

Le TEA come risorsa per aiutare l'agricoltura del domani

35° Forum di Medicina Vegetale

Bari

13 Dicembre 2023

Giulia Ave Bono



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO



DiSAA
DIPARTIMENTO
di SCIENZE
AGRICOLE
e
AMBIENTALI

DBS
Dipartimento
di Bioscienze

È necessario continuare a migliorare le nostre piante per rispondere a:

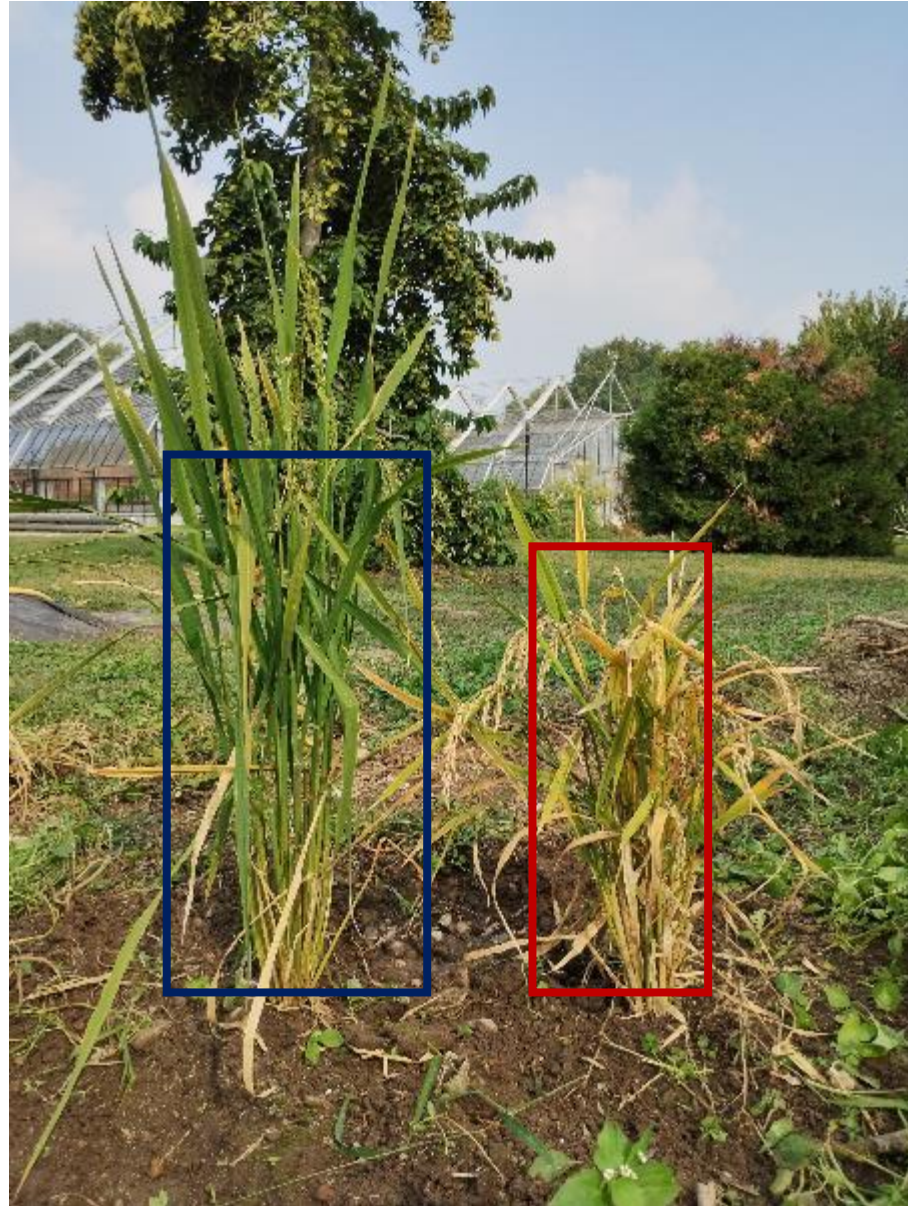
- i cambiamenti climatici
- la siccità
- i parassiti
- la necessità di ridurre gli input
- la richiesta di una maggiore sostenibilità dell'agricoltura

Come miglioriamo le nostre piante?



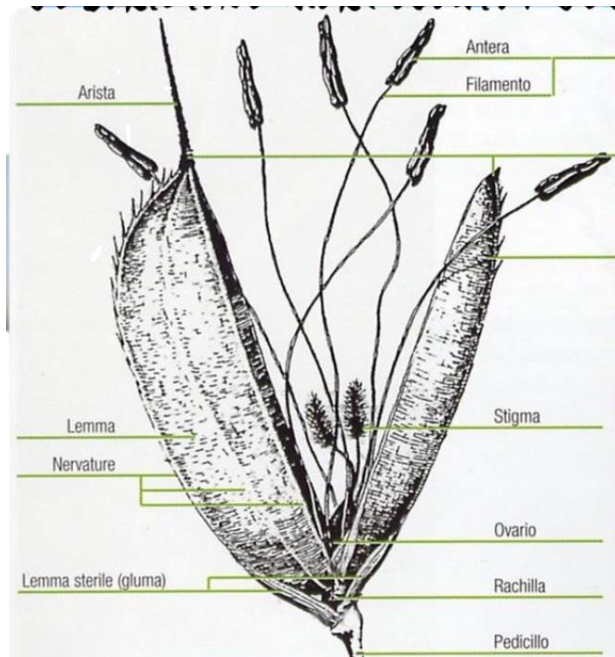
Combiniamo le caratteristiche migliori!

Varietà poco
produttiva
ma resistente
a siccità



Varietà d'élite
ma poco
tollerante alla
siccità

Possiamo incrociare le piante

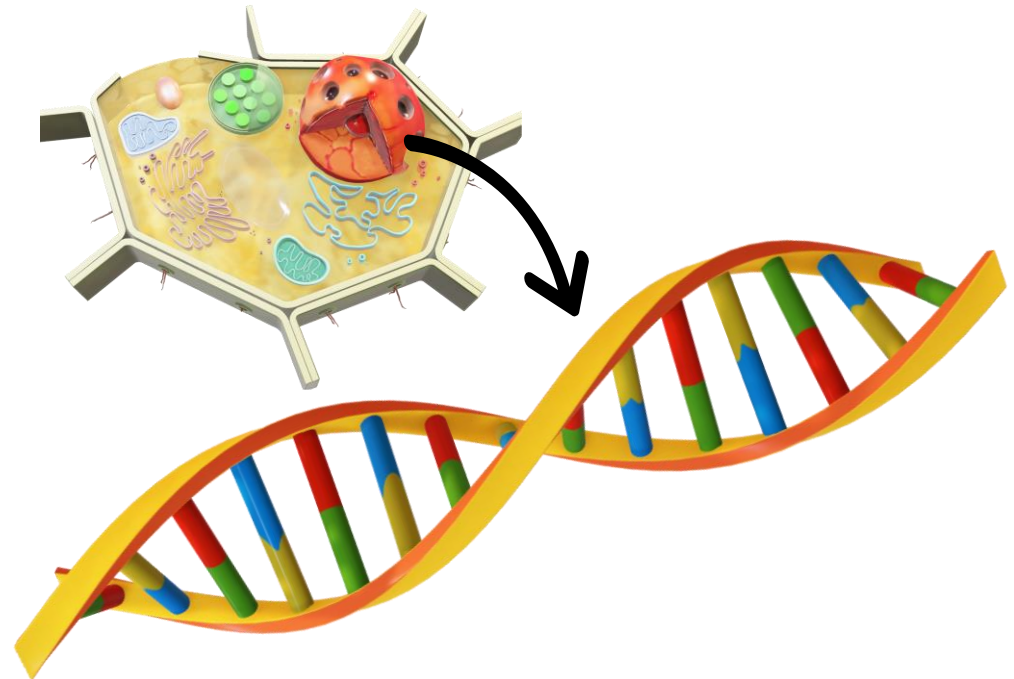


In riso: ci vogliono circa 8 anni per ottenere una nuova varietà per incrocio

Ma differenze nell'aspetto delle piante...



