



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Padua Research Archive - Institutional Repository

Le nuove vie del miglioramento genetico delle piante agroalimentari: dalle tecnologie di breeding cisgenico a quelle di editing genomico.

Original Citation:

Availability:

This version is available at: 11577/3200212 since: 2016-10-13T09:08:47Z

Publisher:

CREA

Published version:

DOI:

Terms of use:

Open Access

This article is made available under terms and conditions applicable to Open Access Guidelines, as described at <http://www.unipd.it/download/file/fid/55401> (Italian only)

(Article begins on next page)

Le nuove vie del miglioramento genetico delle piante agroalimentari: dalle tecnologie di breeding cisgenico a quelle di editing genomico

I progressi compiuti nel sequenziamento dei genomi hanno permesso l'avanzamento delle conoscenze sulla funzione di molti geni chiave, portando allo sviluppo di nuove biotecnologie per il miglioramento genetico delle specie agro-alimentari. Tra queste il breeding cisgenico e l'editing genomico sono le più promettenti e presentano le potenzialità per intensificare l'agricoltura sostenibile e implementare la sicurezza alimentare, in un'epoca caratterizzata da forte aumento demografico e rapidi cambiamenti climatici

Gianni Barcaccia, Margherita Lucchin

The new ways for the genetic improvement of agrifood plants: from cisgenic breeding to genomic editing technologies

Advances in genome sequencing have led to the rapid development of new biotechnologies for the genetic improvement of crop plants. Among the new biotechnological tools, the most promising are cisgenic breeding and genomic editing, which have great potentials for the intensification of sustainable agriculture systems and the implementation of food security, in response to the growing population and the climate change that we are witnessing. Contrary to what happens with transgenesis, the plant genetically modified by these new technologies has the peculiarity of not having exogenous coding DNA and therefore it is not distinguishable from plants improved using traditional plant breeding schemes. Our goal is to explain how these new biotechnologies work, highlighting the potential applications and drawbacks, compared to traditional plant breeding techniques.

Le sfide che attendono l'agricoltura nei prossimi anni sono tante: la crescente quantità di risorse alimentari necessarie per far fronte all'aumento demografico, i repentini cambiamenti climatici che si riflettono nell'innalzamento costante della temperatura terrestre causando problemi come l'aumento della siccità e della salinità dei suoli, la richiesta di prodotti di qualità e tante altre ancora.

È facile prevedere che l'agricoltura avrà un forte impatto sull'ambiente, provocando uno sfruttamento sempre più ampio delle risorse naturali e influenzando sul rilascio di ingenti quantità di prodotti di scarto derivanti dalle attività umane. Il miglioramento genetico delle piante di uso agro-alimentare dovrà portare alla costituzione di varietà in grado di rispondere a queste nuove esigenze.

Con l'obiettivo di soddisfare le richieste della popolazione e allo stesso tempo di garantire una produzione efficiente ed ecologicamente sostenibile, negli ultimi anni sono state sviluppate nuove biotecnologie come alternativa alla transgenesi, e tra queste le più promettenti appaiono il breeding basato su intragenesi o cisgenesi e l'editing genomico.

Biotecnologie sostenibili: dalla transgenesi alla intragenesi e cisgenesi

A seguito delle preoccupazioni della pubblica opinione riguardanti la sicurezza delle colture transgeniche, di recente sono state sviluppate nuove tecnologie per il mi-

glioramento genetico, alternative e migliorative rispetto alla transgenesi, quali l'intragenesi e la cisgenesi che garantiscono successi considerevoli soprattutto per quanto riguarda i caratteri monogenici.

A differenza della transgenesi, che si basa sul trasferimento di uno o più geni esogeni provenienti da specie diversa o anche da regno diverso (ricorrendo ad un transgene tipicamente chimerico), la cisgenesi prevede il trasferimento di uno o più cisgeni ovvero geni nativi con le proprie sequenze regolatrici, e nel normale orientamento, tra organismi appartenenti alla stessa specie o anche a specie diverse, ma affini e sessualmente compatibili. Inoltre, la sequenza codificante del gene trasferito contiene i propri introni e la sua espressione è sotto il controllo del proprio promotore e terminatore. Il termine "cisgenesi" è stato coniato nel 2006 da Schouten, Krens e Jacobsen.

