

CON LA CISGENESI TECNOLOGIE AGRARIE PIÙ SOSTENIBILI

LA CISGENESI, DIVERSAMENTE DALLE TECNICHE TRANSGENICHE OGM, NON UTILIZZA GENI ETEROLOGI E LE PIANTE OTTENUTE SONO UGUALI A QUELLE GENERATE DA RIPRODUZIONE NATURALE, TUTTAVIA, LE NORME IN VIGORE LE EQUIPARANO. PER UN'AGRICOLTURA SOSTENIBILE E COMPETITIVA OCCORRE QUINDI SUPERARE LE VECCHIE DIRETTIVE.

Dodici anni fa l'Università di Bologna, Dipartimento di Colture arboree, insieme al Politecnico di Zurigo, (Eth) Istituto di Fitopatologia, portò a compimento il progetto di trasformazione genetica del melo, cv Gala, con l'inserimento del gene *Vf* di resistenza alla principale affezione fungina (*Venturia inaequalis*, agente della ticchiolatura), gene isolato e trasferito su Gala da una specie selvatica di melo, *Malus floribunda* 821.

Il lavoro, pubblicato dal gruppo italo-svizzero sulla prestigiosa rivista delle accademie scientifiche americane, Pnas (Belfanti et al., 2004), creò immediatamente un cambio di direzione nelle strategie di ingegneria genetica, fino ad allora perseguite dai progetti di ricerca internazionali e in particolare americani.

La mela cisgenica

La nostra realizzazione aprì la strada alla cisgenesi, tecnica alternativa alla transgenesi, storica perché il "costrutto" del vettore plasmidico realizzato dal gruppo, anziché inserire geni estranei, cioè eterologhi, era portatore di un gene naturale (*Vf*) della specie melo (*Malus x domestica*) appartenente allo stesso genere botanico e perciò geneticamente compatibile (omologo). Questo costrutto, in una tappa successiva non più italiana, è divenuto cisgenico in quanto privato del gene promotore virale (35 S) e di quello selettivo all'antibiotico kanamicina ("nptII"), due geni *foreign* necessari nella metodologia di trasformazione genetica tradizionale.

Avrebbe potuto esserci anche un terzo gene, reporter, quale il GUS.

Questo progetto muoveva da obiettivi ecologici e dalle considerazioni legate agli aspetti applicativi, perché le varietà di mele resistenti a detta malattia crittogamica e portanti il gene *Vf*, costituite per via genetica propria dell'incrocio, cioè sessuata, portano con sé anche caratteri indesiderati, soprattutto sul piano qualitativo del frutto, che col *breeding* tradizionale non sarebbe stato possibile eliminare. Inoltre, il normale percorso di ibridazione, reincrocio e poi processo selettivo in campo avrebbe richiesto quindici-venti anni.

Al contrario, inserendo il singolo gene *Vf* in Gala non fu alterato lo standard qualitativo del frutto e nemmeno gli altri caratteri del fenotipo. Il metodo perciò



si dimostrò efficace per il miglioramento genetico della specie melo, avente genoma eterozigotico, stabile solo in quanto la specie (come quasi tutte le altre arboree) è propagata per via vegetativa (innesto).

Per la prima volta al mondo, dunque, si è utilizzato il gene di melo *HCrVf2* per ottenere linee di Gala geneticamente modificate e resistenti a ticchiolatura. Successivamente, a causa del forzato abbandono, a Bologna, di questa linea di ricerca, l'Eth di Zurigo insieme ad un centro di ricerca olandese (Pri di Wageningen) ha realizzato la prima mela Gala "cisgenica" resistente a ticchiolatura, utilizzando il nostro gene *HCrVf2* (Vanblaere et al., 2011). Nel melo, gli altri importanti esempi di cisgenesi già realizzati riguardano da un lato l'introduzione di geni di resistenza contro altre malattie quali il colpo di fuoco batterico (gene *FB_MR5* di *Malus robusta*; Kost et al., 2015), dall'altro la produzione di nuove tipologie di frutto a polpa rossa grazie all'introduzione del gene *Myb* (Krens et al., 2015).