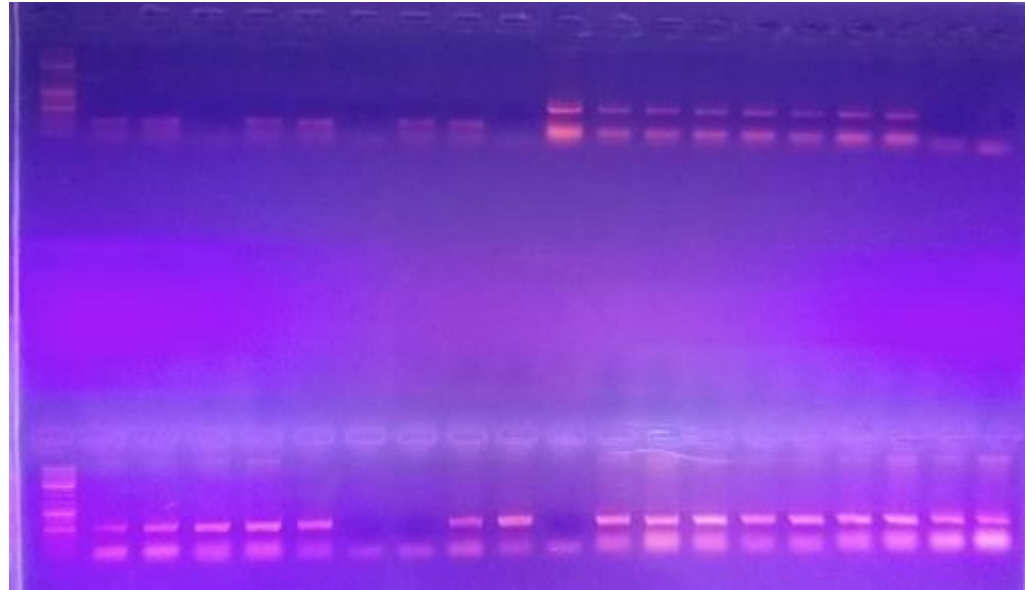
...corrispondono a
differenze nei loro DNA!



Possiamo selezionare il DNA delle piante figlie derivanti da un incrocio

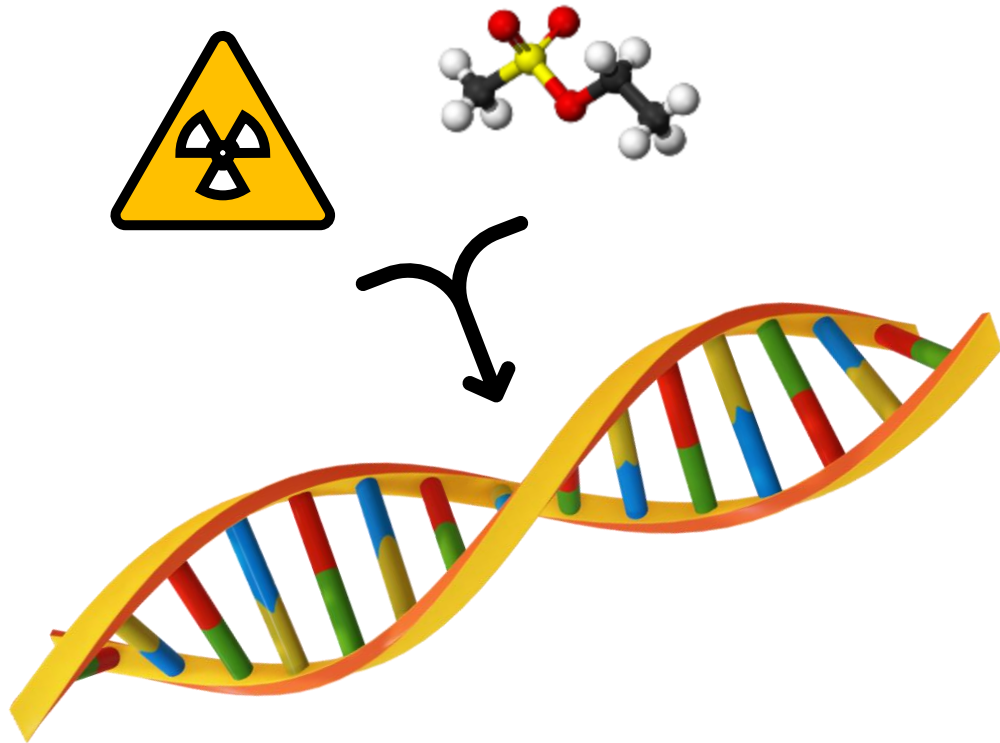


Vittoria Brambilla



Grazie ai marcatori molecolari
(Marker Assisted Selection)

Per creare nuovi caratteri si possono anche usare la mutagenesi chimica o fisica



Mutare il DNA
«alla cieca»

TEMPI LUNGHI,
risultati inattesi

Conosciamo quali varianti nel DNA (o mutazioni nei geni)
sono alla base del carattere che ci interessa



Grazie a:

1) la conoscenza dei geni

2) le TEA -> Tecniche di Evoluzione Assistita

Possiamo riprodurre i risultati degli incroci o della mutazione casuale in una sola generazione



TEMPI BREVISSIMI, grande precisione

Le TEA hanno avuto crescente importanza negli ultimi anni.

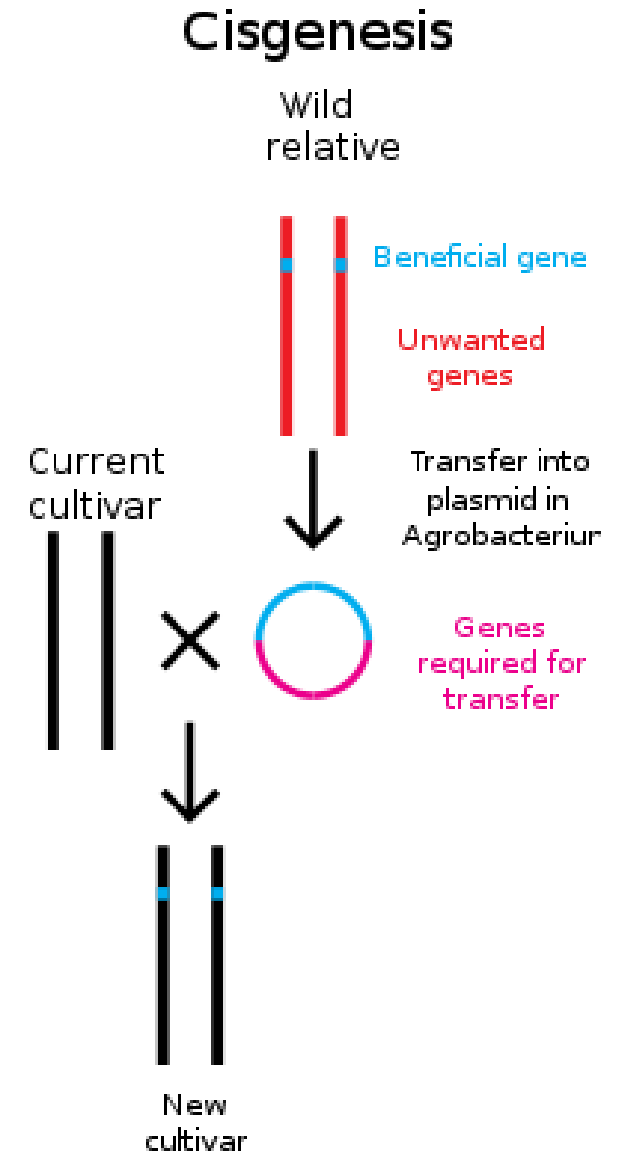
Per TEA intendiamo :