Diversamente dalle piante ottenute da breeding convenzionale, una pianta cisgenica contiene esclusivamente il gene o i geni di interesse del donatore e nessun altro elemento genetico indesiderato. L'intragenesi è un caso particolare poiché gli intrageni sono geni chimerici, in cui la sequenza codificante del gene impiegato nel trasferimento, che non include introni ma prevede la sola presenza di esoni, è assemblata con le sequenze regolatrici di altri geni e/o la sequenza codificante è in orientamento opposto a quello originale. Il termine "intragenesi" è stato introdotto da Rommens nel 2007.

Con la cisgenesi si trasferisce il gene esattamente come

è presente nella specie donatrice, mentre con l'intragenesi si assemblano sequenze (regione codificante, promotore e terminatore) provenienti da più geni. Come conseguenza, l'espressione del gene può essere modificata ricorrendo all'uso di regioni di regolazione diverse da quelle native. La differenza rispetto alla transgenesi risiede nell'origine del gene da trasferire: il donatore è un organismo della stessa specie del ricevente o comunque appartiene a una specie diversa ma affine e sessualmente compatibile.

È importante enfatizzare che con la cisgenesi, la sequenza genica che si trasferisce nel genoma ricevente resta invariata, la regione codificante contiene non solo gli esoni ma anche i propri introni e le sequenze regolatrici originali (promotore e terminatore), disposti secondo il loro normale senso di orientamento. Al contrario, nell'intragenesi si utilizzano promotori, terminatori e sequenze codificanti derivanti da differenti donatori anche se appartenenti a pool genici di specie tassonomicamente affini. Infine, contrariamente a quanto avviene nella cisgenesi, nell'intragenesi le sequenze codificanti possono essere utilizzate nello stesso senso di orientamento che hanno nell'organismo donatore (trasferimento genico con finalità di guadagno di funzione) oppure in senso opposto quando la finalità è il silenziamento genico (Figura 1).

La cisgenesi è una tecnologia concettualmente innovativa rispetto alla transgenesi: offre la possibilità di massimizzare la similitudine del risultato ottenibile con il trasferimento genico convenzionale mediato da incrocio. In virtù di questa peculiarità non è considerata potenzialmente rischiosa

per l'ambiente e la salute. Pertanto, la cisgenesi produce un organismo simile a quello che si ottiene con l'incrocio, avendo però il vantaggio di consentire una riduzione dei tempi necessari per giungere alla varietà ed evitando il trasferimento indesiderato di sequenze associate al gene di interesse, spesso aventi un effetto negativo sul fenotipo.

Negli ultimi anni queste tecnologie sono state utilizzate in diverse specie per migliorare caratteri rilevanti in agricoltura, come la resistenza/tolleranza a stress biotici e abiotici, con effetti positivi sulle produzioni, in termini quantitativi e qualitativi.

Per l'ottenimento di piante geneticamente migliorate attraverso cisgenesi e intragenesi sono necessarie le stesse tecniche utilizzate per la produzione di piante transgeniche. Il metodo di trasferimento di DNA più utilizzato

