata come la modificazione di una pianta mediante l’utilizzo di un gene derivante da un individuo sessualmente compatibile, anche di altra specie. Tale gene, definito cisgene, include i propri introni, promotore e terminatore, con normale orientamento. L’espressione del gene trasferito è quindi sotto il controllo del proprio promotore e terminatore, con totale mancanza di DNA esogeno e relativi marcatori di selezione.

La pianta ottenuta può contenere uno o più cisgeni, ma nessun transgene.

La differenza tra cisgene e transgene risulta notevole sia per l’origine che nella struttura stessa. Nel caso del transgene, la cui origine può essere non vegetale, la struttura può essere modificata ad esempio con l’utilizzo di promotori di un altro gene.

La trasmissione del cisgene all’interno dell’organismo ospite avviene generalmente con le stesse tecnologie utilizzate nell’ottenimento di piante transgeniche. Per le specie dicotiledoni è utilizzato principalmente il metodo mediato da *A. tumefaciens*. Per le specie poco sensibili alle infezioni di tale agrobatterio e le specie monocotiledoni è invece preferito il metodo biolistico.

Una differenza rispetto alla transgenesi è presente nel metodo mediato da *A. tumefaciens*, riguardo le sequenze di confine del T-DNA nel vettore plasmidico. Alcuni autori ritengono che le sequenze di confine del vettore plasmidico devono provenire da genomi del regno vegetale, da specie affini sessualmente compatibili. Queste sequenze denominate P-DNA, molto simili al T-DNA, sono state identificate in diverse specie vegetali. (Yan e Rommens, 2007)

Altri autori, invece, sostengono che l’utilizzo di T-DNA è relativamente sicuro, in quanto le sequenze di confine derivanti da organismi batterici si possono ugualmente trovare all’interno dei genomi delle piante. (Joshi et al., 2011) Inoltre le sequenze apportate nel genoma ospite dal T-DNA sono di ridotta dimensione e non codificanti, quindi non comportano la manifestazione fenotipica di nessuna caratteristica. (Schouten et al., 2006)

L’assenza dei marcatori di selezione è uno degli aspetti fondamentali della cisgenesi. Un procedimento per raggiungere questo obiettivo, prevede il trasferimento di un vettore ridotto, contenente solo promotore, gene d’interesse e terminatore. Questo però comporta un intenso ricorso alla PCR (*Polymerase Chain Reaction*), per valutare l’effettiva presenza del gene inserito, con conseguente aumento dei costi e delle tempistiche.

Inoltre, questa procedura, è possibile solamente con il trasferimento biolistico o mediato da *A. tumefaciens*, ma solamente in caso di specie altamente trasformabili mediante l'agrobatterio. (Dalla Costa et al., 2016)

Esempi di sviluppo di piante cisgeniche, in assenza di marcatori, sono riportati a carico di melo, mediante il cisgene *MdMYB10*, codificante per un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione della biosintesi delle antocianine, che porta alla formazione di frutti e petali rossi. (Krens et al., 2015) La ridotta applicabilità di questo procedimento, comporta il ricorso a procedure che hanno l'obiettivo di rimuovere il/i marcatore/i presente/i. Questo in quanto il loro utilizzo è frequente in cisgenesi, per valutare la corretta integrazione dei geni esogeni nell'organismo ospite. (Vanblaere et al., 2011) (Krens et al., 2015) (Dalla Costa et al., 2016)

Attualmente varie tecniche sono utilizzate, per garantire la rimozione.

Un procedimento si basa sull'induzione di shock termici e l'utilizzo di promotori specifici. Questo è stato testato su vite (*Vitis vinifera* L.), con la rimozione del gene marcatore *nptII*, dopo il trattamento delle cellule transgeniche a temperature di 42°C, per intervalli di 6-8 ore. La rimozione è stata possibile grazie all'azione mediata da un promotore sensibile agli shock termici, del gene della ricombinasi *flp*, che ha indotto la ricombinazione, e conseguente excisione, di una specifica cassetta genica (FRT-*flanked box*), contenente il marcatore, con la conseguente espressione del gene a valle di tale cassetta (35SP). (Figura 19)

L'assenza del marcatore *nptII* è stata poi verificata mediante PCR, che ha confermato l'ottenimento di cellule cisgeniche. (Dalla Costa et al., 2016)



Figura 19 – Particolare della struttura del T-DNA del vettore, contenente la cassetta genica FRT-*flanked box*.

Sono stati inoltre sviluppati altri metodi di excisione, basati sull'utilizzo di sostanze chimiche, come desametasone (DEX) e flucitosina (5-FC).

Studi sono stati effettuati a carico di linee transgeniche di melo var. Gala, trasformate mediante *A. tumefaciens*, con successiva selezione tramite kanamicina, con l'inserimento del gene *Rvi6* che codifica per resistenza a ticchiolatura (*Venturia inaequalis*).

In particolare, i tessuti transgenici sono stati posti in soluzione con DEX, per indurre la rimozione dei marcatori, per un periodo di 17 ore in completa oscurità. Successivamente sono stati inseriti in un'ulteriore soluzione, contenente sia DEX che 5-FC, inducendoli alla rigenerazione. Dopo quattro settimane è avvenuto il trasferimento in soluzione contenente solamente 5-FC, per lo sviluppo dei germogli. Dopo la costituzione e la conferma della natura cisgenica dei rigeneranti, mediante PCR, ulteriore moltiplicazione e preparazione per l'innesto è stata eseguita su terreno senza 5-FC. (Krens et al., 2015)

5.1 CONFRONTO TRA CISGENESI E MIGLIORAMENTO GENETICO CONVENZIONALE

5.1.1 LINKAGE DRAG

Nel miglioramento genetico convenzionale, basato sull'incrocio, non è possibile ottenere solamente il trasferimento del/i gene/i d'interesse, ma piuttosto di interi tratti cromosomici.

L'introggressione di nuovi tratti cromosomici, entro varietà da migliorare, può comportare, accanto all'acquisizione del carattere di interesse, il manifestarsi di caratteri negativi. Questa situazione è chiamata *linkage drag* ed è determinata dalla stretta associazione del gene o del QTL, che determina la manifestazione fenotipica favorevole del carattere d'interesse, con altri geni, che controllano caratteri sfavorevoli. L'espressione del carattere positivo ricercato controlla quindi anche la manifestazione di caratteri indesiderati.

Il *linkage drag* nelle specie vegetali, può inoltre determinare la comparsa di caratteri negativi che interessano anche l'uomo come, ad esempio, la sintesi di tossine e/o allergeni nei frutti. (Telem et al, 2013)

I fenomeni di *linkage drag* possono essere evitati con la cisgenesi, in quanto vengono inseriti nel genotipo da migliorare solamente i geni desiderati, con assenza di qualsiasi frammento di DNA che non sia il cisgene in questione, riducendo quindi il rischio di manifestazione di questi fenomeni negativi. Grazie a ciò, la cisgenesi è generalmente considerata più sicura del breeding tradizionale, nella trasmissione di caratteristiche di resistenza, nei confronti di avversità sia abiotiche che biotiche. Queste caratteristiche positive possono essere piramidizzate in un unico genotipo senza particolare insorgenza di effetti negativi. (Telem et al., 2013)

5.1.2 MANTENIMENTO DEL GENOTIPO ORIGINARIO DELLE VARIETÀ DI *ELITE*

Nel miglioramento genetico convenzionale, mediante i processi di ibridazione, il patrimonio genetico della progenie ottenuta dall'incrocio, sarà il risultato della ricombinazione dei genotipi dei parentali. Nelle situazioni in cui si voglia introgredire uno o pochi caratteri favorevoli in una cultivar di *elite*, è poi necessario procedere alla ricostruzione del genotipo superiore attraverso lunghi e costosi processi di reincrocio (*backcross*).

Questo aspetto è ancora più importante in specie propagate per via vegetativa, come melo e patata, in quanto caratterizzate da elevata eterozigosi, che verrebbe manifestata in caso di fecondazione incrociata. (Jacobsen e Schouten, 2007)

Il ricorso alla cisgenesi permette l'inserimento nel genoma di un determinato gene, mantenendo inalterate le caratteristiche tipiche dell'organismo ospite, se non per la caratteristica codificata dal cisgene. Questo evita quindi il manifestarsi della ricombinazione genetica, a seguito di fecondazione incrociata.

5.1.3 TEMPISTICHE E COSTI

Nel miglioramento genetico convenzionale le tempistiche per ottenere nuove varietà possono essere notevoli e suscettibili a molte variabili: avversità abiotiche e biotiche, fenomeni di *linkage drag*, tempistiche dovute alle numerose generazioni di individui da sviluppare, portano ad un allungamento notevole dei tempi di selezione. Vengono raggiunte tempistiche di almeno 15-20 anni nelle specie arboree per la selezione di caratteri poligenetici (Flachowsky et al., 2011), come ad esempio a carico dei geni *Vf* che regolano la resistenza a ticchiolatura (*Venturia inaequalis*) nel melo. (Chizzali et al., 2016)

L'utilizzo di cisgeni può ridurre enormemente i tempi e i costi necessari, sia per la creazione di nuove varietà che per l'introduzione di singoli caratteri positivi in varietà già affermate. Questo in quanto le caratteristiche ricercate vengono espresse già a partire dalla prima generazione e non sono richiesti successivi cicli di reincrocio, per fissare il carattere ricercato nella nuova varietà. Questa caratteristica ovviamente è la medesima dei processi di transgenesi, in quanto varia la tipologia di gene inserito ma non il processo con cui esso avviene.

5.2 CONFRONTO TRA CISGENESI E TRANSGENESI

5.2.1 TIPOLOGIA DEI CARATTERI TRASFERITI

Nella transgenesi, grazie alla possibilità di ricorrere a geni anche di differente origine, possono essere inseriti nel genoma della specie che si vuole migliorare, caratteri che risultano essere completamente assenti in natura o nelle specie affini.

Nel caso della cisgenesi invece, i pool genetici che possono essere sfruttati sono più limitati. È quindi possibile trasferire solamente alcune caratteristiche, già presenti in natura per una determinata specie o in specie affini. (Telem et al., 2013)

5.2.2 LEGISLAZIONE E OPINIONE PUBBLICA

In tutti i Paesi che prevedono la coltivazione e/o commercializzazione di piante transgeniche, sono previste, in base alla legislazione nazionale, procedure atte a valutare il rischio che tali colture comportano. Le preoccupazioni riguardano principalmente la diffusione incontrollata dei transgeni in natura, l'insorgere di problemi alla salute umana e/o animale o perplessità di natura etica. (Lucht, 2015)

Queste incertezze, interessano solamente in parte le piante cisgeniche, in quanto le modifiche del genoma indotte sarebbero potute avvenire naturalmente nell'ambiente. Questo ha influenzato l'aspetto normativo di tale tecnologia in alcuni Paesi, come ad esempio negli USA, in cui i prodotti cisgenici non sono considerati modificati geneticamente. (Lucht, 2015)

Inoltre tale tecnologia, è generalmente meglio accettata dall'opinione pubblica, rispetto alla transgenesi, in quanto l'origine vegetale dei cisgeni desta meno preoccupazioni. (Rousselière e Rousselière, 2017)

5.2.3 TEMPISTICHE E COSTI PER L'AUTORIZZAZIONE ALLA COLTIVAZIONE

Le tempistiche per lo sviluppo di una nuova varietà transgenica, dallo studio di fattibilità al lancio commerciale, sono molto lunghi. Studi recenti riportano tempistiche di circa 13 anni, per il completamento del processo. (Kumar et al., 2020) Una parte consistente del tempo necessario, è subordinato al superamento dei passaggi burocratici e legislativi necessari per l'approvazione, a cui sono sottoposte le varietà non convenzionali. Il tempo medio necessario per il rilascio dell'autorizzazione nei confronti di una varietà transgenica, da parte degli enti competenti, è stato di 1763 giorni nel periodo 1996-2015, in Unione Europea.

Sono occorsi invece 2467 giorni negli USA, nel periodo 1998-2015. (Smart et al., 2017)

Se le varietà cisgeniche, grazie alle loro caratteristiche, venissero considerate affini alle varietà ottenute da miglioramento genetico convenzionale, e non alle varietà transgeniche, ciò comporterebbe una notevole riduzione delle tempistiche necessarie alla registrazione varietale. Questo già avviene ad esempio negli USA, in cui le varietà cisgeniche non sono considerate dalle autorità come geneticamente modificate. (Lucht, 2015)

La riduzione delle tempistiche avverrebbe grazie a un notevole snellimento dei procedimenti burocratici, legati al rispetto delle normative. La riduzione della complessità dei procedimenti burocratici e legislativi, e conseguentemente dei costi di gestione collegati, garantirebbe poi la possibilità a più aziende, sia pubbliche che private, di entrare in tale mercato, riducendo così l'oligopolio attuale in fatto di brevetti di varietà transgeniche, che a causa dei costi elevati può essere attualmente sostenuto solamente da poche multinazionali, con tutti i rischi che ne conseguono. (Kumar et al., 2020)

Il costo medio globale, per effettuare una valutazione del rischio (*risk assessment*) e successiva registrazione di una varietà transgenica, è stimato attualmente in 35,01 milioni di dollari. (Kumar et al., 2020)

5.3 LIMITI CISGENESI

Gli aspetti positivi della cisgenesi sono sicuramente molti, ma persistono anche alcuni dubbi riguardo tale tecnologia.

Lo sviluppo di varietà cisgeniche implica conoscenze, competenze e tempistiche maggiori rispetto alla transgenesi, con conseguente aumento dei costi. Questo perché la clonazione dei cisgeni d'interesse, in assenza di marcatori di selezione, richiede tempistiche maggiori rispetto alla transgenesi. (Holme et al., 2013)

Un ulteriore aspetto da considerare è l'impossibilità di introdurre caratteri, che non siano compresi nel pool genico sessualmente compatibile. Questa risulta essere una caratteristica intrinseca della cisgenesi, e non propriamente un limite, che però riduce di molto numerosità e tipologia dei caratteri su cui si può intervenire. (Telem et al., 2013)

5.4 INTRAGENESI

L'intragenesi risulta essere un'ulteriore tecnologia, nella modificazione dei genomi vegetali.

Il termine "intragenesi" è stato coniato da Caius M. Rommens nel 2007, esso racchiude sia degli aspetti tipici della transgenesi, che altri della cisgenesi. (Rommens et al., 2007)

Il DNA esogeno da integrare viene definito intragene, esso è un gene chimerico, che non include introni ma la sola presenza di esoni, in cui la sequenza codificante da trasferire, è assemblata con le sequenze regolatrici di altri geni e/o la sequenza codificante può avere orientamento opposto a quello di origine. Con l'intragenesi quindi si assemblano sequenze (regione codificante, promotore, terminatore) provenienti da più geni. Conseguentemente l'espressione dell'intrigene può essere manipolata utilizzando regioni di regolazione diverse da quelle native. (Barcaccia e Lucchin, 2016)

Il processo di ottenimento dell'intrigene risulta quindi molto simile a quanto avviene nella transgenesi. La differenza risiede nell'origine del materiale genetico da trasferire, in quanto il donatore è un organismo appartenente alla stessa specie o comunque a specie sessualmente compatibile. (Figura 20)

Nell'intragenesi poi, le sequenze codificanti, possono essere presenti nello stesso senso di orientamento dell'organismo donatore, quando si ha finalità di guadagno di funzione, oppure in senso opposto, quando l'obiettivo da perseguire è il silenziamento genico.

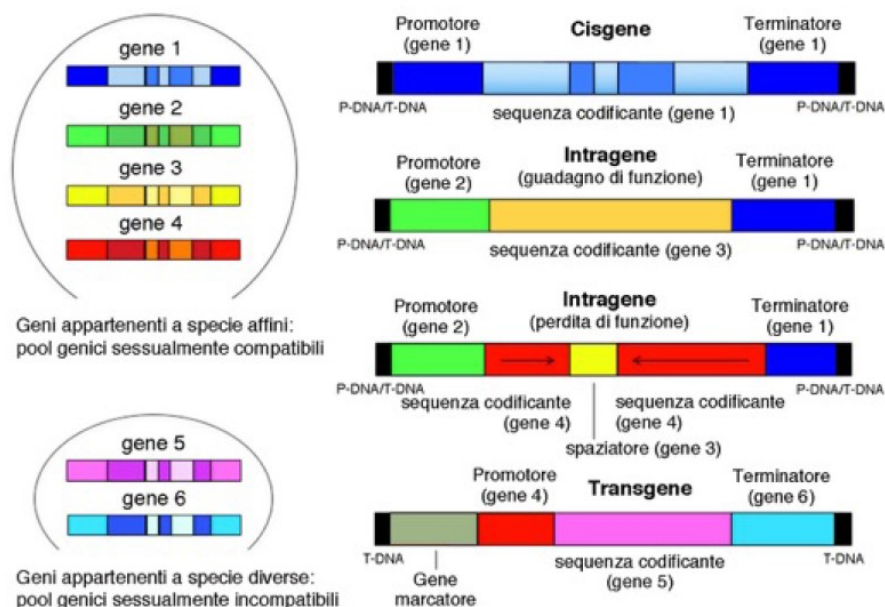


Figura 20 – Cisgene, intragene e transgene: differenza delle varie regioni di composizione

Le tecniche utilizzate per l'ottenimento di piante modificate tramite intragenesi sono le stesse di quelle adottate in transgenesi e cisgenesi. In particolare il metodo mediato da *A. tumefaciens* per le specie dicotiledoni ed il metodo biolistico per le monocotiledoni e le specie poco suscettibili all'infezione da parte di tale agrobatterio.

Come per la cisgenesi, nel metodo di trasferimento mediato da *A. tumefaciens*, è considerata la differente possibilità di utilizzo di plasmidi P-DNA (origine vegetale) o T-DNA (origine batterica). (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

5.4.1 CONFRONTO TRA INTRAGENESI E CISGENESI

La principale caratteristica che differenzia l'intragenesi dalla cisgenesi è la struttura del gene esogeno da trasferire. Nella cisgenesi il gene in questione presenta il suo promotore nativo, introni e terminatore. Esso è una copia completamente identica del gene presente in natura.

Nell'intragenesi invece non sono previsti requisiti riguardanti introni e sequenze di regolazione (promotore e terminatore), l'unica specificità è l'appartenenza dei geni in questione a specie sessualmente compatibili.

Nell'intragenesi sono previsti inoltre costrutti di RNAi (*RNA interference*), meccanismo mediante il quale alcuni frammenti di RNA sono in grado di interferire e spegnere l'espressione genica, grazie alla loro azione di degradazione del mRNA (RNA messaggero) complementare, ed alla successiva mancata sintesi della proteina codificata.