1) Genome Editing

2) Cisgenesi

CISGENESI

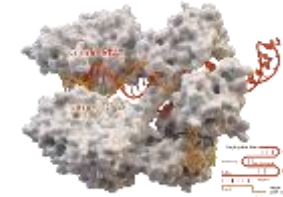
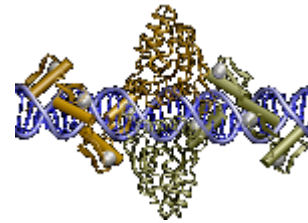
- Aggiunta di un tratto di DNA da una specie sessualmente compatibile.
- È particolarmente utile nelle specie arboree, difficilmente incrociabili.



Genome Editing

- Oligonucleotide Directed Mutagenesis
- Meganucleases
- Zinc Finger Nucleases
- Transcription Activator Like Effector Nucleases (TALEN)
- CRISPR/Cas9

NUCLEASI



CRISPR/Cas9



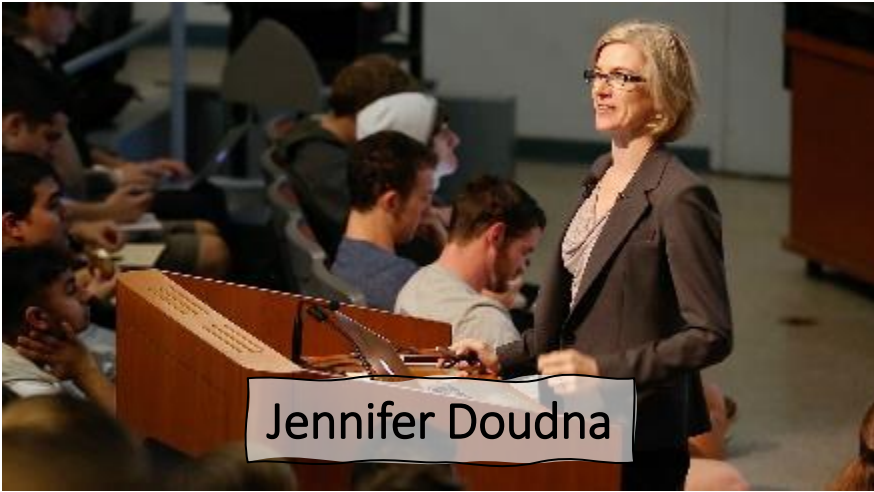
Premio Nobel per
la Chimica 2020



Emmanuelle
Charpentier



Jennifer
Doudna



«CRISPR può aiutare l'umanità, soprattutto contribuendo a migliorare l'AGRICOLTURA»



State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering

Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences

NEWS | SCIENCE

To feed its 1.4 billion, China bets big on genome editing of crops

Scientists there are forging ahead with CRISPR, even as regulations remain unclear

BY ALBERT H. CHANG



With its CRISPR revolution, China becomes a world leader in genome editing

By Jon Cohen, Nirja Desai | Aug. 2, 2019, 8:00 AM

Database di piante migliorate con TEA



European Sustainable Agriculture
Through Genome Editing

[HOME](#) [ABOUT](#) [OUR NETWORK](#) [DATABASE](#) [NEWS](#) [JOIN](#) [CONTACT](#)

Peer-reviewed articles were screened for relevance and were included in the database based on pre-defined criteria. The main criterium is that the research article should describe a research study of any crop plant in which a trait has been introduced that is relevant from an agricultural and/or food/feed perspective. The database does neither give information on the stage of development of the crop plant, nor on the existence of the intention to develop the described crop plants to be marketed.

This database will be regularly updated. Please [contact us](#) via the following webpage in case you would like to inform us about a new scientific study of crops developed for market-oriented agricultural production as a result of genome editing

TRAITS CATEGORIES

- Traits related to biotic stress tolerance (740)
- Traits related to abiotic stress tolerance (64)
- Traits related to improved food/feed quality (72)
- Traits related to increased plant yield and growth (177)
- Traits related to industrial utilization (105)
- Traits related to herbicide tolerance (56)
- Traits related to product color/flavour (44)
- Traits related to storage performance (16)

GENOME EDITING TECHNIQUE

- CRISPR/Cas (705)
- TALENs (30)
- BE (25)
- ZFN (7)

Displaying 776 results

Traits related to biotic stress tolerance

Highly significant reduction in susceptibility to fire blight, caused by the bacterium *Erwinia amylovora*. Apple is one of the most cultivated fruit crops throughout the temperate regions of the world.
{ Pompili et al., 2020 }

SDNI
CRISPR/Cas

Università degli Studi di Udine
Fondazione Edmund Mach,
Italy

[READ MORE](#)

Viral resistance: Enhanced resistance to sweet potato virus disease (SPVD). SPVD is caused by the co-infection of

SDNI
CRISPR/Cas

Jiangsu Normal University
Jiangsu Academy of
Agricultural Sciences

[READ MORE](#)

<https://www.eu-sage.eu/genome-search>

Piante suscettibili a brusone (causata dal patogeno *Magnaporthe oryzae*) possono essere gravemente colpite da questa malattia

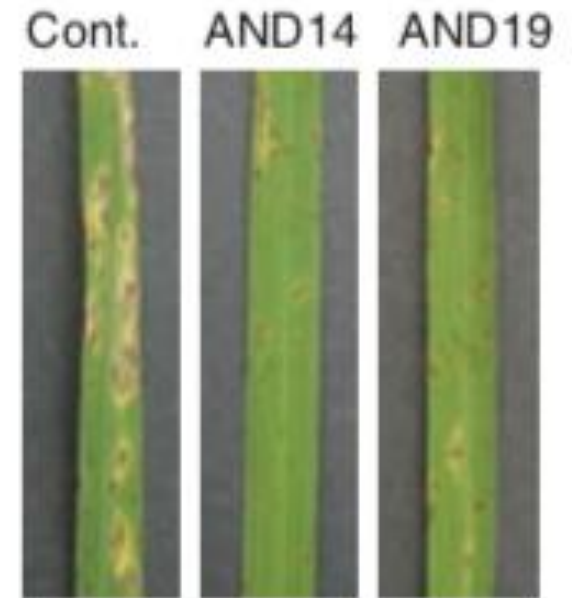


Da molti anni è nota una variante del gene *Pi21* che conferisce resistenza durevole a brusone