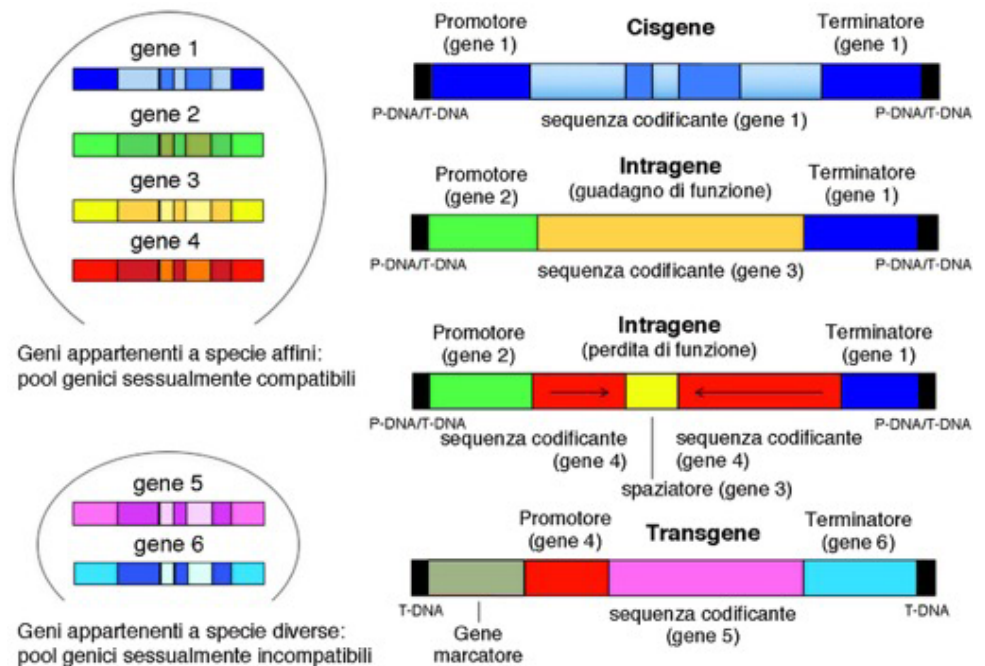


Figura 1: **Cisgenesi:** il cisgene è una copia identica di un gene selezionato da un pool genico sessualmente affine alla specie nell'ambito della quale si vuole migliorare una varietà: esso include gli stessi introni, il promotore e il terminatore nativi. **Intragenesi:** l'intragenesi è prodotto in vitro attraverso tecniche di ingegneria genetica: il promotore, il terminatore e la sequenza codificante, composta di soli esoni, sono riorganizzati combinando sequenze provenienti da geni diversi selezionati in specie sessualmente compatibili. **Transgenesi:** con la transgenesi si trasferisce un gene chimerico prodotto combinando insieme la regione codificante, composta di soli esoni poiché gli introni vengono solitamente rimossi, e regioni di regolazione proveniente da specie, talvolta regni diversi, ad esempio promotore di origine virale e terminatore di origine batterica.

per le dicotiledoni prevede il ricorso ad *Agrobacterium tumefaciens*, mentre per le monocotiledoni e le specie che presentano una bassa suscettibilità all'infezione da parte di questo agrobatterio, il trasferimento di DNA prevede l'uso di un acceleratore di particelle (*particle gun*). Una differenza fondamentale tra cisgenesi e intragenesi riguarda le sequenze di confine del T-DNA nel vettore plasmidico, sequenze che sono trasferite nella pianta come conseguenza del processo di trasformazione genetica mediato da *Agrobacterium*.

Alcuni autori ritengono che le sequenze di confine del vettore plasmidico, utilizzate per cisgenesi e intragenesi, debbano provenire da genomi di piante, appartenenti a specie affini sessualmente compatibili. Sequenze di confine derivanti da piante, note anche come P-DNA, con proprietà simili al T-DNA, sono state identificate in diverse specie vegetali. Tuttavia, argomentazioni che sostengono l'utilizzo di T-DNA, affermano che queste sequenze di confine derivanti da organismi batterici si possano ugualmente trovare all'interno dei genomi delle piante, poiché sono state acquisite nel corso dell'evoluzione e, siccome per loro natura sono sequenze non codificanti, si possono ritenere sicure da utilizzare.

In termini applicativi, cisgenesi e intragenesi hanno entrambe lo scopo di conferire nuove caratteristiche alla pianta modificata, sia attraverso guadagno di funzione (cambiamento genico) che perdita di funzione (silenzamento genico). Tuttavia, solo la cisgenesi può garantire l'ottenimento di risultati conseguibili anche con metodi convenzionali di miglioramento genetico, ma con tempistiche molto più contenute ed evitando effetti di *linkage drag* che talvolta portano anche all'accumulo di sostanze antinutrizionali nei prodotti alimentari.

Un'altra potenzialità della cisgenesi rispetto al miglioramento genetico tradizionale riguarda la sovra-espressione di un gene. Con la cisgenesi è possibile inserire una oppure più copie aggiuntive del gene di interesse, consentendo l'aumento della manifestazione fenotipica per quel determinato carattere. Anche l'intragenesi offre maggiori possibilità di modifica dell'espressione di un gene rispetto agli schemi tradizionali basati su ibridazione e selezione, poiché prevede combinazioni di regioni di regolazione, quali promotori e terminatori, presi da donatori differenti rispetto alla specie di origine della sequenza codificante. Dal confronto tra cisgenesi e intragenesi si evince che è la prima ad essere più simile al miglioramento genetico tradizionale, mentre la seconda è più affine alla transgenesi.

