



ASSOCIAZIONE REGIONALE PUGLIESE
dei TECNICI e RICERCATORI in AGRICOLTURA

in collaborazione con



Giornate Fitopatologiche



IMAGE LINE[®]
INTERNET - COMUNICAZIONE - AGRICOLTURA

33° Forum di Medicina Vegetale

Biotechnologie Sostenibili

Opportunità e sfide
per la protezione delle piante



Martedì 14 Dicembre 2021
Nicolaus Hotel
Via Cardinale A. Ciasca, 27 - 70124 BARI

Quali OGM per gli obiettivi del Green Deal Europeo

Prof. Bruno Mezzetti

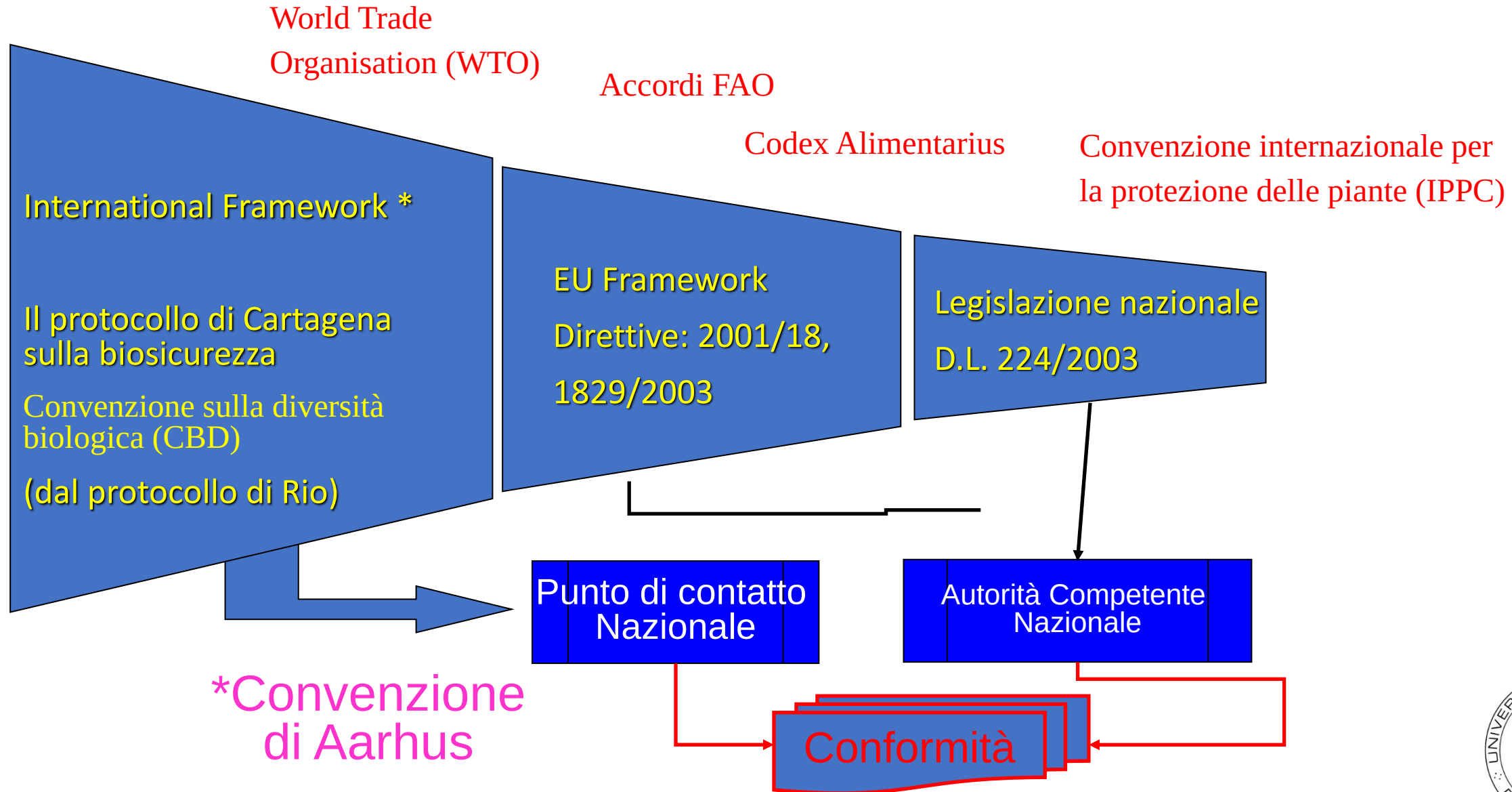
Dip. di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali

Università Politecnica delle Marche

b.mezzetti@univpm.it



Quadro giuridico sulla biosicurezza delle biotecnologie



LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DEGLI OGM: IL RUOLO DELL'EFSA

Per introdurre un prodotto OGM sul mercato Europeo serve l'autorizzazione

Legislazione EU su OGM:

- Regolamento (EC) **1829/2003**: importazione-sicurezza alimentare →
- Direttiva **2001/18/EC**: coltivazione-rischio ambientale (ERA) e alimentare, unico evento autorizzato il **MON810**
- Direttiva 1830/2003 – tracciabilità Prodotti OGM
- D.M. **19/01/2005** Identificare siti per sperimentare OGM – protocolli ?
- Regolamento EU 503/2013 – test su animali per sicurezza alimentare
- Direttiva EU 2015/412 gli Stati Membri possono limitare o vietare la coltivazione di OGM sul loro territorio

Per ottenere un'autorizzazione è necessario avere una valutazione scientifica di ogni possibile rischio per l'uomo, gli animali e l'ambiente



