



Dipartimento di Scienze Agrarie
Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**Nuovi sviluppi del miglioramento
genetico delle piante da frutto
con le biotecnologie alternative
*I casi melo e vite***

Silviero Sansavini

Luca Dondini

Bolzano, 15 settembre 2016

XI GIORNATE SCIENTIFICHE SOI 2016 – 14 – 16 settembre 2016



Miglioramento genetico dei fruttiferi e biotecnologie alternative

I casi melo e vite

1. Stato dell'arte sulle nuove varietà
2. Breeding: scopi, programmi, metodi
3. Genomica e selezione assistita
4. Biotech e trasformazioni alternative



LA RIVOLUZIONE VERDE IN FRUTTIVITICOLTURA

1. Secolo XX: 50% del merito: Genetica e miglioramento nuove varietà
50% del merito: Agronomia e tecniche gestione frutteti/vigneti

2. Secolo XXI: Nuova Rivoluzione Verde (cambiano gli obiettivi)
Confronto fra Scienza e Tecnologia

- a) Genetica + biotecnologie + informatica (resistenze e qualità)
- b) Nuove tecnologie eco-compatibili:
Sostenibilità ecosistemi produttivi intensivi (es. agricoltura di precisione, agricoltura biologica, agricoltura integrata naturale)



BREEDING

1. Vie convenzionali

a) Mutazioni gemmarie

- Selezione massale
- Selezione clonale (pressione selettiva)

Varietà policlonali

b) Ibridazione ed incrocio

- Selezione fenotipica
- Selezione assistita precoce (MAS)

Marcatori biochimici

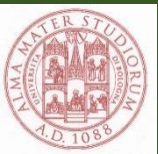
Marcatori molecolari

c) Selezione genetico sanitaria

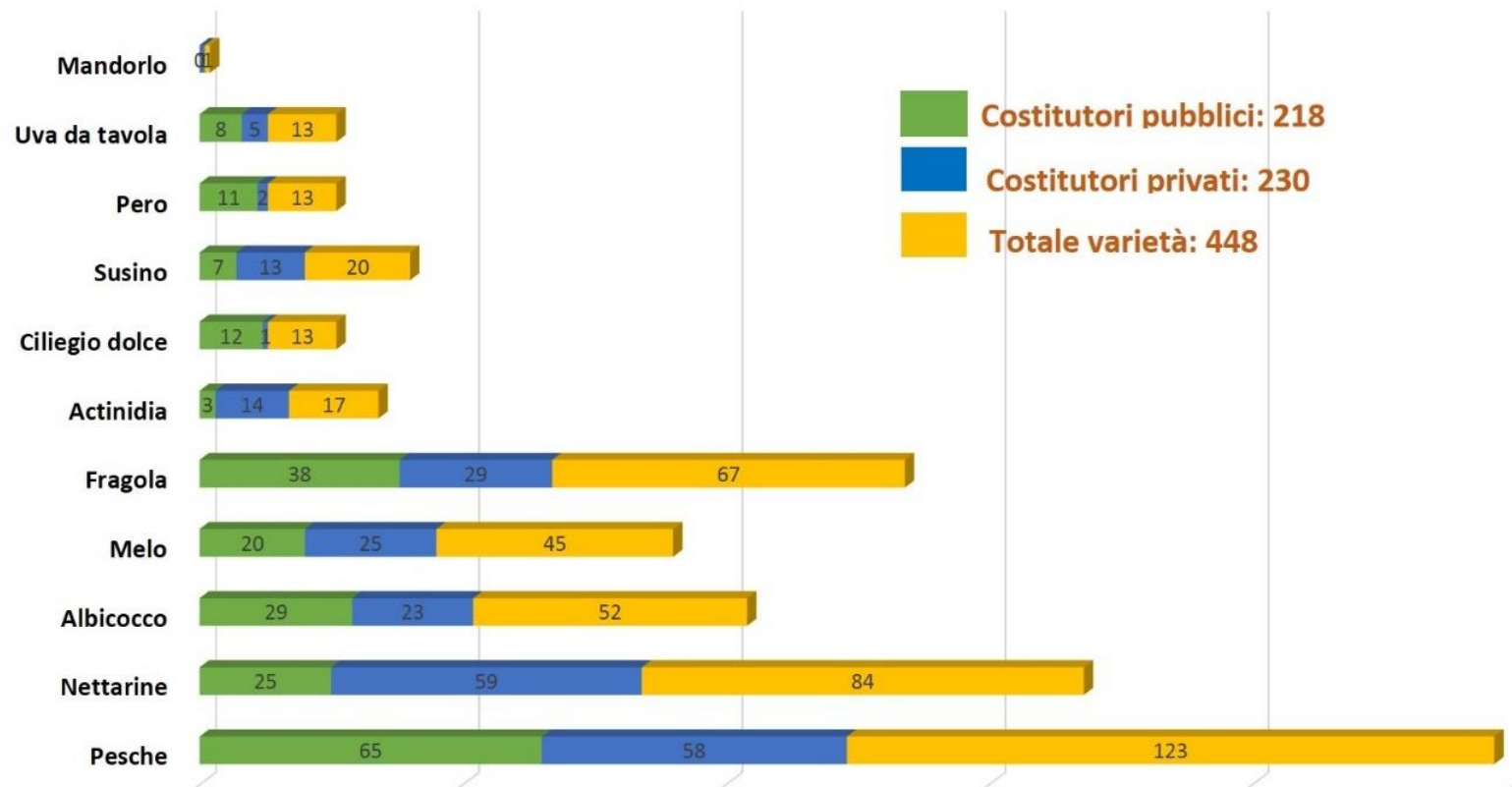
Registrazione e certificazione

2. Vie biotecnologiche alternative (ingegneria genetica)

- a) Cisgenesi
- b) Genoma editing
- c) Silenziamento genico
- d) OGM convenzionale: introgressione costruito genico (Meli e viti OGM)



OLTRE 500 VARIETA' DI FRUTTIFERI COSTITUITE IN ITALIA NEGLI ULTIMI 25 ANNI



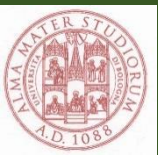
PRIVATIVE COMUNITARIE DELLE VARIETA' DA FRUTTO

Concesse a costitutori italiani dal CPVO (Angers) dal 1992 al 2015

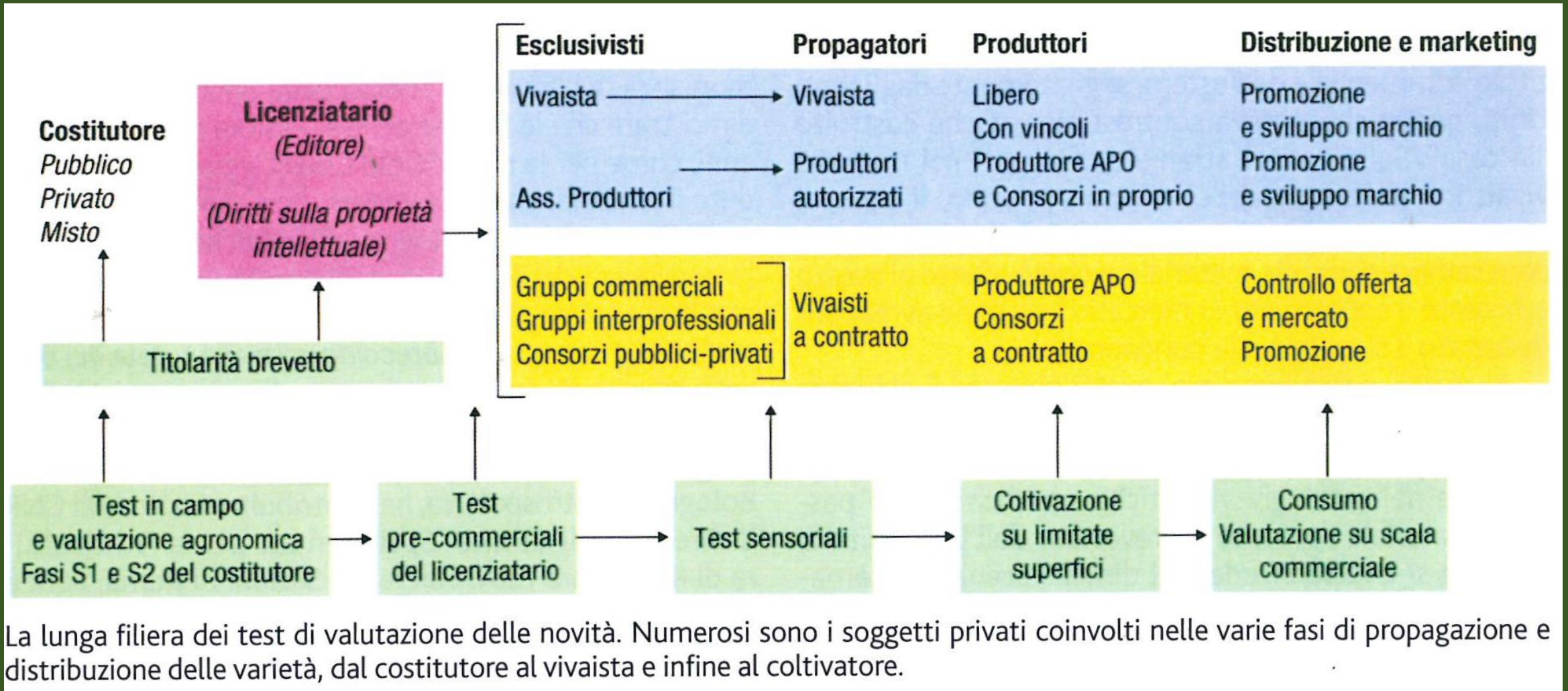
Varietà	
Mele	67
Pesche	139
Susine	16
Albicocche	13
Agrumi	9
	244

Portinnesti	
Pero	10
Melo	4
Pesco/albicocco	9
	23

Privative valide	1.433
Privative terminate	404
Privative ritirate	326
Domande rifiutate	97



LA FILIERA DI DIFFUSIONE DELLE VARIETA'





INCROCI ED IBRIDAZIONE NELLA VITE

SCOPI ED ESEMPI

1. Introdurre resistenze ad avversità biotiche e abiotiche
2. Migliorare caratteristiche qualitative uve
3. Estendere eccellenze qualità dei vini
 - a. Creazione nuovi portinnesti
 - b. Creazione nuovi vitigni (già ibridi produttivi diretti)



