

# Editing genomico il salto quantico del breeding della vite

I primi cloni ottenuti attraverso la tecnologia CRISPR/Cas sono dietro l'angolo. Il nostro Paese deve poter giocare un ruolo di primo piano per salvaguardare la competitività dei suoi vitigni di eccellenza

di Sara Zenoni, Annalisa Polverari,  
Giovanni Battista Tornielli e Mario  
Pezzotti

Dipartimento di Biotecnologie Università di  
Verona e EDITIVE

Il trasferimento tecnologico consiste nel rendere disponibile e applicabile una scoperta scientifica. Si tratta di un processo a volte difficile e non sempre prevedibile, soprattutto in termini temporali. Non è questo il caso per l'editing genomico, che rappresenta un recente

esempio di trasferimento tecnologico di enorme successo.

## La scoperta delle "forbici" molecolari

Nel 2012 **Emmanuelle Charpentier** e **Jennifer Doudna**, sfruttando il modo in cui i batteri si difendono dai virus hanno messo a punto delle vere proprie "forbici molecolari" in grado di tagliare il DNA in punti precisi. Da questa scoperta si è poi sviluppata la tecnologia chiamata CRISPR/Cas 9, considerata ormai fondamentale per l'indagine biologica e per l'applicazione immediata in molteplici settori, tra cui l'agricoltura. La grande potenzialità di questa tecnica, ormai divenuta familiare anche ai non addetti ai lavori, ha motivato il meritato premio Nobel per la Chimica 2020 alle due scienziate. CRISPR/Cas offre possibilità straordinarie e sta già aprendo la strada ad innumerevoli applicazioni. Un vero e proprio salto quantico della gene-

## LA TECNOLOGIA CRISPR/ CAS 9

La tecnologia CRISPR/Cas si avvale di un enzima, generalmente la nucleasi Cas9 che, opportunamente guidata, è in grado di tagliare il "DNA bersaglio" in un punto preciso. In questo punto il DNA potrà essere riparato da meccanismi naturali della cellula generando piccole inserzioni/delezioni di qualche base nucleotidica, oppure potrà essere riscritto e corretto con precisione modificando alcune basi della sequenza del gene, a seconda della strategia di mutazione prescelta (Fig.1). Nel primo caso avremo come effetto la "disattivazione" del gene bersaglio, mentre nel secondo caso, a seconda dell'obiettivo finale, potremmo ottenere ugualmente una disattivazione o invece una variante più efficace del gene stesso. In entrambi i casi è quindi possibile "riscrivere" l'informazione genetica senza introduzione di DNA estraneo. Infine, un'ulteriore recente evoluzione della tecnologia CRISPR/Cas permette di modificare in maniera mirata la struttura chimica di una base nucleotidica senza neanche tagliare il DNA.





tica, che investe molti campi del sapere ed avrà importanti ricadute anche in ambito agricolo.

### Si apre l'era delle “Tecniche di evoluzione assistita”

La Società Italiana di Genetica Agraria ha definito gli impieghi delle forbici molecolari come “tecniche di evoluzione assistita (TEA)”, perché consentono di far evolvere piante e animali di interesse agrario precisamente nella direzione voluta dall'uomo e con tempi estremamente più rapidi rispetto al miglioramento genetico tradizionale.

La nascita della genomica all'inizio del XXI secolo e lo sviluppo di metodologie potenti di sequenziamento hanno resi disponibili innumerevoli genomi di virus, microrganismi e organismi superiori, compresi quelli di molte piante agrarie.

Ma una volta decodificati i genomi, è necessario interpretare le infor-

### FAR EVOLVERE LE PIANTE NELLA DIREZIONE VOLUTA DALL'UOMO

mazioni in essi contenute, cioè assegnare a ciascun gene la sua funzione, definire la sua regolazione e comprendere la relazione biologica che lo lega al carattere di interesse. Per attribuire funzioni ai geni, si studiano le mutazioni spontanee o si inducono mutazioni casuali tramite trattamenti chimici o fisici. La mutazione infatti ci permette di associare ad un cambiamento genetico un certo effetto fenotipico e ci dice che il gene mutato controlla un determinato carattere. Oggi non dobbiamo più affidarci al caso, ma possiamo finalmente produrre mutazioni mirate utilizzando le forbici molecolari CRISPR/Cas che operano con estrema precisione su una o po-

che basi, tra i milioni o miliardi di basi di cui sono costituiti i genomi. Le modifiche sono identiche e indistinguibili rispetto a quelle spontanee, ma generano biodiversità in tempi enormemente più veloci e in modo estremamente più preciso rispetto alla casualità dei trattamenti mutageni (si veda nel primo riquadro).