EFSA = Parere scientifico



Commissione = Decisione politica

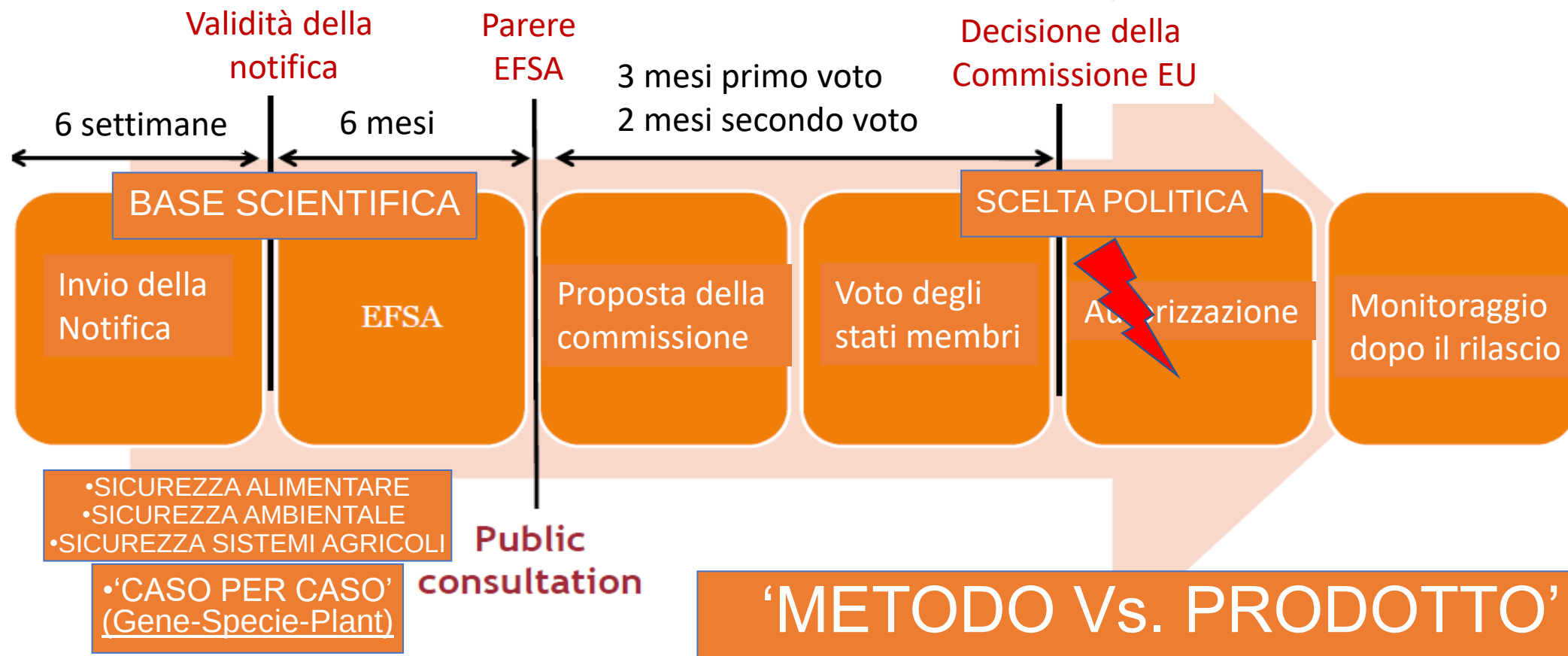


SISTEMA DI REGOLAMENTAZIONE EU

PROCESSO DI APPROVAZIONE IN EU SECONDO LE NORMATIVE:

1829/2003 – IMPORTAZIONE = Più DI 100 EVENTI

2001/18 - COLTIVAZIONE= SOLO MON810

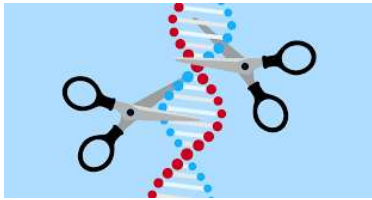


LA NORMATIVA

Art. 3. Allegato 1 **TECNICHE DI MODIFICAZIONE GENETICA PARTE I**

Le tecniche di modificazione genetica di cui all'articolo 3, comma 1, lettera b), punto 1, comprendono, tra l'altro:

1) tecniche di ricombinazione dell'acido nucleico TAGLIA E CUCI DEL DNA



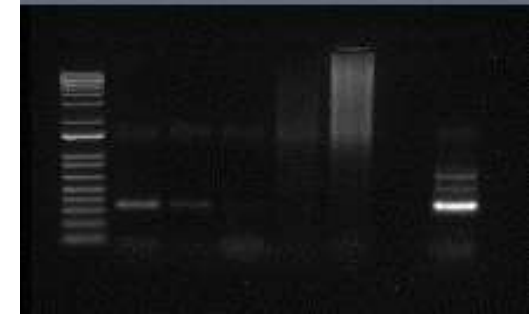
- 2) tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la **microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;**
- 3) **fusione cellulare, inclusa la fusione di protoplasti, o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive,**

Non sono OGM se ottenuti per:

I B: 1) fecondazione in vitro; 2) processi naturali, quali la coniugazione, la traduzione e la trasformazione, 3) induzione della poliploidia.

COSA SI DEVE FARE PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO

1. Caratterizzazione genomica. Geni e numero di copie inserite. Per il Gene Editing può bastare questa fase.



2. Valutazione Rischio Ambientale

Funzione genica nell'organismo donatore e sul fenotipo.
Flusso genico, persistenza e invasività in agricoltura.
Impatto su nessun organismo bersaglio.

3. Valutazione rischio salute

Valutazione composizionale, nutrizionale
Caratterizzazione delle nuove sostanze, no per dsRNA
Sicurezza delle nuove sostanze, no per dsRNA
Evidenze di tossicità ed effetti allergenici.

TECNICHE GENETICHE E PRODOTTI

Breeding

Mutagenesi

Trans-cis-
intra-genesis

Gene editing

*Silenziamento
Genico*

*Risorse gentiche
(germoplasma
selvatico e coltivato)*

*Mutagenesi chimica e
fisica*

*Studi genomici funzionali e identificazione di geni
regolatori bersaglio per resistenze e qualità*

*Tempi lunghi di selezione in vivo / marcatori
molecolari (MAS, QTLs)*

*Ottenimento veloce di piante modificate per i caratteri
attesi*

*Brevetto/privative/registrazione delle nuova
cultivar/clone (derivato)*

*Applicare le normative previste per la biosicurezza degli
OGM*

*Immissione sul mercato senza verifiche di
biosicurezza*

*Affrontare il problema dell'accettazione del pubblico
prima della diffusione commerciale*