La nostra metodologia costò alcuni anni di lavoro per la messa a punto del metodo – allora il genoma del melo non era ancora stato sequenziato – al fine di identificare, mappare e isolare il gene responsabile (*Vf*) all'interno di un genoma che, nel melo, contiene ben cinquantasettemila geni, numero elevato a causa di una poliploidizzazione avvenuta nel corso della sua evoluzione biologica, milioni di anni fa. Fu necessario, in particolare, costruire una libreria Bac e analizzare mega-segmenti di Dna (*contig*), con centinaia di migliaia di paia di basi. Questo nostro metodo si pose anzitutto in antitesi con quello allora ufficialmente seguito non solo negli Stati Uniti, che, nel caso specifico del melo (per ottenere nuove varietà e portinnesti resistenti, Ogm) utilizzava il trasferimento di geni eterologhi codificanti per proteine antibiotiche (quali ad esempio l'"attacina"), isolati da altri organismi batterici o virali, che fra l'altro inducevano solo una riduzione quasi insignificante della suscettibilità.

Cisgenesi e nuove biotecnologie

L'acronimo Nbpt indica un nuovo gruppo di approcci biotecnologici (fra i quali la *cisgenesi* e il *genome editing*) a sostegno dell'attività del miglioramento genetico delle piante, più sicuro e sotto certi aspetti allineato all'evoluzione biologica della specie, perché attraverso

FIG. 1 SELEZIONE ASSISTITA

Schema per l'applicazione della selezione assistita Mas (con marcatori Snp) presso una piattaforma di genomica.

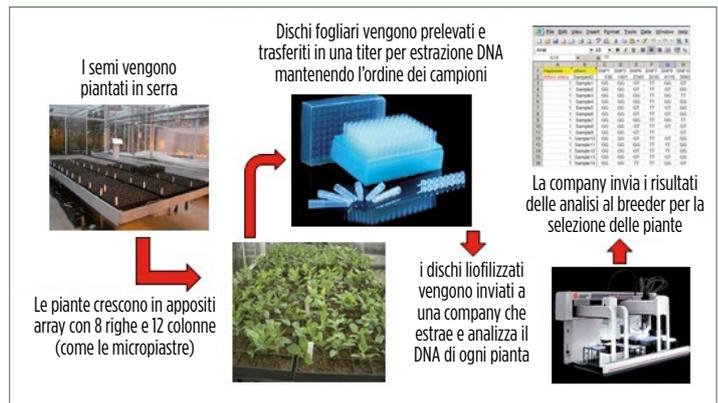


FIG. 2 MELI CISGENICI

Alcuni esempi.

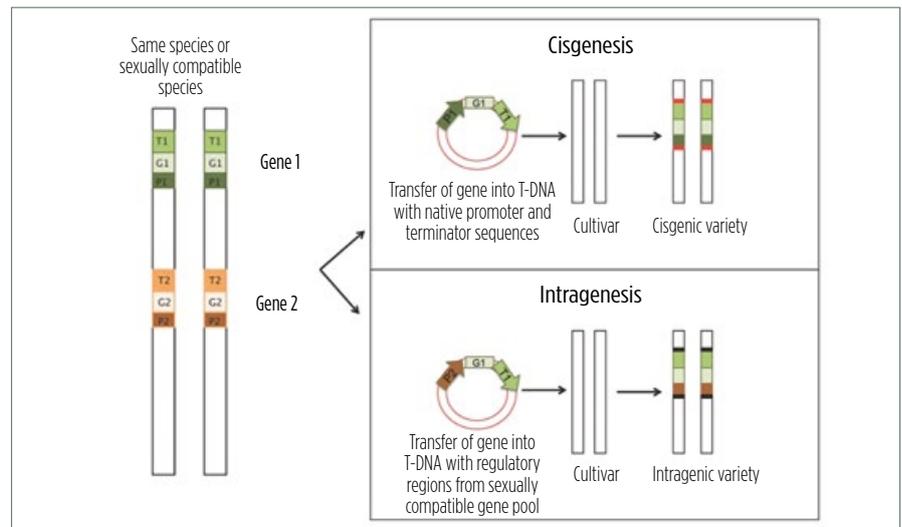
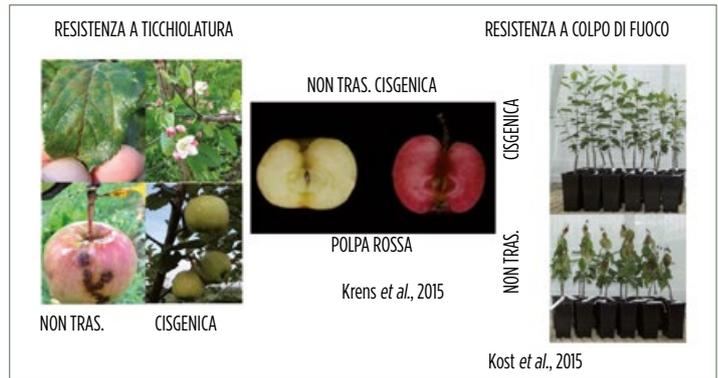