### Le criticità della viticoltura

La viticoltura soffre da tempo di alcune criticità di rilevante impatto. Numerosi caratteri di adattamento e resilienza, mancanti nelle nostre migliori varietà coltivate, necessitano urgentemente di interventi genetici, se l'Italia non vuole perdere il primato di qualità e tipicità che la caratterizza in questo settore. *In primis*, il problema della elevata suscettibilità alle crittogame dei vitigni di maggiore interesse economico e l'alto impatto ambientale della di-

## EDITARE LA VITE

Le forbici molecolari operano direttamente sul DNA contenuto nel nucleo all'interno delle cellule, ed è quindi necessario veicolarle là dove devono andare ad agire. Le cellule vegetali sono racchiuse e protette all'interno di una barriera rigida, la parete cellulare, che deve quindi essere rimossa. Una cellula privata temporaneamente di parete dà luogo ad un protoplasto, circondato solo da membrana plasmatica, sufficientemente sottile da poter essere attraversata dal complesso CRISPR/Cas che effettua l'editing genomico sul gene o i geni bersaglio. Dal protoplasto è possibile poi rigenerare per embriogenesi somatica l'intera pianta (Fig. 2), del tutto identica a quella da cui sono stati isolati i protoplasti. In altre parole si tratterà di un clone della pianta di partenza, portante la modifica genetica desiderata. Nella vite, il processo di isolamento dei protoplasti richiede la messa a punto di protocolli sperimentali adattati e specifici per ogni varietà, per preservare la vitalità della cellula ed una efficiente capacità rigenerativa.

fesa fitosanitaria dei vigneti. Ma certamente molto rilevanti sono anche i caratteri di fertilità, di produttività, di precocità, di qualità, e la loro stabilità nel contesto del cambiamento climatico, in un mercato mondiale sempre più competitivo.

Per decenni l'innovazione genetica in viticoltura non si è spinta oltre l'adozione di mutazioni spontanee o il recupero di qualche vitigno autotono abbandonato.

Ma ciò che è stato selezionato per le esigenze del passato non risponde più alle domande del mercato e della viticoltura del futuro.

La riflessione sui metodi che oggi possono essere adottati per porvi rimedio, è attualmente al centro del dibattito tra difensori della tradizione e sostenitori dell'innovazione.

### Il limite intrinseco dell'incrocio

L'ottenimento di vitigni resistenti ad alcune importanti malattie della vite, ha rappresentato un primo

importante passaggio culturale e scientifico di innovazione in viticoltura, ottenuto grazie ad un intenso lavoro di incrocio e selezione, iniziato a partire dal XIX secolo e proseguito con strumenti più moderni fino alla tanto attesa iscrizione al Registro Nazionale di nuove varietà di *Vitis vinifera*, finalmente disponibili in commercio, che integrano in pedigree complessi varie fonti di resistenza provenienti da progenitori selvatici, ma anche caratteristiche qualitative decisamente superiori a quelle dei vecchi ibridi interspecifici. Il miglioramento genetico per incrocio ha però un limite intrinseco, cioè l'impossibilità di riprendere pienamente le caratteristiche qualitative del genitore pregiato. Le varietà resistenti sono nuove e diverse da quelle che ancora oggi sono maggiormente richieste per la produzione di vini di qualità.

Tuttavia, i nuovi vitigni hanno comunque risvegliato l'interesse del mondo produttivo per le novità va-



Fig. 1 - Le "forbici" molecolari del CRISPR/Cas in azione sul DNA bersaglio



## CON IL CRISPR/CAS, IL SALTO DI QUALITÀ DEL BREEDING DI PRECISIONE

rietali, aprendo il mercato al rinnovamento, con l'intenzione di coniugare qualità del vino e sostenibilità ambientale, ed hanno anche aperto il dibattito sull'opportunità di andare oltre, applicando le più recenti biotecnologie al miglioramento dei vitigni tradizionali italiani.