VITE: Principali varietà policlonali

Vitigni policlonali

Barbera	33
Garganega	15
Glera	14
Greco	6
Lambrusco	4+4+n
Sorbara	4
Grasparossa	4
Malvasia bianca I.	7
Montepulciano	23
Moscato bianco	19
Nebbiolo	43
Negro amaro	13

Picolit	5
Pigoletto	4
Primitivo	5
Raboso Piave	6
Refosco p.r.	10
Riesling It.	5
Sangiovese	113
Tocai friulano	16
Trebbiano toscano	22
Verdicchio	13
Vermentino	20
Vernaccia S.G.	11
Totale	421

Vitis vinifera



Merlese, incrocio Sangiovese x Merlot (Università di Bologna, CRIVE)



Nuovi vitigni FEM-IASMA, San Michele all'Adige

Vitigni tolleranti alla botrite iscritti al Registro nazionale delle varietà di vite

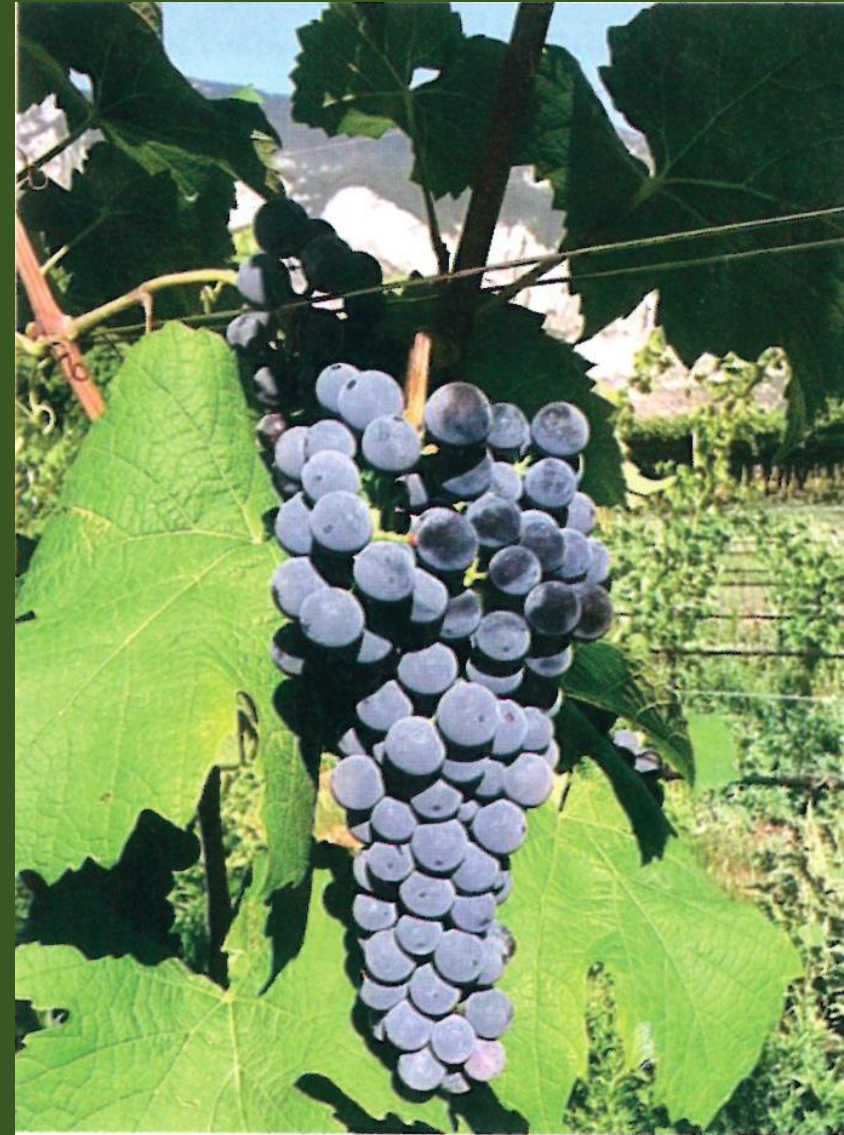
Nomi vitigni	Combinazione	
IASMA ECO 1; IASMA ECO 2	Teroldego	Lagrein
IASMA ECO 3; IASMA ECO 4	Moscato Ottonel	Malvasia bianca aromatica di Candia



Nuovi vitigni FEM-IASMA, San Michele all'Adige



Trebbiano t. × Müller Thurgau



Merzling × Teroldego

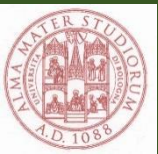
Alcuni geni di resistenza a peronospora e oidio identificati in vite e utilizzati nel mondo

Patogeno	Gene	Cromosoma	Fonte	Riferimento
Peronospora	<i>Rpv1 (b)</i>	12	<i>M. rotundifolia</i>	Blanc <i>et al</i> 2012
	<i>Rpv2</i>	18	<i>M. rotundifolia</i>	Blanc <i>et al</i> 2012
	<i>Rpv3</i>	18	<i>V. rupestris (a)</i>	Di Gaspero <i>et al</i> 2011
	<i>Rpv8</i>	14	<i>V. amurensis</i>	Blasi <i>et al</i> 2011
	<i>Rpv10</i>	9	<i>V. amurensis</i>	Schwander <i>et al</i> 2011
	<i>Rpv12</i>	14	<i>V. amurensis</i>	Venuti <i>et al</i> 2013
Oidio	<i>Run1 (b)</i>	12	<i>M. rotundifolia</i>	Pauquet <i>et al</i> 2001
	<i>Run2</i>	18	<i>M. rotundifolia</i>	Riaz <i>et al</i> 2011
	<i>Ren1</i>	13	<i>V. vinifera</i>	Coleman <i>et al</i> 2011
	<i>Ren4</i>	18	<i>V. rotundifolia</i>	Mahanil <i>et al</i> 2011
	<i>Ren5</i>	14	<i>M. rotundifolia</i>	Blanc <i>et al</i> 2012

(a) *Rpv3* è una regione del cromosoma 18 non ancora risolta. Contiene probabilmente un cluster di geni di resistenza che possono avere avuto origine anche da specie diverse da *V. rupestris*, come *V. riparia*, *V. lincecumii* e *V. labrusca* (Di Gaspero *et al* 2012).

(b) I geni *Rpv1* e *Run1* provenienti da *Muscadinia rotundifolia* sono associati sullo stesso cromosoma e vengono ereditati assieme nelle progenie di incrocio.

**Programmi di ibridazione per geni di resistenza –
Università di Udine e IGA di Udine**





Viti ibride Italiane (2015)

Nuove varietà di vite resistenti a peronospora e oidio ⁽¹⁾

Varietà	Codice Incrocio	Anno Incrocio	Pedigree	Peronospora		Oidio ⁽³⁾
				Rpv3 ⁽²⁾	Rpv12 ⁽²⁾	
Bacca bianca						
Fleurtai	34.111	2002	Tocai friulano x 20/3	-	+	9
Soreli	34.113	2002	Tocai friulano x 20/3	+	+	9
Sauvignon Kretos	76.026	2003	Sauvignon x 20/3	-	+	5
Sauvignon Nepis	55.098	2002	Sauvignon x Bianca	+	-	9
Sauvignon Rytos	55.100	2002	Sauvignon x Bianca	+	-	9
Bacca rossa						
Cabernet Eidos	58.083	2002	Cab. Sauvignon x Bianca	+	-	9
Cabernet Volos	32.078	2002	Cab. Sauvignon x 20/3	-	+	5
Merlot Khorus	31.125	2002	Merlot x 20/3	-	+	7
Merlot Kanthus	31.122	2002	Merlot x 20/3	+	-	7
Julius	36.030	2002	Regent x 20/3	-	+	5

⁽¹⁾ Licenziate nel 2015 congiuntamente dall'Università di Udine e dall'Istituto di genomica applicata. ⁽²⁾ **Rpv3** e **Rpv12** sono due geni, che conferiscono entrambi resistenza a peronospora (- = assente, + = presente). ⁽³⁾ Per l'oidio la resistenza/suscettibilità è basata su osservazioni fenotipiche (scala da 1 a 9: 1 = sensibile, 9 = resistente)

Ottenute a IGA e Università di Udine



Impianto sperimentale di Cabernet Eidos fotografato poco prima della vendemmia

Udine, 2015

Un futuro senza peronospora e oidio?



**Viti ibride resistenti
(Università di Udine)**







Sensibile



Resistente

Nuovi portinnesti vite

Genealogia e principali caratteristiche dei portinnesti serie M				
Portin- nesto	Genotipo materno	Genotipo paterno	Caratteristiche	
M1	106/8 [<i>V. rip.</i> × (<i>V. cord.</i> × <i>V. rup.</i>)]	<i>V.</i> <i>berlandieri</i>	Resa all'innesto elevata Ridotto vigore Elevata resistenza alla clorosi ferrica Mediamente resistente alla salinità	
M2	Teleki 8B (<i>V. berl.</i> × <i>V. rip.</i>)	333 E.M. (<i>V. vin.</i> × <i>V. berl.</i>)	Resa all'innesto elevata Vigoria medio-alta Buona resistenza alla clorosi ferrica Buona resistenza alla salinità e allo stress idrico	
M3	R 27 (<i>V. berl.</i> × <i>V. rip.</i>)	Teleki 5C (<i>V. berl.</i> × <i>V. rip.</i>)	Resa all'innesto elevata Vigore ridotto Elevato assorbimento di potassio Bassa resistenza alla salinità Media resistenza alla siccità	
M4	41 B (<i>V. vin.</i> × <i>V. berl.</i>)	<i>V.</i> <i>berlandieri</i>	Resa all'innesto elevata Vigore medio Ottima resistenza alla siccità Elevata resistenza alla salinità	

Programma realizzato da Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali, Università di Milano
Nuovi portinnesti del Registro Nazionale (2015)