FIG. 3 CISGENESI E INTRAGENESI

Gene 1: derivato da specie sessualmente compatibile (es. *Vf* melo) utilizza il T-Dna borders dell'*Agrobacterium tumefaciens* provvisto delle sequenze native di promotore (P1) e terminatore (T1).

Gene 2: nell'intragenesi, il costrutto genico Gene2 col batterio è un ibrido di varie componenti geniche della stessa specie o di altra specie sessualmente compatibile. I "borders" (in nero) appartengono ad un pool di Dna compatibile (P-Dna).

Fonte: Limera et al., 2017.

la mutagenesi naturale crea nuova variabilità genica.

Le piante cisgeniche utilizzano le conoscenze sviluppate per la produzione delle piante transgeniche, ma introducono un nuovo criterio alla base della scelta del gene da introdurre: si tratta in questo caso di una o più copie di un gene naturale completo di promotore e terminatore nativi, proveniente dallo stesso genere o da specie sessualmente compatibile con la varietà che si vuole trasformare (Schouten et al., 2006).

Ovviamente, nella metodologia della cisgenesi dovranno essere utilizzati costrutti con vettori privi di marker di selezione (de Vetten et al., 2003) o geni di selezione che possano essere successivamente rimossi (Schaart et al., 2004). La pianta così ottenuta non avrà perciò geni eterologhi e sarà del tutto uguale alle piante derivate da *breeding* tradizionale.

È interessante rilevare come in Italia, dopo l'atteso intervento nella scorsa legislatura del Mipaaf, attraverso uno

stanziamento di fondi per l'attuazione di un grande progetto nazionale delle nuove biotecnologie (Nbpt) riservato a cisgenesi e *Genome editing*, ancora oggi siamo in attesa del bando per la presentazione dei progetti. Questo provvedimento di legge era stato accompagnato dall'accettazione speranzosa concordata con le organizzazioni professionali e sindacali e da un positivo atteggiamento dell'opinione pubblica (non erano mancate osservazioni critiche), perché queste nuove biotecnologie pulite, anche per l'affermazione dell'allora ministro, rappresentano il futuro della nostra agricoltura.

Alcuni istituti di ricerca avevano già avviato progetti per essere pronti con le metodologie, soprattutto nel settore vite e melo (vedi Fem, S. Michele all'Adige e Iga, Università di Udine) (Dalla Costa et al., 2017; M. Morgante, Atti Siga, 2018). L'Unione europea, nel frattempo, dopo aver tergiversato a lungo senza prendere posizione circa la liceità delle nuove Npbt, nonostante l'Efsa (*European Food Safety Authority* di Parma) si fosse pronunciata positivamente ("Non ci sono rischi maggiori rispetto al *breeding* convenzionale"), nel luglio 2018 ha decretato lo stop delle ricerche con una sentenza della Corte di giustizia europea. Sentenza che ha equiparato le piante ottenute con cisgenesi e *genoma editing* a quelle derivate da mutagenesi indotta e quindi agli Ogm, evidenziando però la necessità che vengano modificate le vecchie e superate normative del 2001 (direttiva 18). Di fatto, questa sentenza sarà inapplicabile, oltre che essere dannosa per il progresso dell'agricoltura, perché equipara paradossalmente la conservazione del genoma e quindi le mutazioni Nbpt, indistinguibili da quelle naturali, a quelle artificialmente indotte. Con ciò ignorando il principio scientifico che le mutazioni naturali (che hanno generato e sono parte integrante del patrimonio naturale delle varietà attualmente coltivate dell'ortofruitticoltura) sono il risultato di "sbagli" della natura (leggi Dna polimerasi, l'enzima che produce copia del Dna) nella "riparazione" del Dna mutato. Se l'autocorrezione della pianta non riesce, nasce il mutante, che può essere favorevole, come di solito, e propagato, creando nuova variabilità. È proprio questa variabilità che si cerca e che ha seguito e consentito l'evoluzione genetica delle varie specie. La Corte di giustizia perciò ha messo fuori legge anche i mutanti naturali e perciò la stessa evoluzione!