NUOVA CULTIVAR MIGLIORTA

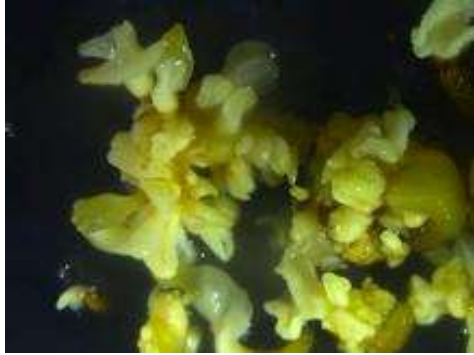
PROMOZIONE COMMERCIALE DELLA NUOVA CULTIVAR



Improved nutritional quality in fruit tree species through traditional and biotechnological approaches

Silvia Sabbadini ^a, Franco Capocasa ^a, Maurizio Battino ^{b,c}, Luca Mazzoni ^{b,c}, Bruno Mezzetti ^{a,*}

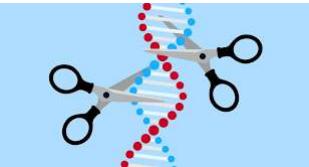
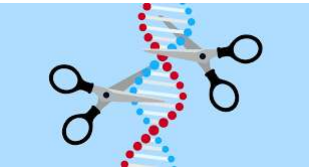
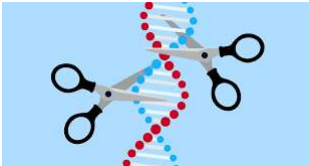
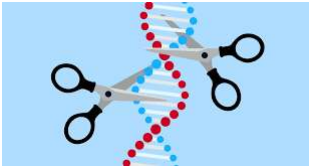
Mutagenesi vite: cloni derivati non OGM – attenti a non farli inserire nelle normativa come OGM