Da più parti si ritiene che l'inserimento casuale della sequenza di DNA nel genoma della pianta target costituisca una limitazione di queste nuove tecnologie poiché la ricombinazione di un gene in uno specifico tratto cromosomico potrebbe alterare l'espressione di altri geni presenti nel genoma ricevente, determinando così rischi non prevedibili. Bisogna però considerare che anche con l'ibridazione si promuove la ricombinazione casuale di geni e che pertanto l'inserimento casuale di DNA dal donatore al ricevente si verifica anche impiegando metodologie tradizionali di miglioramento genetico, da sempre utilizzate per la costituzione di nuove varietà.

Altri timori suscitati dalle piante geneticamente modificate sono connessi ai potenziali rischi della diffusione di nuove combinazioni geniche nell'ambiente. Le piante geneticamente modificate avendo caratteri nuovi o più marcati rispetto alle piante selvatiche della stessa specie, e quindi esprimendo una *fitness* superiore, potrebbero prendere il sopravvento sulle ultime; si teme quindi un effetto di *gene escape* incontrollabile e una perdita irreversibile di biodiversità (*genetic erosion*).

Nel 2011, la Commissione Europea (CE) ha chiesto all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) di valutare i pericoli connessi a cisgenesi e intragenesi rispetto a transgenesi e breeding tradizionale. Quando si considerano i pericoli legati alle piante cisgeniche e intrageniche, le principali considerazioni da parte del gruppo di esperti di tale autorità riguardano: i) la fonte di derivazione del DNA trasferito; ii) le alterazioni del genoma ospite nel tratto cromosomico in cui avviene l'inserimento di DNA; iii) la potenziale presenza nel genoma delle piante di sequenze di DNA non vegetali; iv) l'espressione del gene contenuto nel DNA trasferito.

Come per il miglioramento genetico tradizionale, anche per cisgenesi e intragenesi si deve fare uso di pool genici primari, secondari e terziari. Tuttavia, quando un gene di interesse è utilizzato per produrre piante intrageniche, si possono creare nuove combinazioni genetiche che non sono possibili in piante cisgeniche e nemmeno in quelle derivanti da breeding tradizionale. Queste nuove combinazioni genetiche possono portare alla manifestazione di caratteri nuovi con pericoli ancora non conosciuti ed è per questo motivo che l'EFSA ha definito i rischi connessi all'intragenesi del tutto simili a quelli associati alla transgenesi. Al contrario, la tecnologia basata sulla cisgenesi si avvicina molto al miglioramento genetico tradizionale e in virtù di questa sua peculiarità non è considerata