La seconda differenza tra le due tecnologie risulta essere che nella cisgenesi non esistono specifici requisiti riguardanti le sequenze di confine (*borders*) del T-DNA, od altro DNA non codificante trasferito (Barcaccia e Falcinelli, 2019), mentre nell'intragenesi invece, tutti gli elementi genetici devono derivare da specie sessualmente compatibili.

Anche l'assenza di marcatori di selezione è una caratteristica comune ad entrambe le tecnologie. Tuttavia solamente la cisgenesi può garantire il raggiungimento di risultati conseguibili anche con i metodi di miglioramento convenzionale, ma con gli aspetti positivi analizzati in precedenza. Questo perché con l'intragenesi vengono a crearsi nuove combinazioni geniche a seguito della manipolazione artificiale del pool genetico, che non sono invece possibili in piante cisgeniche e derivanti da breeding tradizionale. Per quest'ultimo motivo in molti Paesi l'intragenesi è paragonata alla transgenesi, incluso in Unione Europea. (EFSA, 2012)

5.5 PRESENZA DI SEQUENZE NON VEGETALI NELL'INSERTO (T-DNA E P-DNA)

Le piante cisgeniche ed intrageniche, così come da definizione da parte di alcuni autori (Schouten et al., 2006) (Joshi et al., 2011), non hanno specifici requisiti riguardo l'origine delle regioni fiancheggianti il costrutto genico, utilizzato nel metodo di trasporto mediato da *A. tumefaciens*. Ciò sia esso di origine vegetale (P-DNA) o batterico (T-DNA).

Questo aspetto ha sollevato alcuni dubbi riguardo le tecniche di cisgenesi e intragenesi, che fanno dell'assenza di materiale genetico non vegetale, il principale punto di forza rispetto alla transgenesi.

All'interno del plasmide Ti, il T-DNA è affiancato dalle ripetizioni del bordo sinistro (LB) e destro (RB), composte da un massimo di 25 paia di basi azotate. Il T-DNA trasferito dall'*A. tumefaciens* alla pianta, generalmente contiene 3 nucleotidi dal bordo destro e circa 22 nucleotidi dal bordo sinistro. I nucleotidi LB possono codificare per un massimo di 8 amminoacidi. (Figura 21) (Jacobsen e Schaart, 2009)

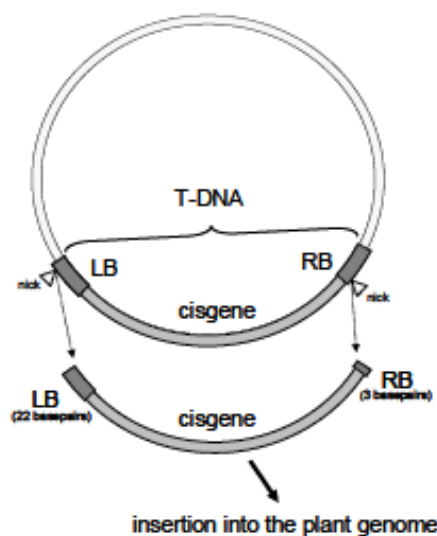


Figura 21 – Particolare del T-DNA contenuto nel plasmide batterico: ripetizione del bordo sinistro LB (22 paia di basi azotate) e ripetizione del bordo destro RB (3 paia di basi azotate).

Durante l'integrazione nel DNA della pianta ospite possono verificarsi delezioni casuali ad una o a entrambe le estremità del T-DNA, con conseguente assenza di queste sequenze di confine nel genoma ospite. (Kim et al., 2003) (Windels et al., 2003) (Hwang et al., 2015)

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che nelle piante si possono naturalmente trovare delle sequenze simili ai 22 nucleotidi del bordo sinistro (Rommens 2004), dati da infezioni precedenti dei batteri *A. tumefaciens* e/o *A. rhizogenes*. (Intrieri e Buiatti, 2001)

Questo aspetto risulta essere di notevole importanza, in quanto dimostra come in natura queste sequenze batteriche possano già essere presenti all'interno dei genomi vegetali, e quindi il loro utilizzo sia sicuro esattamente come quello del P-DNA. (Schouten et al., 2006)

Schouten e Jacobsen (2008) hanno affermato però, in una successiva pubblicazione, che l'assenza di T-DNA nelle piante cisgeniche sarebbe comunque un'eventualità da preferire, se non altro per motivi di opinione pubblica. Pertanto sono stati costruiti vettori specifici per approcci cisgenici ed intragenici, che utilizzano sequenze di DNA provenienti dalla stessa specie vegetale o specie sessualmente affini, per inserire i geni esogeni aggirando i problemi derivanti dall'uso di sequenze di confine batteriche, e della loro eventuale inclusione nel genoma della pianta ospite. (Rommens, 2004) Questi vettori sono rappresentati dal P-DNA.

A conferma dell'assenza di rischio dato dall'utilizzo di T-DNA si è espressa nel 2012 anche l'EFSA, che considera questo aspetto come non fonte di possibili pericoli per la salute umana e l'ambiente. (EFSA, 2012)

In ogni caso è possibile procedere alla costituzione di nuove piante cisgeniche ed intrageniche utilizzando sia P-DNA che T-DNA, come da esempi riportati in Tabella 6. (Holme et al., 2013)

Tabella 6 – Metodi utilizzati per generare piante cisgeniche e intrageniche: utilizzo del P-DNA.

COLTURA	GENE TRASFERITO	METODO DI TRASFERIMENTO	P-DNA
PATATA	<i>GBSS</i>	<i>Agrobacterium</i>	No
PATATA	<i>PPO</i>	<i>Agrobacterium</i>	Sì
PATATA	<i>StAs1</i>	<i>Agrobacterium</i>	Sì
ERBA MEDICA	<i>Comt</i>	<i>Agrobacterium</i>	Sì
FRAGOLA	<i>PGIP</i>	<i>Agrobacterium</i>	No
MELO	<i>HcVf2</i>	<i>Agrobacterium</i>	No
ORZO	<i>HvPAPhy_a</i>	<i>Agrobacterium</i>	No
FRUMENTO	<i>1Dy10</i>	Biolistico	No

5.4 APPLICAZIONE PRATICHE DI CISGENESI E INTRAGENESI

Attualmente gli studi riguardo cisgenesi e intragenesi, applicate alle specie vegetali agro-alimentari, sono in continuo aumento.

Di particolare interesse risulta essere il miglioramento a carico delle specie che vengono riprodotte per via vegetativa, come patata, melo, vite e fragola. Questo perché il miglioramento genetico convenzionale a carico di queste specie è molto complesso e laborioso.

Le caratteristiche maggiormente ricercate sono sia di natura migliorativa della qualità, di resistenza nei confronti di patogeni e/o di caratteristiche fisiologiche, ma anche di silenziamento genico nel caso dell'intragenesi.

Di seguito vengono riportati alcuni esempi, tra gli studi più significativi compiuti ad oggi.

5.4.1 PATATA

La patata (*Solanum tuberosum* L.) è una delle principali colture al mondo per diffusione, sfruttata sia per consumo umano diretto che per trasformazione.

I patogeni che attaccano questa coltura sono molti, ma uno in particolare ha diffusione pressoché globale ed è stato fautore di numerose carestie nel corso della storia: il patogeno fungino *Phytophthora infestans* (peronospora della patata e del pomodoro). A partire dall'arrivo del patogeno in Europa, circa 180 anni fa, è iniziato il tentativo, mediante miglioramento genetico convenzionale, di selezionare varietà resistenti. (Haverkort et al., 2009)

Dal 2006 al 2015 è stato sviluppato nei Paesi Bassi, in collaborazione tra il governo olandese e l'Università di Wageningen, un programma di miglioramento genetico, denominato Programma DuRPh (Durable Resistance against *Phytophthora*), che ha portato alla costituzione di varietà di patata resistenti al fungo, mediante cisgenesi. (Haverkort et al., 2016)

L'approccio è stato quello di incrementare la resistenza di cultivar già coltivate, mediante piramidizzazione in esse dei geni *R*, che inducono resistenza all'avversità. Questo perché, in passato, il patogeno si era dimostrato molto abile nel superare le resistenze indotte dall'espressione dei singoli geni. Sono stati identificati quindi 13 geni *R*, a partire da specie selvatiche di *Solanum* spp. Si è provveduto poi a trasferire tali geni, singolarmente o come cassetta genica contenente più geni, all'interno del vettore *A. tumefaciens*.

Le varietà di patata scelte per il trasferimento dei geni *R* sono state Première, Désirée, Aveka, Atlantic e Bintje.

Inizialmente è stato utilizzato il gene marcatore *nptII*, che codifica per la resistenza alla kanamicina, per valutare in quali combinazioni gene *R*/varietà e/o combinazioni di geni *R*, meglio veniva espresso il carattere ricercato. Grazie all'utilizzo del marcatore è stato possibile selezionare 5 geni, che massimizzavano l'espressione della resistenza: *Rpi-edn2*, *Rpi-blb3*, *Rpi-vnt1.1*, *Rpi-chc1* e *Rpi-sto1*. (Tabella 7) Successivamente il gene marcatore *nptII* è stato rimosso.

Tabella 7 – Manifestazione di resistenza dei cinque geni *R* selezionati, su cinque varietà differenti di patata: è indicata la percentuale di eventi di resistenza manifestati (40-70 eventi testati per varietà).

<i>R</i> gene	Désirée	Première	Aveka	Atlantic	Bintje
<i>Rpi-edn2</i>	95	5	90	95	–
<i>Rpi-blb3</i>	90	80	80	90	80
<i>Rpi-vnt1.1</i>	95	95	90	95	80
<i>Rpi-chc1</i>	50	5	45	50	–
<i>Rpi-sto1</i>	75	80	80	85	90

Con successiva analisi molecolare mediante PCR si è valutato se i geni inseriti risultavano presenti nel genotipo e, successivamente, con test di resistenza mediante l'inoculo del patogeno se la manifestazione fenotipica della resistenza era soddisfacente.

Dall'osservazione dei dati rilevati dopo l'inoculo del patogeno, si è potuto osservare come il manifestarsi della resistenza varia in base al singolo gene *R* trasferito. In particolare una resistenza totale si è avuta solo con la piramidizzazione di più geni, in quanto l'espressione di un singolo gene *R* ha comportato, anche se con intensità variabili, l'infezione da parte del patogeno. (Figura 22)

Questo studio ha quindi dimostrato che, mediante cisgenesi, è possibile modificare delle varietà di patata sensibili al patogeno *Phytophthora infestans* in varietà resistenti. (Figura 23)

Grazie all'eliminazione quasi totale di questa avversità su scala mondiale, la produzione globale di patate potrebbe aumentare di 80 milioni di tonnellate, contribuendo in maniera significativa alla produzione globale di cibo. (Haverkort et al., 2016)

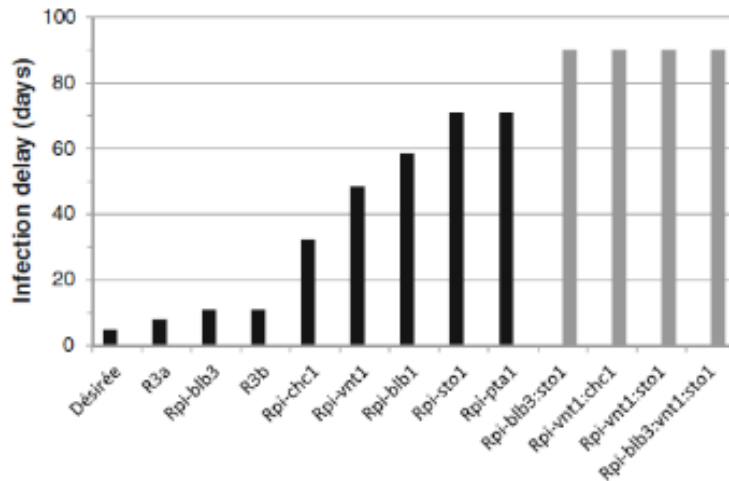


Figura 22 – Monitoraggio della virulenza su varietà Désirée nel 2011 a Lelystad (Paesi Bassi), utilizzando la varietà convenzionale Désirée e le varietà cisgeniche, con uno o più geni *R*. Il ritardo nell'infezione è calcolato tramite differenza (in giorni) tra la prima infezione del patogeno in campo e la prima infezione al clone interessato. Un ritardo maggiore di 90 giorni (colonne grigie) indica che il clone non è stato infettato durante tutta la stagione.



Figura 23 – Confronto tra varietà Première cisgenica, provvista di geni *R* (con foglie) a fianco della medesima varietà convenzionale, defogliata a causa dell'infezione da peronospora (3 settimane dopo l'inoculazione del patogeno, luglio 2008).

5.4.2 MELO

Il melo (*Malus domestica* Borkh) è una tra le colture che meglio si presta al miglioramento genetico tramite cisgenesi, a causa dei notevoli tempi imposti nel miglioramento genetico convenzionale, dati dalla lunghezza del ciclo vitale della pianta.

Una caratteristica molto importante è l'ampia accettazione delle cultivar più diffuse da parte dei consumatori (es: Gala, Golden Delicious), fattore che porta a una difficile diffusione di nuove varietà, a causa di motivi commerciali. Risulta perciò molto interessante la possibilità di inserire un determinato gene di resistenza in una cultivar già affermata.

La cisgenesi nel melo è poi favorita da altre caratteristiche, come l'autoincompatibilità della specie, che impedisce di fissare in condizione omozigote geni di interesse, la riproduzione delle cultivar generalmente per via vegetativa e l'elevata eterozigosità.

Tra i vari patogeni che attaccano questa coltura, quello che richiede un maggiore intervento chimico alle nostre latitudini, è indubbiamente *Venturia inaequalis* (ticchiolatura del melo). (Ugolini, 2018)

La presenza di resistenza nella specie selvatica *Malus floribunda* è nota già dagli inizi del secolo scorso, per cui la specie è stata impiegata come parentale per l'ottenimento di varietà di melo resistenti al patogeno, tramite miglioramento genetico convenzionale. (Crandall, 1926) La successiva identificazione che tale resistenza era controllata da specifici geni *Vf*, ha garantito la possibilità di disporre di materiale genetico per procedere al miglioramento tramite cisgenesi.

In particolare studi sono stati effettuati a carico della cultivar Gala, mediante l'inserimento del cisgene *HcrVf2*, derivante dalla cultivar Florina, resistente a ticchiolatura. (Vanblaere et al., 2011)

Inizialmente il cisgene in questione è stato clonato nel vettore pMF1, derivante da *Escherichia coli* (Figura 24), e successivamente inserito all'interno di *A. tumefaciens*, mediante elettroporazione. Si è provveduto poi all'inoculazione del batterio su giovani tessuti fogliari di cultivar Gala, coltivati *in vitro*. Per verificare la corretta integrazione del DNA esogeno si è fatto ricorso al gene marcatore *nptIII*, resistente a kanamicina.

Successivamente allo sviluppo dei tessuti cisgenici, ottenuti mediante micropropagazione, si è provveduto al loro innesto su portainnesto M9.

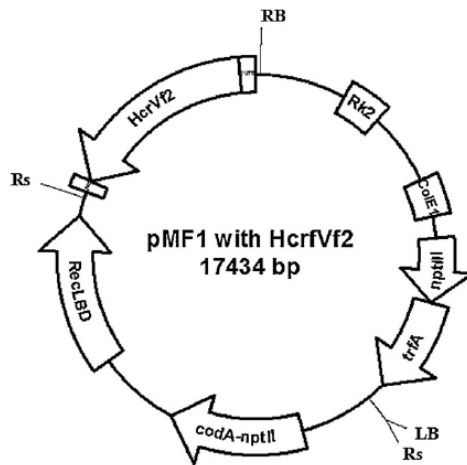


Figura 24 – Rappresentazione del vettore pMF1 contenente il gene *HcrVf2*. Il segmento compreso tra il bordo destro (RB) e sinistro (RB) è trasferito entro le cellule della pianta ospite, mentre il segmento compreso tra i siti di ricombinazione (Rs) è rimosso mediante delezione, dai processi di ricombinazione. Il gene marcatore *nptIII* conferisce resistenza alla kanamicina.

La presenza/assenza del gene *HcrVf2* e del gene marcatore *nptIII* nei tessuti, è stata verificata mediante PCR, con l'utilizzo dei rispettivi primers specifici RT1for e RT2rev per *HcrVf2*, ed i primers pmf_bb3 e pmf_bb4 per *nptIII*. Si è potuto quindi osservare come il cisgene *HcrVf2*, avente banda di dimensione 856 bp, fosse presente, oltre ovviamente che nella cv Florina, anche nelle linee cisgeniche T7.1, C7.1.49, T11.1, C11.1.53, T12.1, C12.1.49. (Figura 25) (Vanblaere et al., 2011)

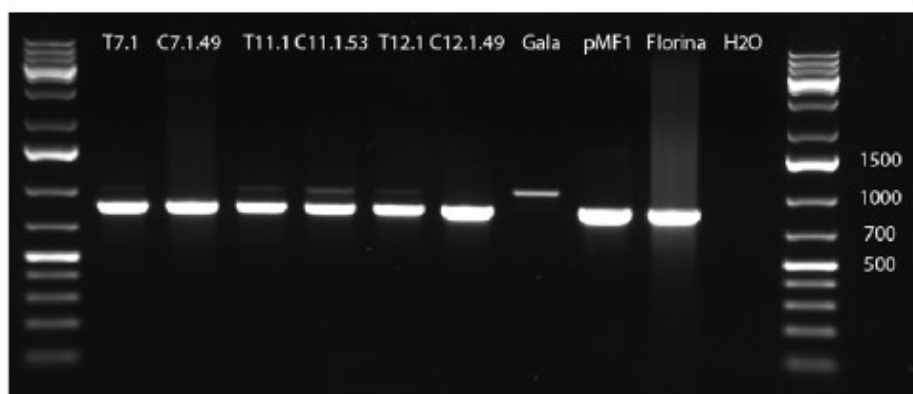


Figura 25 – Analisi genomica del DNA: PCR utilizzando i primers specifici per il gene *HcrVf2*. Il frammento visibile a 1050 bp risulta dalle sequenze omologhe presenti nella cv Gala. La cv Gala e l'acqua sono state utilizzate come controllo incrociato negativo, mentre il plasmide pMF1 (vettore di *HcrVf2*) come controllo positivo.

5.5 NORMATIVA IN UNIONE EUROPEA E CISGENESI

L'interesse del legislatore comunitario riguardo le Tecnologie per l'Evoluzione Assistita, facendo riferimento a cisgenesi ed intragenesi, sono iniziate immediatamente dopo la loro messa a punto. Su volere della Commissione europea venne richiesto nel 2011 all'EFSA (*European Food Safety Authority*), agenzia comunitaria che fornisce consulenza scientifica riguardo i rischi associati alla catena alimentare, di valutare l'eventuale presenza di pericoli per la salute umana in tali tecnologie.