Mutagenesi
In vitro

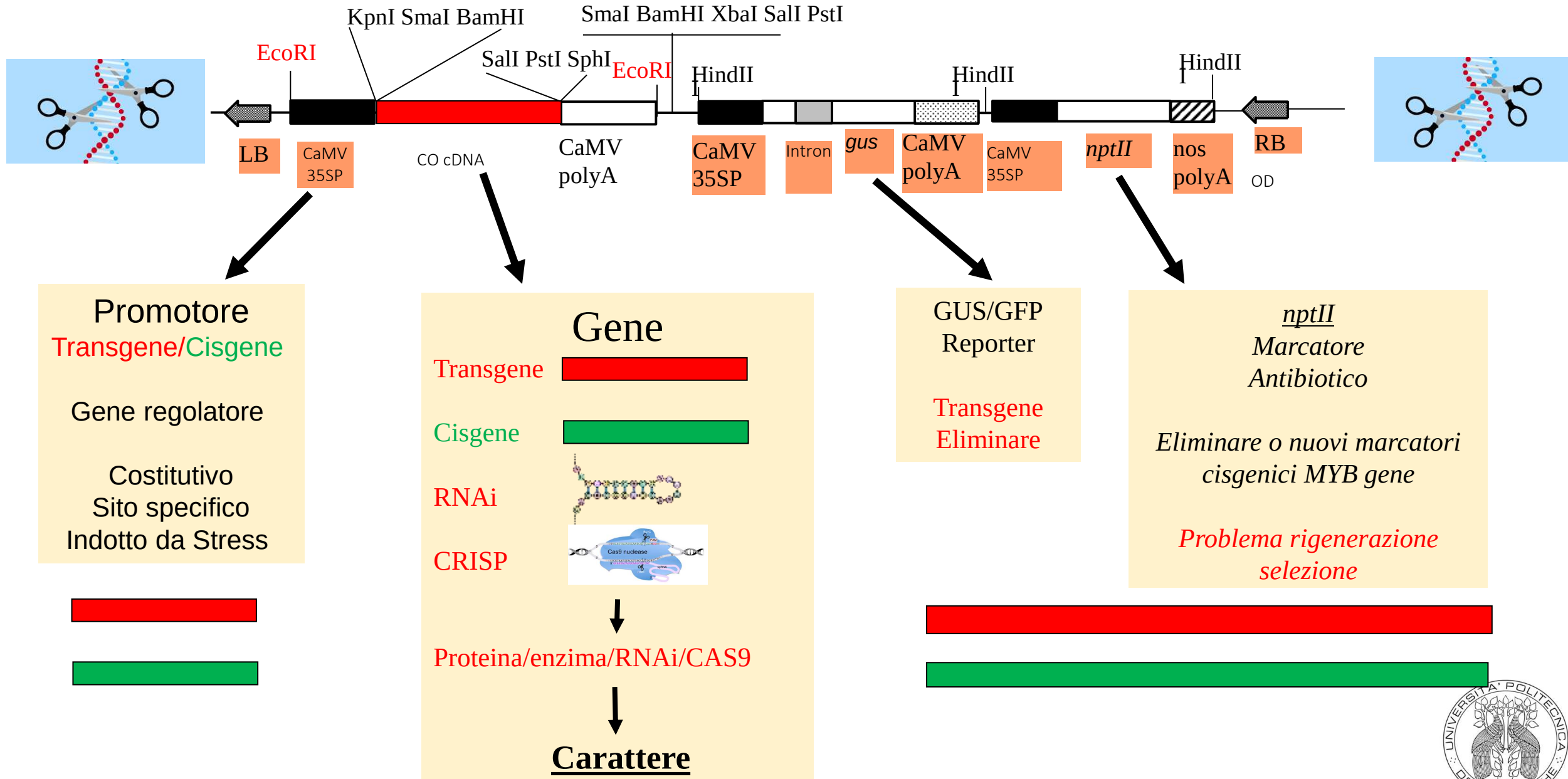


ESSERE O NON ESSERE....., UN OGM

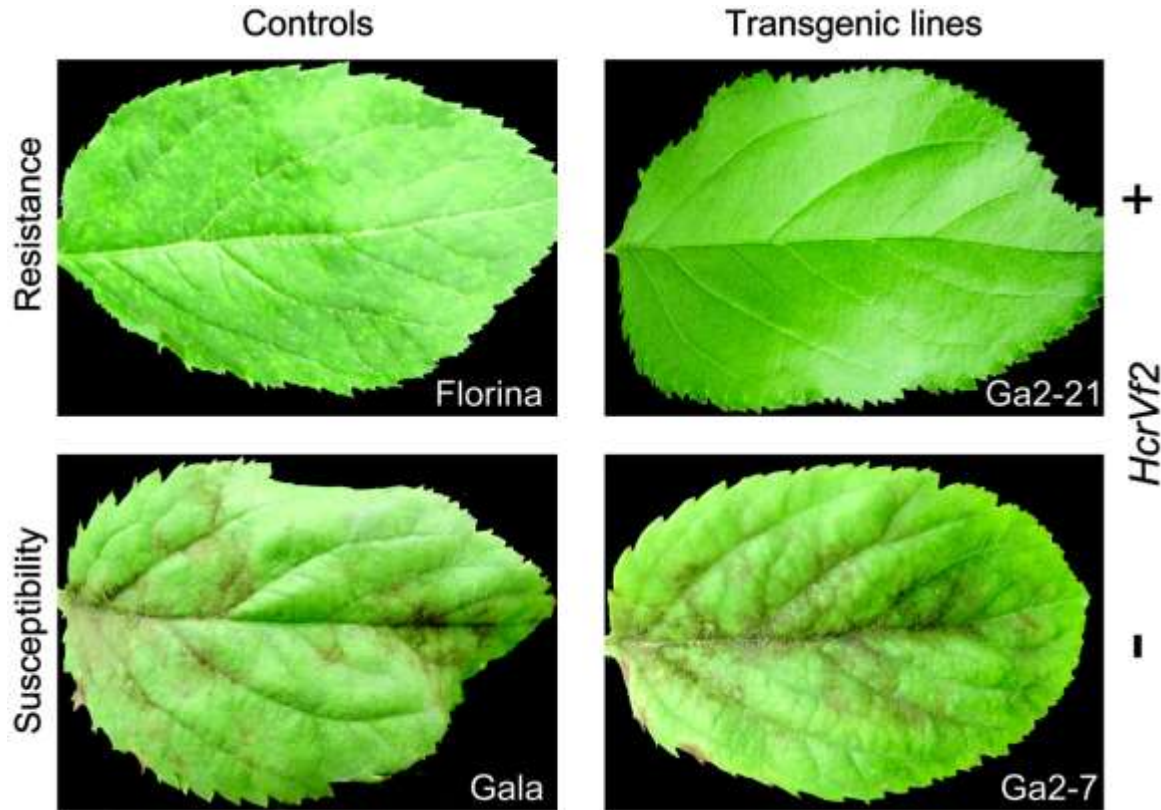
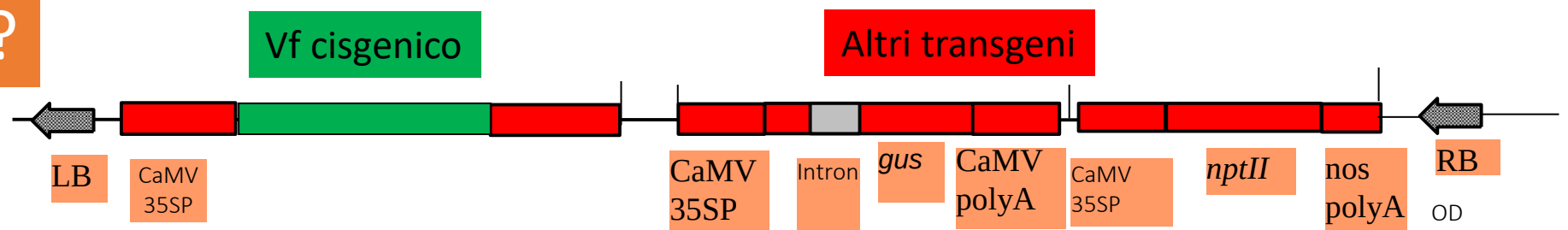
- Trasformazione con sequenze esogene  OGM
- Cisgenesi/intragenesi  OGM **Corte Europea (25/07/2018)**
- Pianta con innesto intermedio OGM no OGM
- Cultivar innestata su portinnesto OGM no OGM
- Genome editing  OGM **Corte Europea (25/07/2018)**
- Espressione stabile in pianta di dsRNA  OGM
- Prodotti a base dsRNA per applicazione diretta no OGM

PER RISOLVERE L'OPPOSIZIONE CONTRO LE BIOTECNOLOGIE E'
IMPORTANTE DARE INFORMAZIONI CORRETTE

IL DNA E I GENI: Transgeni, Cisgeni, RNAi, gene editing



Mela cisgenica?



(PNAS, 20 gennaio 2004, vol. 101, n.3, fig.3)

Same symptoms

COSI E' OGM

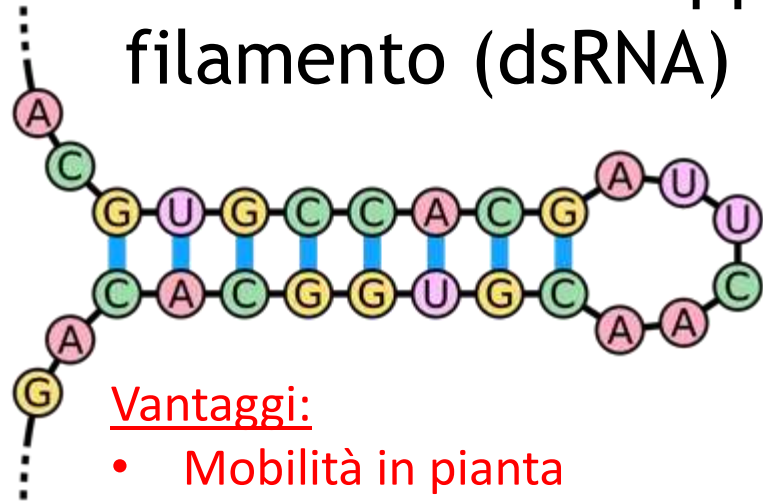


BELFANTI E., SILFVERBERG-DILWORTH E., TARTARINI S., PATOCCHI A., BARBIERI M., ZHU J., VINATZER B.A., GIANFRANCESCHI L., GESSLER C. AND SANSAVINI S., 2004. *The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety*. P. Natl. Acad. Sci. USA 101: 886-890.