BREEDING

IBRIDAZIONE E INCROCIO

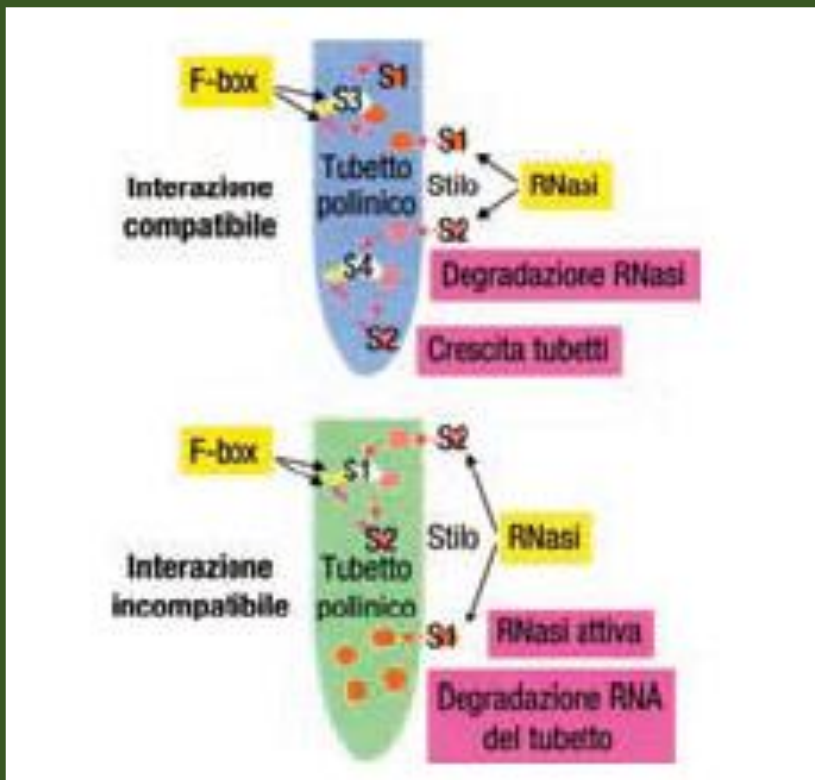
Il breeding convenzionale per la resistenza alle malattie, tanto nel melo quanto nella vite, non è rimasto fermo.

Le istituzioni pubbliche italiane hanno condotto programmi di ibridazioni interspecifiche, che hanno fatto compiere alla nostra melicoltura e viticoltura grandi salti di conoscenza e di acquisizione di materiale genetico coi seguenti obiettivi.

Obiettivi del breeding nel melo

Due obiettivi attuali:
Superare l'incompatibilità

**Indagine europea di 15
anni fa**



Qualità frutto	95%
Malattie e patogeni	92%
Adattamento climatico	30%
Conservazione e shelf life	25%
Variazione epoca raccolta	22%
Costanza produttiva	15%
Trasformazione industriale	15%

La polpa rossa





Miglioramento genetico del melo in Italia

Istituzioni pubbliche e private* italiane che hanno attivato programmi di MG del melo fra il 1971 e il 2016.

Enti	Numero incroci		Semenzali n°	Stadio moltiplicazione			Cv n° (1)
	Totale	Per anno		S1	S2	S3	
				N° selezioni			
AGRION CN	196	12	184.000	186	32	--	--
CIV FE	278	12	273.000	328	102	18	10
CREA FO	991	29	74.000	550	45	3	3
CSAF BZ	300	20	50.000	120	20	4	1
DCA BO	529	23	48.200	144	256	5	8
ISF TN (cessato)	824	48	51.000	409	16	4	11
FEM IASMA TN	405	68	140.000	12.000	280	30	2
UNIUD - IGA	120	-	8.048	1.993	-	-	-
Totale	3.643	212	728.248	15.730	751	64	39

(1) Numero di varietà licenziate nel periodo 1971/2016.

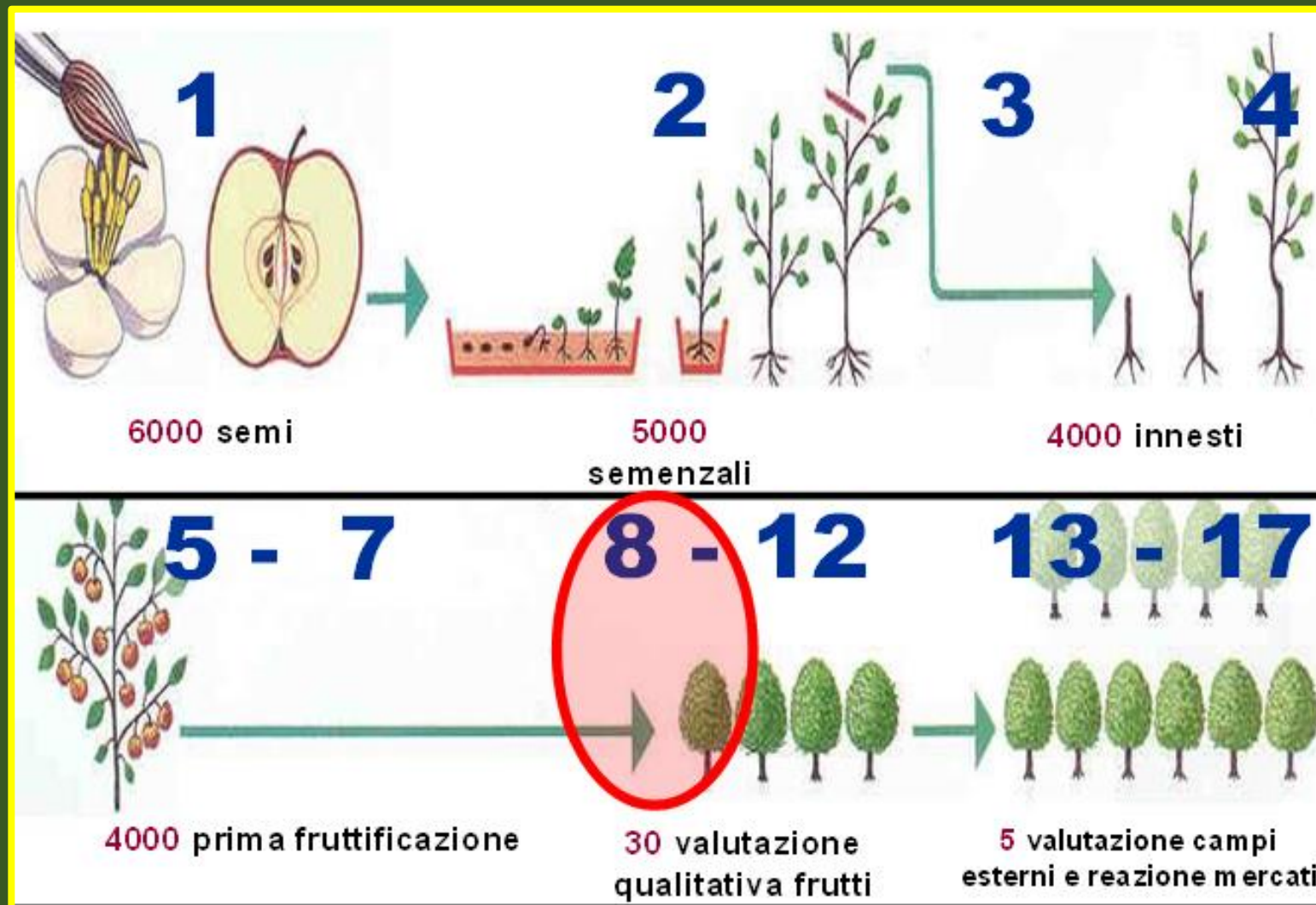
*Fra le istituzioni private che hanno sviluppato programmi di *breeding* melo sono da annoverare la Soc. Griba di Terlano, la Fondazione Fojanini di Sondrio e la Soc. Feno di Bolzano. Di queste non sono stati resi noti dati specifici sul *breeding*

Acronimi:

CREA, già Istituto Sperimentale Frutticoltura, Sez. Forlì
 ISF TN, già Istituto Sperimentale Frutticoltura, Sez. Pergine, Trento (cessato)
 DCA BO = Dipartimento di Colture Arboree, ora Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Bologna
 CIV FE = Consorzio Italiano Vivaisti, Ferrara

AGRION CN = già CRESO, Fondazione per la ricerca, l'innovazione e lo sviluppo tecnologico dell'agricoltura piemontese, Manta, Cuneo
 CSAF BZ = Centro Sperimentale Agrario Forestale, Laimburg, Bolzano
 FEM IASMA TN = Fondazione E. Mach, già Istituto Sperimentale Agrario, San Michele all'Adige, Trento
 UNIUD = Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Udine
 IGA = Istituto Genomica Applicata, Udine

Schema delle fasi e lunghezza (n° anni) della selezione per nuove varietà di melo



(Da W. Guerra, 2012)

Nuove mele italiane



Gold Chief



Golden Orange



Modì



Rubens



Forlady



Fujion



Majestic



Isaaq

Nuove mele diffuse in esclusiva in Italia (a Club o a contratto), al 2016

Varietà Club		Resistente
Ambrosia [®]	Ambrosia	
Antarès [®]	Dalinbel	
Cameo [®] /Camela [®]	Caudle/Cauflight	
Choupette [®]	Dalinette	TR
Crimson Snow [®]	MC38	
Diwa [®] /Junami [®]	Milwa	
Envy [®]	Scilate	
Evelina [®]	RoHo3615	
Galant [®]	Lumaga	TR
Greenstar [®]	Nicogreen	
Honeycrunch [®]	Honeycrisp	
Isaaq [®]	CIV323	TR
Jazz [®]	Scifresh	
Joya [®]	Cripps Red	
Juliet [®]	Coop43	TR
Kanzi [®]	Nicoter	

Les Naturianes [®]	Ariane	TR
Lola [®]	Maribelle	
Modi [®]	CIVG198	TR
Natyra [®]	SQ159	TR
Opal [®]	UEB32642	TR
Pink Lady [®]	Cripps Pink/ Rosy Glow	
Redlove [®]	Luresweet	TR
Rockit [®]	PremA96	TR
Rubens [®]	Civni/Civnered	
SweeTango [®]	Minneiska	
Tentation [®]	Delblush	
	Belgica	
	Bonita	
Varietà libere		
Story [®]	Inored	TR
	Fujion	TR
	Gemini	TR
	Gaia	TR
	Smeralda	TR

[®] Marchio registrato



Principali varietà policlonali in Italia (2016)