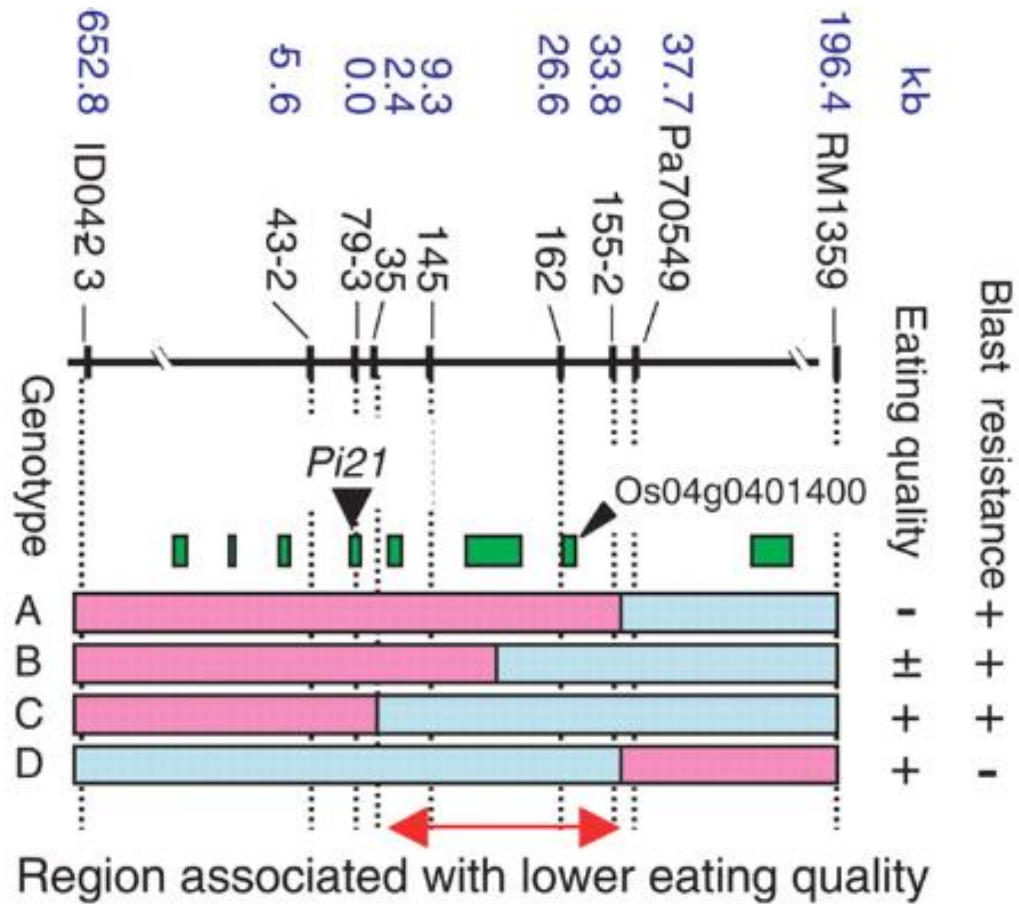
Loss of Function of a Proline-Containing Protein Confers Durable Disease Resistance in Rice

Shuichi Fukuoka,^{1*} Norikuni Saka,² Hironori Koga,³ Kazuko Ono,¹
Takehiko Shimizu,⁴ Kaworu Ebana,¹ Nagao Hayashi,⁵ Akira Takahashi,⁵
Hirohiko Hirochika,⁶ Kazutoshi Okuno,⁷ Masahiro Yano¹

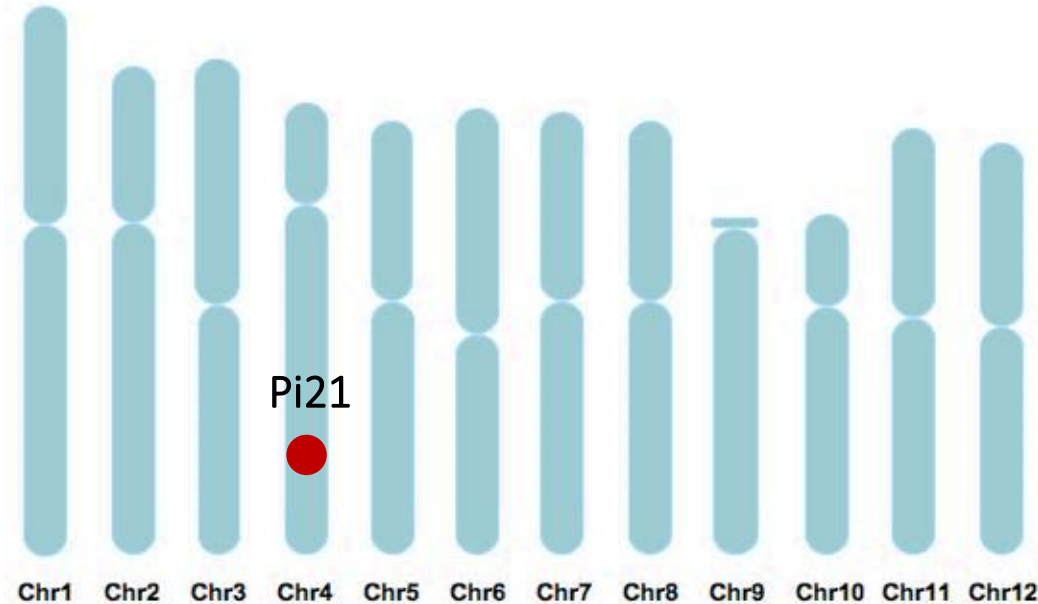
21 AUGUST 2009 VOL 325 SCIENCE www.sciencemag.org



Questa resistenza non è stata usata dai breeders perché associata ad una granella di cattiva qualità



Nel 2017 abbiamo inserito con CRISPR la mutazione in *Pi21* e altri due geni in una varietà tipo Arborio