RNAi versus CRISPR/Cas9

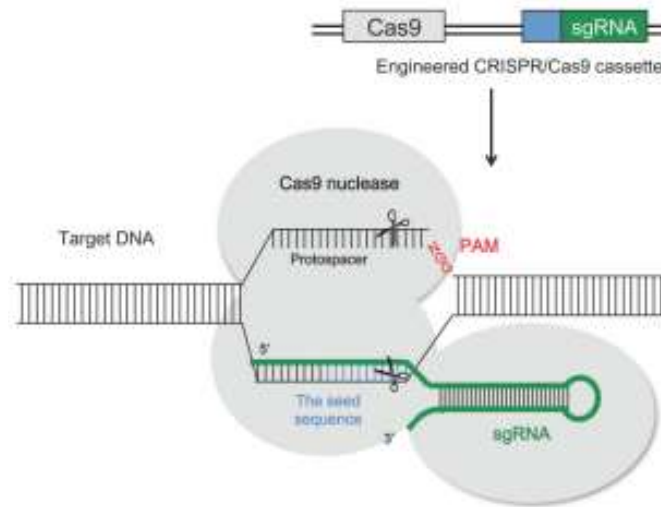
L'RNAi inibisce l'espressione genica in un modo sequenza-specifico indotto da RNA a doppio filamento (dsRNA)



Vantaggi:

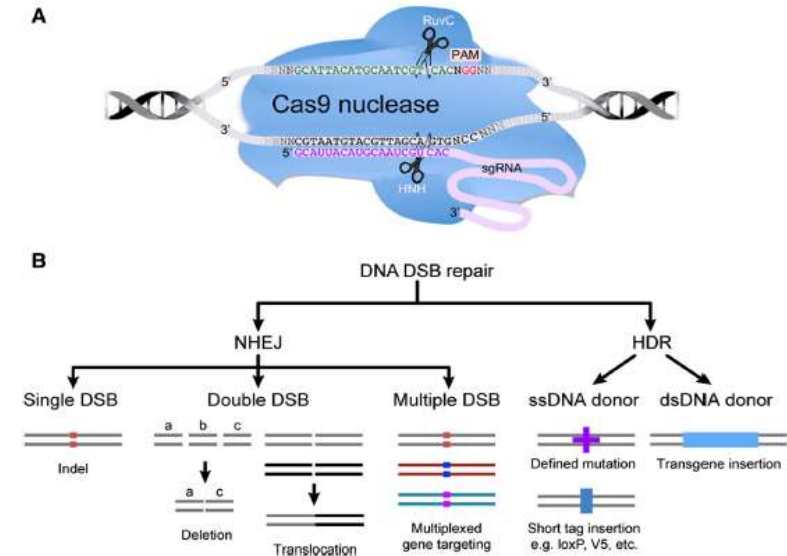
- Mobilità in pianta
- Mobilità tra pianta e organismi target
- Espressione stabile in pianta
- Applicazione diretta - spray

Fire e Mello Premio Nobel per la Medicina nel 2006



In teoria il gene editing può sostituire il silenziamento genico – RNAi ma solo per geni endogeni

GENE EDITING



La proteina CAS9 è lo strumento per indurre il gene editing e deve essere inserita/espressa nella cellula e taglia il DNA. Per questo secondo la normativa è comunque un OGM.

Charpentier e Doudna Premio Nobel per la Chimica nel 2020

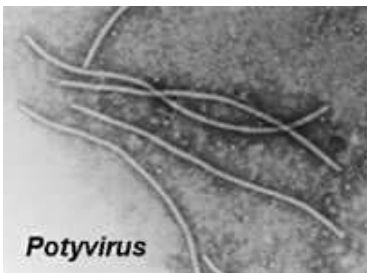


Approcci RNAi per la resistenza al virus PPV – Sharka in Pesco

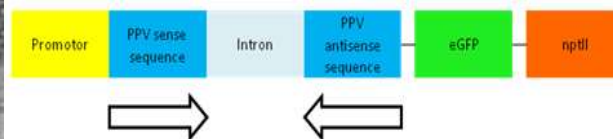
In collaborazione con Prof. T. Pandolfini and Dr B.Molesini, UNIVR, Italy



Vettore: *Myzus persicae*



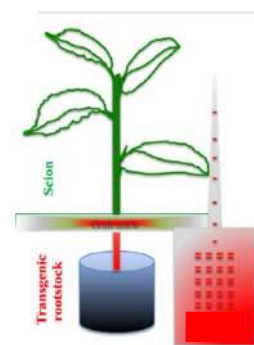
Plum pox virus



PPV RNAi fragment 194 bp

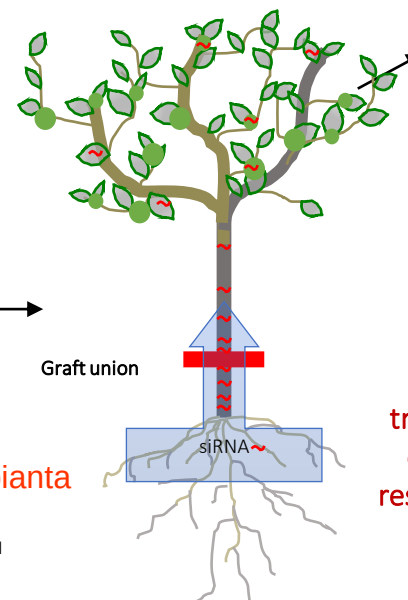
(costrutto genico validato in tabacco da Pandolfini et al., 2003)

Trans-grafting



Mobilità dsRNA in pianta

Zhao & Song (2014). Plant biotechnology journal



Pesco non trasgenico resistente a Sharka

Portinnesto transgenico RNAi che conferisce resistenza a Sharka



Simptomi della Sharka

Minor rischio ambientale/alimentare – maggiore accettabilità del pubblico



Silenziamento genico per resistenza a Botrite e Peronopora in vite

- Bc-DCL1/2 RNAi costruito genico (**Brevettato da Hailing Jin's lab, Università della California Riverside USA, Wang et al., 2016**)
 - Costrutto genico Pv-DCL1/2 RNAi (**non ancora brevettato, preparato prima dell'inizio del progetto in collaborazione con Prof. Elena Baraldi, UNIBO**)
- A.tumefaciens* ceppo GV3101