Risale al 2012 la prima pubblicazione scientifica dell'EFSA, riguardante la valutazione della sicurezza di cisgenesi ed intragenesi. (EFSA, 2012) Le richieste della Commissione furono due: 1) determinare la necessità di disporre di nuove linee guida per valutare tali tecnologie e 2) valutare il rischio che tali prodotti potrebbero comportare a carico della salute umana, animale e dell'ambiente, indifferentemente che esse vengano equiparate o meno alla transgenesi.

L'agenzia considerò di procedere facendo riferimento al *GMO Panel*, ovvero le linee guida utilizzate per gli studi a carico delle PGM, messe a punto negli anni 2010 (*Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants*) e 2011 (*Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants*). Questo perché gli eventuali effetti negativi sulla salute umana e sull'ambiente vennero considerati i medesimi, indifferentemente dall'origine della tecnologia.

Dopo la valutazione degli aspetti tecnici, il parere dell'EFSA fu che cisgenesi e miglioramento genetico convenzionale sono due tecnologie equiparabili, in quanto comportano i medesimi rischi. L'intragenesi è invece paragonata alla transgenesi, e quindi considerata potenzialmente pericolosa. Questo in quanto i geni, anche se originari da specie sessualmente compatibili, sono manipolati artificialmente e quindi possono generare effetti indesiderati.

A seguito di questo parere favorevole, nei confronti della cisgenesi, non ci fu però un riscontro positivo da parte del legislatore comunitario. Con sentenza C-528/16 del 25 luglio 2018 la Corte di giustizia dell'Unione Europea ha decretato lo stop delle ricerche. Questo in quanto le piante cisgeniche sono state equiparate dalla sentenza a quelle ottenute da transgenesi, evidenziando però la necessità che vengano modificate le vecchie e superate normative risalenti al 2001, in fatto di organismi transgenici. (Sansavini, 2018) Questa necessità deriva dal fatto che le Tecnologie per l'Evoluzione Assistita, cisgenesi ed intragenesi incluse, sono state concepite successivamente all'entrata in vigore della direttiva che regola la diffusione degli organismi geneticamente modificati, cioè la direttiva 2001/18/CE.

5.6 CISGENESI E CITTADINI EUROPEI

L'interesse dell'opinione pubblica e dei cittadini europei è sempre stata molto forte, nei confronti delle tecnologie adottate a carico delle colture agro-alimentari. (Woźniak et al., 2020)

Anche per questo motivo sono numerosi gli studi a carico delle piante di origine transgenica, e più recentemente cisgenica, effettuati anche direttamente dalle istituzioni europee. (Gaskell et al., 2010) In queste rilevazioni si evince come il consumatore europeo sia generalmente scettico nei confronti delle tecniche di ingegneria genetica, che sono viste come un processo "non naturale" e che non apporta nessun beneficio al consumatore finale, condividendo quindi la legislazione comunitaria molto stringente nei confronti di tali piante.

In particolare, nell'ultima rilevazione effettuata dalla Commissione europea, che ha coinvolto 30 800 cittadini comunitari e di Norvegia, Islanda, Svizzera e Turchia maggiori di 15 anni, il favore nei confronti della transgenesi risultava addirittura in calo, rispetto alla rilevazione precedente. (Figura 26) (Gaskell et al., 2010)

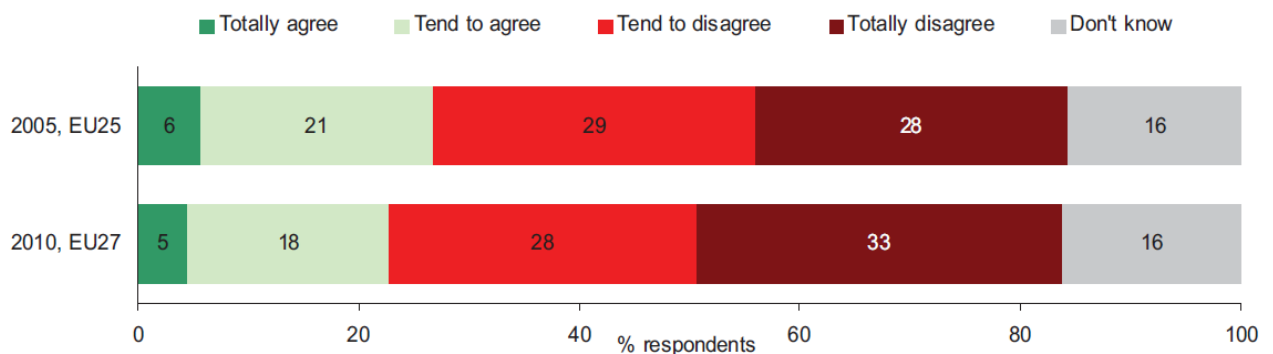


Figura 26 – Cittadini europei e approvazione dei prodotti alimentari derivanti da colture GM, confronto tra 2005 e 2010.

Come precedentemente affermato, una delle cause dello scarso favore nel confronto della transgenesi è la considerazione di tale tecnica come "non naturale". A partire da questa considerazione si è ipotizzato come invece il processo di cisgenesi, ritenuto maggiormente affine al miglioramento genetico convenzionale (EFSA, 2012), possa avere una migliore percezione nell'opinione dei consumatori. Questa ipotesi ha avuto conferma in tutti i Paesi comunitari, in cui è stata analizzata l'approvazione dei cittadini nei confronti di mele di origine transgenica e cisgenica (resistenti a ticchiolatura). Questo ha dimostrato come nella maggior parte dei casi, l'approvazione della cisgenesi fosse addirittura maggiore del 50% del campione. (Figura 28)

Questo dimostra come il garantire prodotti ottenuti da processi considerati “naturali”, che allo stesso tempo consentono di ridurre significativamente l’uso di fitofarmaci, porta a un maggiore favore da parte dei consumatori. (Figura 27)

	GM food	Transgenic apples	Cisgenic apples
<i>% responses</i>			
Safe/not risky¹¹	27	37	53
Not harmful for the environment	30	55	63
Unnatural	76	78	57
Support	27	33	55

Figura 27 – Confronto tra cibi GM, mele transgeniche e mele cisgeniche: percezione della sicurezza alimentare, impatto ambientale, innaturalità ed approvazione (in %), 2010 (EU27, esclusa Danimarca).

L’Italia risulta invece tra i Paesi europei con una più bassa fiducia nelle tecniche di ingegneria genetica, applicate alle colture agro-alimentari, anche se con valori di fiducia più alti nella cisgenesi rispetto alla transgenesi. Questo in quanto l’approvazione dei cittadini italiani è solamente del 44% per il prodotto cisgenico e del 37% per il prodotto transgenico. Tali valori risultano i più bassi in assoluto tra i Paesi comunitari, ad eccezione solamente del Lussemburgo. (Figura 28)

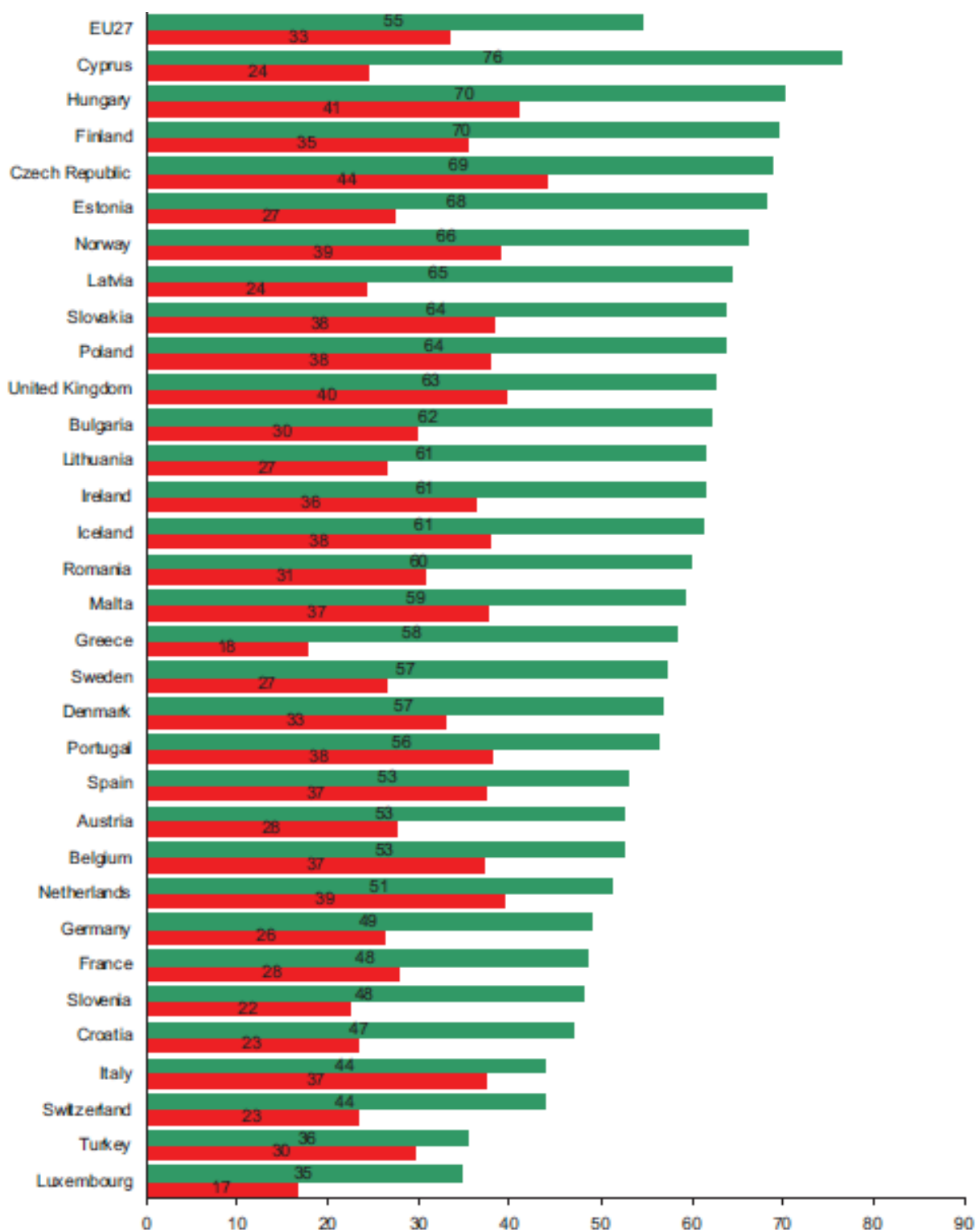


Figura 28 – Approvazione dei cittadini europei, nei confronti di mele cisgeniche (verde) e transgeniche (rosso). Percentuale (%) di votanti che si considerano “d’accordo” o “totalmente d’accordo”, 2010.

Oltre all'aspetto dell'origine "naturale" dei prodotti cisgenici, particolare attenzione è rivolta all'utilizzo dei prodotti fitosanitari, che la quasi totalità dei consumatori vede come aspetto negativo, collegando l'utilizzo delle molecole chimiche in agricoltura a una moltitudine di problematiche ambientali, oltre che sinonimo di una scarsa salubrità dei prodotti alimentari. (Rousselière e Rousselière, 2017) Questo aspetto è molto importante per l'accettazione dei prodotti cisgenici da parte dell'opinione pubblica, in quanto precedenti studi avevano analizzato come i consumatori vedessero in maniera positiva la riduzione dell'uso di fitofarmaci garantito dalla transgenesi, ma non sufficientemente per accettare il rischio di consumare prodotti che al loro interno contengono materiale genetico non derivante dal mondo vegetale. (Kaye-Blake et al., 2005) (Rousselière e Rousselière, 2010)

Recentemente quindi si sono analizzate le preferenze dei consumatori europei, considerando lo stretto collegamento esistente tra cisgenesi e riduzione dell'uso delle molecole chimiche. Viene suggerito l'impiego di un'apposita etichettatura per il prodotto cisgenico, sia per garantire la giusta informazione riguardo la tecnologia che è stata utilizzata per ottenerlo, e inoltre per indicare che di conseguenza tale prodotto è stato sottoposto a minori interventi chimici, grazie alle caratteristiche di resistenza intrinseca date dalla cisgenesi. (Rousselière e Rousselière, 2017) Un ulteriore aspetto da considerare sono le fonti d'informazione dei consumatori, nei confronti delle biotecnologie in campo agrario. Se diversi studi affermano come i cittadini statunitensi siano generalmente più favorevoli ai prodotti di origine transgenica e cisgenica, rispetto agli omologhi europei, (Lusk e Rozan, 2008) questo è dovuto anche alle fonti d'informazione ritenute affidabili in materia. In particolare negli USA prevale una maggiore fiducia nei confronti di scienziati, autorità pubbliche ma anche aziende produttrici di tali tecnologie. In Europa invece risultano avere maggiore credito le associazioni ambientaliste e di difesa dei consumatori, che sono fortemente dubbiose, se non apertamente avverse, nei confronti di tutte le varie tecniche di miglioramento biotecnologico. (Huffman et al., 2004) (Huffman et al., 2007) (Rousselière e Rousselière, 2017)

6. EDITING GENOMICO

Le tecniche di editing genomico si basano sulla possibilità di correggere, rimuovere, inserire o sostituire specifiche sequenze di DNA, in un punto preciso del genoma. Si tratta quindi di indurre la rottura di entrambi i filamenti del DNA nel locus di interesse, che saranno poi riparati mediante processi che avvengono naturalmente nelle cellule, durante i quali si possono produrre delle mutazioni.

Una delle caratteristiche fondamentali di queste tecnologie, risulta essere l'estrema precisione d'intervento. Se le tecniche di transgenesi inseriscono casualmente il materiale genetico nell'organismo ospite, con l'editing genomico si agisce a carico di siti specifici. (Barcaccia e Lucchin, 2016)

Come analizzato precedentemente, queste tecnologie si basano sulla capacità degli enzimi nucleasi di tagliare in modo specifico la molecola di DNA, e sulla successiva riparazione spontanea della cellula.

6.1 MECCANISMI DI RIPARAZIONE E RICOMBINAZIONE DEL DNA: NHEJ E HDR

Le molecole di DNA sono costantemente sottoposte a lesioni, dovute a cause ambientali e/o metaboliche. Risulta quindi di fondamentale importanza per l'organismo, poter intervenire tempestivamente a riparare questi danni.

Quando la rottura interessa entrambi i filamenti del DNA, la riparazione può avvenire mediante due differenti meccanismi: la giunzione delle estremità non omologhe (*Non Homologous End Joining* – NHEJ) e la ricombinazione omologa (*Homology Directed Repair* – HDR). (Liu et al., 2019b)

Per poter avvenire, entrambi questi processi, richiedono un evento scatenante: la rottura del doppio filamento di DNA genomico (*Double Strand Break* – DSB), evento che può essere indotto sfruttando l'azione di nucleasi sito-specifiche. Solo quando questo accade si può indurre una correzione che, con una certa probabilità, non ripristini la sequenza originaria, ma la modifichi con l'integrazione del materiale genetico esogeno di nostro interesse. (Miyaoaka et al., 2016)

Le riparazioni di tipo NHEJ generalmente interessano i singoli nucleotidi, con la loro inserzione (IN) o delezione (DEL) in maniera casuale. Questo genera una mutazione di tipo *frameshit*, che può determinare un codone di stop inatteso, causando così il fenomeno di silenziamento genico. Ciò avviene quando la mutazione è a carico della regione codificante del gene.

Con la riparazione HDR invece, è necessaria la presenza di endonucleasi ingegnerizzate, che inducono il taglio sito-specifico nel cromosoma (DNA genomico), e un donatore di DNA omologo (DNA template). Quest'ultimo viene usato come stampo per l'inserzione o sostituzione del gene, attraverso l'introduzione di alcuni nucleotidi (correzione della sequenza) oppure di un intero gene (sostituzione o inserzione). (Figura 29) (Barcaccia e Falcinelli, 2019)

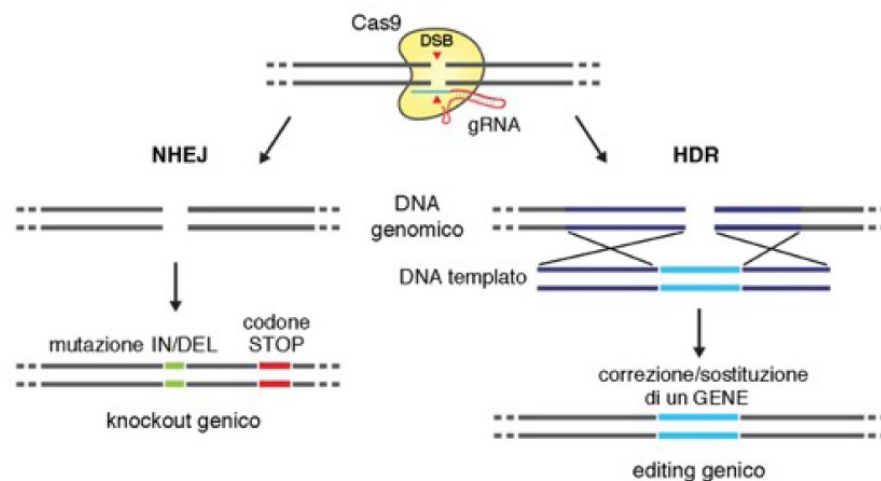


Figura 29 - Riparazione della molecola di DNA a seguito di taglio (DSB) indotto da nucleasi sito-specifica: meccanismo NHEJ e HDR.

Una volta creato il taglio sul doppio filamento di DNA, la cellula ripara il danno utilizzando i meccanismi naturali di riparazione: nel caso di congiunzione non omologa (NHEJ), le due estremità terminali vengono saldate in modo impreciso, consentendo di aggiungere o rimuovere alcuni nucleotidi, determinando così l'inattivazione mirata del gene desiderato, con la successiva produzione di un fenotipo mutato. Tale risultato è del tutto analogo a quelli derivanti da mutazioni naturali o indotte.

Proprio per la possibilità di generare mutazioni il meccanismo di riparazione NHEJ, attivo durante tutto il ciclo cellulare, risulta essere anche il più rischioso per la cellula. (Miyaoaka et al., 2016) È infatti stato dimostrato essere responsabile di mutazioni nel sito di riparazione, con una frequenza del 50% dei DSB in *mycobacteria*. (Gong et al., 2005)

Il meccanismo di riparazione per ricombinazione omologa (HR) è invece considerato meno suscettibile a errori, ma è attivo solamente quando è disponibile il DNA template rappresentato dal cromatidio fratello, cioè principalmente nelle fasi S e G2, il quale viene usato come stampo per la riparazione della lesione del DNA.