● Influisce negativamente sulla qualità della granella

SENZA ALTERARE LA QUALITA' DELLA GRANELLA

I SEMI SONO IN FRIGORIFERO DA 6 ANNI



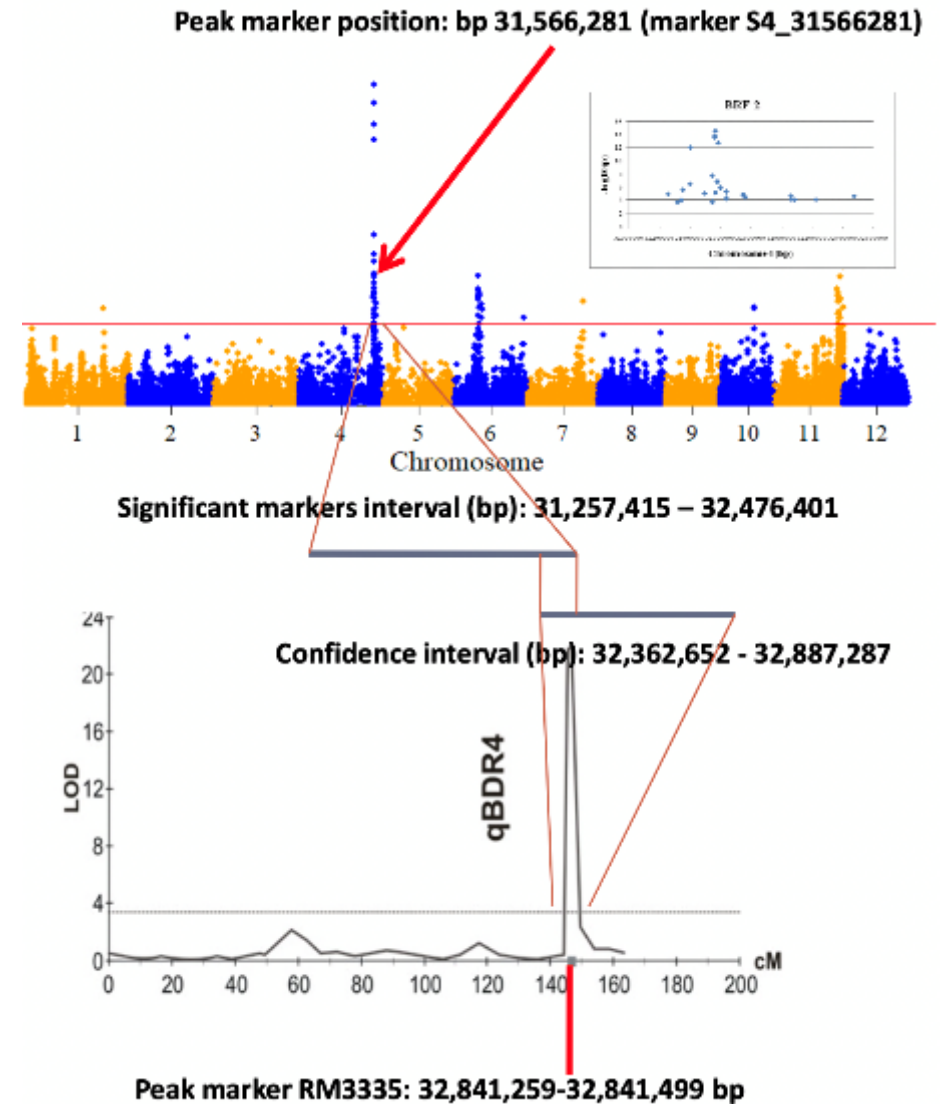
The Sainsbury Laboratory

TSL

Un altro gene probabilmente coinvolto nella resistenza a brusone

Identificato da:

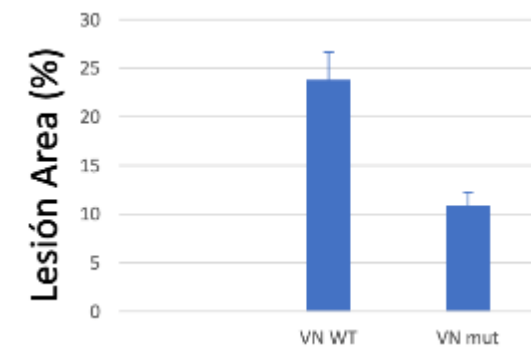
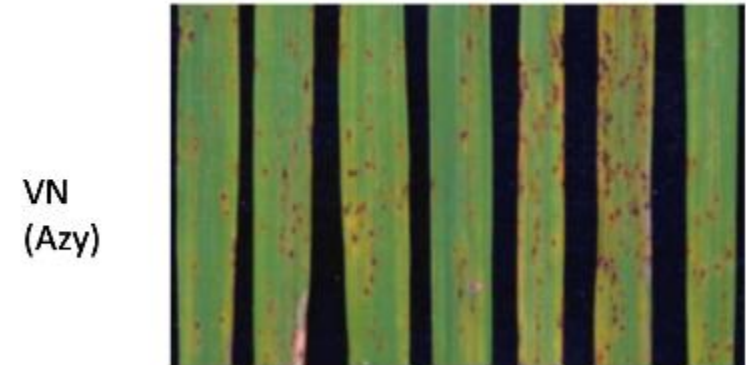
- **Giampiero Valè** - Università del Piemonte Orientale, Vercelli
- **Blanca San Segundo** - CRAG, Barcellona, Spagna



Un altro gene probabilmente coinvolto nella resistenza a brusone

Identificato da:

- **Giampiero Valè** - Università del Piemonte Orientale, Vercelli
- **Blanca San Segundo** - CRAG, Barcellona, Spagna



Resistenza a *Xantomonas oryzae*








ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0267-z>

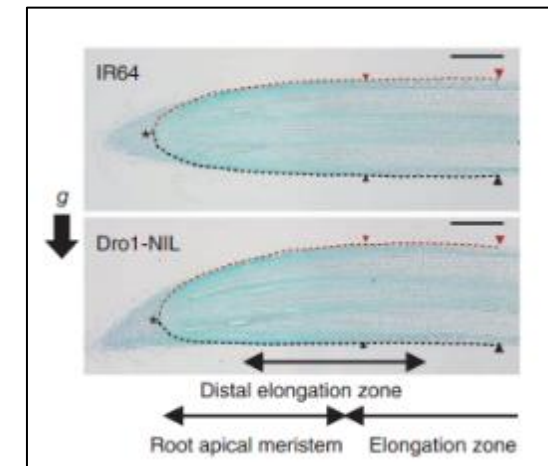
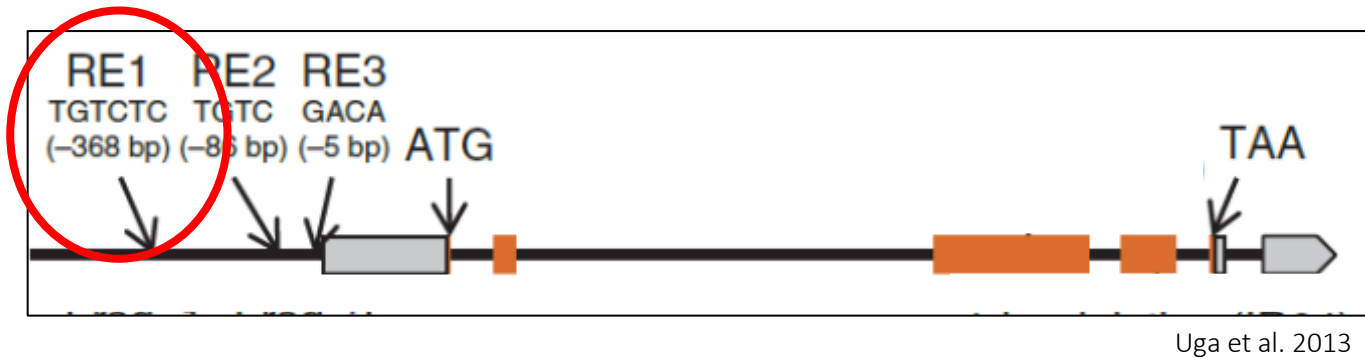
nature
biotechnology

OPEN

Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing

Ricardo Oliva ^{1,12*}, Chonghui Ji^{2,12}, Genelou Atienza-Grande^{1,10,12}, José C. Huguet-Tapia^{3,12}, Alvaro Perez-Quintero ^{4,11,12}, Ting Li ⁵, Joon-Seob Eom⁶, Chenhao Li², Hanna Nguyen ¹, Bo Liu², Florence Auguy⁴, Coline Sciallano⁴, Van T. Luu⁶, Gerbert S. Dossa⁷, Sébastien Cunnac⁴, Sarah M. Schmidt⁶, Inez H. Slamet-Loedin¹, Casiana Vera Cruz¹, Boris Szurek⁴, Wolf B. Frommer ^{6,8*}, Frank F. White ³ and Bing Yang ^{2,9*}

