

Impiego della tecnologia CRISPR/Cas9-FLP/FRT per rendere cultivar di melo meno suscettibili al colpo di fuoco batterico

Valerio Pompili, Lorenza Dalla Costa, Stefano Piazza, Mickael Malnoy
Dipartimento di Biologia e Genetica delle Piante da frutto, Centro di Ricerca ed Innovazione, Fondazione Edmund Mach, via E. Mach 1, 38010, San Michele all'Adige, Trento

Parole chiave: *Malus x domestica*, *Erwinia amylovora*, editing genetico, ricombinazione sito specifica

Le principali cultivar di melo attualmente in commercio sono suscettibili al colpo di fuoco batterico causato dal batterio *Erwinia amylovora*. Allo scopo di contrastare questo patogeno, verso il quale i trattamenti fitosanitari (come l'impiego di specifiche pratiche colturali, o il controllo chimico e biologico) hanno un'efficacia limitata, sono state prodotte cultivar resistenti mediante breeding tradizionale (ad esempio 'Rewena' ed 'Enterprise'; Kellerhals et al., 2014), i cui frutti tuttavia non soddisfano qualitativamente le aspettative dei consumatori. Anche l'ingegneria genetica è stata sfruttata per inserire in varietà di pregio geni di resistenza derivati da genotipi selvatici (Broggini et al. 2014; Kost et al. 2015). Tuttavia, la resistenza indotta da questi geni è già stata superata dal batterio che ha subito un rapido processo evolutivo. Un'ulteriore strategia, che in base ad evidenze in altre specie sembra poter essere più durevole rispetto a quella basata sui geni di resistenza, consiste nel silenziamento dei geni di suscettibilità della pianta utilizzati dal patogeno per innescare l'infezione. La famiglia dei geni *DIPM*, composta da 4 membri codificanti per proteine con attività recettoriale, sembra essere sfruttata da *Erwinia amylovora* per disattivare la risposta di difesa della pianta, rendendola di fatto suscettibile (Meng et al., 2006). Pertanto, l'inattivazione dei membri di questa famiglia genica ci è apparsa una linea di ricerca promettente su cui puntare per ridurre la suscettibilità del melo a questo patogeno.

Per attuare questo progetto ci siamo serviti della tecnologia di editing genetico mediato da *Agrobacterium tumefaciens*. Lo strumento attualmente più avanzato per l'editing genetico è CRISPR/Cas9, sistema ad altissima efficienza, mutuato dai batteri e applicato per la prima volta in melo nel 2016 (Nishitani et al., 2016). Questa formidabile tecnologia ha visto negli ultimi anni una notevole diffusione nel campo delle biotecnologie vegetali perché permette di ottenere facilmente mutazioni INDEL (inserzioni/delezioni) in sequenze geniche target con conseguente perdita o alterazione della funzione della proteina codificata.

Le piante 'Gala' e 'Golden Delicious' editate nel gene *DIPM4* (Fig. 1), con mutazioni che generavano codoni di stop prematuri e deleteri per la funzionalità recettoriale, sono risultate significativamente meno suscettibili al patogeno rispetto alle piante wild-type, senza effetti

pleiotropici sul fenotipo né effetti off-target a livello genetico. Questo studio, durato circa 3 anni, ha permesso di dimostrare il ruolo chiave di un gene di melo nella suscettibilità ad un'importante malattia. E' in corso di sperimentazione lo spegnimento degli altri membri della famiglia genica *DIPM*.

Parallelamente, abbiamo anche studiato delle modalità per apportare un'innovazione al processo di trasferimento genico via Agrobatterio, attualmente ancora il più diffuso, al fine di minimizzare il più possibile la presenza di DNA esogeno nel genoma delle piante editate. Il costrutto binario che è stato inserito in Agrobatterio conteneva nel T-DNA (porzione di DNA che viene trasferita alla pianta) un sistema di ricombinazione sito-specifica indotto da calore (regolato da un promotore heat-shock), basato sulla ricombinasi FLP e sui siti da essa riconosciuti (FRT) posti alle due estremità del T-DNA (Fig. 1). Questo sistema è risultato efficace per la rimozione di una cassetta di T-DNA di oltre 10 kb, contenente il sistema CRISPR/Cas9, il gene marcatore per la resistenza alla kanamicina e la ricombinasi stessa. Nel genoma delle piante editate è rimasto un piccolo frammento di DNA esogeno della lunghezza di poco più di un centinaio di basi.

Sebbene il DNA esogeno non sia stato completamente rimosso, questo risultato va nella direzione di rendere queste tecnologie sempre più precise e pulite come auspicato dai cittadini/consumatori. Molti paesi nel mondo (USA, Argentina, Australia, Brasile, Cile) hanno stabilito che se un prodotto di editing non contiene DNA esogeno deve essere considerato come un prodotto convenzionale e va esentato dalla regolamentazione OGM. In Europa, al momento, qualsiasi modifica genetica prodotta in laboratorio (con l'eccezione dei prodotti ottenuti con mutageni fisico-chimici) viene regolamentata nell'ambito della normativa sugli OGM. Tuttavia, in futuro le Direttive Europee potrebbero subire variazioni anche alla luce del fatto che uno dei pilastri su cui si fonda il principio di precauzione, da sempre faro e guida dei legislatori europei, è la revisione delle misure sulla base del progresso scientifico e tecnologico (Aerni et al., 2019).