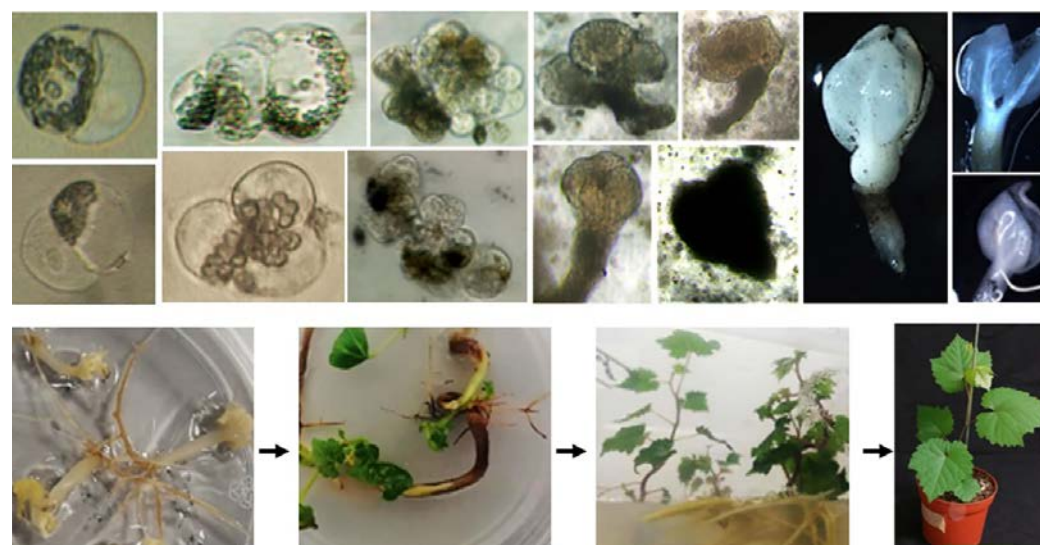
### Obiettivo resistenza

Tra queste biotecnologie menzioniamo ad esempio la cisgenesi che consente di trasferire geni provenienti da specie selvatiche sessualmente compatibili, nelle loro condizioni "native", così come avverrebbe con l'incrocio, senza le lungaggini degli incroci e reincroci e mantenendo l'assetto genetico della varietà di partenza.

Ma il salto di qualità dirompente è arrivato con l'editing genomico attraverso la tecnologia CRISPR/Cas. In questo caso la struttura genetica del vitigno di pregio non viene in nessun modo modificata, poiché si interviene chirurgicamente solo sul gene desiderato.

Le potenziali applicazioni in viticoltura sono moltissime e riguardano soprattutto la resistenza a malattie, ma anche caratteri di qualità e di resilienza al cambiamento climatico, una volta che i geni responsabili di certi caratteri siano stati identificati e studiati a fondo.

Un esempio spesso riportato è quello del gene *MLO* di orzo, che se disattivato conferisce resistenza all'oidio dell'orzo. La stessa modifica, artificialmente indotta in altre specie, compresa la vite, conferisce ugualmente resistenza ai rispettivi agenti di oidio. *MLO* è quindi un co-



siddetto "gene di suscettibilità" per un'importante malattia. Altre informazioni fondamentali per la ricerca dei geni da mutare, derivano dagli studi avanzati di espressione genica, che forniscono una panoramica dei geni "accesi" ad esempio durante un'infezione o durante una fase fenologica della vite, e ci indicano i geni "candidati" più probabilmente responsabili di un carattere e fra questi i candidati da mutare con le forbici molecolari.

### Modulare i geni

Con l'editing genomico è anche possibile pensare di modulare l'espressione dei geni senza disattivarli, e ottenere fenotipi con livelli differenti di manifestazione del carattere. Per questo la ricerca di base sulla funzione e la regolazione di ciascun gene in ogni determinato momento o condizione nella vita della pianta, rimane essenziale prerequisito.

Nel caso della vite, l'applicazione dell'editing genomico richiede un ulteriore passaggio delicato che riguarda il metodo con cui il complesso CRISPR/Cas viene veicolato all'interno delle cellule. Per ciascuna varietà questo processo deve essere ottimizzato, attraverso la

messa a punto di protocolli di rigenerazione delle piante editate (vedi nel secondo riquadro). Il risultato finale sarà una pianta identica al vitigno di partenza con l'aggiunta di un carattere desiderato.

### Nuovi cloni editati

A partire dal 1 dicembre 2020 presso il laboratorio di Genetica Agraria dell'Università di Verona opererà lo spin-off universitario EDIVITE che avrà appunto l'obiettivo di realizzare nuovi cloni editati di varietà coltivate di vite. Questo impegno si inserisce in un'imponente ondata di ricerca che si sta alzando in tutto il mondo, con applicazioni di CRISPR/Cas nei campi più diversi della biologia. È importante che l'Europa non perda questo treno a causa di legislazioni obsolete e miopi. È prevedibile che nei prossimi 5 anni inizino ad apparire numerose varietà editate di diverse specie vegetali, ma nel caso della vite sarà la tradizione a supportare l'innovazione, perché la grande ricchezza e peculiarità del panorama ampelografico italiano, che il CRISPR/Cas aiuta a preservare, non ha competitori al mondo e rimane il punto di forza della viticoltura nazionale.

**Fig. 2 -  
Embriogenesi  
somatica della  
vite a partire da  
protoplasti**