Una mutazione nel promotore di *DRO1* migliora la resistenza alla siccità

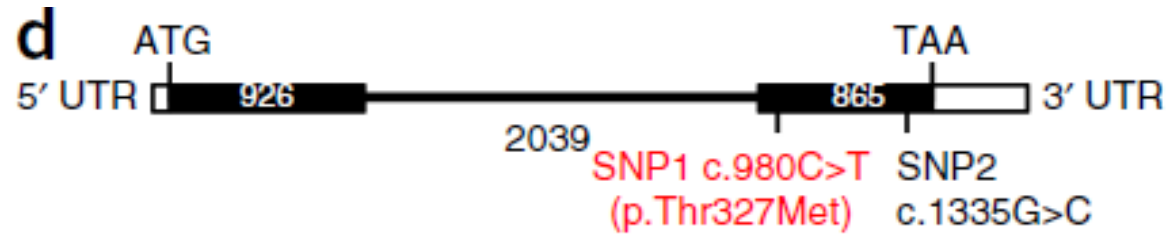


RE1 SITE

```

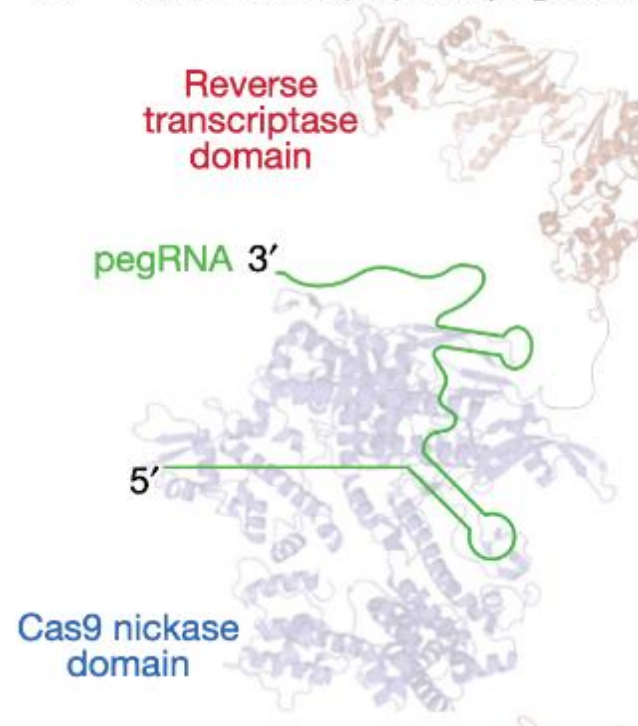
WT >aagaaggatataatcgagatgatggtttttatcgtaaaacttaatatctctagtaggtgtctcgaaatcgtac
ALLELE 1_DEL_3BPS >aagaaggatataatcgagatgatggtttttatcgtaaaacttaatatctctagtagg-tctcgaaatcgtac
ALLELE 2_DEL_1BP >aagaaggatataatcgagatgatggtttttatcgtaaaacttaatatctctagtaggt-tctcgaaatcgtac
    
```

Una mutazione nel gene *NRT1.1b* migliora l'efficienza dell'uso di azoto



Hu et al. 2015

b Prime editor (PE) and pegRNA



Le mutazioni si possono combinare

Resistenza a brusone

Pi21, PiK...

X

Resistenza a siccità

DRO1

X

Efficienza uso azoto

NRT1.1b

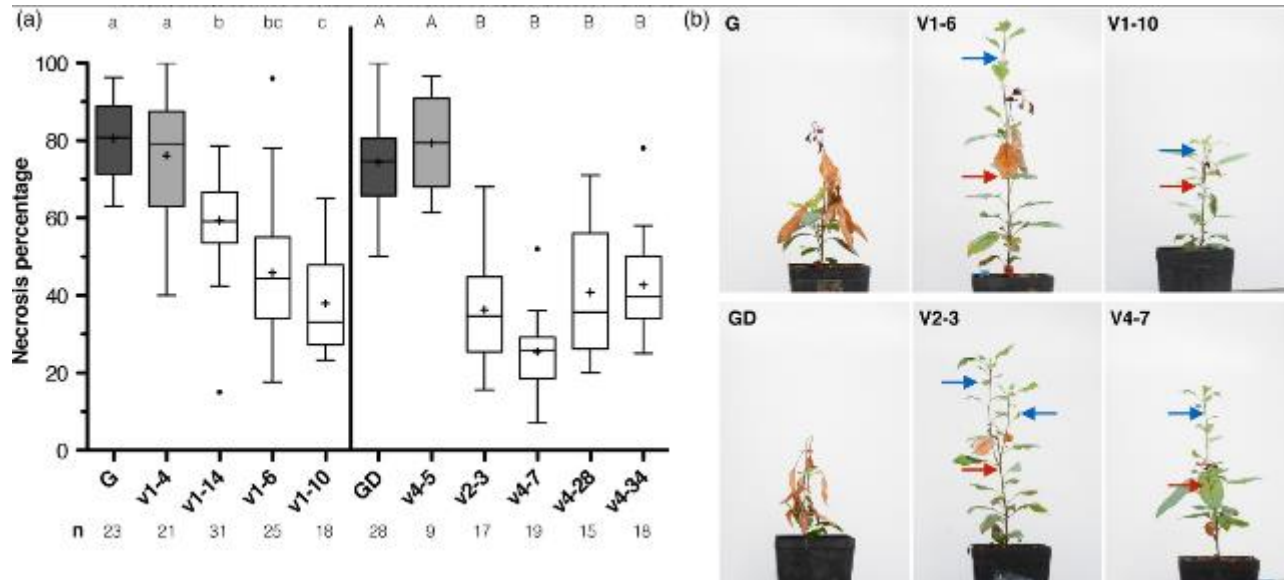


Research Article | Open Access |

Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system

Valerio Pompili , Lorenza Dalla Costa, Stefano Piazza, Massimo Pindo, Mickael Malnoy

First published: 08 September 2019 | <https://doi.org/10.1111/pbi.13253> | Citations: 74



Riduzione in suscettibilità alla malattia del colpo di fuoco batterico, causato da *Erwinia amylovora*.

Engineering null mutants in *ZmFER1* confers resistance to ear rot caused by *Fusarium verticillioides* in maize