Bibliografia

Aerni P (2019) Politicizing the Precautionary Principle: why disregarding facts should not pass for farsightedness. *Front Plant Sci* doi: 10.3389/fpls.2019.01053

Broggini GA, Wöhner T, Fahrentrapp J, Kost TD, Flachowsky H, Peil A et al. (2014) Engineering fire blight resistance into the apple cultivar 'Gala' using the FB_MR5 CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus × robusta* 5. *Plant Biotechnol J* **12**: 728-733

Kellerhals M, Schütz S, Baumgartner IO, Schaad J, Kost T, Broggini G et al. (2014) Züchtung feuerbrandrobuster Apfelsorten. *Agrarforschung Schweiz* **5**: 414-421

Kost TD, Gessler C, Jansch M, Flachowsky H, Patocchi A and Broggini GA (2015) Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. PLoS One doi: 10.1371/journal.pone.0143980

Meng XD, Bonasera JM, Kim JF, Nissinen RM and Beer SV (2006) Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. Mol Plant Microbe Interact **19**: 53-61

Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K et al. (2016) Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. Sci Rep doi: 10.1038/srep31481

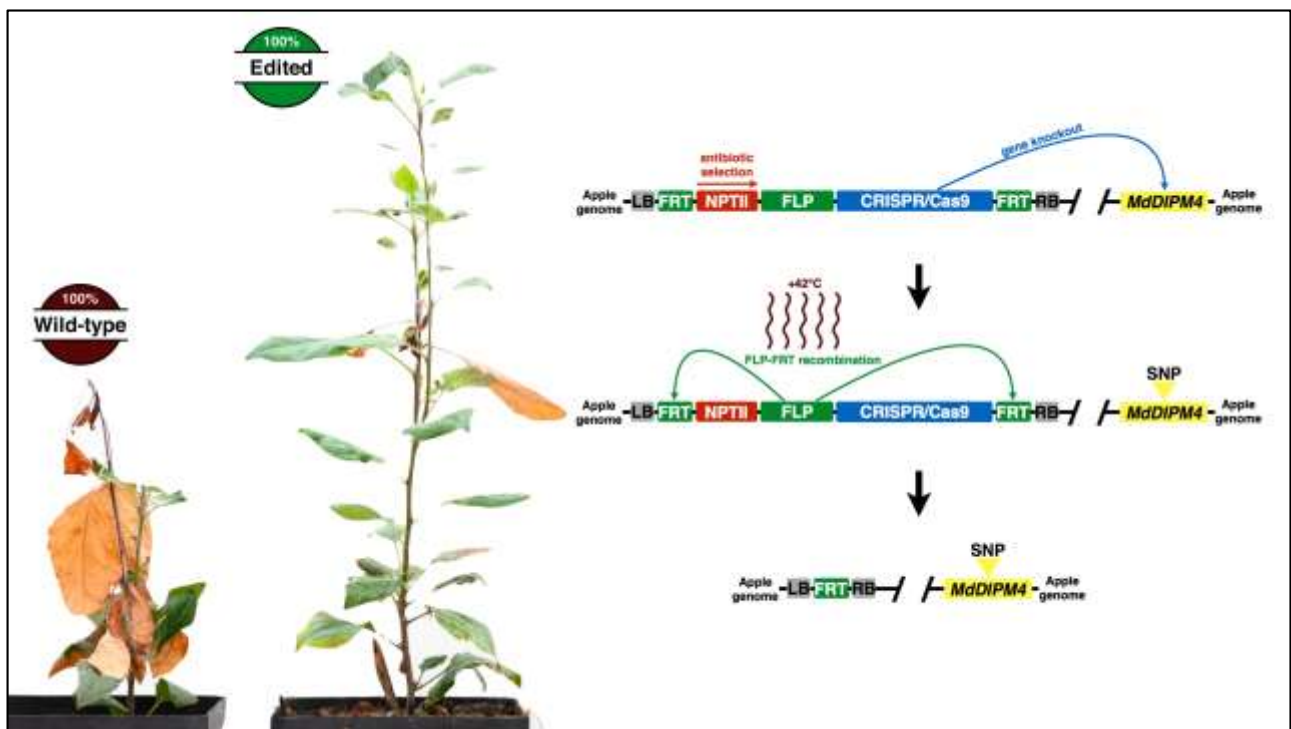


Fig. 1: Applicazione del sistema di editing genico CRISPR/Cas9-FLP/FRT per la produzione di cultivar di melo con ridotta suscettibilità al colpo di fuoco batterico e una minima traccia di DNA esogeno.