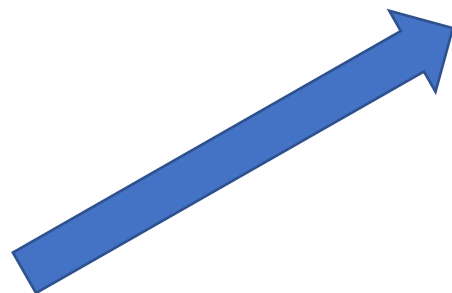


Selezione su
kanamicina



Radicazione
su kanamicina

Già disponibile
diverse linee
modificate



Prove di inoculo per verificare resistenza
su piante transgeniche in vivo

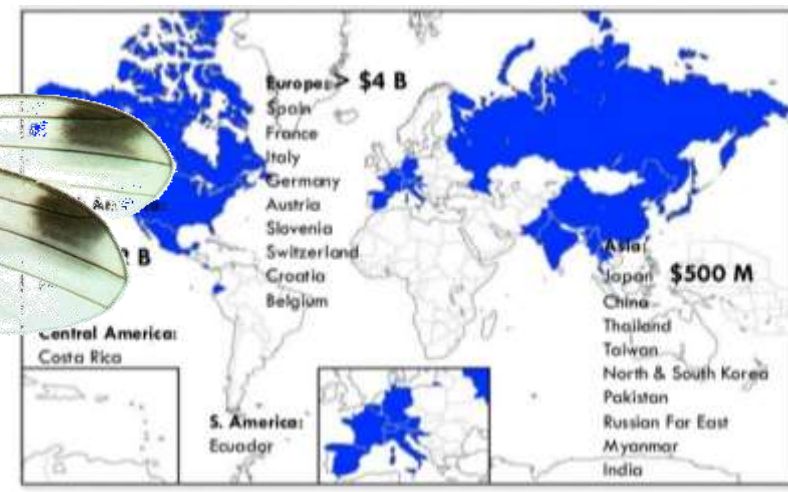
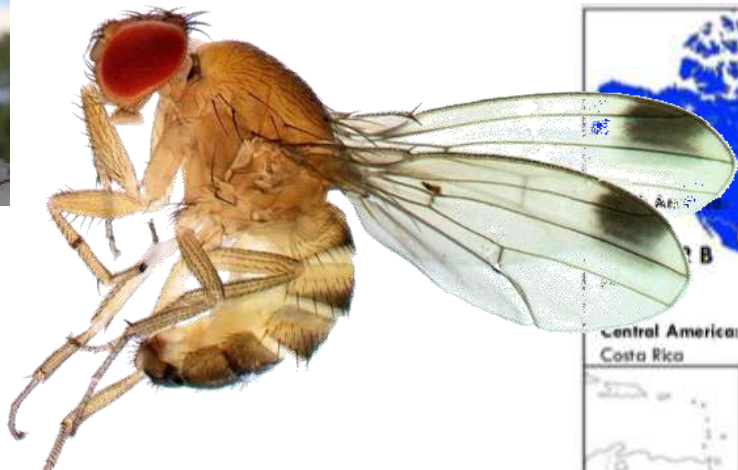


Cv. Thompson Seedless linea P8g1

Drosophila suzukii UN'ALTRA IMPORTANTE EMERGENZA



Dr. Clauvis
Taning



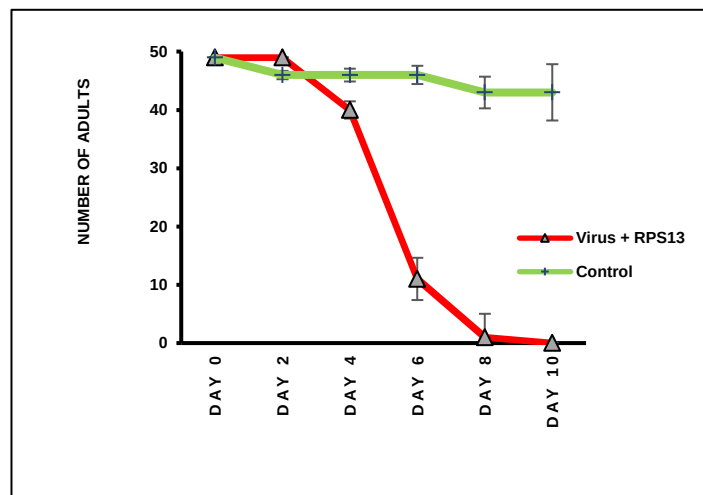
Preparati costruiti per espressione
in planta - OGM di dsRNA per controllo

D. suzukii

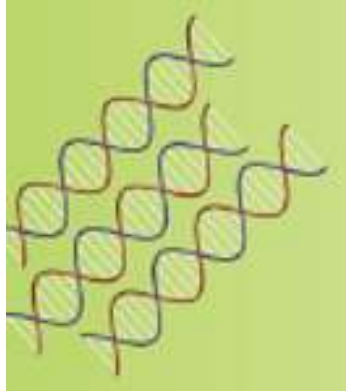


Resistenza a *Drosophila suzukii* indotta da RNAi applicato
tramite virus (VIGS) – virus OGM

Effetto del RNAi-VIGS sul
controllo degli adulti



Applicazione esogena di RNAi contro patogeni e parassiti : Identificare sequenze, produzione, formulati, tecniche di applicazione



Sequenza



Nano materiale



Applicazione
formulato

- Applicazione fogliare
- Iniezione dal tronco
- Assorbimento radicale
- Assorbimento seme
- Applicazione spray ad alta pressione



- **Registrazione prodotto: Classificare i nuovi prodotti a base di RNAi non nella Categoria dei pesticidi chimici.**
- **RNAi piccola molecola naturale: registrazione come BIOPESTICIDA**
- **Avviare la produzione – servono aziende interessate**



RNAi per il controllo della Botrytis cinerea: fase più avanzata per sviluppo prodotti