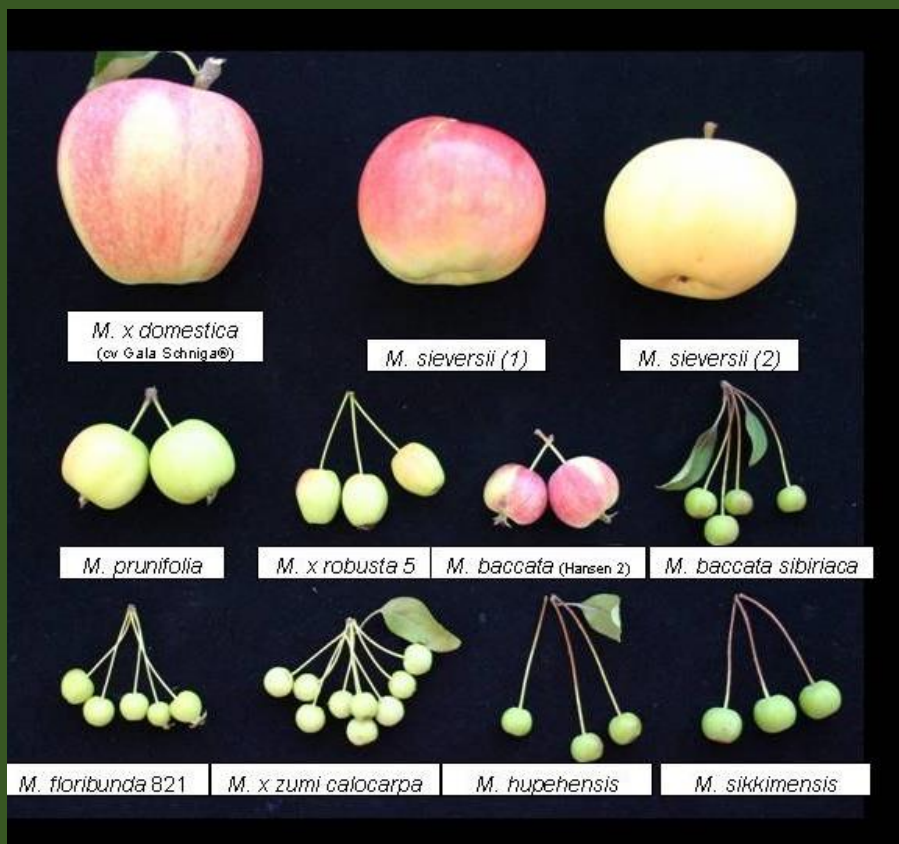


Gruppi varietali	Cloni brevettati
Gruppo	Varietà o selezione
GALA (Cloni):	Annaglo
	Baigent Brookfield Gala®
	Devil Gala
	Fendeca
	Fengal
	Gala 2013 DarkBaron®
	Gala Perathoner Redlum®
	Gala SchniCo Schniga®
	Gala Schnitzer Schniga®
	Gala Schnico Red
	Galafab Galastar®
	Galaval
	Gala Vill
	Bigigalaprim Jugala
	Gala Norge
	Royal Beaut
	Simmons Buckeye®
Cripps Pink (cloni)	Cripps Pink
	Rosy Glow
	Sekzie

FUJI (Cloni):	Aztec Fuji Zhen®
	Fuji Fubrax* Kiku®
	Fuciv181 Ko-Civ®
	Fuciv52 San-Civ®
	VW King Fuji®
	ROFM 811 RubinFuji®
GOLDEN DELICIOUS (Cloni):	Golden Delicious cl. B
	Golden Parsi da rosa®
	Golden Reinders®
	Golden 1895 mema®
BRAEBURN (Cloni):	Mariri Red Aporo®
	Royal Braeburn
PINOVA (Cloni):	Roho3615 Evelina®
STAYMAN (Cloni):	Stayman Lb® 78/1
	Superstayman
RED DELICIOUS (Cloni):	Roat King®
	Jeromine
	Mestar mema®
	Valtod Red Cap®
	Sandidge Superchief®
	Stark Guggler RedVelox®

® Marchio
registrato

Specie di melo ornamentali e selvatiche quali fonti di geni di resistenza a ticchiolatura



<i>Malus</i>					<i>Venturia inaequalis</i>			
Differential host			Resistance locus		Avirulence locus			
Number	Accession	Phenotype	Historical	LG ^a	New	New	Old	Race
h(0)	Royal Gala	susceptibility			–	–		(0)
h(1)	Golden Delicious	necrosis	Vg	12	Rvi1	AvrRvi1		(1)
h(2)	TSR34T15	stellate necrosis	Vh2	02	Rvi2	AvrRvi2	p-9	(2)
h(3)	Geneva ^b	stellate necrosis	Vh3	04	Rvi3	AvrRvi3 ^d	p-10	(3)
h(4)	TSR33T239	hypersensitive response	Vh4 = Vx = Vr1	02	Rvi4	AvrRvi4 ^d		(4)
h(5)	9-AR2T196	hypersensitive response	Vm	17	Rvi5	AvrRvi5		(5)
h(6)	Priscilla	chlorosis	Vf	01	Rvi6	AvrRvi6		(6)
h(7)	<i>Malus x floribunda</i> 821 ^b	hypersensitive response	Vfh	08	Rvi7	AvrRvi7		(7)
h(8)	B45	stellate necrosis	Vh8	02	Rvi8	AvrRvi8		(8)
h(9)	K2	stellate necrosis	Vdg	02	Rvi9	AvrRvi9	p-8	(9)
h(10)	A723–6 ^b	hypersensitive response	Va	01 ^c	Rvi10	AvrRvi10 ^d		(10)
h(11)	A722–7	stellate necrosis/chlorosis	Vbj	02	Rvi11	AvrRvi11 ^d		(11)
h(12)	Hansen's baccata #2 ^b	chlorosis	Vb	12	Rvi12	AvrRvi12 ^d		(12)
h(13)	Durello di Forlì	stellate necrosis	Vd	10	Rvi13	AvrRvi13 ^d		(13)
h(14)	Dülmener Rosenapfel ^b	chlorosis	Vdr1	06	Rvi14	AvrRvi14 ^d		(14)
h(15)	GMAL2473	hypersensitive response	Vr2	02	Rvi15	AvrRvi15 ^d		(15)
h(16)	MIS op 93.051 G07–098 ^b	hypersensitive response	Vmis	03	Rvi16	AvrRvi16 ^d		(16)
h(17)	Antonovka APF22 ^b	chlorosis	Va1	01	Rvi17	AvrRvi17 ^d		(17)

^aLG = linkage group of apple.
^bTemporary differential host until the host has been confirmed as being monogenic, or a monogenic progeny from this polygenic host has been selected.
^cProvisional placement based on the assumption that the resistance in sources PI 172823 and PI 172833 are identical.
^dGene-for-gene relationship not confirmed to date.

Biotecnologie nel Miglioramento genetico dei fruttiferi

(Genomica e Ingegneria Genetica)

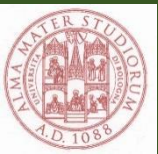
A. Marker Assisted Selection (MAS)

B. Trasformazione genetica

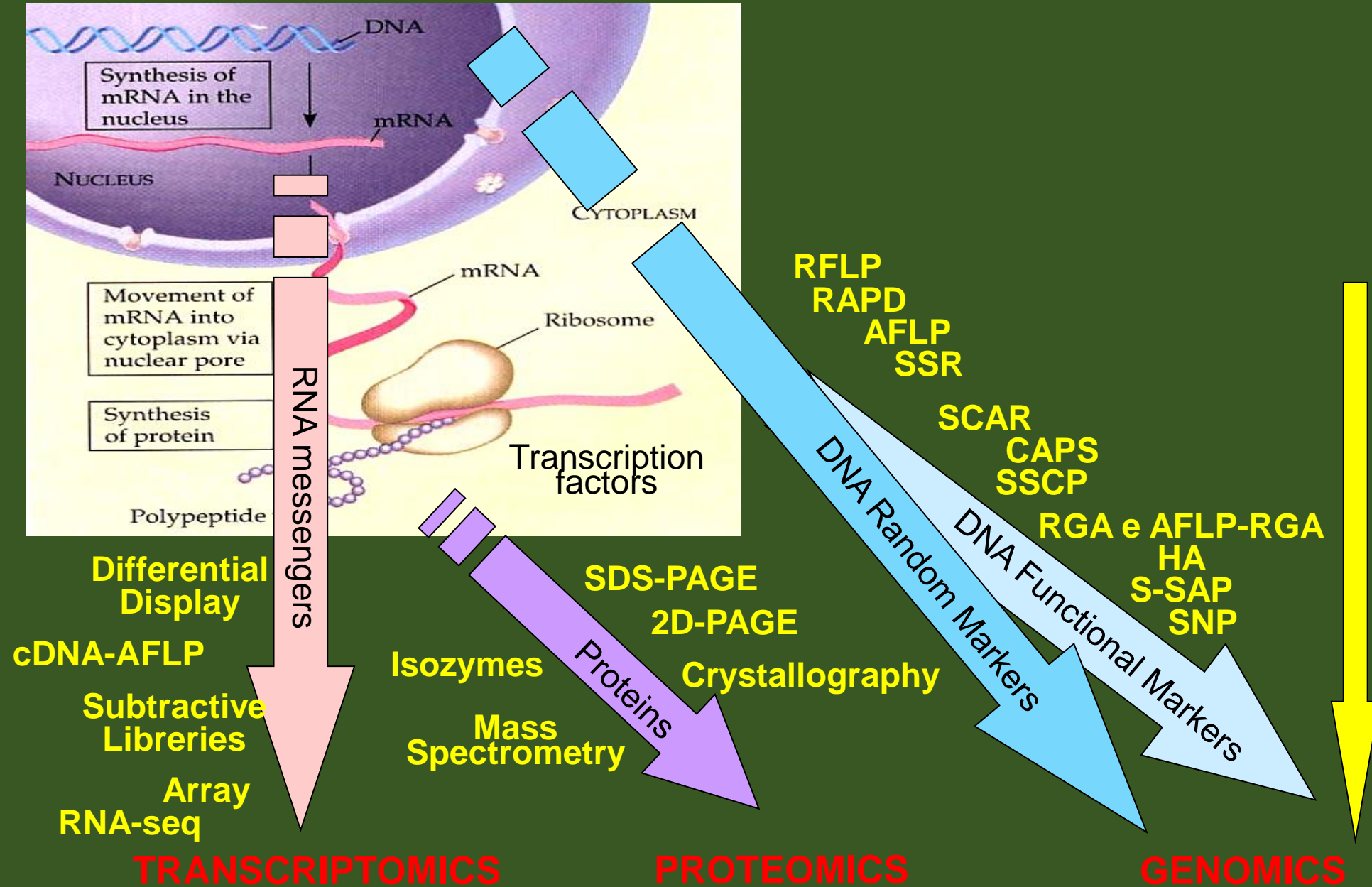
- Trasferimento di geni utili
- Silenziamento genico