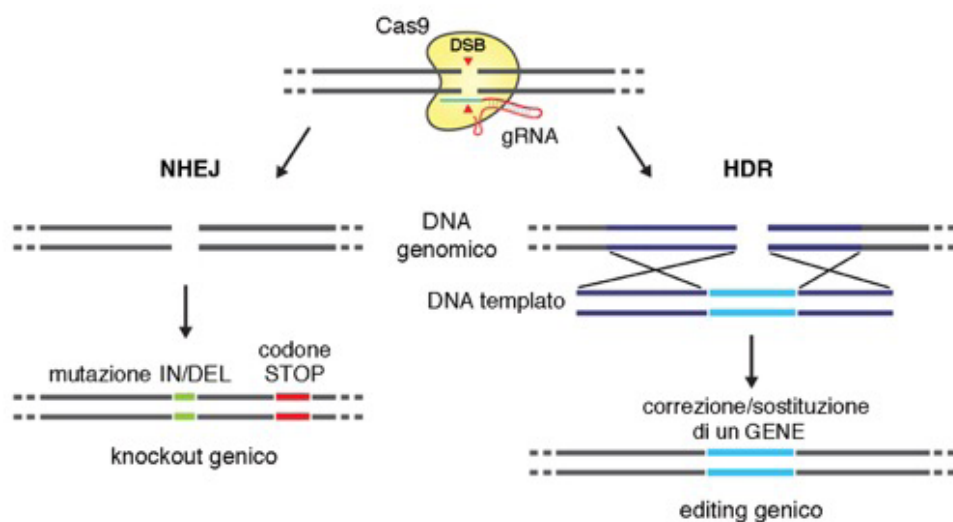


Figura 2: Editing genomico con nucleasi sito-specifiche. I tagli indotti del DNA (DSB) possono essere riparati attraverso due percorsi differenti: *non-homologous end joining* (NHEJ) oppure *homology directed repair* (HDR). Le riparazioni NHEJ solitamente determinano inserzione o delezione di singoli nucleotidi (IN/DEL) con conseguente mutazione di tipo frameshift che determina un codone di stop inatteso, provocando così knockout genico (silenziamento di un gene); con la riparazione HDR, quando è presente il DNA di un donatore, questo viene utilizzato come template per avere un editing genico attraverso l'inserzione di alcuni nucleotidi (correzione della sequenza di un gene) oppure di un intero gene (sostituzione o inserzione di un gene).

codificante. Una seconda via di riparazione è quella basata sul meccanismo HDR che richiede l'introduzione simultanea di endonucleasi ingegnerizzate che inducono il taglio sito-specifico nel cromosoma e un donatore di DNA omologo che viene usato come stampo per la inserzione o sostituzione del gene.

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/rimuovere alcuni nucleotidi e determinando l'inattivazione mirata del gene (ad esempio, inattivazione di geni di

dall'EFSA potenzialmente rischiosa per l'ambiente e la salute.

Nuove biotecnologie sostenibili: editing genomico

Il "genome editing" comprende un insieme di tecniche in grado di correggere, rimuovere, inserire o sostituire specifiche sequenze di DNA in un punto preciso del genoma. In altre parole, l'editing genomico consente di produrre mutazioni mirate in siti specifici del genoma avvalendosi di enzimi nucleasi capaci di tagliare la doppia elica del DNA e sfruttando i meccanismi cellulari di riparazione. Si possono così realizzare diverse modifiche del genoma a seconda del percorso di riparazione delle rotture del DNA: la congiunzione delle estremità terminali non omologhe (*non-homologous end joining*, NHEJ) o la riparazione basata sulla ricombinazione omologa (*homology directed repair*, HDR), come illustrato in Figura 2. Il meccanismo NHEJ causa inserzioni o delezioni casuali che possono portare a mutazioni in grado di inibire il funzionamento del gene se avvengono nella sua regione

suscettibilità a patogeni) e la produzione di un fenotipo mutato. Tale risultato è del tutto analogo a quelli derivanti da mutazioni spontanee o indotte. Nonostante questo sia il meccanismo 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 (HR). In questo caso il frammento di DNA esogeno fornito viene utilizzato dalla cellula come stampo per la riparazione e, di conseguenza, la sua informazione genetica viene trasferita nel genoma della cellula. In questo modo è possibile modificare/correggere la sequenza di un gene utilizzando un DNA esogeno con sequenza corretta o è possibile inserire un nuovo gene (transgene o cisgene) in una porzione specifica del genoma ospite.

Negli ultimi due decenni, sono state individuate quattro diversi tipi di endonucleasi, ognuna delle quali possiede una particolare struttura in grado di scindere una specifica sequenza di DNA: le *meganucleasi*, le *zinc finger nucleases* (ZFNs), le *Transcription Activator-Like Effector-based Nucleases* (TALENs) e infine il sistema CRISPR (*clu-*

stered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas (CRISPR-associated).

Fino a qualche anno fa, gli strumenti principali di modifica del genoma erano le nucleasi ZFN e le TALEN. Entrambe sono endonucleasi ingegnerizzate composte di due elementi principali: un dominio in grado di legarsi al DNA e un dominio nucleasico per l'induzione della rottura del DNA nella posizione desiderata del genoma. Solo di recente il sistema CRISPR/Cas9 è risultato essere il metodo più efficace per l'editing genomico, grazie alla sua semplice struttura e la facile applicabilità ad una vasta gamma di organismi.