SPERIMENTAZIONE CAMPO SERRA DI
FORMULATI dsRNA



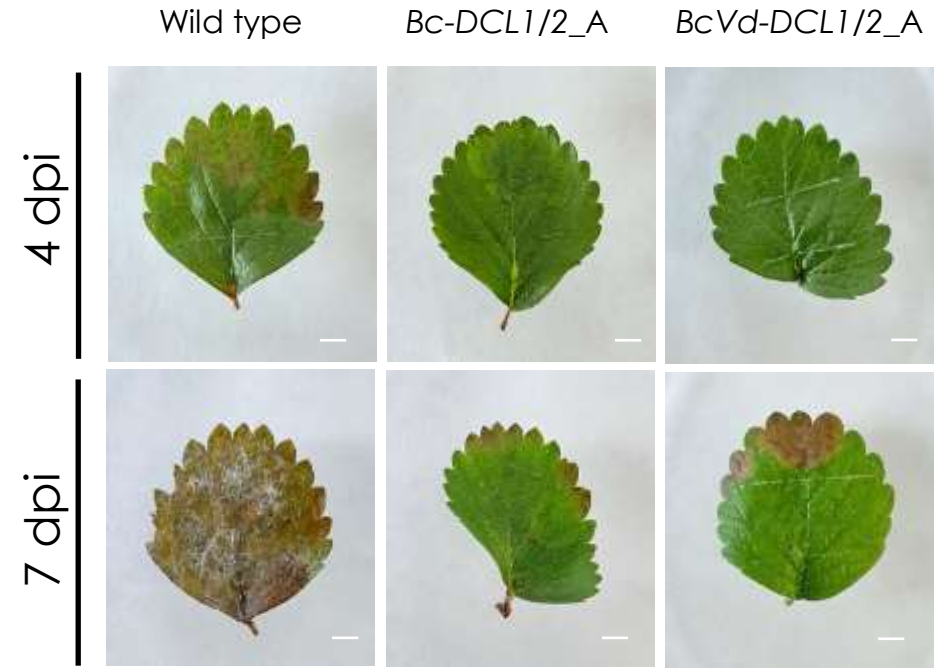
Testare
formulati di
dsRNA per
identificare i più
efficaci

Comparare i
formulati
dsRNA con i
pesticidi chimici
e biologici

Identificare il
livello di
protezione dei
formulate
dsRNA in pre e
post-harvest

Controllare
effetti non
attesi dei
formulati
dsRNA

CONFERMATA L'EFFICACIA DI ESPRESSIONE IN PLANTA: OGM



April 2021

Sunday	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday
			1	2	3	
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	

May 2021

Sunday	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
30	31					

June 2021

Sunday	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30			

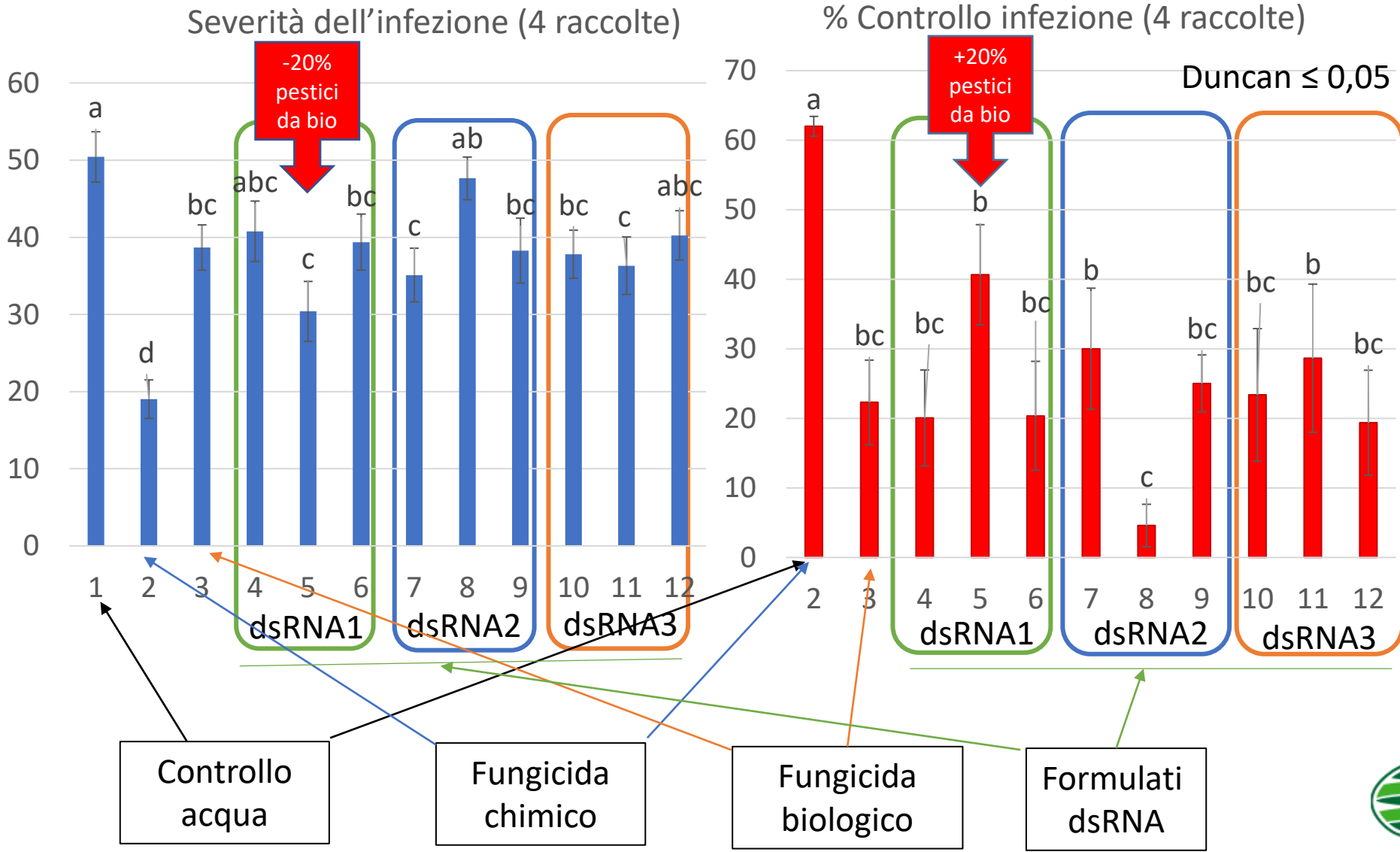
July 2021

Sunday	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday
			1	2	3	
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31



Confronto fungicida chimico, biologico e formulato dsRNA

Prova in campo controllo botrite su fragola



Risultati dopo 8 giorni dall'infezione in vivo

	5 ng/ul	20 ng/ul	200 ng/ul	2000 ng/ul
ccdB (Ctrl)				
DCL1				
DCL1+DCL2				


frontiers
in Plant Science

Double-Stranded RNA Targeting
Dicer-Like Genes Compromises the
Pathogenicity of *Plasmopara viticola*
on Grapevine

Zoraya Mohari Hader^{1,2}, Daniel Endele Gbureckiewicz¹, Luca Caprini^{1,3},
Barbara Molodtsova¹, Francesca Negri¹, Maria Collina¹, Silvia Sabbadini¹,
Bruno Medda^{1,4} and Elena Barak^{1,2*}


ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



Abate



3 gg
Infetto + h20



Infetto + RNAi



4 gg
Infetto + h20



Infetto + RNAi



5 gg
Infetto + h20



Infetto + RNAi

Conference



*Espressione in planta di
sequenze di dsRNA per resistenze*

Messa a punto di protocolli di
trasformazione per avere
espressione stabile di dsRNA
per difesa ad *Alternaria* in
Abate Fetél e portinnesti pero.