Ma le nuove tecnologie Nbpt, nel frattempo, stanno camminando in tutto il mondo, non soltanto per introdurre geni

ricercati, senza cambiare gli altri caratteri delle varietà coltivate. Citiamo alcuni importanti risultati conseguiti in Olanda (2014) soprattutto per l'ottenimento di patate resistenti a peronospora, anche con resistenze multigeniche (India 2013), di orzo e grano duro cisgenici per la qualità della granella (2008 e 2012), di pioppo per la crescita e la qualità del legno (2011), di pompelmo (2013) e altri ancora. In Italia, dunque, a causa di questa sentenza si verrà a creare un nuovo vuoto formativo nella ricerca, paragonabile a quello conseguente al no agli Ogm dell'inizio del 2000, quando l'intera classe di ricercatori (alcune centinaia) dovettero cambiare programmi o recarsi all'estero. Questo accade mentre in altri grandi paesi (vedi Usa) non esistono preclusioni metodologiche verso la Nbpt o, come in India, dove in due recenti *review* (2017), i consumatori non pongono riserve sui prodotti alimentari cisgenici, distinguendoli però da quelli transgenici (Ogm). A questo punto non ci resta che sperare che i paesi europei si uniscano, Italia compresa, per proporre una nuova regolamentazione che consenta l'approccio alla ricerca e alla sperimentazione delle due nuove tecniche post-Ogm (cisgenesi e *genoma editing*)



che sono alternative, non invasive, prive di geni estranei rispetto all'ingegneria genetica degli Ogm. Ne va di mezzo l'eccellenza delle produzioni agricole italiane, perché queste potranno mantenere la competitività sui mercati se acquisiranno i nuovi requisiti ecologici ed economici della sostenibilità: ampie resistenze, valori gustativi sensoriali e nutraceutici volti a soddisfare categorie di consumatori alla ricerca di frutta e prodotti personalizzati.

Silviero Sansavini

Dipartimento di Scienze e tecnologie agro-alimentari, Università di Bologna

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S., Patocchi A., Barbieri M., Zhu J., Vinatzer B.A., Gianfranceschi L., Gessler C., Sansavini S., 2004, "The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety", *Proc Natl Acad Sci Usa*, 101(3):886-90.
- Cardi T. 2016, "Cisgenesis and genome editing: combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding", *Plant Breeding*, 135, 139-147.
- Dalla Costa L., Malnoy M., Gribaudo I., 2017, "Breeding next generation tree fruits: technical and legal challenges", *Hortic. Research*, vol. 4, <http://dx.doi.org/10.1038/hortres.2017.67>
- Jogdand S.M., Bhat S., Misra K.K., Lal R.L., Singh Preet M., 2017, "The cisgenesis new tool of breeding: a review", *Chemical Science Review and Letters*, 6(22), 690-703.
- Kost T.D., Gessler C., Jansch M., Flachowsky H., Patocchi A., Broggini G.A.L., 2015, "Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight", *PLoS ONE*, 10(12): e0143980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143980>.
- Limera C., Sabbadini S., Sweet J.B., Mezzetti B., 2017, "New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species", *Front Plant Sci*, Aug 15;8:1418. doi: 10.3389/fpls.2017.01418.
- Sansavini S., 2015, "Il rifiuto degli Ogm: esperienze per la resistenza ai patogeni", *Riv. Frutticoltura*, 12, 26-34.
- Sansavini S., Dondini L., 2016, "Innovazioni nel miglioramento genetico convenzionale e biotecnologie delle piante da frutto", *Italus Hortus*, 23(2), 45-62.
- Schouten H.J., Krens F.A., Jacobsen E., 2006, "Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: International regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis", *EMBO Rep.*, 7(8): 750-753. doi: 10.1038/sj.embor.7400769.
- Singh V., Singh S., Shikha K., Kumar A., 2018, "Cisgenesis. A sustainable approach of gene introgression and its utilization in horticultural crops: a review", *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, Special issue-7: 5002-5009.
- Vanblaere T., Szankowski I., Schaart J., Schouten H., Flachowsky H., Broggini G.A., Gessler C., 2011, "The development of a cisgenic apple plant", *J Biotechnol.*, 154(4):304-11. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.05.013.