Nel 2007 un gruppo di ricercatori dell'Università di Laval (Canada) e di un'azienda danese dimostrarono che alcuni batteri conservano nel proprio cromosoma una sorta di "biblioteca" delle infezioni fagiche trascorse che permetteva loro di riconoscere un DNA estraneo già incontrato. Questa "biblioteca" è stata chiamata CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*: brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari) e rappresenta una sorta di immunizzazione presente nel 50% circa dei batteri. Successive analisi bioinformatiche hanno rivelato che nella sequenza CRISPR sono inoltre presenti geni che codificano per endonucleasi dette Cas (CRISPR associated) in grado di tagliare il DNA in un punto preciso della sequenza.

Nel 2011 ricercatori francesi scoprirono che nel sistema CRISPR II, l'enzima Cas9 riconosce esclusivamente un DNA estraneo e lo taglia in modo specifico quando il batterio ha una copia di questa sequenza nel suo CRISPR. Nello stesso anno presso l'Università svedese di Umeå fu dimostrato che l'enzima Cas9 ha bisogno di un piccolo RNA specifico che lo guida nel riconoscimento della sequenza da tagliare. Tali scoperte hanno quindi aperto la possibilità di programmare *in vitro* il taglio di una molecola di DNA in un punto preciso utilizzando una nucleasi Cas9, una copia del DNA bersaglio sotto forma di un piccolo RNA complementare e un altro RNA specifico dell'enzima. I due piccoli RNA possono in realtà essere riuniti in un solo RNA capace di guidare (gRNA) Cas9 verso qualsiasi sequenza di DNA specificata *in vitro*. Questa sorta di sistema immunitario sviluppato dai batteri ha consentito di sviluppare una tecnica per intervenire sulla sequenza di un genoma e correggere in modo mirato un gene.

La tecnologia dell'editing genomico può accelerare il processo di miglioramento genetico in qualunque spe-

cie di uso agro-alimentare, consentendo l'introduzione di precise modifiche che possono interessare sia poche basi nucleotidiche sia intere sequenze geniche. Va inoltre sottolineato che, a differenza di quanto avviene per le mutazioni indotte da radiazioni o agenti chimici, con le tecniche di editing genomico le mutazioni cosiddette *off-target*, cioè quelle che avvengono in siti diversi da quello bersaglio, sono molto rare e possono essere facilmente individuate.

Il sistema CRISPR/Cas9 si sta rivelando uno strumento potentissimo per la ricerca biotecnologica e, in particolare, e per lo studio dei genomi vegetali, anche se molti avanzamenti devono ancora essere messi a punto per una sua concreta applicazione al miglioramento genetico delle colture. In una prospettiva di breve-medio termine il sistema consentirà di realizzare modificazioni mirate nella pianta ospite senza inserire DNA estraneo.

La cellula infatti eliminerà l'enzima e il suo RNA guida e la pianta non conterrà più DNA esogeno nel suo genoma, come avviene nelle piante transgeniche, ma semplicemente modificazioni limitate e ben conosciute. Questo sistema sarà inoltre in grado di consentire una più precisa caratterizzazione e una più efficiente utilizzazione delle risorse genetiche vegetali e un'accelerazione nello sviluppo di nuove varietà.

Da non trascurare è inoltre la possibilità molto vantaggiosa offerta dal sistema CRISPR/Cas9 di poter intervenire su più caratteri contemporaneamente.

L'editing genomico è già stato applicato con successo su alcune piante modello come *Arabidopsis*, ma anche in alcune specie di interesse agro-alimentare consentendo l'ottenimento di mutazioni utili per migliorarne la qualità dei prodotti o la resistenza ai patogeni.

Oltre ai numerosi aspetti tecnici ancora da approfondire (ad esempio, i metodi per un trasferimento transiente di Cas9 e del suo gRNA), non vanno trascurati i problemi derivanti dalla protezione brevettuale dei geni e delle procedure utilizzabili e gli aspetti normativi che, a livello europeo, sono legati non tanto alle caratteristiche intrinseche del prodotto ottenuto, quanto piuttosto alle tecnologie impiegate per il suo ottenimento.

Una delle principali preoccupazioni che hanno suscitato le piante transgeniche riguarda l'integrazione casuale del DNA esogeno nel genoma, secondo eventi che potrebbero potenzialmente determinare nuove combinazioni geniche indesiderate. Le tecnologie di editing genomico permettono di ovviare a questa problematica poiché con-

sentono di inserire o sostituire in un genoma o rimuovere da un genoma sequenze di DNA in regioni predeterminate, attraverso mutazioni sito-specifiche. Ciononostante, non è ancora chiaro se gli organismi prodotti con queste procedure debbano essere regolati dalle attuali leggi previste per gli OGM.