L'avvenimento dell'uno o dell'altro meccanismo, dipende dal sistema biologico dell'organismo ospite: nei domini eucarioti prevale il meccanismo NHEJ, mentre nei domini procarioti si assiste con una maggiore frequenza ad eventi HDR. (Abdullah et al., 2020)

Nonostante quindi il meccanismo NHEJ sia più comune nelle piante, è stato dimostrato che fornendo un frammento di DNA omologo al sito bersaglio tagliato, aumenta la frequenza di riparazione mediante ricombinazione omologa (HDR). In questo caso, il frammento di DNA esogeno fornito, viene utilizzato dalla cellula come stampo per la riparazione e, conseguentemente, seppure con una frequenza ridotta, la sua informazione genetica viene trasferita nel genoma della cellula. In questo modo è possibile modificare la sequenza di un gene utilizzando un DNA esogeno con sequenza corretta o, addirittura, è possibile inserire un nuovo gene in una porzione specifica del genoma ospite. (Figura 30) (Barcaccia e Lucchin, 2016)

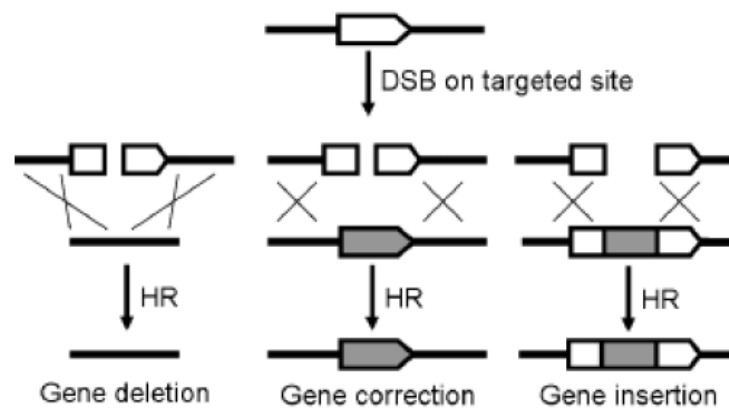


Figura 30 – Riparazione HDR a seguito di evento DSB: in base alle regioni di omologia del DNA donatore è possibile ottenere la delezione, correzione o inserimento di una sequenza genetica. (De Chicchis, 2015)

Per introdurre il DSB sito-specifico nel DNA, sono state sviluppate quattro classi di enzimi endonucleasi: meganucleasi (MNs), *Zinc finger nucleases* (ZNFs), *Transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e il sistema CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Cas (CRISPR-associated).

6.2 MEGANUCLEASI (MN)

Le meganucleasi (MN) sono degli enzimi endonucleasi altamente specifici, in grado di indurre ricombinazione omologa, mediante il taglio sito-specifico della molecola di DNA.

In natura le meganucleasi sono rappresentate dalle *homing endonuclease* (HE), una famiglia molto diffusa di MN, che include centinaia di proteine. (Takeuchi et al., 2014)

A partire dalle HE, sono state ingegnerizzate le MN impiegate nell'editing genomico, mediante due processi. Il primo consiste nel modificare la specificità delle HE esistenti, introducendo un piccolo numero di variazioni alla sequenza di amminoacidi dell'enzima, selezionando quindi le proteine funzionali alla modificazione del sito di riconoscimento naturale. (Rosen et al., 2006)

Un secondo procedimento, si basa sulla possibilità di associare o fondere domini proteici derivanti da diversi enzimi. Questo permette di sviluppare meganucleasi chimeriche con un nuovo sito di riconoscimento, composto da un mezzo sito della meganucleasi A e un mezzo sito della meganucleasi B. (Arnould et al., 2006)

L'obiettivo finale di questi processi di ingegnerizzazione ha quindi come obiettivo la riprogrammazione delle MN, per generare l'evento di DSB in un preciso punto-bersaglio.

Come conseguenza di questi processi a cui sono sottoposte, le meganucleasi utilizzate nelle tecniche di editing genomico vengono definite "ingegnerizzate".

Le MN ingegnerizzate identificano nella molecola di DNA sequenze costituite da 14-40 bp, che vengono riconosciute e scisse con elevata specificità. L'elevata estensione del sito bersaglio, fa in modo che generalmente esso sia presente solamente una volta nel genoma. Questo fa sì che le MN siano delle endonucleasi estremamente specifiche.

Esse sono suddivise in cinque famiglie: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, His-Cys box e PD- (D/E)XK. (Kahlil, 2020) Il loro utilizzo può avvenire a carico di genomi batterici, vegetali e animali.

Attualmente le MN più diffuse, nelle tecniche di editing genomico, sono appartenenti alla famiglia LAGLIDADG, in particolare le meganucleasi I-CreI (Figura 31), derivante dall'alga *Chlamydomonas reinhardtii*, ed I-SceI, derivante dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*. (Alexander, 2018)

Attualmente però le MN sono poco utilizzate nella modifica dei genomi, alle quali vengono preferiti altri enzimi endonucleasi. Questo perché la loro specificità, nei confronti della molecola di DNA, è elevata. Ciò richiede una sequenza estesa fino a 50 amminoacidi, che ne rende complicata e costosa la riprogettazione, limitandone quindi l'impiego. (Takeuchi et al., 2014)

Un esempio di recente applicazione sperimentale di questa tecnologia, nell'ambito delle colture agrarie, ha riguardato piante transgeniche di frumento (*Triticum aestivum* L.), mediante l'utilizzo della meganucleasi I-CreI. In particolare è stata effettuata la rimozione della cassetta genica *DsRed*, contenente il gene marcatore *nptII*. Si è potuto inoltre osservare come in molti casi il sito target della meganucleasi sia stato correttamente ricostituito, offrendo la possibilità a un successivo inserimento di un transgene. (Youssef et al., 2017)

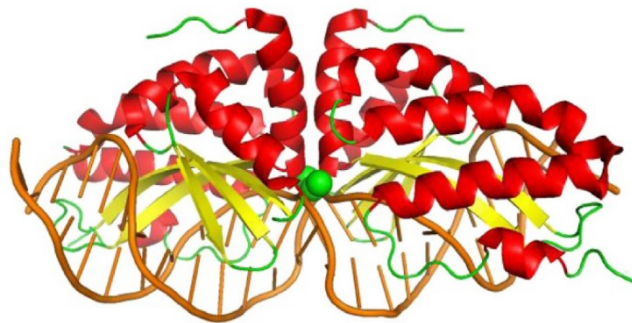


Figura 31 – Struttura tridimensionale del complesso I-CreI/DNA. (Zaslavskiy et al., 2014)

6.3 NUCLEASI A DITO DI ZINCO – ZINC FINGER NUCLEASE (ZNF)

La scoperta dei motivi a dita di zinco risale al 1983, grazie agli studi compiuti a carico del fattore di trascrizione (TF) IIIA, presente negli ovociti della rana acquatica africana *Xenopus laevis*. (Hanas et al., 1983) La sequenza amminoacidica sequenziata da TF-III A ha rivelato la presenza di sequenze in tandem, formate da residui di circa 30 amminoacidi ciascuna, con la presenza di due cisteine (C) e due istidine (H). Tali residui formano dei legami con uno ione zinco (Zn^{2+}), presente all'interno della struttura tridimensionale, che si ottiene dal ripiegamento (*folding*) dei suddetti 30 residui amminoacidici, nel momento in cui si vanno a formare le strutture caratteristiche di ogni proteina. (Lee et al., 1989)

Si fa riferimento al termine “dito di zinco” in quanto il legame con lo ione zinco, determina una struttura ad ansa, che ricorda la forma di un dito. (Figura 32)

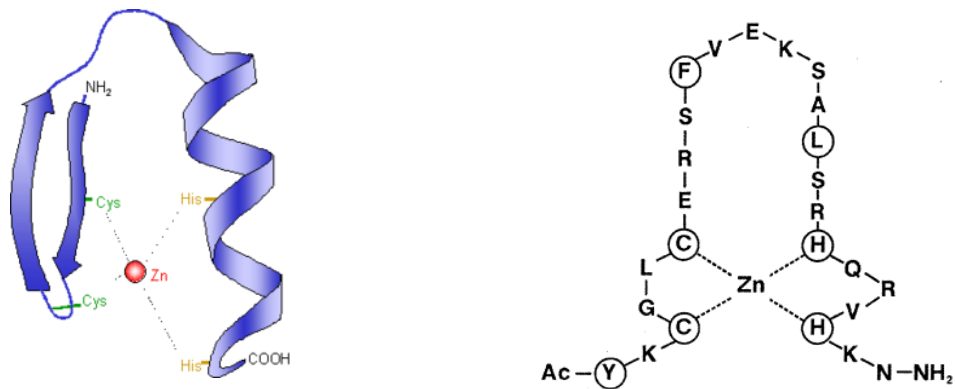


Figura 32 – Rappresentazione tridimensionale (sinistra) e lineare (destra) della struttura proteica a dito di zinco. Gli amminoacidi cisteina (Cys, C) e istidina (His, H) si legano con lo ione zinco, formando la tipica struttura ad ansa.

A partire da queste scoperte è iniziata la sintesi delle nucleasi a dito di zinco (ZFNs), mediante la fusione del dito di zinco e una nucleasi. In questo modo, quando le ZNFs riconoscono una sequenza specifica di nucleotidi, generano un'interruzione sulla doppia elica del DNA (DSB). In seguito a ciò è possibile inserire in tale interruzione il DNA esogeno d'interesse, sfruttando i processi di ricombinazione omologa (HDR).

La capacità di queste nucleasi, di legarsi a una determinata regione genica, avviene grazie all'allestimento modificabile delle sequenze di amminoacidi, che garantiscono così un riconoscimento sito-specifico. Conseguentemente, le nucleasi con sequenze di amminoacidi programmabili, sono potenzialmente in grado di legarsi a qualsiasi punto del DNA genomico. (Gaj et al., 2013)

Le ZNFs sono formate da due differenti domini: il dominio di legame al DNA ed il dominio di scissione del DNA. Il dominio di legame al DNA contiene il motivo a dito di zinco, ripetuto da tre a sei volte. L'assemblaggio più diffuso è quello che implica tre dita di zinco, ognuna in grado di riconoscere una specifica sequenza di nove coppie di basi del DNA. (Klug, 2010) L'aspetto positivo dell'utilizzo di ZNFs, quando si legano a gruppi di sole tre coppie di basi, è quello di ridurre la possibilità che ci siano regioni di riconoscimento sovrapponibili. (Figura 33) (Klug, 2010)

Il dominio di scissione aspecifica del DNA invece è rappresentato dall'enzima di restrizione *FokI*, legato all'estremità terminale della proteina a dito di zinco.

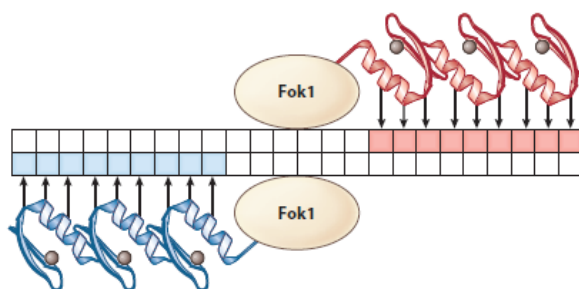


Figura 33 – Correzione genica utilizzando una coppia di ZFNs a tre dita di zinco, per indurre una DSB. Un singolo dito di zinco si lega a tre residui nucleotidici. I peptidi del dito di zinco sono collegati all'endonucleasi *Fok1* da un breve linker di amminoacidi. Nella struttura tridimensionale i due domini formano un'associazione dimerica. (De Chicchis, 2015)

Per fare in modo che il dominio endonucleasico sia in grado di generare il taglio del doppio filamento di DNA, è necessaria la sua dimerizzazione e, per tale motivo, sono necessarie due ZFNs. (Figura 34) (Miller et al., 2007)

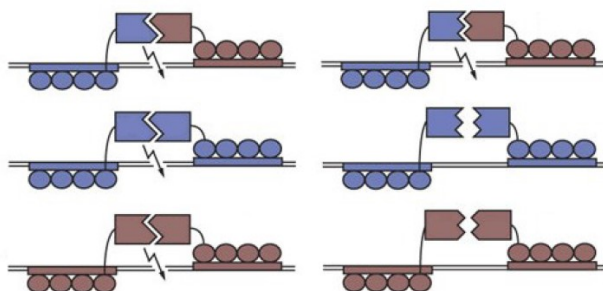


Figura 34 – L'interfaccia di dimerizzazione simmetrica (sinistra) consente tre associazioni, in grado di indurre fenomeni di DSB. L'interfaccia di dimerizzazione asimmetrica (destra) consente una sola associazione tra endonucleasi *Fok1*. (De Chicchis, 2015)

Successivamente al DSB è possibile introdurre il DNA esogeno. Questo avviene grazie ai processi di riparazione HDR oppure HNEJ, quest'ultimo più frequente negli organismi vegetali, che porta alla manifestazione di fenomeni di silenziamento genico (*gene knockout*).

L'azione svolta dalle ZFNs risulta essere molto precisa: una terna di ZF riconosce una sequenza specifica di 9 residui nucleotidici, per un totale quindi di 18 bp, grazie all'utilizzo di due terne ZF. La principale limitazione nell'uso delle ZFNs, definita "specificità dipendente dal contesto", fa riferimento alla stabilità con cui le dita di zinco adiacenti aderiscono alla molecola di DNA. Cioè la loro specificità non dipende solamente dalla sequenza bersaglio, ma anche dalle sequenze adiacenti nel genoma.

Questo può causare la frammentazione e l'instabilità del genoma stesso, quando si verificano molte scissioni non specifiche.

Inoltre le ZFNs possono causare fenomeni di tossicità nelle cellule, a causa di scissioni fuori bersaglio. Questo è dato dalla probabilità di un taglio impreciso della sequenza bersaglio, a causa di sostituzioni di singoli nucleotidi, o di un'interazione inappropriata tra i domini. (Kahlil, 2020)

Applicazioni sperimentali delle ZFNs su colture agro-alimentari sono state effettuate su frumento. In particolare si è intervenuto a carico dell'enzima acetoidrossi-sintasi (AHAS), mediante l'inserimento di una tripletta (e, quindi, singolo amminoacido nella proteina bersaglio), tramite processo di riparazione NHEJ, per conferire alla pianta ospite tolleranza gli erbicidi imidazolinoni (inibitori dell'ALS). (Ran et al., 2018)

6.4 TRANSCRIPTION ACTIVATOR-LIKE EFFECTOR NUCLEASE (TALEN)

I limiti che caratterizzano le ZFNs hanno contribuito allo sviluppo di una nuova classe di endonucleasi: le *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (TALEN). (Kahlil, 2020)

Esse sono ottenute dalla fusione di un dominio di scissione del DNA (due unità di *FokI*) e un dominio proteico TAL (*Transcription Activator-Like Effectors*), che si lega in modo selettivo alle sequenze target del DNA. Il dominio TAL effectors può essere modificato artificialmente, per garantire il riconoscimento delle sequenze di DNA, esattamente come il dominio di legame al DNA nelle nucleasi a dito di zinco.

Tali proteine sono originarie dell'agrobatterio *Xanthomonas*, che le introduce nella pianta successivamente all'infezione, mediante un sistema di secrezione di tipo III. (Figura 35)

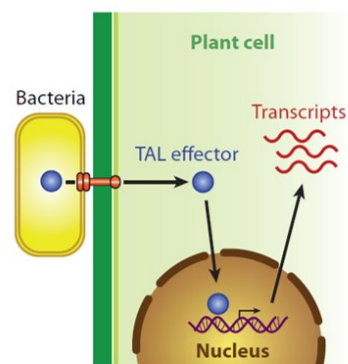


Figura 35 – Trasferimento mediato da agrobatterio *Xanthomonas*: il dominio proteico TAL effector è inserito all'interno della cellula e successivamente integrato nel nucleo, favorendo la manifestazione dei geni che avvantaggiano l'infezione. (Boch e Bonas, 2010)

L'identificazione di tale sequenza promotrice da parte dei TAL effectors è garantita da una sequenza centrale ripetuta da 1,5 a 33,5 volte, composta da 33-34 residui di amminoacidi altamente conservati, ad esclusione dei residui presenti in posizione 12 e 13. (Kahlil, 2020) Si fa riferimento a queste due posizioni (12, 13) con l'acronimo RVD (*Repeat Variable Di-residue*), in quanto sono altamente variabili. La presenza dei due amminoacidi in questione è fortemente collegata al riconoscimento dei singoli nucleotidi. La ripetizione presente all'estremità carbossiterminale risulta troncata, cioè è formata da un numero di residui di amminoacidi inferiore ai 33-34, per tale motivo viene definita "mezza ripetizione". (Figura 36)

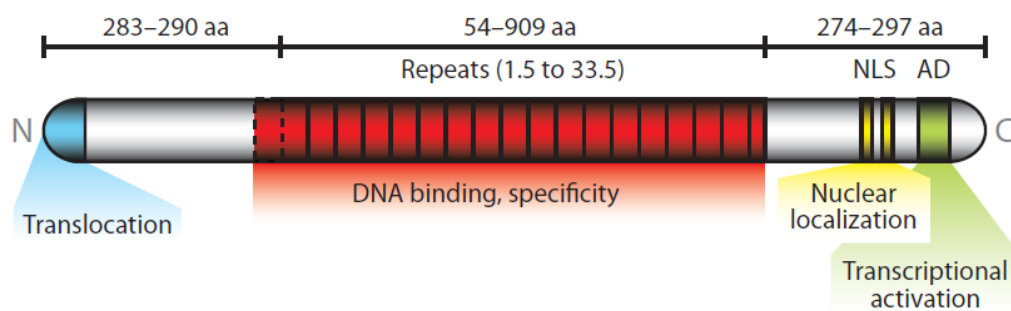


Figura 36 – Dominio funzionale TAL di agrobatterio Xanthomonas: la regione N-terminale contiene il segnale di traslocazione di tipo III. Il numero delle ripetizioni TAL varia da 1,5 a 33,5, con le posizioni RVD (tratteggiate) che contribuiscono al legame con la molecola di DNA. Sono inoltre presenti la zona che rappresenta il segnale di localizzazione nucleare (NLS) ed il dominio di attivazione trascrizionale (AD). (Boch e Bonas, 2010)

La capacità di riconoscimento dei singoli nucleotidi (Figura 37), risulta essere la caratteristica che avvantaggia le TALENs rispetto alle ZFNs, in cui ogni singolo dito di zinco si lega a 3 nucleotidi. Questo comporta una maggiore precisione nell'azione di DSB, limitando gli eventi off-target, responsabili di fenomeni di tossicità a carico delle cellule. Inoltre l'ingegnerizzazione delle TALENs risulta più semplice, rispetto alle ZFNs. Entrambi questi aspetti, risultano essere i principali vantaggi di queste nucleasi, rispetto ai metodi analizzati in precedenza. (Kahlil, 2020)

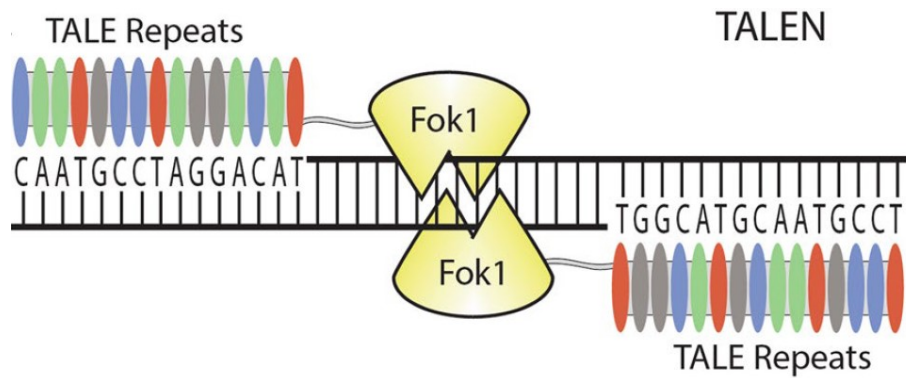


Figura 37 – Struttura di una endonucleasi TALEN: dominio proteico TALE, in grado di legarsi ai singoli nucleotidi, associato all'enzima nucleasi *Fok1*, responsabile dell'azione di DSB. (Malzahn et al., 2017)

Esempi applicativi a carico di colture agro-alimentari, mediante queste nucleasi, sono stati compiuti su riso (*Oryza sativa* L.) per contrastare il patogeno *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, vettore della malattia della peronospora batterica del riso, in particolare intervenendo a carico del gene *Os11N3*, che induce suscettibilità alla batteriosi. Tale gene, in situazioni normali, codifica per la sintesi dei trasportatori del saccarosio all'interno della pianta. In seguito all'infezione l'attività di tale gene viene modificata, deviando il flusso di saccarosio verso il batterio, in modo da garantirne la sopravvivenza e lo sviluppo, ai danni della pianta ospite. Mediante l'ingegnerizzazione di due coppie di TALENs specifiche, è stato possibile intervenire in maniera mirata, inducendo mutazione nelle regioni del gene aventi funzioni di induzione alla virulenza, senza intaccare l'attività di sviluppo dei trasportatori del saccarosio.