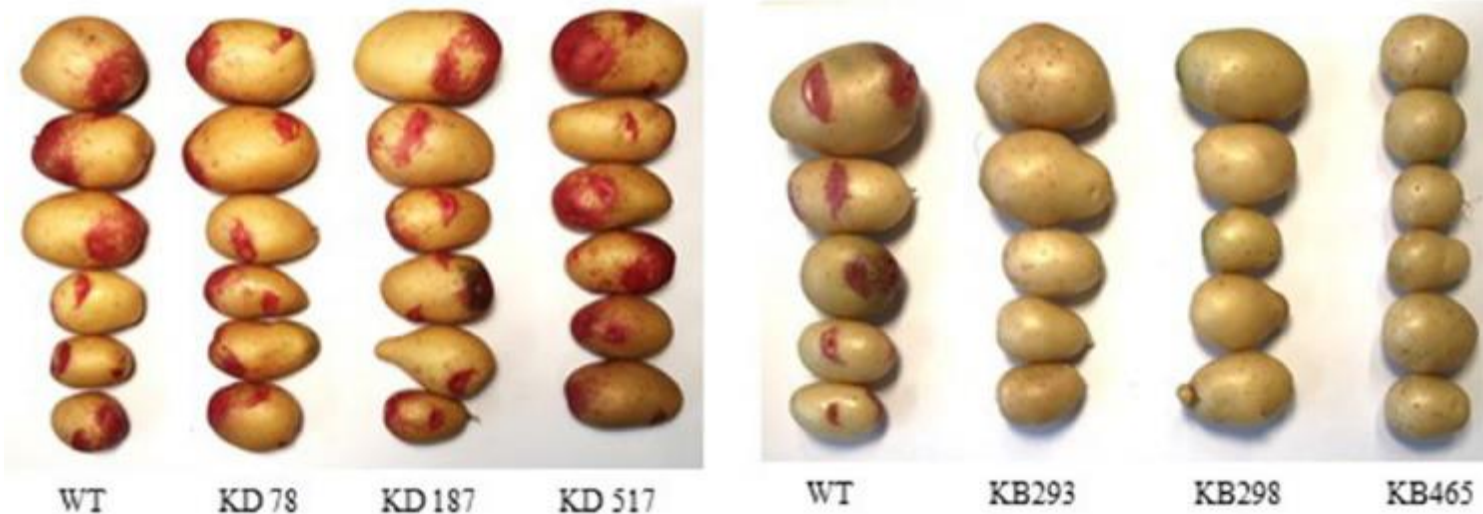
Changlin Liu✉, Ming Kong, Jinjie Zhu, Xiantao Qi, Canxing Duan, Chuanxiao Xie✉



La generazione di mutazioni knock-out nel gene *ZmFER1* produce resistenza in mais alla fusariosi della spiga, causata dal fungo *Fusarium verticillioides*.

Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes

Nam Phuong Kieu¹, Marit Lenman¹, Eu Sheng Wang¹, Bent Larsen Petersen² & Erik Andreasson¹✉



Aumentata resistenza a *Phytophthora infestans*, un fungo che causa la peronospora della patata. Questo fungo può infettare le foglie, i fusti e i tuberi della pianta della patata. Un campo non trattato può essere distrutto in pochi giorni.

Simultaneous editing of two *DMR6* genes in grapevine results in reduced susceptibility to downy mildew

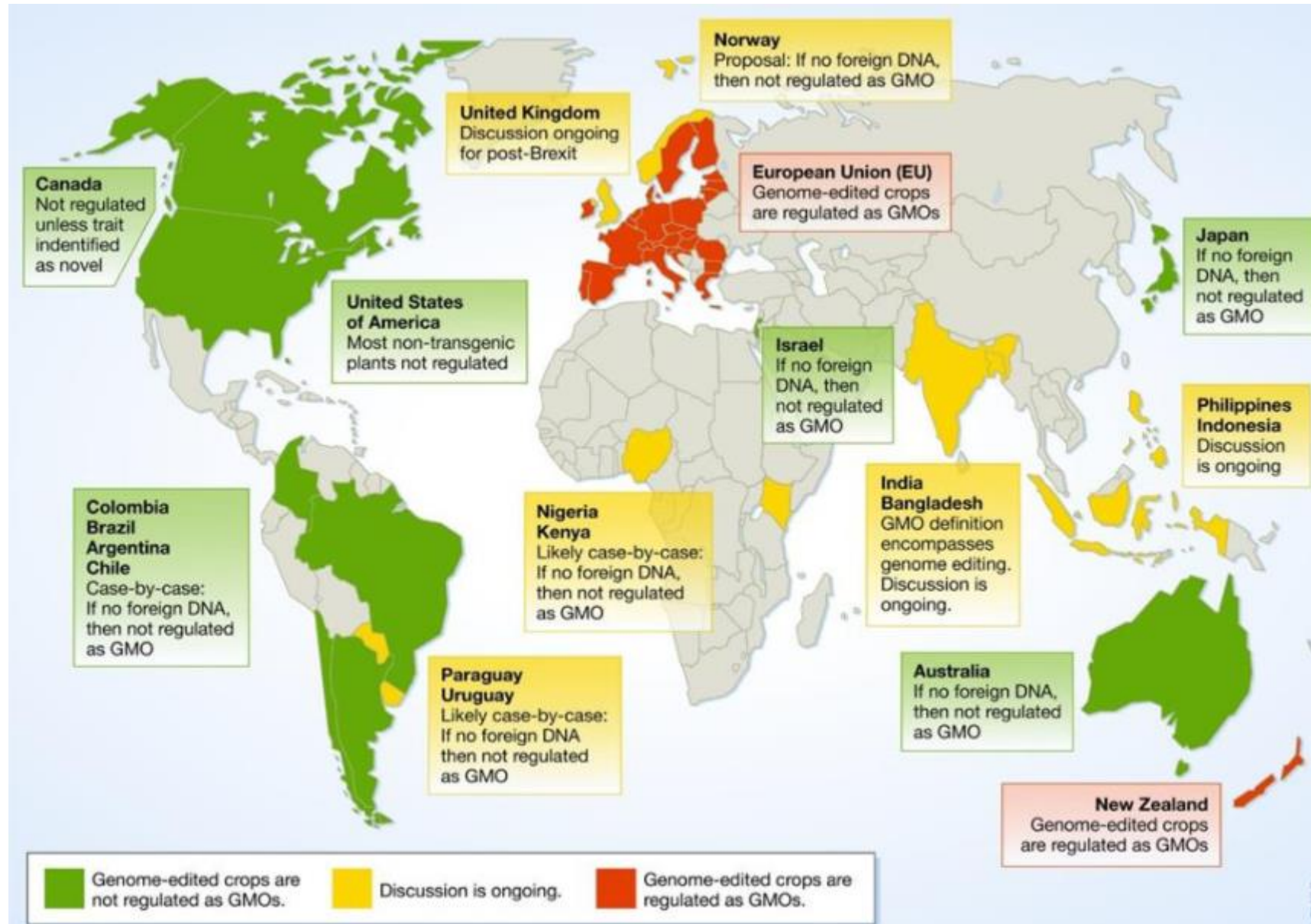
Lisa Giacomelli^{1*}, Tieme Zeilmaker², Oscar Giovannini¹,
Umberto Salvagnin^{1†}, Domenico Masuero¹, Pietro Franceschi¹,
Urska Vrhovsek¹, Simone Scintilla^{1†},
Jeroen Rouppe van der Voort² and Claudio Moser¹

¹Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Italy, ²Enza Zaden Research & Development B.V., Enkhuizen, Netherlands

L'editing di due geni *DMR6* in vite porta ad una riduzione in suscettibilità alla peronospora della vite, causata da *Plasmopara viticola*.



Legislazione TEA in agricoltura nel mondo



Moving towards precision breeding: UK enables plant breeding innovation

March 24, 2023



Parliamentary Bills

[UK Parliament](#) > [Business](#) > [Legislation](#) > [Parliamentary Bills](#) > Genetic Technology (Precision Breeding) Act 2023

Genetic Technology (Precision Breeding) Act 2023

Government Bill

Originated in the House of Commons, Session 2022-23

Last updated: 27 March 2023 at 17:17

Situazione legislativa in Europa

SENTENZA della Corte di Giustizia del 25 luglio 2018:
Piante TEA = OGM



Reports of Cases

JUDGMENT OF THE COURT (Grand Chamber)

25 July 2018*

(Reference for a preliminary ruling — Deliberate release of genetically modified organisms into the environment — Mutagenesis — Directive 2001/18/EC — Articles 2 and 3 — Annexes I A and I B — Concept of ‘genetically modified organism’ — Techniques/methods of genetic modification conventionally used and deemed to be safe — New techniques/methods of mutagenesis — Risks for human health and the environment — Discretion of the Member States when transposing the directive — Directive 2002/53/EC — Common catalogue of varieties of agricultural plant species — Herbicide-tolerant plant varieties — Article 4 — Acceptability of genetically modified varieties obtained by mutagenesis for inclusion in the common catalogue — Human health and environmental protection requirement — Exemption)

In Case C-528/16,

La definizione di OGM (dir. 2001/18/CE)

Definizione

- «**organismo geneticamente modificato (OGM)**», 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.