Gli Stati Uniti hanno deciso di focalizzare la loro attenzione sul prodotto finale e, quindi, nonostante le piante siano ottenute attraverso tecniche di ingegneria genetica, il prodotto finale non contiene DNA esogeno e la mutazione indotta non è distinguibile da una mutazione spontanea. Per questi motivi gli Stati Uniti hanno già approvato l'utilizzo in agricoltura di diverse varietà derivanti da editing genomico. Diversa è, invece, la situazione in Europa, dove la direttiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo "sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati", stabilisce che un OGM è un organismo "il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con la riproduzione sessuale e/o la ricombinazione genetica naturale".

Perciò, anziché focalizzare l'attenzione sul prodotto finale, com'è accaduto negli Stati Uniti, l'Europa pone l'attenzione sulla tecnologia cui si ricorre per crearlo.

Conclusioni

L'innovazione nel miglioramento genetico delle varietà di specie coltivate ad uso alimentare è necessaria per far fronte alle sfide dei cambiamenti globali, come la crescita della popolazione e il cambiamento climatico. Nel corso degli anni, l'agricoltura ha modificato e implementato le sue tecniche agronomiche e genetiche, e di conseguenza la capacità di far fronte alle esigenze di una popolazione in forte crescita. Tuttavia, l'utilizzo della transgenesi come possibile risposta a svariate richieste del mercato, degli agricoltori e dei consumatori, non ha risolto questo problema, poiché in molti Paesi non è mai stata pienamente accettata in quanto ritenuta pericolosa a livello ambientale. Il progresso e lo sviluppo di nuove tecnologie alternative alla transgenesi è stato sorprendentemente rapido, portando alla implementazione di procedure di breeding cisgenico e intragenico, e di editing genomico per la costituzione di varietà aventi uno o pochi caratteri migliorati. Tuttavia non è ancora chiaro se l'uso di varietà ottenute attraverso tali nuove biotecnologie debba essere regolato adottando le normative vigenti per gli OGM oppure no.

Nuove biotecnologie: il quadro giuridico della UE

Il quadro giuridico europeo per l'autorizzazione all'immissione in commercio di alimenti derivanti dagli OGM e per la coltivazione di varietà transgeniche è definito dalla Direttiva UE 2015/412 (che modifica la precedente Direttiva 2001/18/CE) e dal Regolamento CE 1829/2003, un insieme di norme il cui scopo è quello di garantire la salute umana, il benessere animale e la tutela ambientale. Inoltre, la Direttiva 2015/412 lascia la libertà agli Stati Membri di approvare o meno la coltivazione nel proprio territorio nazionale di varietà GM precedentemente approvate.

Le nuove tecnologie di breeding cisgenico e di editing genomico consentono di ridurre i potenziali effetti negativi che potrebbero insorgere con l'utilizzo di transgenesi e breeding tradizionale. Esse consentono, infatti, una modifica genetica pre-determinata e sito-specifica all'interno di un genoma e garantiscono la totale assenza di DNA esogeno nelle piante delle varietà sviluppate attraverso questi sistemi. Tuttavia, la direttiva 2001/18/CE stabilisce che se le tecnologie utilizzate per l'ottenimento di un prodotto sono le stesse utilizzate per produrre un OGM, tali prodotti sono da ritenersi OGM. A seguito di questa affermazione, un gruppo di lavoro istituito nel 2007 dalla Commissione Europea ha valutato le nuove tecnologie di trasformazione e modificazione genetica al fine di stabilire se gli organismi risultanti da breeding cisgenico e editing genomico debbano rientrare nel campo di applicazione della normativa UE sugli OGM. Secondo questo gruppo di lavoro (*New Techniques Working Group*), cisgenesi, intragenesi e editing genomico rientrano nella legislazione riguardante gli OGM. Tuttavia, non v'è alcun dubbio che le piante ottenute attraverso cisgenesi e editing genomico siano uguali o assimilabili alle piante ottenute con procedure di breeding tradizionale e, in assenza di DNA esogeno nel loro genoma, non c'è alcun modo di determinare con certezza quali tecniche siano state impiegate per ottenerle.