Testare
sequenze
di dsRNA



Anche i pesticidi biologici inquinano

RESEARCH HIGHLIGHT | 17 November 2021

Even organic pesticides spur change in the wildlife next door

A keystone aquatic species develops resistance to compounds used to treat organic fields near its ponds.

Differential local genetic adaptation to pesticide use in organic and conventional agriculture in an aquatic non-target species

Rafaela A. Almeida¹, Pieter Lemmens^{1,2}, Luc De Meester^{1,2,3,4} and Kristien I. Brans¹

THE ROYAL SOCIETY
PUBLISHING

SPERIMENTARE A CONFRONTO PESTICIDI CHIMICI, BIOLOGICI, NUOVI FORMULATI dsRNA e OGM RESISTENTI

CON QUESTA IMPOSTAZIONE, APPLICARE LA 2001/18 PER VALUTARE RISCHI E BENEFICI DI PIANTE OGM RESISTENTI



CREARE UNA RETE DI RICERCA SULLA VALUTAZIONE DEI RISCHI E DEI BENEFICI OGM IN CAMPO APERTO



Per la sperimentazione in campo
serve la notifica

FRAGOLA

VITE

POSSIBILMENTE CON FONDI PUBBLICI

Per la sperimentazione in ambiente
controllato basta comunicare



I CAMPI SPERIMENTALI SONO FONDAMENTALI: COMUNICAZIONE



Controllo

-

OGM



Controllo

-

OGM

MOSTRARE I CAMPO E I PRODOTTI
CONTROLLO NON OGM A CONFRONTO CON LE LINEE OGM
DI FATTO UNA PROVA VARIETALE



Proposte per azioni:

- Unione tra **SCIENZA, PRODUZIONE e POLITICA** per affrontare in modo appropriato ed efficiente le emergenze climatiche e sanitarie. Non bisogna avere paura a dire che **si fanno OGM e che sono TUTTI OGM.**
- Comunicazione su **BASE SCIENTIFICA INATTACCABILE** per guadagnare consenso. E' impossibile raggiungere l'unanimità – **basta la maggioranza** – *lavorando sul biotech è una vita che sono in minoranza*
- E' vero le biotecnologie sono in mano alle multinazionali ma per le commodities (mais, soia,...), c'è ancora spazio per la ricerca pubblica e per le piccole imprese interessate ad applicare le biotecnologie per risolvere emergenze nelle piante ortofrutticole. **Il blocco dal mondo 'biologico' favorisce le multinazionali e blocca la ricerca a livello locale.**
- Solo superando questi sbarramenti si può pensare di usare le biotecnologie per trovare soluzioni utili a ridurre l'impatto delle emergenze che distruggono le nostre produzioni.
- La tecnologia RNAi offre la doppia possibilità di ottenere **nuovi prodotti/formulati per la difesa e piante resistenti.**
- **Servono aziende pronte a produrre nuovi formulati dsRNA**
- E' fondamentale estendere la discussione a diversi livelli istituzionali, sulle procedure da seguire per **garantire l'immediata sperimentazione in ambiente controllato e campo** di nuove piante RNAi/Gene Editing resistenti.
- L'applicazione della 2001/18 può essere solo di aiuto per dimostrare i benefici, anche per le coltivazioni biologiche, e l'assenza di rischio.
- **È FONDAMENTALE CHE GLI IMPRENDITORI AGRICOLI E TUTTI I CITTADINI POSSANO VEDERE E «TOCCARE MANO» I RISULTATI DELLA RICERCA**





ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA
APLICADA DEL SEGURO



GHENT
UNIVERSITY



C.I.V.V. Ampelos
Consorzio Italiano
Vivaisti Viticoli



INTERNATIONAL AND NATIONAL PROJECTS



Med-Berry PRIMA Project: Developing new strategies to protect strawberry crop in Mediterranean countries.



BREEDINGVALUE: Pre-breeding strategies for obtaining new resilient and added value berries



GOODBERRY: Improving the stability of high-quality traits of berry in different environments and cultivation systems for the benefit of European farmers and consumers



iPLANTA: Modifying plants to produce interfering RNA. OC-2015-2-20281

iPlanta



MIUR-PRIN2017: Small RNAs and peptides for controlling diseases and development in horticultural plants 20173LBZM2,



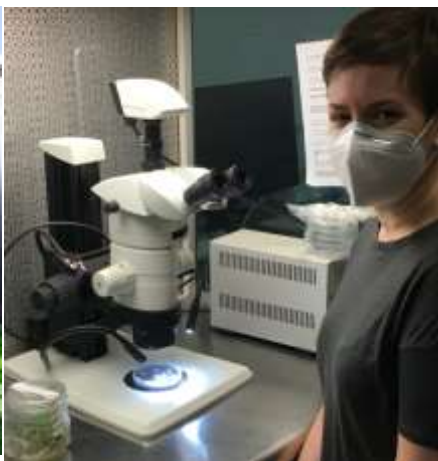


D3A – UPM RESEARCH GROUP

Prof. Bruno Mezzetti
Prof. Franco Capocasa
supervisors



Silvia Sabbadini
Researcher



Luca Capriotti
Research Grant



Angela Ricci
Research Grant



Luca Mazzone Researcher,
Micol Marcellini, Research Grant,
Francesca Balducci, technician



Giammarco Giovannetti
PhD student



Valeria Pergolotti
PhD student



Rohullah Quaderi
PhD student



Lucia Regolo
PhD student



Davide Raffaelli
PhD student



Irene Piunti
Research grant