In seguito a test mediante l'inoculo del patogeno, il 48% delle piante trattate ha manifestato fenomeni di resistenza alla batteriosi. (Li et al., 2012)

6.5 CRISPR/Cas9

6.5.1 INTRODUZIONE E CENNI STORICI

Le tecniche di ingegneria genomica mediate da ZFNs e TALENs sono fortemente dipendenti dall'assemblamento di una sequenza di amminoacidi nel costrutto, successivamente in grado di riconoscere e legarsi a una specifica sequenza di DNA. La sintesi di questi domini proteici risulta essere molto laboriosa e richiede tempistiche notevoli, con conseguente aumento dei costi. Con queste premesse si è quindi ricercato un metodo di editing genomico che garantisse una maggiore applicabilità, senza comprometterne l'efficacia.

Il sistema CRISPR/Cas9 risulta essere il metodo più recente e innovativo tra le tecniche di editing genomico, grazie a una struttura semplice e un'applicabilità a carico di una vasta gamma di organismi. A differenza di ZFN e TALEN, nel sistema CRISPR/Cas9 il riconoscimento della sequenza di DNA da modificare è operata non da proteine, ma da una sequenza di RNA.

Le prime scoperte, riguardanti tale sistema, avvennero nel 1987: un gruppo di ricerca dell'Università di Osaka (Giappone) clonò accidentalmente una parte delle sequenze CRISPR, in seguito a studi su *Escherichia coli*. (Ishino et al., 1987) Solamente nel 2007 però, un gruppo di ricercatori dell'Università di Laval (Canada) e di un'azienda danese, grazie a studi compiuti in *Streptococcus thermophilus*, dimostrarono che alcuni batteri conservano nei propri cromosomi una "biblioteca genica" delle passate infezioni fagiche, avvenute a carico della cellula, sottoforma di brevi sequenze ripetute di DNA. Questo garantisce la possibilità d'immunità adattativa del batterio, grazie alla capacità di riconoscimento del DNA estraneo, con cui era già venuto in contatto. (Barrangou et al., 2007) Questo insieme di brevi sequenze di DNA è stato denominato CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* – brevi ripetizione palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari), che è presente in circa il 40% dei batteri e il 90% degli archeobatteri. (Kahlil, 2020)

Studi successivi hanno dimostrato che nelle sequenze CRISPR sono presenti dei geni che codificano per delle endonucleasi denominate Cas (*CRISPR associated*), in grado di tagliare la molecola di DNA in un punto preciso della sequenza. (Brouns et al., 2008)

Nel 2011 venne scoperto che nel sistema CRISPR II, l'enzima Cas9 riconosce esclusivamente un DNA estraneo entrato nel batterio e lo taglia in maniera specifica, quando il batterio ha una copia di questa sequenza nel suo CRISPR. Nello stesso anno venne inoltre dimostrato che l'enzima Cas9 ha bisogno di un piccolo RNA specifico, che lo guida nel riconoscimento della sequenza da

tagliare. (Deltcheva et al., 2011) La specificità rispetto al DNA bersaglio è legata a una piccola (20 nucleotidi) molecola guida di RNA, il cosiddetto CRISPR RNA (crRNA), codificato nel locus CRISPR e complementare al DNA estraneo.

A partire da tali scoperte, le ricercatrici Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier, hanno progettato un sistema in grado di tagliare il DNA in un sito specifico, grazie all'unione di più componenti. Si è provveduto a unire una nucleasi Cas9, una copia del DNA bersaglio (sotto forma di un piccolo RNA complementare) e un ulteriore RNA, specifico dell'enzima. I due RNA possono essere uniti in una sola molecola (gRNA – RNA guida), in grado di guidare Cas9 verso la sequenza di DNA specificata. (Jinek et al., 2012) Grazie a tale scoperta le due ricercatrici sono state insignite del premio Nobel per la chimica nel 2020.

A partire quindi da un primitivo sistema immunitario presente nei batteri, si è riusciti a sviluppare un innovativo sistema per intervenire in maniera specifica sulla sequenza di un genoma, con la possibilità di correggere in maniera mirata un singolo gene.

6.5.2 STRUTTURA DEL LOCUS CRISPR

La struttura del locus CRISPR è divisa in tre regioni. Una regione è rappresentata dalla sequenza leader, ricca di basi azotate adenina e timina.

Una seconda regione (*array*) si compone di una serie di sequenze ripetute (*repeats*), distanziate tra loro da sequenze spaziatrici (*spacers*) variabili, corrispondenti a brevi tratti di sequenze derivanti dai fagi che in passato hanno tentato di infettare il batterio.

E' poi presente la regione dove sono localizzati i geni che codificano per le endonucleasi Cas (operone *Cas*). (Figura 38)

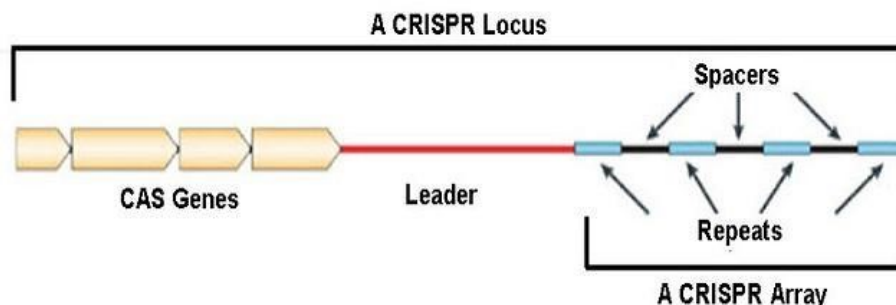


Figura 38 – Particolare della struttura del locus CRISPR: operone composto da geni *Cas*, sequenza leader e regione *array*, formata da sequenze ripetute (*repeats*) separate da sequenze spaziatrici (*spacers*).

Attualmente sono stati identificati più di 90 geni *Cas*, ma il loro numero dipende dalla specie batterica. I geni *Cas1* e *Cas2*, gli unici presenti in ciascun organismo procariote, codificano per due proteine coinvolte nella fase iniziale di ciascuna tipologia di sistema CRISPR/Cas, cioè nell'integrazione della sequenza virale (*protospacer*) nel locus CRISPR. (Hille e Charpentier, 2016)

6.5.3 CLASSIFICAZIONE DEI SISTEMI CRISPR/Cas

I sistemi CRISPR/Cas sono suddivisi in due sistemi principali, ulteriormente classificati in sei tipologie e più di venti sottotipi.

La classificazione avviene in base alla presenza della proteina Cas, che effettua il taglio a carico della molecola di DNA. Nei sistemi CRISPR/Cas di classe 1 (tipi I, III e IV), il modulo Cas è costituito da un complesso multiproteico, mentre i sistemi di classe 2 (tipi II, V e VI) utilizzano una sola proteina Cas. (Hille e Charpentier, 2016)

Il sistema di tipo II, noto anche come CRISPR/Cas9, è ad oggi quello più utilizzato nelle tecniche di editing genomico. Esistono tuttavia ulteriori varianti come CRISPR/Cas6, CRISPR/Cas12a, CRISPR/Cas12b e le più recenti scoperte CRISPR/Cas13a e CRISPR/Cas13b. (Kahlil, 2020)

6.5.4 MECCANISMO D'AZIONE NEI SISTEMI CRISPR/CAS DI TIPO II

6.5.4.1 INTEGRAZIONE DELLA SEQUENZA VIRALE NEL LOCUS CRISPR

La fase iniziale del meccanismo di riconoscimento e demolizione del DNA fagico, è comune a tutti i sistemi CRISPR/Cas. Essa consiste nell'acquisizione di una regione *spacer* di origine virale, lunga 20 residui nucleotidici, all'interno dell'*array* CRISPR. Prima che uno *spacer* sia integrato nell'*array* CRISPR, prende il nome di *protospacer*. Esso è posto a valle di una sequenza PAM (*Promoter Adjacent Motif*) di lunghezza compresa tra 2 e 5 nucleotidi. (Figura 39)

L'acquisizione dello *spacer* all'interno dell'*array* CRISPR avviene grazie all'attività di un complesso enzimatico formato dalle proteine Cas1 e Cas2. In particolare la subunità Cas1 provvede all'azione catalitica, mentre la subunità Cas2 sviluppa l'attività di integrazione della sequenza *spacer* nel locus CRISPR. Tale integrazione avviene preferibilmente tra l'*array* CRISPR e la sequenza leader che la precede. A monte dell'operone Cas (geni *Cas9*, *Cas1*, *Cas2*, *Csn2*) è inoltre presente il *tracrRNA* (RNA trans-attivatore), una piccola molecola di RNA che prenderà successivamente parte ai processi di sintesi del gRNA (RNA guida), fondamentale nel riconoscimento del DNA da degradare, da parte della proteina Cas9. (Jiang e Doudna, 2017)

6.5.4.2 BIOSINTESI DEL TRASCRITTO DI DNA

Successivamente all'integrazione della sequenza *spacer* avviene la trascrizione dell'*array* CRISPR, all'interno della sequenza denominata pre-crRNA (precursore CRISPR RNA), contenente ripetizioni e *spacer*. Tale sequenza pre-crRNA non è però codificante, quindi alla sua sintesi non segue la traduzione del trascritto.

Il tracrRNA viene trascritto separatamente e successivamente allineato al pre-crRNA. Le lunghezze dei tracrRNA che vengono trascritti sono differenti (171 e 89 residui nucleotidici), in quanto si ha la presenza di due promotori in posizione differente, ed un solo terminatore.

La maturazione del pre-crRNA, nei sistemi di tipo II, avviene grazie all'azione delle ribonucleasi III (RNasi III) e del tracrRNA. Il tracrRNA si associa alle ripetizioni palindromiche, presenti nei diversi pre-crRNA, dando luogo alla formazione di complessi pre-crRNA-tracrRNA. Tali complessi vengono riconosciuti dalle RNasi III del batterio, che eseguono un taglio alla fine di ogni elemento *spacer*, formando ibridi di pre-crRNA-tracrRNA. I primi 20 nucleotidi all'estremità 5' compongono la sequenza complementare a quella target, mentre la sequenza a doppio filamento all'estremità 3' è adibita all'interazione con la proteina Cas9. (Figura 39) (Jiang e Doudna, 2017)

6.5.4.3 DEGRADAZIONE DEL DNA TARGET ESOGENO

Il crRNA maturo, ora gRNA (RNA guida), ottenuto per ibridazione tra il trascritto primario ed il tracrRNA, viene riconosciuto dalla proteina Cas9. La regione del crRNA non coinvolta nell'ibridazione con il tracrRNA è la sequenza *spacer*, in grado di riconoscere una porzione del DNA esogeno complementare, permettendo alla proteina Cas9 associata al gRNA, di generare un'interruzione nella parte di DNA virale riconosciuta, che successivamente verrà degradata. Il riconoscimento avviene grazie all'origine virale della sequenza *spacer*, mediante l'azione delle proteine Cas1 e Cas2.

Il DNA virale che viene interrotto non può essere riparato mediante ricombinazione omologa (HDR), in quanto tale meccanismo richiede una copia integra del genoma che è stato interrotto. La ricombinazione non omologa (NHEJ) non rappresenta una valida alternativa, in quanto è raramente applicata nelle cellule procariotiche. Per questi motivi, il DNA virale una volta lesionato, non viene riparato ma digerito da esonucleasi. (Jiang e Doudna, 2017)

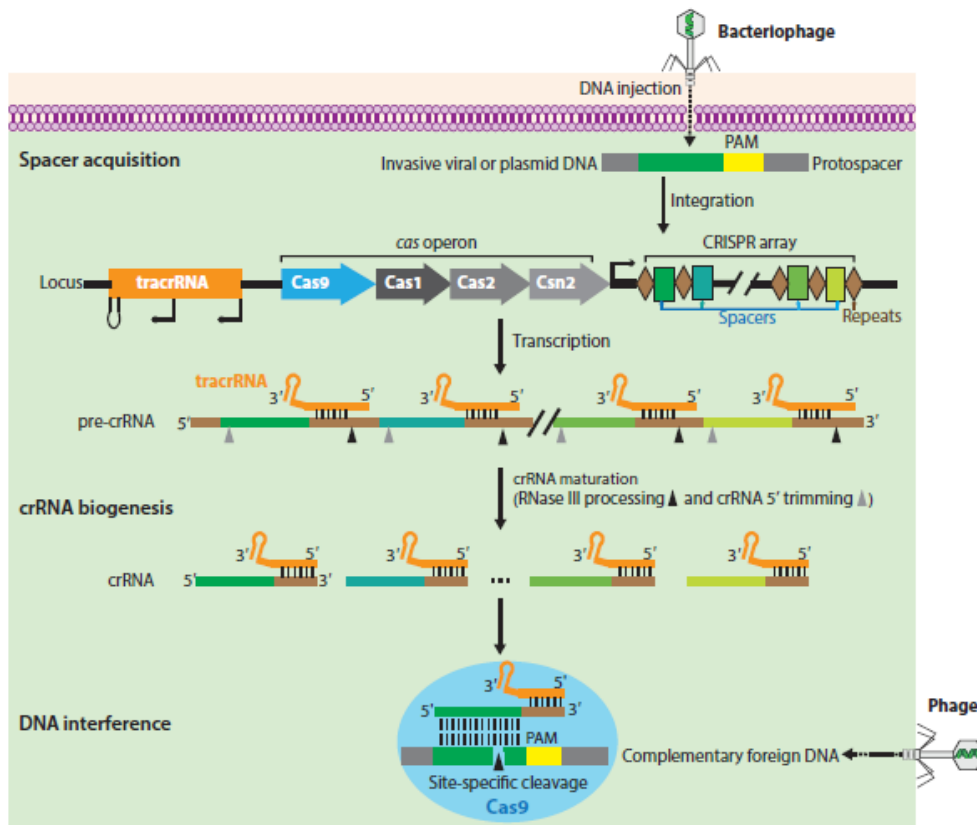


Figura 39 – Rappresentazione schematica delle varie fasi che incorrono in un sistema CRISPR/Cas di tipo II.

6.5.4.4 LA PROTEINA Cas9

Le proteine Cas9, espresse dall'operone Cas nei sistemi di tipo II, sono caratterizzate da due distinti domini nucleasici: HNH e RuvC. L'HNH non è suddiviso in sottodomini, mentre il RuvC è costituito da tre sottodomini (RuvC-I, RuvC-II, RuvC-III). Il sottodominio RuvC-I è situato nella regione terminale della proteina Cas9, mentre i sottodomini RuvC-II e RuvC-III sono situati a fianco del dominio HNH, al centro della sequenza proteica. (Figura 40)

La proteina sfrutta il dominio HNH per applicare un *nick* (rottura del singolo filamento) sul filamento di DNA complementare alla sequenza di 20 residui nucleotidici del crRNA, mentre il dominio RuvC causa un *nick* sul filamento opposto a quello riconosciuto dal crRNA. (Figura 41)

Tra i domini RuvC-II e HNH e tra HNH e RuvC-III sono presenti due linker di collegamento (L-I, L-II), mentre al termine della sequenza è presente il dominio CTD (*C-terminal domain*), che contiene la sequenza PI (*PAM Interacting*). L'insieme di questi domini costituisce il lobo NUC (nucleasico), uno dei due lobi proteici delle proteine Cas9.

Il secondo lobo viene invece definito REC (*alpha-helical recognition*). (Figura 42) Esso è composto da tre domini ad alfa-elica (Hel-I, Hel-II, Hel-III) e non condivide somiglianze strutturali con altre proteine note.

I due lobi REC e NUC sono uniti da due sequenze di collegamento: un ponte di collegamento ricco di arginina (Arg) e da un linker disordinato, che interessa i residui nucleotidici 712-717. (Figura 40) (Jiang e Doudna, 2017)

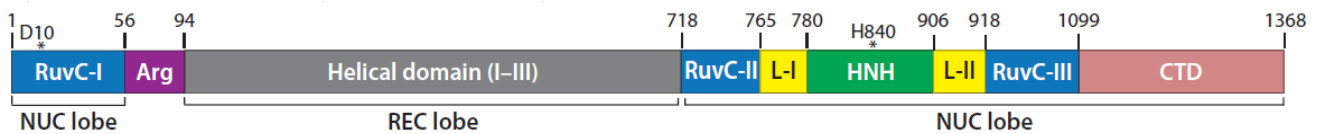


Figura 40 – Rappresentazione schematica della struttura del dominio Cas9 in *Steptococcus pyogenes* (SpCas9), caratterizzato da sistema CRISPR/Cas di tipo II.