Se l'Unione Europea scegliesse di proibirne la coltivazione e l'importazione perché classificate come OGM, ci si troverebbe davanti ad altri quesiti ancora più ardui: vietare la coltivazione e fidarsi ciecamente di agricoltori e di esportatori che garantiscono prodotti OGM-free im-

possibili da verificare oppure bloccare le importazioni da Paesi che acconsentono alla coltivazione di varietà ottenute attraverso queste tecnologie?

È evidente che la regolamentazione prevista dall'Unione Europea per queste nuove tecnologie non risulti appropriata. La definizione di OGM è stata prodotta nel 2001, quando queste nuove tecnologie non erano ancora state scoperte o sviluppate. La comunità scientifica richiede pertanto una legislazione più flessibile che si basi sulle caratteristiche intrinseche del prodotto finale e che si concentri sulla sua potenziale pericolosità, piuttosto che sul processo che conduce al suo ottenimento. Anche l'Italia, come altri Stati Membri, è in attesa che Bruxelles faccia chiarezza sulla differenza tra queste tecnologie e la transgenesi, e autorizzi la sperimentazione in campo di piante ottenute attraverso cisgenesi e editing genomico.

In conclusione si può affermare che queste nuove biotecnologie sostenibili sono caratterizzate da un potenziale enorme tanto da rappresentare uno strumento importante, se non determinante per l'agricoltura italiana, potendo potenzialmente contribuire a risolvere le esigenze produttive e le problematiche ambientali esistenti del nostro Paese. Riteniamo che le nuove biotecnologie consentiranno non solo di modificare singoli geni, ma anche di agire su intere vie biosintetiche e reti regolative, permettendoci di migliorare la formazione e/o la composizione di singoli tessuti e organi. Non possiamo però più aspettare, né imitare: è tempo di innovare ricorrendo alle nuove vie del miglioramento genetico. Sappiamo indurre le mutazioni genetiche e usare le trasformazioni genetiche per creare nuovi alleli e trasferire nuovi caratteri e abbiamo una grande tradizione nel miglioramento genetico delle piante agrarie, anche supportato da metodi di selezione genetica assistita da marcatori molecolari. Personalmente auspichiamo che si possa e si riesca ad arrivare un giorno non troppo lontano alla coesistenza di diverse tipologie varietali (biotecnologiche, tradizionali, e locali) e sistemi colturali (tradizionali e biologici) e che sia poi compito degli agricoltori e dei consumatori operare delle scelte strategiche, economiche e consumistiche.

Bibliografia

- Ann Ran F., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, vol. 8, pp. 2281-2308
- Baeksted Holme I., Wendt T., Bach Holm P. (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternative to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 11, pp. 395-407
- Bhargava A., Carmona F. (2012) *Cisgenesis and Intragenesis*. Nova Science Publisher, Inc., pp. 137-151
- Bortesi L., Fischer R. (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, vol. 33, pp. 41-52
- Cardi T. (2016) Cisgenesis and genome editing: combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding. *Plant Breeding*, vol. 135, pp. 139-147.
- Chikelu M., Guimaraes E.P., Ghosh K. (2012) Re-orienting crop improvement for the changing climatic conditions of the 21st century. *Agriculture and Food Security*, vol. 1, art. 7
- Espinoza C., Schlechter R., Herrera D., Torres E., Serrano A., Medina C., Arce-Johnson P. (2013). Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. *Biological Research*, vol. 46, pp. 323-331
- EFSA-European Food Safety Authority (2012) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *Efsa Journal*, 2012
- Hartung F., Schiemann J. (2014) Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal*, vol. 78, pp. 742-752
- Lamalakshmi Devi E., Chongtham S.K., Praveen Holeyachi, Nagma Kousar, Mamta Singh, Chandana Behera, Telem R. S, N.B Singh, Shabir H. Wani (2013) Cisgenesis and Intragenesis: twin sisters for crop improvement. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, vol. 1(10), pp. 22-26
- Lusser M., Parisi C., Plan D., Rodríguez-Cerezo E. (2011) European Commission, New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development. Joint Research Center, 2011
- Quétier F. (2016) The CRISPR-Cas9 technology: closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. *Plant Science*, vol. 242, pp. 65-76