C. Nuove tecniche per nuove strategie di breeding (NBT)

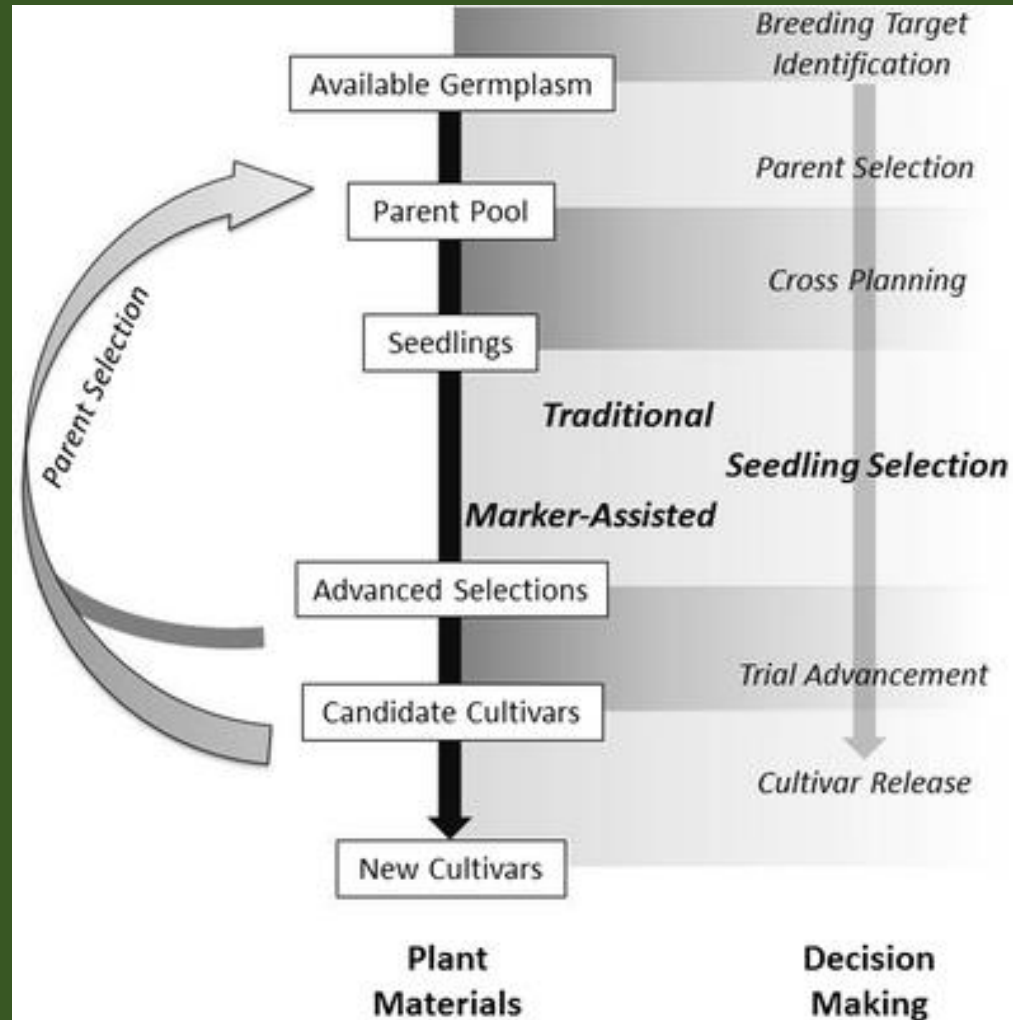
- Piante cisgeniche
- DNA editing
- Fast breeding
- Uso di portinnesti trasformati



Dai marcatori molecolari alla selezione assistita e al sequenziamento genomico



Marker Assisted Selection nelle specie arboree da frutto



Resistenza a patogeni

Autoincompatibilità

Caratteristiche del frutto:

Durezza e conservabilità

Dimensione

Acidità

Colore della buccia e della polpa



Esempi nell'uso della MAS in piante arboree da frutto con vari marcatori

Reported examples of MASS application in Rosaceae tree fruit breeding

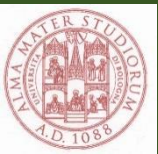
Oggetto MAS	Plant materials	Gene or trait locus	Marker	Reference
Ticchiolatura	More than 1000 seedlings from nine controlled crosses	<i>Rvi6</i> locus	M18-CAPS, AM19-SCAR, and AL07-SCAR	Tartarini et al. (2000)
Conservazione	2964 seedlings from a 'Honeycrisp' × 'Cripps Pink' cross, Washington apple breeding program	<i>Md-ACS1</i> gene	Redesigned primers based on <i>Md-ACS1</i> -indel	Edge-Garza et al. (2010)
Fireblight	Progenies of ACW 12382 × 'Enterprise' and ACW 12382 × E 10_34_100, Research Station Agroscope Changins-Wädenswil (ACW)	FBF7 QTL; <i>Rvi6</i> and <i>Rvi4</i> loci; <i>Pl2</i> locus	AE10-375 and GE-8019 SCARs; CH-Vf1 SSR (<i>Rvi6</i>) and CH02c02 (<i>Rvi4</i>); <i>Pl2</i> : CH04h02 SSR	Kellerhals et al. (2011)
Autocomp. Pezzatura ciliegie	837 seedlings from 2009 crosses and 1439 seedlings from 2010 crosses, PNW sweet cherry breeding program	<i>S</i> locus; (G2 fruit size locus) ^a	Pru-C2+PCE-R SCAR and Pav-S4-indel; (CPPCT038 and BPPCT034 SSRs) ^a	Haldar et al. (2010); Rowland et al. (2012)
Durezza Succosità Croccantezza Acidità	9000 seedlings, Washington apple breeding program	(<i>Md-ACO1</i> gene; <i>Ma</i> locus) ^a	(Redesigned primers based on <i>Md-ACO1</i> -indel; <i>Ma</i> -indel) ^a	Sebolt (2013)
Colore buccia Bitter pit	1693 seedlings from 3 families, University of Minnesota apple breeding program	(<i>Rf</i> ; <i>Ma</i> ; <i>Bp13</i> ; <i>Rvi6</i> loci) ^a	(<i>Rf</i> -SSR; <i>Ma</i> -indel; <i>Bp13</i> -SSR; CH-Vf1) ^a	Peace (2013a)

Modificato da
Ru et al.,
2015

Progetto Europeo Fruit Breedomics

Development of SNP-based assays for disease resistance and fruit quality traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and validation in breeding pilot studies

- Lo sviluppo di marcatori molecolari associati a caratteri specifici è pratica di routine.
- Evidente è il ritardo tra sviluppo di marcatori e la loro applicazione nel breeding.
- Nell'ambito del progetto Europeo FruitBreedomics, studi pilota sono stati progettati in melo per applicare immediatamente nel breeding i risultati del progetto.
- Protocolli per analisi SNP sono stati sviluppati per breeder che non hanno accesso ad un laboratorio per analisi molecolari.
- La tecnica KASP™ (PCR allele-specifica competitiva) è stata utilizzata per l'analisi di marcatori per geni di resistenza a ticchiolatura (Rvi2, Rvi4, Rvi6, e Rvi15), oidio (PI2), afide grigio (Dpfl), durezza e conservabilità dei frutti (Md-ACS1, Md-ACO1, e Md-PG1)
- Lo studio pilota ha dimostrato l'efficacia della selezione con marcatori SNP per programmi volti a piramidizzare sorgenti di resistenza e caratteri della qualità del frutto
- Lavoro analogo complementare svolto da L. Dondini sul germoplasma europeo del melo con un array di 480.000 SNP analizzati con germoplasma di 1.200 varietà, di cui 200 italiane; 280.000 SNP rivelatisi utili per differenziare i caratteri



Specializzazione della MAS

Dalla serra al laboratorio e ritorno (utilizzo SNP) (es. LCG Genomics/NL)

I semi vengono piantati in serra



Dischi fogliari vengono prelevati e trasferiti in una titer per estrazione del DNA mantenendo l'ordine dei campioni



	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Haploview	others	SNP1	SNP3	SNP6	SNP7	SNP9	SNP10
2	Affect status	SampleID	538	1401	2340	3230	4119	5093
3		1 Sample1	GG	GG	GT	TT	GG	GT
4		1 Sample2	GG	GG	GT	TT	GT	GG
5		1 Sample3	GG	GG	GG	TT	GG	TT
6		1 Sample4	GG	GG	GG	TT	GG	GG
7		1 Sample5	GG	GG	GT	TT	GT	GG
8		1 Sample6	GG	GG	GT	TT	GT	GG
9		1 Sample7	GG	GG	GG	TT	GG	TT
10		1 Sample8	GG	GG	GT	TT	GT	GT
11		1 Sample9	GG	GG	GT	TT	GT	GT
12		1 Sample10	GG	GG	GT	TT	GT	GG
13		1 Sample11	GG	GG	GG	TT	TT	GG
14		1 Sample12	GG	GG	GT	TT	TT	GG
15		1 Sample13	GG	GG	GT	TT	GT	GG
16		1 Sample14	GG	GG	TT	TT	GG	GT

La company invia i risultati delle analisi al breeder per la selezione delle piante



I dischi liofilizzati vengono inviati ad una company che estrae e analizza il DNA di ogni pianta



Le piante crescono in appositi array con 8 righe e 12 colonne (come le micropiastre)