Quando la proteina Cas9 non si trova legata al gRNA assume una conformazione autoinibente, in cui il dominio HNH ha il proprio sito attivo bloccato dal dominio RuvC.

In presenza di gRNA la proteina si attiva e, grazie a modifiche conformazionali indotte dal riconoscimento con il gRNA, va a ricercare in maniera stocastica il DNA target a cui si legherà.

Nel momento in cui la proteina Cas9 riconosce il DNA virale a doppio filamento, si assicura che la regione *protospacer* sia complementare alla sequenza PAM del gRNA. Questa fase prevede (nel sistema SpCas9 di *Steptococcus pyogenes*) l'azione degli amminoacidi serina 1109 e lisina 1107, del dominio proteico PI (*PAM Interacting*). Essi agiscono, mediante legami idrogeno, sul gruppo fosfato presente nella sequenza backbone del DNA target, che precede la sequenza PAM 5'-NGG-3'. Bloccando il gruppo fosfato del DNA target, si genera la torsione del filamento complementare a quello contenente la sequenza 5'-NGG-3', partendo dalla prima base a monte di tale sequenza, cioè la prima base nucleotidica al 5' della sequenza *protospacer*. Alla torsione del primo nucleotide segue quella del secondo, e degli altri nucleotidi successivamente, ottenendo quindi un filamento della sequenza *protospacer* del DNA target, legata alla sequenza *spacer* presente nel gRNA. Quando questo avviene si attivano i domini nucleasici di HNH e RuvC, i quali eseguono l'azione di DSB a carico dei due filamenti del DNA target, di cui uno è associato al gRNA. (Figura 41) In questa maniera il DNA target virale viene lesionato, e conseguentemente inattivato. (Jiang e Doudna, 2017)

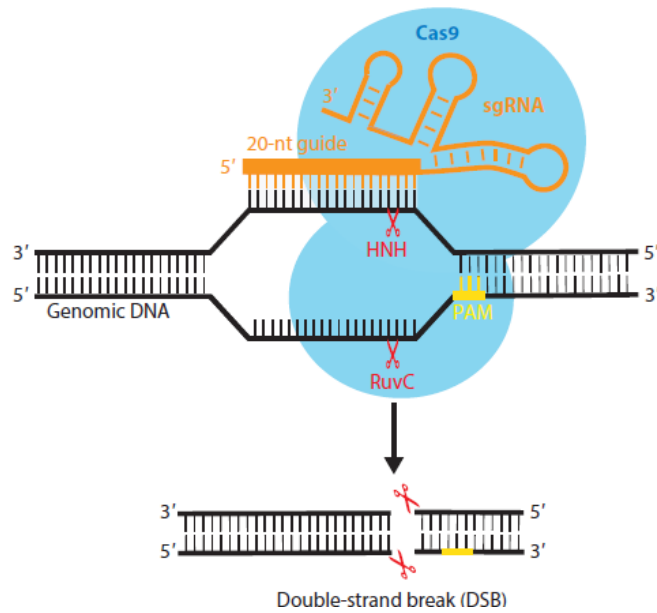


Figura 41 – Rappresentazione delle fasi di riconoscimento, associazione e DSB a carico del DNA target, effettuate dalla proteina Cas9 in *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). In giallo la sequenza PAM NGG, da cui ha inizio la torsione del filamento *protospacer* del DNA target.

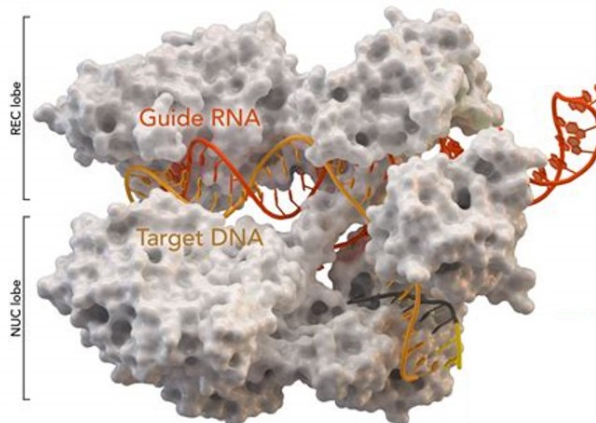


Figura 42 – Rappresentazione tridimensionale della proteina Cas9, composta da lobo REC (superiore) e lobo NUC (inferiore), in fase di attività a carico di una sequenza di DNA target.

6.5.5 VANTAGGI E SVANTAGGI DEL SISTEMA CRISPR/Cas9: CONFRONTO CON ZFN E TALEN

Le tecnologie maggiormente utilizzate ad oggi, nell'ambito dell'editing genomico, sono rappresentate da ZFNs, TALENs e sistema CRISPR/Cas9. (Malzahn et al., 2017) Ognuno di questi metodi presenta proprie caratteristiche intrinseche, che li differenziano tra loro.

Una delle principali differenze è che entrambe le tecnologie ZFNs e TALENs richiedono la creazione di una proteina specializzata, per ciascuna sequenza di DNA con cui si vuole interagire. Tale passaggio richiede tempistiche e costi notevoli. Questo non accade invece nel sistema CRISPR/Cas9, in quanto è richiesta solamente la creazione di una molecola di RNA guida, che porta all'attivazione dell'enzima Cas9, nei confronti della sequenza di DNA target desiderata. La possibilità di utilizzo di una sequenza di RNA di 20 nucleotidi, rispetto alla sintesi di una proteina, risulta essere uno dei vantaggi principali del sistema CRISPR/Cas9, rispetto a ZFNs e TALENs.

Un'ulteriore differenza si ha nei confronti dell'efficacia di questi sistemi, nell'ottenimento delle modifiche desiderate, a carico del DNA dell'organismo ospite. Studi recenti indicano tassi di successo, definito come la proporzione di nucleasi che inducono mutazioni con frequenza > 0,5%, nelle cellule HEK293 (cellule embrionali renali umane), maggiori del 99% mediante TALENs, maggiori del 90% con sistema CRISPR/Cas9 e solamente con valori medi del 24% in ZFNs. (Kahlil, 2020)

Infine la problematica principale, condivisa da tutte e tre le tecnologie, risulta essere il rischio di eventi off-target, con la conseguente possibilità di mutazioni indesiderate. Tale eventualità risulta essere elevata nelle ZFNs, bassa nelle TALENs e limitata, ma con valori variabili, in CRISPR/Cas9. In quest'ultimo caso però, ad oggi, gli studi compiuti a carico delle specie vegetali non sono ancora stati debitamente approfonditi. (Kahlil, 2020) E' auspicabile che, nei prossimi anni, maggiori dati siano disponibili, riguardo gli eventi off-target del sistema CRISPR/Cas9, a carico degli organismi vegetali. Questo in quanto tale aspetto, risulta essere di fondamentale importanza per la sicurezza della salute umana e ambientale, oltre che influenzare l'intervento del legislatore e dell'opinione pubblica, nei confronti di tale tecnologia. (Woźniak et al., 2020)

6.5.6 APPLICAZIONI PRATICHE DEL SISTEMA CRISPR/Cas9

In seguito alla scoperta della possibilità di utilizzo del sistema CRISPR/Cas9, come tecnica di editing genomico, si sono susseguiti numerosi studi a carico degli organismi vegetali. A partire dalle prime applicazioni riguardanti piante modello, quali *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana benthamiana*, si è passati in poco tempo a intervenire a carico delle principali specie agro-alimentari, principalmente erbacee (orzo, mais, tabacco, patata, riso, pomodoro, soia, frumento, cotone) ma anche arboree (vite, melo, pioppo, arancio).

Le principali tipologie di intervento hanno riguardato modificazioni di tipo NHEJ, con obiettivo di silenziamento genico, ma sono stati effettuati anche interventi di tipo HDR, mediante l'inserimento di DNA esogeno nel genoma della specie ospite. (Malzahn et al., 2017)

L'applicazione dell'editing genomico al miglioramento genetico delle piante, necessita innanzitutto della caratterizzazione bioinformatica del genoma in cui si vuole produrre la mutazione, per evitare di scegliere come bersaglio sequenze ripetute o aspecifiche che porterebbero a mutazioni, anche in loci diversi da quello obiettivo. Le cellule da sottoporre al trattamento con le nucleasi sono solitamente rappresentate da protoplasti, che devono quindi essere sottoposti al trattamento di trasformazione per inserire le nucleasi e le sequenze guida. A questo scopo sono preferibili sistemi di trasformazione transienti, quali vettori virali, in modo da ottenere genotipi con mutazione nei loci programmati ma che non contengono geni estranei, in quanto il vettore virale potrà essere rimosso una volta espletata la sua funzione. Le cellule mutate, infine, dovranno essere in grado di rigenerare piante intere nelle quali dovrà essere verificata la corretta mutazione e il fenotipo prodotto.

Di seguito sono riportati degli esempi di applicazioni sperimentali del sistema CRISPR/Cas9.

6.5.6.1 VITE

Applicazioni su vite (*Vitis vinifera* L.) sono state effettuate a carico della cultivar Chardonnay, con l'obiettivo di silenziare il gene L-idonato deidrogenasi (*IdnDH*), responsabile della sintesi dell'acido tartarico (TA) nell'uva, mediante meccanismo di riparazione NHEJ.

Si è proceduto alla sintesi di due sequenze di nucleotidi da 20 bp (sgRNA1 e sgRNA2), con un tandem di molecole di guanosina (GG) nella sequenza PAM.

Un sito d'azione, nel gene *IdnDH*, è risultato complementare ad una sequenza nel primo esone, una invece nel secondo esone. (Figura 43) (Ren et al., 2016)

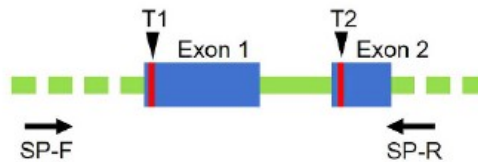


Figura 43 – Illustrazione schematica dei siti target nella sequenza codificante del gene *IdnDH*, cultivar Chardonnay. I rettangoli blu indicano gli esoni, mentre i rettangoli verdi gli introni. T1 e T2 sono i due differenti siti target d’azione. SP-F e SP-R sono i primers specifici, utilizzati durante l’amplificazione PCR.

Si sono quindi inseriti in due vettori binari differenti, mediante ricombinazione omologa, le due cassette geniche contenenti le sequenze sgRNA1 ed sgRNA2, oltre alla sequenza codificante per la proteina Cas9. (Figura 44) (Ren et al., 2016)

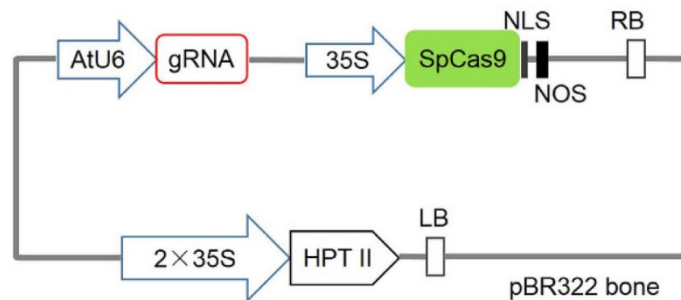


Figura 44 – Rappresentazione schematica del vettore pCACRISPR/Cas9: la cassetta genica gRNA (contenente la sequenza sgRNA) è collegata al promotore AtU6, mentre la sequenza codificante per la proteina Cas9 (SpCas9) è collegata al promotore CaMV 35S.

I vettori sono quindi stati introdotti nella cellula ospite, con trasferimento mediato da *A. tumefaciens*. L’identificazione del T-DNA esogeno nei calli, per valutare l’eventuale integrazione, è stata successivamente verificata tramite PCR, rivelando un tasso di trasformazione medio del 37,78%. Successivamente si è proceduto all’analisi dell’eventuale mutazione indotta dai due sgRNA, mediante test dell’endonucleasi CEL I e sequenziamento di Sanger.

Essi hanno dimostrato un’efficacia del 100% dell’azione di sgRNA1, che ha principalmente comportato l’inserzione di 1 bp, seguita dalla delezione di 1-3 bp. La sequenza sgRNA2 non ha invece introdotto alcuna mutazione. Tale differenza di risultato, è stata ipotizzata come conseguenza del diverso contenuto di guanina (G) e citosina (C). In particolare la sequenza sgRNA1 era caratterizzata da un elevato contenuto GC (60%), mentre valori minori erano presenti in sgRNA2 (35%).

Le mutazioni indel apportate da sgRNA1 hanno modificato l'espressione del gene *IlnDH*, con conseguente variazione del contenuto in acido tartarico, misurato mediante analisi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). (Tabella 8) (Ren et al., 2016)

Tabella 8 – Determinazione del contenuto di acido tartarico (TA) nel testimone (EC-1, EC-2) ed in quattro piante trasformate mediante sgRNA1. Il valore P (P-value) è stato determinato mediante test T di Student. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra EC-1 e sgRNA1 (*P<0,05 e **P<0,01). ND, non determinato.

Samples	CM ID	Content of TA (mg/g)	Range of values	P-value
EC-1	1	91.73 ± 3.98	87.89–97.21	ND
EC-2	3	90.35 ± 5.78	88.36–95.95	0.70
sgRNA1-1	1	83.53 ± 2.08*	81.52–85.67	0.02
sgRNA1-2	2	87.96 ± 2.97	84.60–90.25	0.23
sgRNA1-3	4	82.73 ± 1.96*	80.82–84.73	0.02
sgRNA1-4	9	58.67 ± 1.17**	57.35–59.75	0.00

6.5.6.2 MAIS

Applicazioni su mais (*Zea mays* L.) hanno riguardato il silenziamento del gene *Zmzb7*, codificante per la proteina IspH, essenziale nella via metabolica che porta alla formazione di metil-D-eritritolo-4-fosfato (MEP). Il silenziamento di tale gene porta all'ottenimento di piante completamente albine. (Figura 45) (Han et al., 2016)



Figura 45 – Piante di mais coltivate in vitro: a sinistra il testimone, a destra individui albini ottenuti dal silenziamento del gene che codifica per la proteina IspH (Lai et al., 2012)

È stata quindi costituita una sequenza sgRNA, collegata al promotore U3, con sito d'azione nell'ottavo esone del gene *Zmzb7*. La sequenza codificante per Cas9 è invece collegata al promotore 2x35S. (Figura 46) (Han et al., 2016)

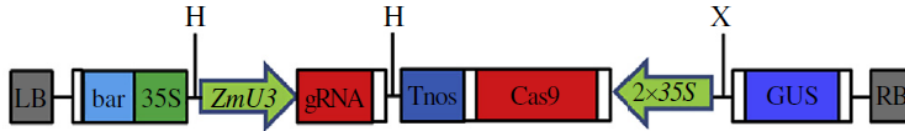


Figura 46 – Rappresentazione schematica del costrutto di DNA integrato nell'organismo ospite.

Successivamente alla costituzione del plasmide contenente il costrutto, è seguita l'integrazione nell'organismo ospite, tramite metodo mediato da *A. tumefaciens*.

Dalla successiva rigenerazione di 150 calli, si è osservata la manifestazione del fenotipo albino a carico della sola linea 6 (Figura 47), avvenuta a seguito di mutazioni indel a carico di due alleli. (Figura 48) Tale individuo ha manifestato una crescita rallentata rispetto alle altre linee, a causa del rapporto di mutazione estremamente elevato. (Han et al., 2016)

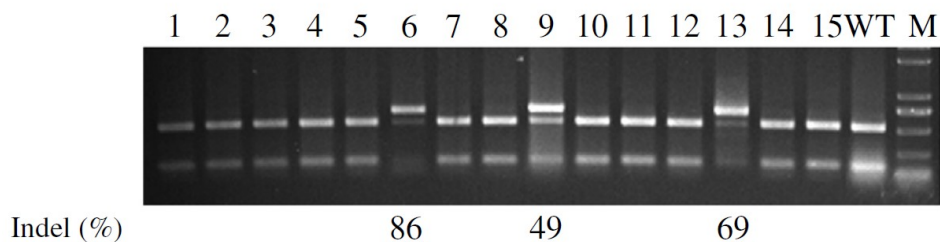


Figura 47 – Rilevazione di mutazioni mediate da CRISPR/Cas9: test PCR delle prime 15 linee transgeniche. L'efficienza di mutazione (Indel %) è indicata in basso. La linea 6, unica a manifestare fenotipo albino, è caratterizzata da un valore dell'86%. Valori significativi sono stati raggiunti anche dalle linee 9 (49%) e 13 (69%), che non hanno però manifestato il fenotipo mutato. WT: testimone.

Lane 6:

WT	TCCTCAGGAAAGACAAGATGCTATGTATC . AGCTGGTGAAAGAGAAAAGTTGACCTTATTC	
1	TCCTCAGGAAAGACAAGATGCTATGTAT . . AGCTGGTGAAAGAGAAAAGTTGACCTTATTC	-1
2	TCCTCAGGAAAGACAAGATGCTATGTATCAAGCTGGTGAAAGAGAAAAGTTGACCTTATTC	+1

Figura 48 – Sequenziamento dei due alleli mutati nella linea 6. Si notano la delezione di 1 bp nel primo allele e l'inserzione di 1 bp nel secondo allele. La sequenza sottolineata in rosso (TGG) rappresenta la sequenza PAM. WT: testimone.

6.6 IDENTIFICAZIONE DI ORGANISMI MODIFICATI TRAMITE EDITING GENOMICO

Le tecniche di editing genomico sono caratterizzate da un'elevata precisione d'intervento. Le piante GM ottenute mediante tali tecnologie, possono manifestare la modifica di un solo nucleotide, sfruttando le riparazioni di tipo NHEJ. Conseguentemente, queste modifiche possono essere indistinguibili dalle mutazioni naturali. Si pone quindi il problema del riconoscimento di tali varietà GM, una volta introdotte nel mercato.

Per valutare l'eventuale origine transgenica degli organismi vegetali, il metodo più utilizzato si basa sull'amplificazione del DNA mediante PCR. (Grohmann et al., 2019) Attualmente il modello più diffuso, nel rilevamento di genomi transgenici, viene definito "approccio a matrice" (*matrix approach*). Il funzionamento è basato sulla conoscenza preliminare di una serie di sequenze, comunemente utilizzate in molte specie di PGM, come ad esempio il promotore CaMV P-35S o il terminatore T-nos. Il riconoscimento si basa quindi sull'analisi mediante PCR di queste sequenze, confrontate con la specie oggetto di studio per valutarne la presenza/assenza. (Chhalliyil et al., 2020) L'applicabilità di questo procedimento risulta però impossibile, nel caso in cui l'obiettivo sia ricercare un evento indel di pochi nucleotidi.