Una modificazione genetica è ottenuta **almeno mediante l'impiego di:**

- **tecniche di ricombinazione** dell'**acido nucleico** che comportano la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento in un virus, un plasmide batterico o qualsiasi altro vettore, di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo all'esterno di un organismo, nonché la loro incorporazione in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;
- tecniche che comportano **l'introduzione diretta** in un organismo di **materiale ereditabile preparato al suo esterno**, tra cui la microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;
- **fusione cellulare** (inclusa la fusione di protoplasti) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali.

Non sono considerate tecniche che hanno per effetto una modificazione genetica:

- fecondazione in vitro;
- processi naturali (la coniugazione, la trasduzione e la trasformazione);
- induzione della poliploidia.

La definizione di OGM (dir. 2001/18/CE)

Deroghe

La direttiva **non** si applica agli organismi ottenuti con le tecniche di:

- Mutagenesi (chimica e fisica);
- Fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali.

Brussels, 24 October 2019
(OR. en)

12781/19

AGRI 479
AGRILEG 167
ENV 825

Article 1

The Council requests the Commission to submit, by 30 April 2021, a study in light of the Court of Justice's judgment in Case C-528/16 regarding the status of novel genomic techniques under Union law.

LEGISLATIVE ACTS AND OTHER INSTRUMENTS

Subject: COUNCIL DECISION requesting the Commission to submit a study in light of the Court of Justice's judgment in Case C-528/16 regarding the status of novel genomic techniques under Union law, and a proposal, if appropriate in view of the outcomes of the study

14.11.2019

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

L 293/103

DECISIONE (UE) 2019/1904 DEL CONSIGLIO

dell'8 novembre 2019

che invita la Commissione a presentare uno studio alla luce della sentenza della Corte di giustizia nella causa C-528/16 concernente lo statuto delle nuove tecniche genomiche conformemente al diritto dell'Unione e una proposta, se del caso tenendo conto dei risultati dello studio



Regione Lombardia

LA GIUNTA

DELIBERAZIONE N° XI / 7526

Seduta del 15/12/2022

Presidente

ATILIO FONTANA

Assessori regionali

FABRIZIO SALA *Vicepresidente*
GUIDO BERTOLASO
STEFANO BOLOGNINI
DAVIDE CARLO CAPARINI
RAFFAELE CATTANEO
MELANIA DE NICHILLO RIZZOLI
PIETRO FORONI
STEFANO BRUNO GALLI

GUIDO GUIDESI
ROMANO MARIA LA RUSSA
ELENA LUCCHINI
LARA MAGONI
ALAN CHRISTIAN RIZZI
FABIO ROLFI
MASSIMO SERTORI
CLAUDIA MARIA TERZI

Con l'assistenza del Segretario Enrico Gasparini

Su proposta dell'Assessore Fabio Rolfi

Oggetto

DETERMINAZIONI IN ORDINE ALLA SPERIMENTAZIONE IN CAMPO APERTO DI NUOVE VARIETA' VEGETALI D'INTERESSE AGRARIO OTTENUTE CON NUOVE TECNICHE GENETICHE (NGT)

LEGGI ED ALTRI ATTI NORMATIVI

DECRETO-LEGGE 14 aprile 2023, n. 39.

Disposizioni urgenti per il contrasto della scarsità idrica e per il potenziamento e l'adeguamento delle infrastrutture idriche.

Testo in vigore dal: 14-6-2023

[aggiornamenti all'articolo](#)

Art. 9-bis

((*Disposizioni urgenti in materia di genetica agraria*).))

((1. Per consentire lo svolgimento delle attività di ricerca presso siti sperimentali autorizzati, a sostegno di produzioni vegetali in grado di rispondere in maniera adeguata a condizioni di scarsità idrica e in presenza di stress ambientali e biotici di particolare intensità, nelle more dell'adozione, da parte dell'Unione europea, di una disciplina organica in materia, l'autorizzazione all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi prodotti con tecniche di editing genomico mediante mutagenesi sito-diretta o di cisgenesi a fini sperimentali e scientifici e' soggetta, fino al 31 dicembre 2024, alle disposizioni di cui al presente articolo.

Proposta della Commissione Europea per una normativa

TEA differente da OGM



Brussels, 5.7.2023
COM(2023) 411 final

2023/0226 (COD)

Proposal for a

REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

**on plants obtained by certain new genomic techniques and their food and feed, and
amending Regulation (EU) 2017/625**

(Text with EEA relevance)

{SEC(2023) 411 final} - {SWD(2023) 411 final} - {SWD(2023) 412 final} -
{SWD(2023) 413 final}

La definizione di pianta TEA -COM (2023)411final-

Le **piante TEA** sono piante ottenute tramite *genome editing* o *cisgenesis*, o una combinazione delle due, con la condizione che non contengano materiale genetico originato dall'esterno, che temporaneamente possa essere stato introdotto per generare la pianta TEA stessa.

Le due categorie di piante TEA (NGT plants)

- **Categoria 1 NGT** -> piante TEA che presentino:
 - Sostituzioni o inserzioni di non più di 20 basi
 - Delezioni di un qualsiasi numero di basi
 - Inversione di una sequenza di un qualsiasi numero di nucleotidi
 - Qualsiasi altra modifica di ogni dimensione, con la condizione che le risultanti sequenze di DNA possano verificarsi già in una specie dal pool genetico dei breeders.
- **Categoria 2 NGT** -> piante TEA escluse dalla categoria 1 NGT

ANNEX III

Traits referred to in Article 22

Part 1

Traits **justifying the incentives** referred to in Article 22:

- (1) yield, including yield stability and yield under low-input conditions;
- (2) tolerance/resistance to biotic stresses, including plant diseases caused by nematodes, fungi, bacteria, viruses and other pests;
- (3) tolerance/resistance to abiotic stresses, including those created or exacerbated by climate change;
- (4) more efficient use of resources, such as water and nutrients;
- (5) characteristics that enhance the sustainability of storage, processing and distribution;
- (6) improved quality or nutritional characteristics;
- (7) reduced need for external inputs, such as plant protection products and fertilisers.

Part 2

Traits **excluding** the application of the **incentives** referred to in Article 22: tolerance to herbicides.



Lollobrigida: "Salvare l'agricoltura con la tecnologia, l'Italia sarà la prima"

di Lara Loreti



▲ L'agricoltura può salvarsi solo con la tecnologia

Contro la crisi climatica, il ministro spinge sugli investimenti nelle Tecniche di evoluzione assistita, grazie alle quali si può migliorare la salute delle colture: "Le esploreremo in maniera ampia"



COLDIRETTI



AGRICOLTORI ITALIANI

Grazie a tutti per l'attenzione!

Un ringraziamento particolare a:

ARPTRA, per l'invito
Vittoria Brambilla, PhD
Prof. Fabio Fornara



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO