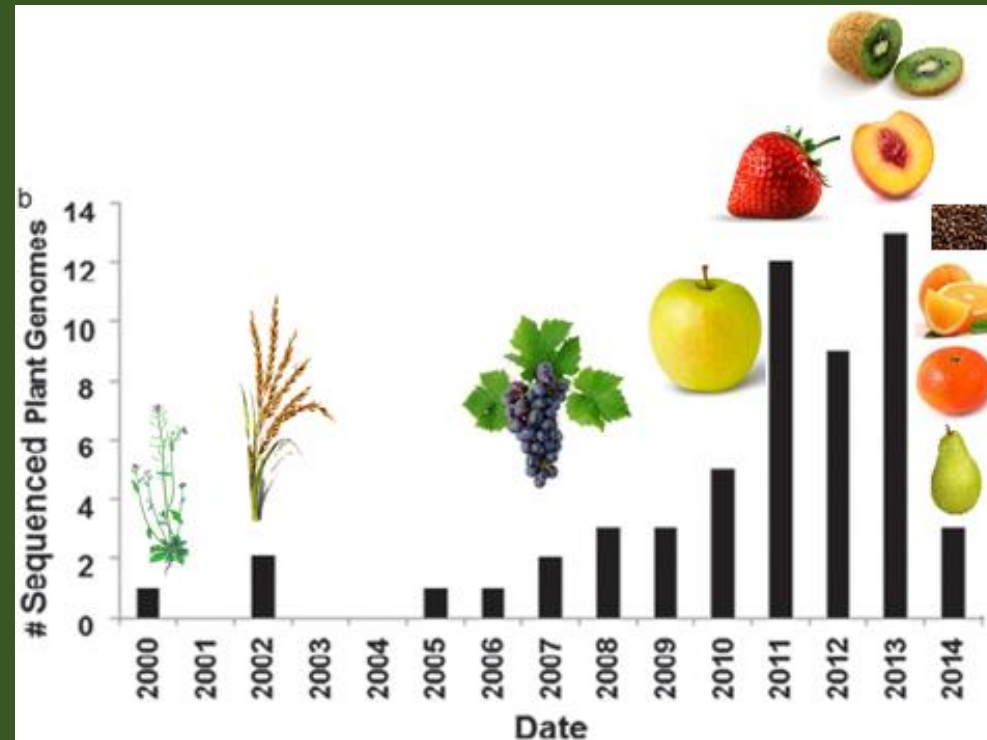
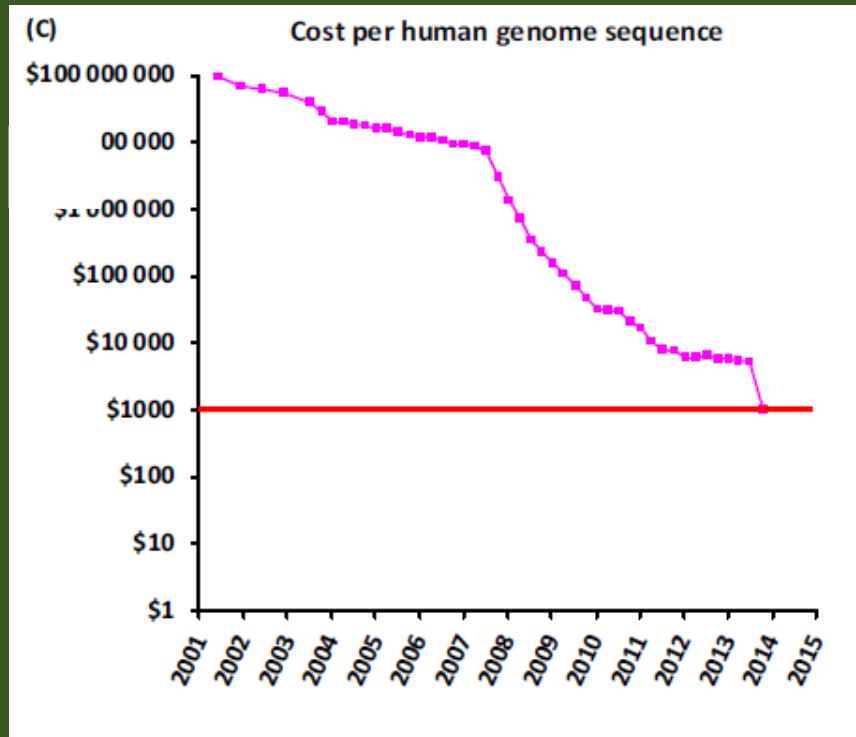
Costo analisi: 0,15 € per data-point (carattere e pianta) + estrazione (es. € 500) ed elaborazione (es. € 3.000).
Totale <€ 5.000 per 3.000 piante e 2-6 caratteri)

NEXT GENERATION SEQUENCING

NGS e l'era dei genomi verdi

L'abbattimento dei costi e l'inizio dell'era genomica

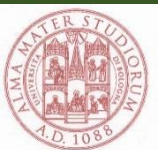
Nel 2013 è stata superata la soglia dei 50 genomi vegetali sequenziati



Gapper N.E. et al., 2014

2016: Sequenziato il genoma dell'olivo

Dal 2007 al 2014 dalla vite a melo, pesco, kiwi, pero ecc.



25 anni di trasformazione genetica nelle piante da frutto

1991-2016

Sono ad oggi disponibili in letteratura più di 70 lavori sulla trasformazione genetica nelle specie arboree da frutto (reviews da Petri e Burgos 2005 a Albuquerque, Murcia *et al.*, 2016)

I principali obiettivi:

- *resistenza a patogeni*
- *resistenza a stress ambientali*
- *modifica dell'habitus della pianta*
- *riduzione della giovanilità*
- *autocompatibilità riproduttiva*
- *riduzione del contenuto di allergeni*
- *conservabilità dei frutti*
- *caratteri della qualità dei frutti*



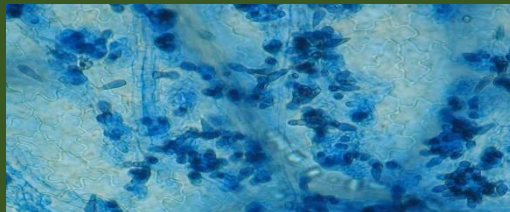


Gala GM trasformata con il gene *Vf*:

il primo gene di resistenza isolato da melo usato in melo

La collaborazione fra il DCA di Bologna e l'ETH di Zurigo ha prodotto le prime piante transgeniche in cui il gene per la trasformazione proveniva da una specie sessualmente compatibile con quello coltivato (*Malus floribunda* 821), aprendo la strada alle moderne piante cisgeniche.

Gala WT →

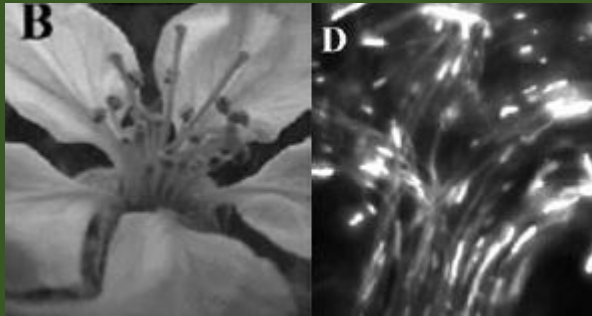


← Gala GM

Belfanti et al., 2004

IL SILENZIAMENTO GENICO

2004 Antisenso



La mela Elstar GM autofertile
Silenziamento S-RNasi



La mela Greensleaves GM a
lunga conservazione
Silenziamento ACO

Dandekar *et al.*, 2004

2013 PTGS

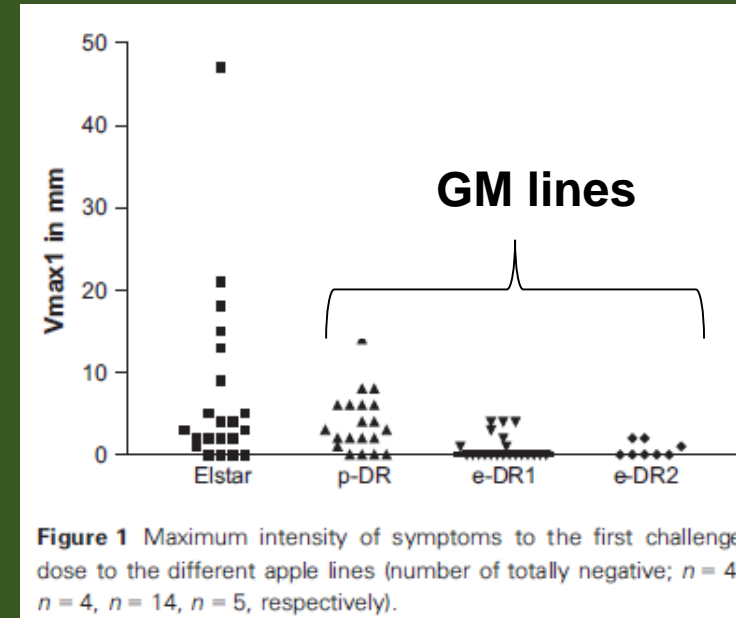
Resistenza a
Sharka in susino
attraverso il
silenziamento
della CP di PPV



Scorza *et al.*, 2013

2015 RNA interference

Riduzione della produzione
di allergeni in melo



Modificato da Dubois *et al.*, 2015 e
G. Pagliarani e F. Savazzini, 2014



Specie arboree GM autorizzate in USA

Arctic apple
soppressione del gene ppo



4 genotipi di Papaya resistenti a
ring spot virus



La susina Honey Sweet resistente
a Sharka



Vari tipi di banana (in progress)

The screenshot shows the ISAAA website interface. At the top, there is the ISAAA logo and the text "INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS". To the right, there is a CBU logo and a "Join our new Crop Biotech Update mailing list" button with "Join now!" text. Below the header is a navigation menu with items: "ISAAA in Brief", "ISAAA Programs", "Knowledge Center", "Biotech Information Resources", "GM Approval Database" (highlighted), "ISAAA Blog", and "Donate". Below the menu is a breadcrumb trail: "/ ISAAA / GM Approval Database". On the left side, there is a "GM Plants" list with the following items: Alfalfa, Apple, Argentine Canola, Bean, Carnation, Chicory, Cotton, Creeping Bentgrass, Eggplant, Eucalyptus, Flax, Maize, Melon, Papaya, Petunia, Plum, Polish canola, Poplar, Potato, Rice, Rose, Soybean, and Squash. On the right side, there is a large green box with yellow text: "DATABASE AMERICANO con genotipi OGM approvati e autorizzati per coltivazione e alimentazione". Below this box, there is a "Latest Update:" section with a date "August 24, 2016" and the text "South Korea approved the soybean event [MON87751](#) (IR) for food use." with a "See more updates" link. Below that is a "Jump to an Event:" dropdown menu with "Select..." text. At the bottom, there is an "Advanced Search (Beta)" section with the following fields: "Crop" (Apple (Malus x Domestica)), "Commercial Trait" (Any), "Developer" (Any), "Country" (Any), and "Type of Approval" (Any), with a "Go" button.