L'impossibilità di identificazione, nei confronti dei prodotti delle tecniche di editing genomico, è motivo di grande apprensione, soprattutto nei Paesi in cui la coltivazione di piante ottenute da tali tecnologie è vietata. Questo perché, l'eventuale importazione di prodotti ottenuti mediante editing genomico, da nazioni in cui ne è consentita la coltivazione, non potrebbe essere rilevata. Questa situazione si presenta in Unione Europea, in quanto la necessità di riconoscimento di eventuali modifiche genetiche, è uno dei pre-requisiti su cui si basa la normativa comunitaria, in fatto di valutazione del rischio, etichettatura e tracciabilità del prodotto. (Grohmann et al., 2019) Ad oggi però, nuove ricerche stanno cercando di realizzare delle procedure che permettano il riconoscimento di PGM mediante editing genomico.

Uno studio pubblicato a settembre 2020, del gruppo di ricerca guidato da John Fangan, direttore dell'Health Research Institute (USA), ha analizzato l'origine di una varietà di colza resistente agli erbicidi mediante editing genomico (*SU Canola*). In particolare la tolleranza a sulfoniluree e imidazolinoni è stata ottenuta grazie alla modifica di 1 bp da G a T, in posizione 1676 nel gene *AHAS1C* e in posizione 1667 nel gene *AHAS3A*.

Il metodo sviluppato si basa sulla qPCR (*quantitative PCR*), tecnica che permette una simultanea amplificazione e quantificazione del DNA, abbinata all'uso di acidi nucleici bloccati (*Locked Nucleic Acids – LNA*) per la progettazione dei primers.

Questo ha portato alla distinzione di due cultivar della varietà *SU Canola* (40K e 68K) attualmente in commercio, rispetto ad altre varietà di colza già coltivate, anch'esse tolleranti gli erbicidi solfoniluree e imidazolinoni, ma modificate mediante mutagenesi chimica. Tale procedimento non ha previsto il riconoscimento della tecnica di editing genomico utilizzata, ma solamente l'identificazione dell'organismo in cui sono avvenute le modifiche. È stata quindi dimostrata, per la prima volta, la possibilità di rilevare modifiche indotte tramite editing genomico, a carico di una sola coppia di basi azotate. (Chhalliyil et al., 2020)

6.7 DIFFUSIONE DELLE COLTURE OTTENUTE MEDIANTE EDITING GENOMICO

Data la recente scoperta delle tecnologie di editing genomico, le varietà registrate per la coltivazione in pieno campo sono al momento poco numerose. Attualmente, l'applicazione di tali tecnologie sulle colture agrarie, è studiata principalmente in USA e Cina ma anche in Italia, utilizzando principalmente le tecniche TALENs e CRISPR/Cas9. (Richroc, 2019)

Ad oggi risultano essere coltivate in pieno campo una varietà di colza e una di soia, entrambe in Nord-America. La varietà di colza *SU Canola*, tollerante agli erbicidi solfoniluree e imidazolinoni, è coltivata negli USA (varietà 68K, 32K, 40K) e Canada (varietà 68K, 79K), mediante modifica del gene *AHAS* tramite sistema CRISPR/Cas9. La varietà di soia Calyxt, con aumentato contenuto di acido oleico, ottenuta mediante TALENs, è coltivata solamente negli USA. (Chhalliyil et al., 2020) (CIBUS, 2020)

6.8 NORMATIVA IN UNIONE EUROPEA ED EDITING GENOMICO

Il primo intervento normativo del legislatore comunitario, nei confronti delle tecniche di editing genomico, è avvenuto nel 2018. Con sentenza C-528/16 del 25 luglio 2018, della Corte di giustizia dell'Unione Europea, tali tecnologie sono state equiparate alla transgenesi, facendole ricadere all'interno della direttiva 2001/18/CE, sul rilascio degli OGM nell'ambiente. Ciò ha portato nei Paesi membri, ad uno stop nello sviluppo di tali tecniche. In tempi recenti però, le stesse istituzioni comunitarie si sono espresse a favore di una revisione legislativa, a carico di queste tecnologie. La Commissione europea ha constatato che la definizione di OGM presente nella direttiva 2001/18/CE risale al 1990, mentre il sistema CRISPR/Cas9, la più innovativa tra le tecniche di editing genomico, è stato descritto per la prima volta nel 2012. Tale revisione garantirebbe così un allineamento con le più recenti normative comunitarie, relative alla sicurezza alimentare e protezione ambientale. (Commissione europea, 2018)

7. CONSIDERAZIONI FINALI: PROSPETTIVE FUTURE DELLE TECNOLOGIE PER L'EVOLUZIONE ASSISTITA

L'interesse riguardo le Tecnologie per l'Evoluzione Assistita nel settore agricolo, è molto forte ed è destinato ad aumentare ancor più nel prossimo futuro, mano a mano che le applicazioni a carico delle specie agro-alimentari andranno aumentando. Questo aspetto è stato confermato anche dall'assegnazione del premio Nobel per la chimica del 2020, alle ricercatrici che hanno ideato il sistema CRISPR/Cas9, dimostrando come questi argomenti influenzeranno molto il dibattito scientifico dei prossimi anni. (Figura 49)

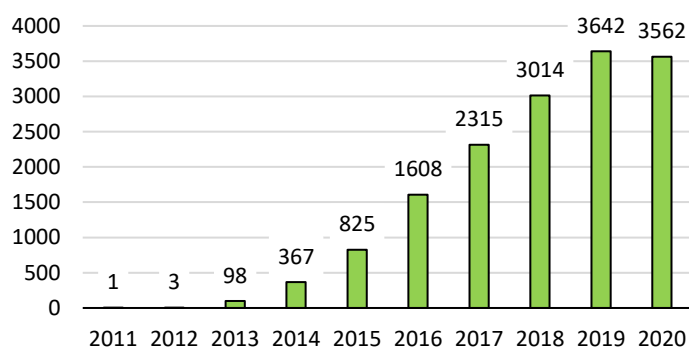


Figura 49 – Numero di pubblicazioni annuali con topic “CRISPR/Cas9” al 12/11/2020.

Il rallentamento dell'anno 2020 è probabilmente attribuibile alla pandemia da COVID-19.

(PubMed, 2020)

Una seria divulgazione scientifica nei confronti dei consumatori, la riduzione delle mutazioni off-target e la scoperta di nuove procedure per aumentare l'efficienza di queste tecniche, sono solo alcune delle sfide con cui bisognerà confrontarsi.

È auspicabile che, negli anni futuri, sarà possibile affrontare un serio dibattito, tra tutte le parti sociali interessate dal tema delle piante GM, senza alcun pregiudizio legato a tecnologie ormai datate, come la transgenesi. A riguardo fa ben sperare il recente accordo a livello nazionale, tra la Confederazione Nazionale Coltivatori Diretti (Coldiretti) e la Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA), firmato il 20 giugno 2020. Tale accordo si pone l'obiettivo di sostenere l'agricoltura nazionale, tutelare la biodiversità agraria italiana dai cambiamenti climatici e favorire la ricerca, mediante l'utilizzo delle TEA.

Questo accordo riveste una fondamentale importanza, in quanto dimostra che, anche un'associazione che storicamente è sempre stata avversa alla transgenesi in agricoltura, ha inteso come le tecniche di cisgenesi ed editing genomico possano influire positivamente nel campo delle produzioni agricole, senza compromettere la biodiversità e la tutela della salute umana ed animale. (Coldiretti, 2020. <https://www.coldiretti.it/ambiente-e-sviluppo-sostenibile/storico-patto-contadini-scientiati-nasce-la-genetica-green>)

È indubbio inoltre, che in futuro l'Unione Europea dovrà intervenire a carico della normativa, che regola attualmente lo sviluppo delle colture GM, aggiornando dei regolamenti che risultano ormai datati, nei confronti delle più recenti scoperte scientifiche avvenute negli ultimi anni.

A conferma dell'interesse comunitario riguardo le TEA, l'8 novembre 2019 è stato commissionato, da parte del Consiglio dell'Unione Europea, uno *“studio alla luce della sentenza della Corte di giustizia nella causa C-528/16 riguardante lo status delle nuove tecniche genomiche ai sensi del diritto dell'Unione”* (Decisione del Consiglio (EU) 2019/1904). Tale studio sarà effettuato dalla Commissione europea, che esporrà i risultati ottenuti entro il 30 aprile 2021. Lo scopo è di approfondire le conoscenze sull'uso di nuove tecniche genomiche in piante, animali e microrganismi, in un'ampia varietà di potenziali usi, compresi i settori agro-alimentare, medicinale e industriale. Tale analisi non comporterà studi sperimentali, ma una consultazione dell'EFSA e dei vari *stakeholders* nazionali, per avere una panoramica della situazione attuale riguardo stato e uso potenziale, valutazione del rischio, implicazioni etiche e sociali e prospettive future, delle TEA. (Commissione europea, 2019. https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/modern_biotech/new-genomic-techniques_en)

Le TEA possono inoltre rappresentare un importante risvolto, all'interno del *“New Green Deal”* europeo, che influenzerà le scelte legislative ed economiche comunitarie dei prossimi anni. Un minore utilizzo dei prodotti fitosanitari e una maggiore efficienza nell'impiego delle risorse, rappresentano il principale apporto che queste tecnologie possono garantire, nel raggiungimento dell'obiettivo di uno sviluppo sostenibile e un impatto carbonico azzerato in Unione europea, entro il 2050.

È lecito quindi pensare che, le Tecnologie per l'Evoluzione Assistita, influenzeranno notevolmente il miglioramento genetico delle specie agro-alimentari, nei prossimi anni.

8. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Abdullah J., Jiang Z., Hong X., Zhang S., Yao R. e Xiaoa Y. 2020. "CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants". *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5 (4): 277–292.
- Abrahamian P., Hammond R. W. e Hammond J. 2020. "Plant Virus-Derived Vectors: Applications in Agricultural and Medical Biotechnology". *Annual Review of Virology*, 7 (1), 513–535.
- Adebayo A. R. e Sebetha E. T. 2020. "Data on Influence of Different Nitrogen Fertilizer Rates and Plant Density on Grain Yield and Yield Components of Water Efficient Maize (WEMA) Variety". *Data in Brief*, 30: 105582–105582.
- African Centre for Biodiversity, 2019. "The Water Efficient Maize For Africa (WEMA) project—profiteering not philanthropy!". 29170 - Melville, Sud Africa.
- Alexander W. G. 2018. "A history of genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast*, 35 (5): 355–360.
- Arnould S., Chames P., Perez C., Lacroix E., Duclert A., Epinat J. C., Stircher F., Petit A. S., Patin A., Guillier S., Rolland S., Prieto J., Blanco F. J., Bravo J., Montoya G., Serrano L., Duchateau P. e Pâques F. 2006. "Engineering of Large Numbers of Highly Specific Homing Endonucleases that Induce Recombination on Novel DNA Targets". *Journal of Molecular Biology*, 355 (3): 443–458.
- Arntzen C., Hammond R., Karasev A., Koprowski H., Pang T., Plotkin S., Russell M., Sodoyer R. e Dodet B. 2005. "Plant-Derived Vaccines and Antibodies: Potential and Limitations". *Vaccine*, 23 (15): 1753–1756.
- Bahramnejad N., Naji M., Bose R. e Jha S. 2019. "A Critical Review on Use of Agrobacterium Rhizogenes and Their Associated Binary Vectors for Plant Transformation." *Biotechnology Advances*, 37 (7): 107405.

- Barcaccia G. e Falcinelli M. 2019. "Genetica e genomica. Volume III: Genomica e Biotecnologie genetiche". Napoli, Liguori Editore.
- Barcaccia G. e Lucchin M. 2016. "Le nuove vie del miglioramento genetico delle piante agroalimentari: dalle tecnologie di breeding cisgenico a quelle di editing genomico". CREA.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A. e Horvath P. 2007. "CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes". *Science*, 315 (5819): 1709-1712.
- Benbrook C. M. 2016. "Trends in Glyphosate Herbicide Use in the United States and Globally". *Environmental Sciences Europe*, 28 (1): 1–15.
- Bevan M. W., Flavell R. B. a Chilton M. D. 1983. "A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation". *Nature*, 304 (5922): 184-187.
- Blow M. J., Clark T. A., Daum C. G., Deutschbauer A. M., Fomenkov A., Fries R., Froula J., Kang D. D., Malmstrom R. R., Morgan R. D. Posfai J., Singh K., Visel A., Wetmore K., Zhao Z., Rubin E. M., Korlach J., Pennacchio L. A. e Roberts R. J. 2016. "The Epigenomic Landscape of Prokaryotes". *PLoS Genetics*, 12 (2): 1-28
- Boch J. e Bonas U. 2010. "*Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function". *Annual Review of Phytopathology*, 48: 419–436.
- Bøhn T. e Lövei G. L. 2017. "Complex Outcomes from Insect and Weed Control with Transgenic Plants: Ecological Surprises?". *Frontiers in Environmental Science*, 5: 1-8.
- Bonny S. 2015. "Genetically Modified Herbicide-Tolerant Crops, Weeds, and Herbicides: Overview and Impact". *Environmental Management*, 57 (1): 31-48

- Brouns S. J. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J. H., Snijders A. P. L., Dickman M. J., Makarova K. S., Koonin E. V. e van der Oost J. 2008. "Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes". *Science*, 321 (5891): 960–964.
- Brown, T. A. 2016. "Gene cloning and DNA analysis: an introduction." Hoboken (USA): John Wiley & Sons, Incorporated.
- Chhalliyil P., Ilves H., Kazakov S. A., Howard S. J., Johnston B. H. e Fagan J. 2020. "A Real-Time Quantitative PCR Method Specific for Detection and Quantification of the First Commercialized Genome-Edited Plant". *Foods*, 9 (1245): 1-18.
- Chilton M. D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F. e Tempe J. 1982. "Agrobacterium Rhizogenes Inserts T-DNA into the Genomes of the Host Plant Root Cells". *Nature*, 295 (5848): 432-434
- Chizzali C., Gusberti M., Schouten H. J., Gessler C. e Boggini G. A. L. 2016. "Cisgenic Rvi6 Scab-Resistant Apple Lines Show No Differences in Rvi6 Transcription When Compared with Conventionally Bred Cultivars". *Planta*, 242 (3): 635-644
- Christie P. J. e Gordon J. E. 2014. "The Agrobacterium Ti Plasmids." *Microbiology Spectrum*, 2 (6): 1-29.
- Clark A. J., Archibald A. L., Mc Clenaghan M. e Simons J. P. 1993. "Enhancing the Efficiency of Transgene Expression". *Philosophical Transactions. Biological Sciences*, 339 (1288): 225-231
- Cohen S. N., Chang A. C., Boyer H. W. e Helling R. B. 1973. "Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 (11): 3240-3244
- Commissione europea. 2018. "A Scientific Perspective on the Regulatory Status of Products Derived from Gene Editing and the Implications for the GMO Directive".

- Cooley M. B., D'Souza M. R. e Kado C. 1991. "The virC and virD Operons of the Agrobacterium Ti Plasmid Are Regulated by the ros Chromosomal Gene: Analysis of the Cloned ros Gene". *Journal of bacteriology*, 173 (8): 2608-2616.
- Crandall C. 1926. "Apple breeding at the University of Illinois." *Bollettino n°275*. Urbana, Illinois. University of Illinois.
- Dalla Costa L., Piazza S., Campa M., Flachowsky H., Hankes M. V. e Malnoy M. 2016. "Efficient Heat-Shock Removal of the Selectable Marker Gene in Genetically Modified Grapevine". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124 (3): 471-481.
- De Chicchis F. 2015. "Metodiche di ingegneria genomica con particolare riguardo al sistema CRISPR/Cas9: possibili applicazioni". Relatore Gualandi G., Dipartimento per l'innovazione dei sistemi biologici e agroforestali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo (VT).
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M. Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M. R., Vogel J. e Charpentier E. 2011. "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III". *Nature*, 471 (7340): 602-607.
- EFSA. 2012. "Panel on Genetically Modified Organisms (GMO); Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis". *EFSA Journal*, 10 (2).
- Fernández-Piñán S., López J., Armendariz I., Boher P., Figueras M. e Serra O. 2019. "Agrobacterium Tumefaciens and Agrobacterium Rhizogenes-Mediated Transformation of Potato and the Promoter Activity of a Suberin Gene by GUS Staining". *Journal of Visualized Experiments*, 145: 1-9.
- Firko, M. J. 2016. "Extended Determination of Nonregulated Status for Okanagan Specialty Fruit Non-Browning Arctic Apple". Biotechnology Regulatory Services, Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture.

- Flachowsky H., Le Roux P. M., Peil A., Patocchi A., Richter K. e Hanke M. V. 2011. "Application of a High-Speed Breeding Technology to Apple (*Malus × Domestica*) Based on Transgenic Early Flowering Plants and Marker-Assisted Selection". *The New Phytologist*, 192 (2): 364-377.
- Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Sanders P. R., Flick J. S., Adams S. P., Bittner M. L., Brand L. A., Fink C. L., Fry J. S., Galluppi G. R., Goldberg S. B., Hoffmann N. L. e Woo S. C. 1983. "Expression of Bacterial Genes in Plant Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (15): 4803-4807
- Gaj T., Gersbach C. A. e Barbas III C. F. 2013. "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering". *Trends in Biotechnology*, 31 (7): 397–405.
- Galata V., Fehlmann T., Backes C. e Keller A. 2019. "PLSDB: a Resource of Complete Bacterial Plasmids". *Oxford University Press*, 47 (D1): D195-D202
- Gaskell G., Stares S., Allansdottir A., Allum N., Castro P., Esmer Y., Fischler C., Jackson J., Kronberger N., Hampel J., Mejlgaard N., Quintanilha A., Rammer A., Revuelta G., Stoneman P., Torgersen H. e Wagner W. 2010. "Europeans and biotechnology in 2010. Winds of change?". *Directorate-General for Research Science in Society and Food, Agriculture & Fisheries, & Biotechnology. European Union.*
- Gong C., Bongiorno P., Martins A., Stephanou N. C., Zhu H., Shuman S e Glickman M. S. 2005. "Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C". *Nature Structural & Molecular Biology*, 12 (4): 304-312.
- Grochulski P., Masson L., Borisova S., Pusztai-Carey M., Schwartz J. L., Brousseau R. e Cygler M. 1995. "acillus thuringensis CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation". *Journal of Molecular Biology*, 254: 447-464.

- Grohmann K., Keilwagen J., Duensing N., Dagand E., Hartung F., Wilhelm R., Bendiek J. e Sprink T. 2019. "Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities". *Frontiers in Plant Science*, 10 (236): 1-8.
- Guan Z., Guo B., Huo Y., Guan Z. e Wei Y. 2010. "Overview of Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Plants". *Vaccine*, 28 (46): 7351-7362.
- Han F., Feng C. F., Yuan J., Wang R., Liu Y. e Birchler J. A. 2016. "Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System". *Journal of Genetics and Genomics*, 43 (1): 37-43.
- Hanas J. S., Hazuda D. J., Bogenhagen D. F., Wu F. Y. H. e Wul C. W. 1983. "Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene". *Journal of Biological Chemistry*, 258 (23): 14120-14125.
- Haverkort A. J., Boonekamp P. M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L. A. P., Kessel J. T., Vossen J. H. e Visseri R. G. F. 2016. "Durable Late Blight Resistance in Potato Through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project". *Potato Research*, 59 (1): 35-66.
- Haverkort A. J., Struik P. C., Visser R. G. F., e Jacobsen E. 2009. "Applied Biotechnology to Combat Late Blight in Potato Caused by *Phytophthora Infestans*". *Potato Research*, 52 (3): 249-264.
- Hernalsteens J. P., Van Vliet F., De Beuckeleer M., Depicker A., Engler G., Lemmers M., Holsters M., Van Montagu M. e Schell J. 1980. "The *Agrobacterium Tumefaciens* Ti Plasmid as a Host Vector System for Introducing Foreign DNA in Plant Cells". *Nature*, 287 (5783): 654-656.
- Hille C. e Charpentier E. 2016. "CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance". *Philosophical Transactions. Biological Sciences*, 371 (1707): 1-12.

- Holme I. B., Wendt T. e Holm P. B. 2013. "Intragenesis and Cisgenesis as Alternatives to Transgenic Crop Development". *Plant Biotechnology Journal*, 11 (4): 395-407.
- Huffman W. E., Rousu M., Shogren J. F. e Tegene A. 2007. "The effects of prior beliefs and learning on consumers' acceptance of genetically modified foods". *Journal of Economic Behavior & Organization*, 63 (1): 193-206.
- Huffman W. E., Rousu M., Shogren J. F. e Tegene A. 2004. "Who Do Consumers Trust for Information: The Case of Genetically Modified Foods?". *American Journal of Agricultural Economics*, 86 (5): 1222-1229.
- Hwang H., Lai E. e Gelvin S. B. 2015. "Agrobacterium biology and its application to transgenic plant production". *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-165.
- Intrieri M. C. e Buiatti M. 2001. "The Horizontal Transfer of *Agrobacterium Rhizogenes* Genes and the Evolution of the Genus *Nicotiana*". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20 (1): 100-110.
- ISAAA. 2017. "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years". ISAAA Brief N°53. ISAAA: Ithaca, New York (USA).
- ISAAA. 2018. "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018". ISAAA Brief N°54. ISAAA: Ithaca, New York (USA).
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M. e Nakata A. 1987. "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product". *Journal of Bacteriology*, 169 (12): 5429–5433.
- Jackson D. A., Symons R. H. e Berg P. 1972. "Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda

- Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia Coli*". Proceedings of the National Academy of Sciences, 69 (10): 2904-2909.
- Jacobsen E. e Schaart J. G. 2009. "Risk assessment of T-DNA borders from *Agrobacterium tumefaciens* in cisgenic crops." Plant Breeding, Wageningen University and Research Centre, 6700 AA Wageningen, Paesi Bassi.
- Jacobsen E. e Schouten H. J. 2007. "Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants." Trends in Biotechnology, 25 (5): 219–223.
- James C. 2001. "The Activities of the International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA) in Crop Biotechnology Transfer". Journal of the Science of Food and Agriculture, 81 (9): 813-821.
- James C. 1997. "Global Status of Transgenic Crops in 1997". ISAAA Briefs N°5. ISAAA: Ithaca, New York (USA).
- Jiang D. e Doudna J. A. 2017. "CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms". Annual Review of Biophysics, 46: 505–529.
- 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, 337 (6096): 816–821.
- Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P. e Claverys J. P. 2014. "Bacterial Transformation: Distribution, Shared Mechanisms and Divergent Control". Nature Reviews. Microbiology, 12 (3): 181-196.
- Joshi S. G., Schaart J. G., Groenwold R., Jacobsen E., Schouten H. J. e Krens F. A. 2011. "Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples". Plant Molecular Biology, 75 (6): 579-591.

- Kashima K., Yuki Y., Mejima M., Kurokawa S., Suzuki Y., Minakawa S., Takeyama N., Fukuyama Y., Azegami T., Tanimoto T., Kuroda M., Tamura M., Gomi Y. e Kiyono H. 2016. "Good manufacturing practices production of a purification-free oral cholera vaccine expressed in transgenic rice plants". *Plant Cell Reports*, 35 (3): 667-679.
- Kaye-Blake W., Bicknell K. e Saunders C. 2005. "Process versus product: which determines consumer demand for genetically modified apples?". *The Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, 49 (4): 413-427.
- Khalil A. M. 2020. "The genome editing revolution: review". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18 (1): 1–16.
- Kim S. R., Lee J., Jun S. H., Park S., Kang H. G., Kwon S. e An G. 2003. "Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants". *Plant Molecular Biology*, 52 (4): 761-773.
- Klein T. M., Wolft E. D., Wu R. e Sanford J. C. 1987. "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells". *Nature*, 327 (6117): 70-73.
- Klug A. 2010. "The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation". *Annual Review of Biochemistry*, 79 (1): 213–231.
- Krens F. A., Schaart J. G., van der Burgh A. M., Tinnenbroek-Capel I. E. M., Groenwold R., Kodde L. P., Broggini G. A. L., Gessler C. e Schouten H. J. 2015. "Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance". *Frontiers in Plant Science*, 6 (286): 1-11.
- Kumar K., Gambhir G., Dass A., Tripathi A. K., Singh A., Jha A. K., Yadava P., Choudhary M. e Rakshit S. 2020. "Genetically Modified Crops: Current Status and Future Prospects". *Planta*, 251 (4): 1-27.
- Kuykendall J. M., Young J. M., Martinez-Romero E., Kerr A. e Sawada H. 2001. "A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the Genus, and the inclusion of

- all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. Rubi*, *R. Undicola* and *R. vitis*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (1): 89-103.
- Lai J. S., Lu X. M., Hu X. J., Hu X. J., Zhao Y. Z., Songa W. B., Zhang M., Chen Z. L., Chen W., Dong Y. B. e Wang Z. H. 2012. "Map-Based Cloning of *zb7* Encoding an IPP and DMAPP Synthase in the MEP Pathway of Maize". *Molecular Plant*, 5 (5): 1100–1112.
- Lee M. S., Gippert G. P., Soman K. V., Casa D. A. e Wright P. E. 1989. "Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain". *Science*, 245 (4918): 635–637.
- Li T., Liu B., Spalding M. H., Weeks D. P. e Yang B. 2012. "High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice". *Nature Biotechnology*, 30 (5): 390–392.
- Liu C. 2013. "Strategies for Designing Transgenic DNA Constructs" in *Methods in Molecular Biology: Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols*, vol. 1027, ed. L. Freeman, 183-201, Springer Science+Business Media.
- Liu J., Nannas N. J., Fu F. F., Shi J. Aspinwall B., Parrott W. A. e Dawe R. K. 2019a. "Genome-Scale Sequence Disruption Following Biolistic Transformation in Rice and Maize". *The Plant Cell*, 31 (2): 368-383.
- Liu M., Rehman S., Tang X., Gu K., Fan Q., Chen D. e Ma W. 2019b. "Methodologies for Improving HDR Efficiency". *Frontiers in Genetics*, 9 (691): 1-9.
- Lucht J. M. 2015. "Public Acceptance of Plant Biotechnology and GM Crops" *Viruses*, 7 (8): 4254-4281.
- Lusk J. L. e Rozan A. 2008. "Public Policy and Endogenous Beliefs: The Case of Genetically Modified Food". *Journal of Agricultural and Resource Economics*, 33 (2): 270-289.

- Ma J. K.-C., Hiatt A., Hein M., Vine N. D., Wang F., Stabila P., van Dolleweerd C., Mostov K. e Lehner T. 1995. "Generation and Assembly of Secretory Antibodies in Plants". *Science*, 268 (5211): 716-719.
- Malzahn A., Lowder L. e Qi Y. 2017. "Plant genome editing with TALEN and CRISPR". *Cell & Bioscience*, 7 (21): 1–18.
- Mariani C., Gossele V., De Beuckeleer M., De Block M., Goldberg R. B., De Greef W. e Leemans J. 1992. "A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants". *Nature*, 357 (6377): 384-387.
- Masani M. Y. A., Noll G. A., Parveez G. K. A., Sambanthamurthi R. e Prüfer D. 2014. "Efficient Transformation of Oil Palm Protoplasts by PEG-Mediated Transfection and DNA Microinjection". *PloS One*, 9 (5): 1-11.
- Miller J. C., Holmes M. C., Wang J., Guschin D. Y., Lee Y. L., Rupniewski I., Beausejour C. M., Waite A. J., Wang N. S., Kim K. A., Gregory P. D., Pabo C. O. e Rebar E. J. 2007. "An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing". *Nature Biotechnology*, 25 (7): 778–785.
- Miyaoka Y., Berman J. R., Cooper S. B., Mayerl S. J., Chan A. H., Zhang B., Karlin-Neumann G. A. e Conklin B. 2016. "Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing". *Scientific Reports*, 6 (1): 1-12.
- Murai N., Sutton D. W., Murray M. G., Slightom J. L., Merlo D. J., Reichert N. A., Sengupta-Gopalan C., Stock C. A., Barker R. F., Kemp J. D. e Hall T. C. 1983. "Phaseolin Gene from Bean Is Expressed After Transfer to Sunflower Via Tumor-Inducing Plasmid Vectors". *Science*, 222 (4623): 476-482.
- Murray A. W. e Szostak J. W. 1983. "Construction of artificial chromosomes in yeast". *Nature*, 305 (5931): 189-193.

- Ozyigit I. I. 2020. "Gene transfer to plants by electroporation: methods and applications". *Molecular Biology Reports*, 47 (4): 3195-3210.
- Preston A. 2003. "Choosing a cloning vector" in *Methods in Molecular Biology: E. coli plasmid vector*, vol. 235, ed. Casali N. e Preston A., 19-26, Totowa (USA), Humana Press Inc.
- Ran Y., Patron N., Kay P., Wong D., Buchanan M., Cao Y. Y., Sawbridge T., Davies J. P., Mason J., Webb S. R., Spangenberg G., Ainley W. M., Walsh T. A. e Hayden M. J. 2018. "Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template". *Plant Biotechnology Journal*, 16 (12): 2088–2101.
- Ren C., Liu X., Zhang Z., Wang Y., Duan W., Li S. e Liang Z. 2016. "CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.)". *Scientific Reports*, 6 (32289): 1-9.
- Ricroch A. 2019. "Global developments of genome editing in agriculture". *Transgenic Research*, 28: 45–52.
- Roberts A. P., Chandler M., Courvalin P., Guédon G., Mullany P., Pembroke T., Rood J. I., Smith J., Summers A. O., Tsuda M. e Berg D. E. 2008. "Revised Nomenclature for Transposable Genetic Elements". *Plasmid*, 60 (3): 167-173.
- Roberts R. J., Vincze T., Posfai J e Macelis D. 2015. "REBASE—a Database for DNA Restriction and Modification: Enzymes, Genes and Genomes". *Nucleic Acids Research*, 43 (D1): D298-D299.
- Rommens C. M. 2004. "All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering". *Trends in Plant Science*, 9 (9): 457-464.
- Rommens C. M., Haring M. A., Swords K., Davies H. V. e Belknap W. R. 2007. "The Intragenic Approach as a New Extension to Traditional Plant Breeding". *Trends in Plant Science*, 12 (9): 397-403.

- Rosen L. E., Morrison H. A., Masri S., Brown M. J., Springstubb B., Sussman D., Stoddard B. L. e Seligman L. M. 2006. "Homing endonuclease I-Crel derivatives with novel DNA target specificities". *Nucleic Acids Research*, 34 (17): 4791-4800.
- Rosenberg I. H. 2015. "New GMO Potato Cuts Cancer-Linked chemical". Tufts University: Health & Nutrition Letter, 33 (1): 2.
- Rousselière D. e Rousselière S. 2017. "Is Biotechnology (more) Acceptable When It Enables a Reduction in Phytosanitary Treatments? A European Comparison of the Acceptability of Transgenesis and Cisgenesis". *PloS One*, 12 (9): 1-21.
- Rousselière D. e Rousselière S. 2010. "On the Impact of Trust on Consumer Willingness to Purchase GM Food : Evidence from a European Survey". *Revue D'études En Agriculture et Environnement*, 91 (1): 05-26.
- Sansavini S. 2018. "Con la cisgenesi tecnologie agrarie più sostenibili". *Ecoscienza*, 5: 32-34
- Schouten H. J. e Jacobsen E. 2008. "Cisgenesis and Intragenesis, Sisters in Innovative Plant Breeding". *Trends in Plant Science*, 13 (6): 260-261.
- Schouten H. J., Krens F. A. e Jacobsen E. 2006. "Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants - International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis". *EMBO Reports*, 7 (8): 750-753.
- Shizuya H. e Kouros-Mehr H. 2001. "The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system". *Keio Journal of Medicine*, 50 (1): 26-30.
- SIGA - Società Italiana di Genetica Agraria. 2020. "Tecnologie per l'Evoluzione Assistita - Un nuovo nome alle tecnologie, non alle piante da esse prodotte".
<http://www.geneticagraria.it/home.asp>

- Singh A., Srivastava S., Chouksey A., Sing Panwar B., Verna P. C., Roy S., Singh P. K., Saxena G. e Tuli R. 2015. "Expression of Rabies Glycoprotein and Ricin Toxin B Chain (RGP-RTB) Fusion Protein in Tomato Hairy Roots: A Step Towards Oral Vaccination for Rabies". *Molecular Biotechnology*, 57 (4): 359-370.
- Smart R. D., Blum M. e Wesseler J. 2017. "Trends in Approval Times for Genetically Engineered Crops in the United States and the European Union". *Journal of Agricultural Economics*, 68 (1): 182-198.
- Smith M. 2020. "Shop GMO-Smart." *Better Nutrition*, 82 (1): 44-46.
- Tabashnik B. E., Brévault T. e Carrière Y. 2013. "Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres". *Nature Biotechnology*, 31 (6): 510-521.
- Takeuchi R., Choi M. e Stoddard B. L. 2014. "Redesign of extensive protein-DNA interfaces of meganucleases using iterative cycles of in vitro compartmentalization". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (11): 4061-4066.
- Talakayala A., Katta S. e Garladinne M. 2020. "Genetic Engineering of Crops for Insect Resistance: An Overview". *Journal of Biosciences*, 45 (1): 1-12.
- Telem R. S., Wani S. H., Singh N. B., Nandini R., Sadhukhan R., Bhattacharya S. e Mandal N. 2013. "Cisgenics - A Sustainable Approach for Crop Improvement". *Current Genomics*, 14 (7): 468-476.
- Ugolini D. 2018. "Manuale dell'agronomo - VI edizione" ed. Reda, E-81 - E-111. Torino; Reda edizioni - Gruppo editoriale il Capitello.
- Vanblaere T., Szankowski I., Schaart J., Schouten H., Flachwsky H., Broggin G. A. L. e Gessler C. 2011. "The Development of a Cisgenic Apple Plant". *Journal of Biotechnology*, 154 (4): 304-311.

- Vergauwen D. e De Smet I. 2017. "From early farmers to Norman Borlaug — the making of modern wheat". *Current Biology*, 27 (17): R858-R862.
- Vessey J. K. 2002. "First Fruit: The Creation of the Flavr Savr™ Tomato and the Birth of Biotech Foods". The University of Chicago Press, 77 (4): 459-460.
- Waltz, E. 2015. "Nonbrowning GM apple cleared for market." *Nature Biotechnology*, 33 (4): 326-327.
- Wang J., Jiang J. e Wang Y. 2012. "Protoplast fusion for crop improvement and breeding in China". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112 (2): 131-142.
- Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M. e Losick R. 2015. "Biologia molecolare del gene". Bologna: Zanichelli Editore spa.
- Windels P., De Buck S., Van Bockstaele E., De Loose M. e Depicker A. 2003. "T-DNA Integration in *Arabidopsis* Chromosomes. Presence and Origin of Filler DNA Sequences". *Plant Physiology*, 133 (4): 2061-2068.
- Wu Y., Fox T. W., Trimnell M. R., Wang L., Xu R., Cigan A. M., Huffman G. A., Garnaat C. W., Hershey H. e Albertsen M. C. 2016. "Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops". *Plant Biotechnology Journal*, 14 (3): 1046-1054.
- Woźniak E., Tyczewska A. e Twardowski T. 2020. "A Shift Towards Biotechnology: Social Opinion in the EU". *Trends in Biotechnology*.
- Xanat V. M., Jiang K., Barnett G. A. e Park H. W. 2018. "International trade of GMO-related agricultural products". *Quality & Quantity*, 52 (2): 565-587.
- Xu J., Zhang J. e Zhang W. 2018. "Antisense RNA: the new favorite in genetic research". *Journal of Zhejiang University*, 19 (10): 739-749.

Yan H. e Rommens C. M. 2007. "Transposition-Based Plant Transformation". *Plant Physiology*, 143 (2): 570-578.

Youssef D., Nihou A., Partier A., Tassy C., Paul W., Rogowsky P. M., Beckert M. e Barret P. 2017. "Induction of Targeted Deletions in Transgenic Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Using Customized Meganuclease". *Plant Molecular Biology Reporter*, 36 (1): 71–81.

Zaslavskiy M., Bertonati C., Duchateau P., Duclert A. e Silva G. H. 2014. "Efficient design of meganucleases using a machine learning approach". *BMC Bioinformatics*, 15 (191): 1–11.

Zeitlin L., Olmsted S. S., Moench T. R., Co M. S., Martinell B. J., Paradkar V. M., Russell D. R., Queen C., Cone R. A. e Whaley K. J. 1998. "A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes". *Nature Biotechnology*, 16 (13): 1361-1364.

CIBUS. <https://www.cibus.com/>

Coldiretti. <https://www.coldiretti.it/>

Commissione Europea. https://ec.europa.eu/info/index_en

Del Monte Foods. <https://www.delmonte.com/>

EFSA - European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/en>

FAO – Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura. <http://www.fao.org/biotech>

ISAAA database - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>

OSF – Okanagan Specialty Fruits. <https://www.okspecialtyfruits.com/>

PLSDB – A plasmid database. <https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/>

PUBMED – National Center for Biotechnology Information (USA).

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

REBASE – The Restriction Enzymes Database. <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

SIGA – Società Italiana di Genetica Agraria. <http://www.geneticagraria.it/home.asp>