Nuove tecniche per nuove strategie di breeding (NBT)

Le piante devono essere equivalenti a quelle ottenibili col breeding

GLI STEP SPERIMENTALI

MODIFICAZIONI GENETICHE DI PIANTE



SCREENING PER LE MODIFICAZIONI DESIDERATE (BREEDING)



RIMOZIONE DEL DNA RICOMBINANTE

RISULTATI



- 1) Piante che contengono un nuovo DNA (es. Un nuovo gene; cisgenico con eliminazione DNA eterologo)
- 2) Piante senza nuovo DNA ma con modificazioni del proprio DNA (DNA editing, iniezione diretta RNA genico)
- 3) Piante senza nuovo DNA e senza modificazioni del proprio DNA (uso di portinnesti trasformati, micro RNA traslocabile)
- 4) Altro esempio: *fast breeding*



I prodotti finali ottenuti con le nuove tecniche di breeding

Technique	What is the Final Product after Breeding?			NPBT Products with Improved Traits
	Improved Plant 1	Improved Plant 2	Improved Plant 3	
	Plant with New Genes at a New Chromosomal Locus	Plant without New Genes but with a Mutation	Plant without New Genes or Modifications	
Cisgenesis	Yes ^c	Not	Not	Scab and fire blight resistance in apple
DNA editing (by CRISPR)	Not	Yes	Not	Mildew resistance in grape (in progress) Mutation of PDS gene in Sweet Orange *
Induced early flowering Fast breeding	Not	Not	Yes	Apple lines with stacked scab and fire blight resistances
Grafting on GM rootstock	Not	Not	Yes	<i>Prunus</i> necrotic ringspot virus resistance in sweet-cherry scions

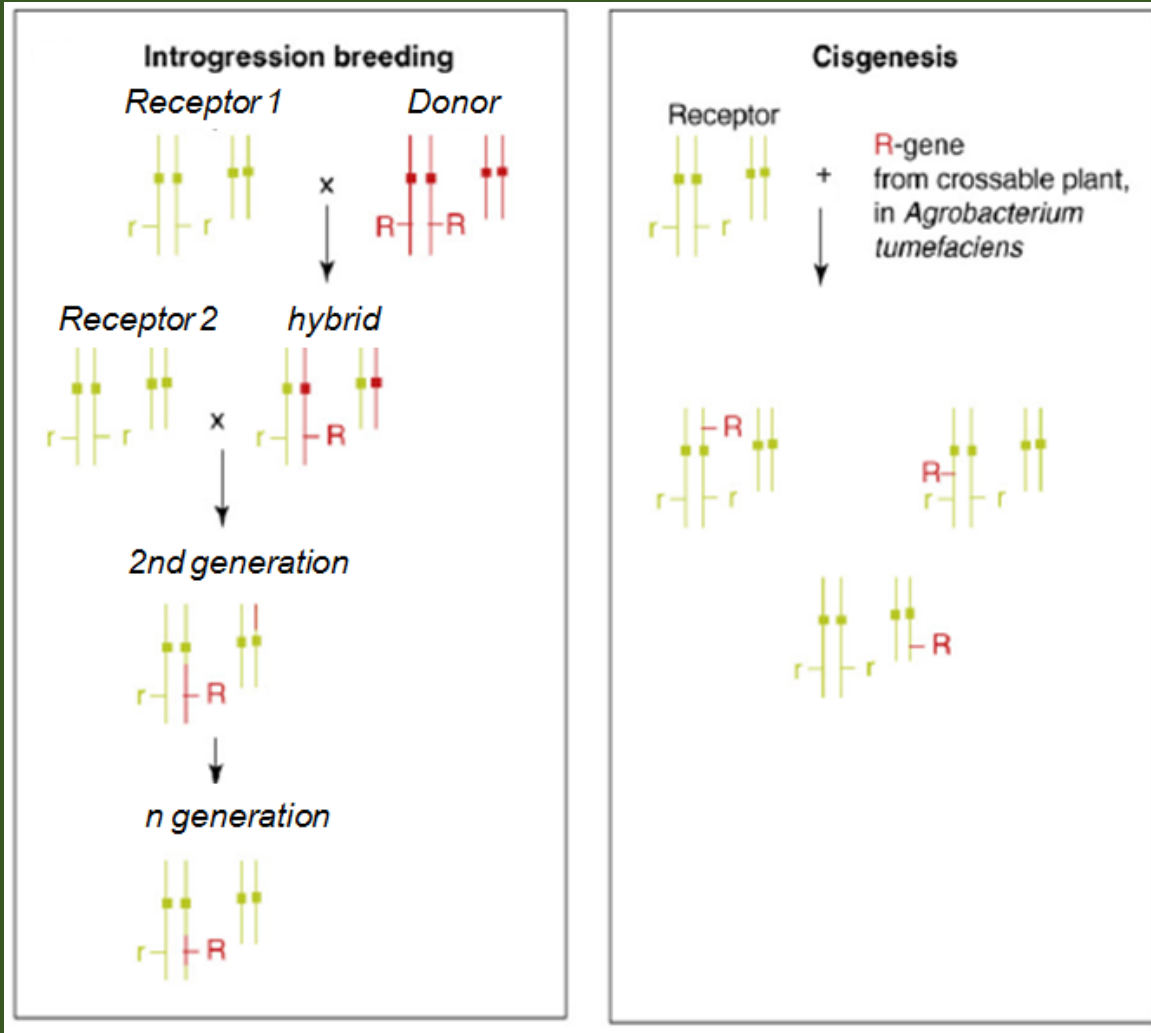
* PDS: phytoene desaturase

Modificato da Schaart et al., 2016



PIANTE CISGENICHE

Le piante cisgeniche sono piante geneticamente modificate con uno o più alleli derivati da piante donatrici appartenenti a specie sessualmente compatibili con la pianta accettrice



- Solo gli alleli desiderati sono introdotti. Nessun allele indesiderato o sconosciuto viene introdotto (linkage drag)
- I marker di selezione vanno rimossi
- L'originale pool genico delle varietà di pregio viene conservato
- Sono piante equivalenti a quelle ottenibili con breeding tradizionale

MELE CISGENICHE

RESISTENZA A TICCHIOLATURA



NON TRAS.

CISGENICA

NON TRAS. CISGENICA



POLPA ROSSA

Krens *et al.*, 2015

RESISTENZA A COLPO DI FUOCO

CISGENICA

NON TRAS.

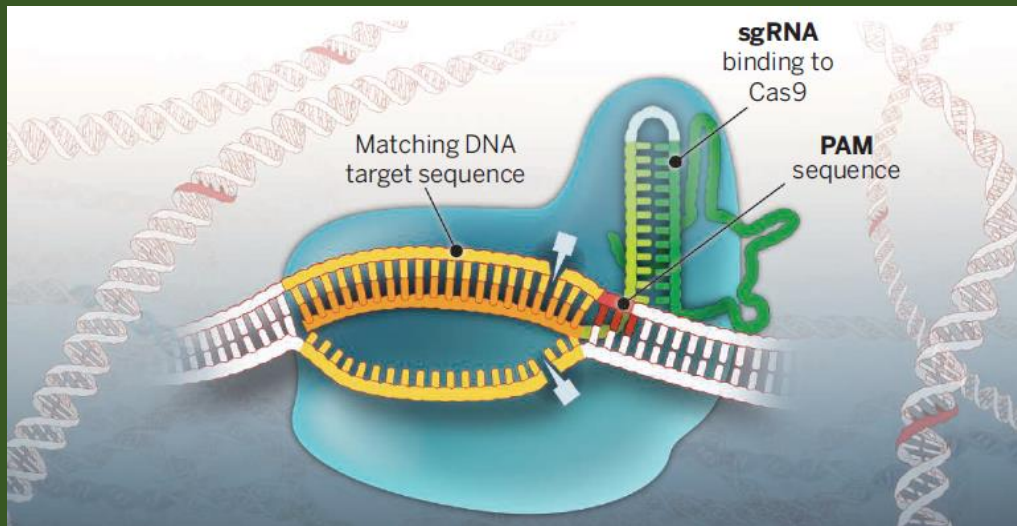


Kost *et al.*, 2015

DNA editing con metodo CRISPR

(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

- Il genome editing rappresenta un nuovissimo approccio per modificare la sequenza di un gene mediante l'aggiunta, la rimozione o la sostituzione di nucleotidi.
- La tecnica CRISPR-Cas utilizza l'enzima CAS9 per tagliare il DNA a doppia elica in prossimità di una sequenza complementare alla sequenza target di 20 nucleotidi dell'RNA a singola guida (sgRNA) che identifica la sequenza genica da modificare.
- Fino ad oggi si è preferito far produrre alle piante l'RNA guida e la proteina Cas9, eliminare il costrutto incrociando la pianta mutata con una non mutata e selezionare le nuove piante sulla base dell'assenza del costrutto (come per il fast breeding).



Questo approccio è:

- Ottimale per le colture cerealicole in cui possono essere utilizzate linee pure
- Non è ottimale nelle specie da frutto in cui è importante mantenere il genotipo delle varietà di pregio.
- L'uso di costrutti excidibili (come nel cisgenico) o della trasformazione transiente può ovviare a questo problema

Non-GMO genetically edited crop plants

Chidananda Nagamangala Kanchiswamy¹, Mickael Malnoy¹, Riccardo Velasco¹, Jin-Soo Kim^{2,3}, and Roberto Viola¹

L'iniezione diretta della proteina Cas e dell'RNA guida nella cellula vegetale rappresenta una delle alternative oggi studiate per il DNA Editing

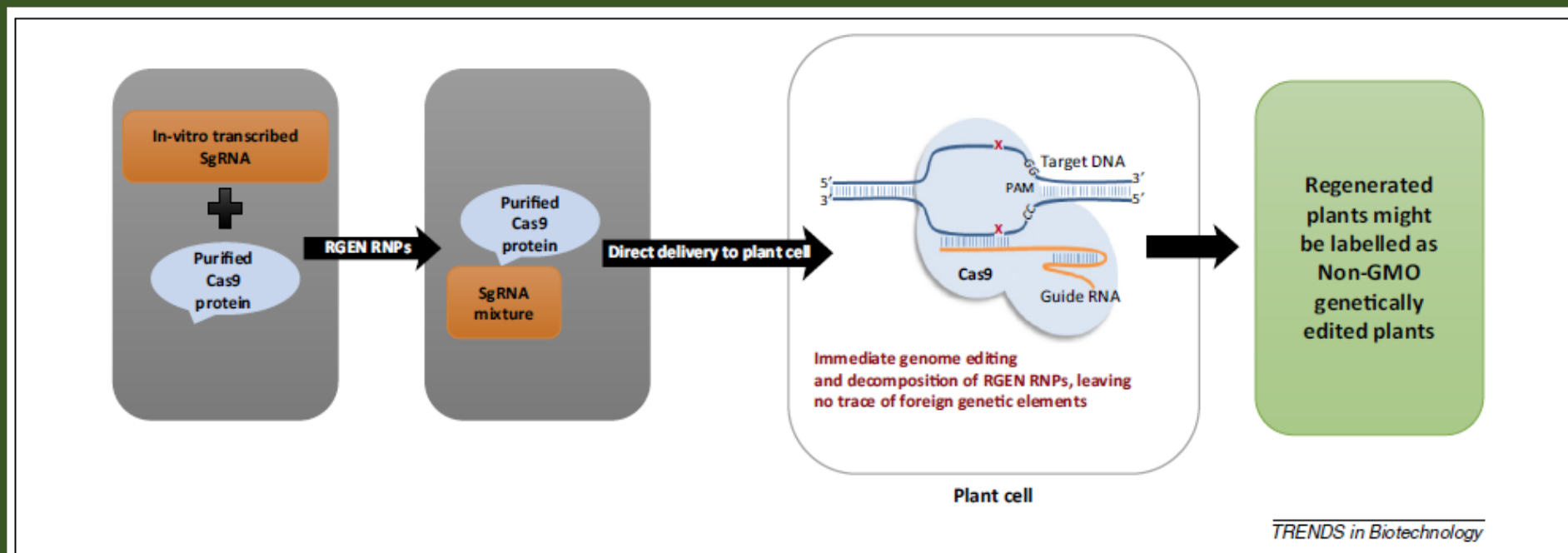
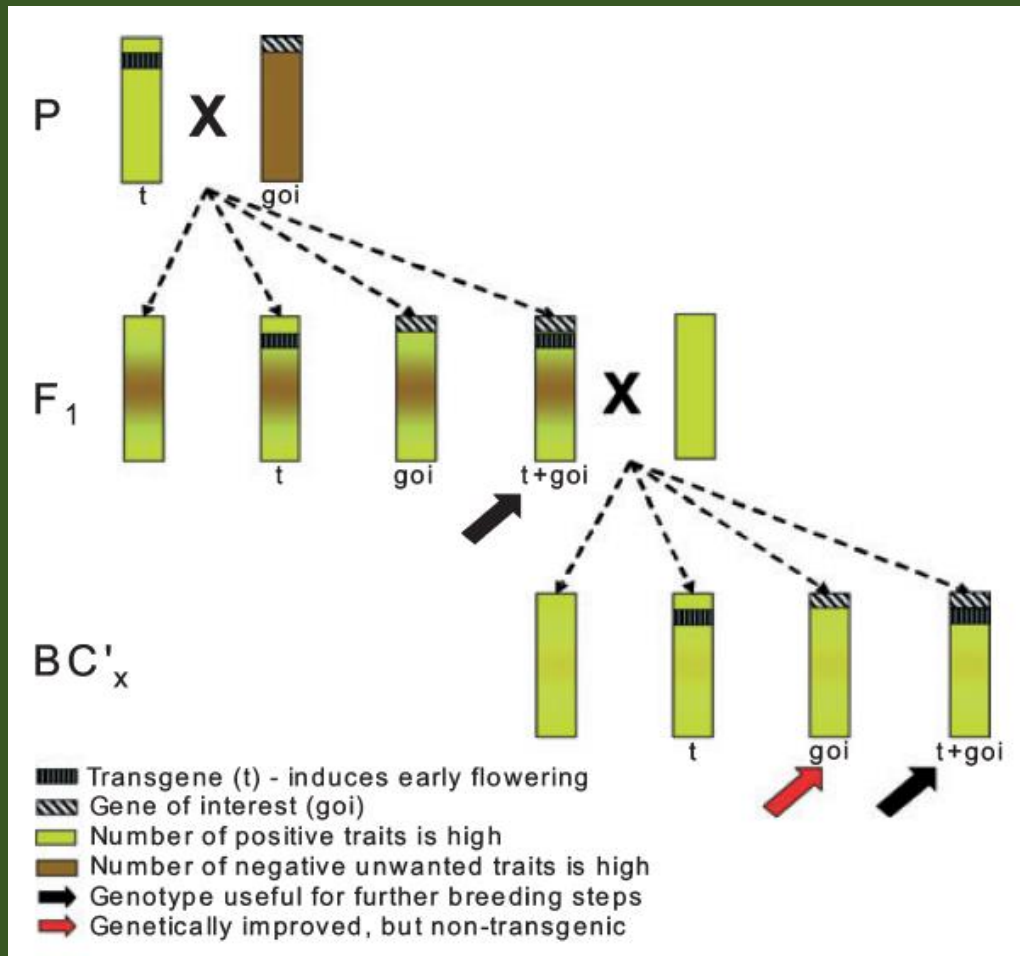


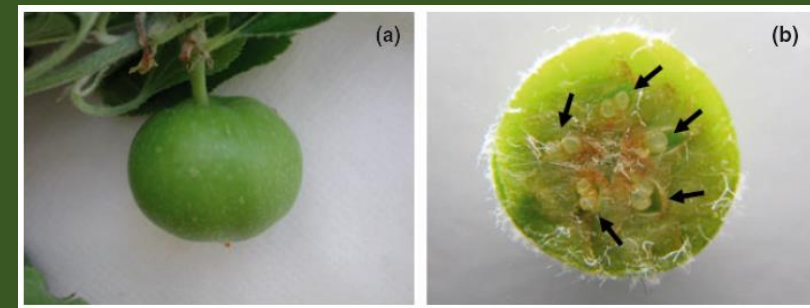
Figure 1. Schematic diagram of RNA-guided endonuclease (RGEN) ribonucleoprotein (RNP) direct delivery to plant cells and their role in genome editing while leaving no trace of foreign genetic elements.

FAST BREEDING con piante early flowering



➤ La sovraespressione di un MADS box di betulla in melo è stata utilizzata per indurre il carattere dell'early flowering

➤ Questo carattere è alla base del FAST BREEDING



Flachowsky *et al.*, 2007; 2009

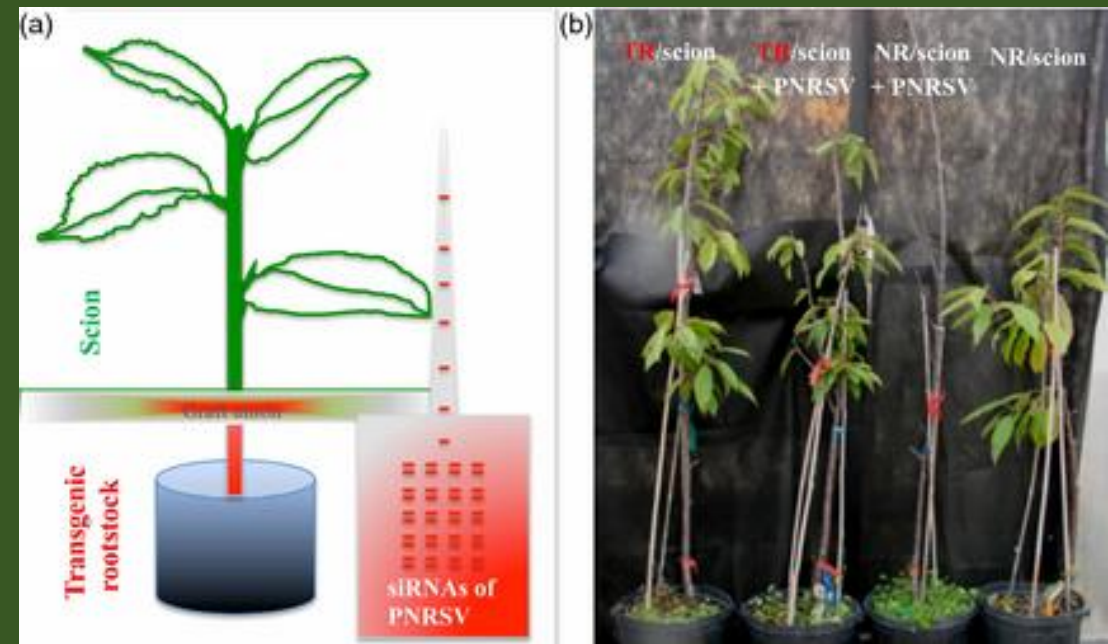
Portinnesti transgenici per indurre resistenza in piante non transgeniche

- Piccoli small interfering RNA (siRNA) inducono silenziamento genico nelle piante
- Un esperimento pilota ha introdotto una resistenza al Prunus Necrotic Ringspot Virus in un portinnesto silenziando con siRNA una regione del genoma virale.
- Questo portinnesto GM è in grado di trasferire la resistenza alla varietà di ciliegio non trasformata innestata su di esso

Non Transgenic
'Emperor Francis'



Transgenic Gisela 6



CONCLUSIONI

- **Nonostante le difficoltà causate dalla diffidenza dell'opinione pubblica e dai costi necessari per l'iter dell'approvazione, alcuni genotipi biotech sono stati realizzati presso le istituzioni di ricerca e sono disponibili per la coltivazione in USA, essendo stati approvati. Altri, numerosi, sono tuttora «fermi» in paesi che ne fanno divieto**
- **Il DNA editing offre una nuova e potente possibilità di modificare il genoma delle piante e promette grandi vantaggi di specificità di intervento e riduzione dei costi rispetto al breeding tradizionale e alla trasformazione genetica se la regolamentazione nascente lo permetterà.**
- **In futuro sarebbe auspicabile sviluppare una idea di miglioramento genetico unitaria in cui l'uso opportuno del germoplasma delle specie è impiegato nei programmi di breeding insieme ai nuovi genotipi realizzati con applicazioni biotech.**
- **I progetti di trasferimento tecnologico dovranno mettere a disposizione dei produttori i nuovi genotipi migliorati nati dall'attività di ricerca. La realizzazione di questi progetti potrà essere facilitata da una più attiva collaborazione fra istituzioni pubbliche e private.**

Norman Borlaug (1914-2009)



«Abbiamo bisogno del coraggio dei leader di quei paesi in cui gli agricoltori non hanno ancora altra scelta se non l'impiego dei metodi più vecchi e meno efficaci.

La Rivoluzione Verde ed ora le biotecnologie vegetali stanno aiutando a soddisfare la crescente domanda di produzione alimentare, preservando il nostro ambiente per le generazioni future»

(citazione ISAAA, 2009).

**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**