





**Ministero dell'agricoltura,
della sovranità alimentare
e delle foreste**



Meeting conclusivo di Progetto

**15-16 Febbraio 2023
ROMA**

Al termine del progetto BIOTECH, il più importante progetto nazionale sulle applicazioni delle nuove tecnologie di evoluzione assistita in agricoltura, il meeting fa il punto sui risultati e sul loro potenziale impatto per un'agricoltura innovativa e sostenibile, in attesa di una regolamentazione che consenta la sperimentazione in campo.

Sottoprogetto COBIO

Coordinamento progetto BIOTECH

Cattivelli L.¹, Cardone MF.², Cardi T.²

¹ Crea Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica, Fiorenzuola d'Arda

² Crea Centro di ricerca Viticoltura ed Enologia, Turi

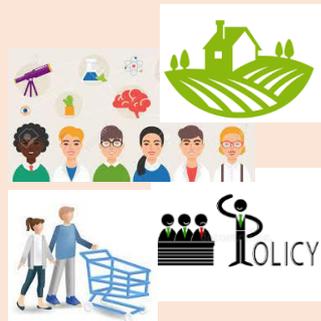
³ Crea Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pontecagnano (indirizzo attuale: CNR-IBBR, Portici)

BIOTECH è il primo grande progetto nazionale sul miglioramento genetico vegetale dopo oltre venti anni. Il progetto, finanziato nel 2018 dal Ministero dell'agricoltura con un contributo di 6 milioni di euro, intendeva costruire un *know how* scientifico e tecnologico per contribuire a trasformare le conoscenze relative ai genomi delle diverse specie oggetto di studio in prodotti migliorati, sempre più competitivi ed autenticamente italiani. Il cuore scientifico di BIOTECH è rappresentato dall'applicazione delle Tecniche di Evoluzione assistita (TEA) alle filiere produttive nazionali, al fine di innalzare la qualità e/o la sostenibilità delle colture.

BIOTECH, coordinato dal CREA, ha interessato colture di rilievo per l'agroalimentare italiano (vite, olivo, albicocco, pesco, ciliegio, melo, pero, pomodoro, melanzana, basilico, carciofo, frumento, riso, pioppo) e ha messo a sistema il capitale genetico e di conoscenze già presente in numerose istituzioni pubbliche del Paese per consentire ai ricercatori italiani di essere protagonisti nel contesto europeo e mondiale della ricerca biotecnologica.

Oltre all'attività scientifica, BIOTECH ha curato innumerevoli iniziative per la diffusione di una cultura scientifica nel settore del miglioramento genetico vegetale. Quest'ultime sono state indirizzate a diversi interlocutori come: la comunità scientifica nazionale e internazionale, il mondo politico, il settore delle industrie sementiere ed i cittadini, inclusi gli studenti che, a lungo termine, saranno i veri consumatori delle varietà sviluppate.

Vista la pluralità degli interlocutori, l'azione di disseminazione e divulgazione è stata realizzata attraverso l'organizzazione di iniziative con le scuole e il grande pubblico, la partecipazione a numerosi incontri, dibattiti, interviste e video, nonché con pubblicazioni su riviste a carattere divulgativo.



Tra le diverse attività realizzate si riportano le principali

BIOTECH school contest: un percorso didattico sul miglioramento genetico in agricoltura per scoprire le connessioni tra scienza, genetica, agricoltura e cibo, realizzato mediante un concorso per le scuole a cui hanno partecipato circa 400 studenti appartenenti a nove scuole superiori, preceduto da un corso di aggiornamento per gli insegnanti di scienze (marzo - aprile 2021).
<https://www.youtube.com/watch?v=qBeOPvf37Kc> (#Biotechschoolcontest : i momenti migliori)



Eventi di formazione per giornalisti

Comunicare nel modo appropriato le conoscenze su queste nuove tecnologie è un passaggio importante per favorire l'accettabilità di prodotti derivanti da innovazione genetica. Per questo BIOTECH ha realizzato due eventi.

CREA: CORSO DI FORMAZIONE GRATUITO PER GIORNALISTI, 6 CREDITI

LE BIOTECNOLOGIE PER UN'AGRICOLTURA SOSTENIBILE: CONOSCKERLE DAVVERO PER COMUNICARLE MEGLIO

GIOVEDÌ 26 SETTEMBRE 2019 ore 10.00 - 17.00

CREA - Centro di ricerca Alimenti e Nutrizione, via Ardeatina 546, Roma



1. Corso teorico pratico sulla genetica molecolare (Roma, 26 settembre 2019);
<https://www.youtube.com/watch?v=MXvZy7Lk-OA&t=5s>



Presentazione del progetto e dei primi risultati al festival del giornalismo alimentare (Torino, 31 maggio - 1 giugno 2022).

<https://www.ilgiornaledelcibo.it/biotecnologie-agricoltura/?fbclid=IwAR1qaleJKOqHovRYXMZZypx9omgto1aUGAJF-8fiQRXZeWfKJax8FCBQrQ>; <https://www.crea.gov.it/-/il-crea-al-festival-del-giornalismo-alimentare>; https://www.youtube.com/playlist?list=PLuHR_wWt4GLUm4B_KYg3cxGsnIIPmLuVp

L'attività di divulgazione delle TEA non poteva non passare dall'utilizzo dei webmedia:

A partire dalla creazione di una pagina dedicata al progetto BIOTECH sul sito del **CREA** @ <https://www.crea.gov.it/-/biotech>



...realizzazione di video divulgativi su obiettivi e risultati dei sottoprogetti in collaborazione con l'ufficio stampa del **CREA** (Giannetti C. ; Ambrosini F.)



- Cattivelli L. https://www.youtube.com/watch?v=P_5mCrSvUTs (#CREABREAK: alla scoperta di Biotech)
- Bergamini C., Cardone M.F, Chitarra W., Nerva L. #CREABREAK per #innovazione2020: il progetto #VITECH di #ViticolturaEnologia
- Crosatti C., Tacconi G., Battaglia R., Desiderio F., Guerra #CREABREAK per #innovazione2020: [miglioramento genetico e biotecnologie in #GenomicaBioinformatica - YouTube](#)
- Battaglia R. Diversità e miglioramento genetico [Diversità e miglioramento genetico - YouTube](#)
- Nicolìa A., Savona M. <https://www.youtube.com/watch?v=XFIRQkEgX8s> (#CREABREAK per #innovazione2020: il [miglioramento genetico](#) di #OrticolturaFlorovivaismo)
- Cattivelli L. La ricetta del Genome editing [#CREABREAK XL: La ricetta del Genome editing - YouTube](#)
- Innovazione Biotech per un agroalimentare smart sostenibile e salutare [Innovazione Biotech per un agroalimentare smart sostenibile e salutare - YouTube](#)
- Cattivelli L.; Nicolìa A. #Ricerca: webinar #Copagri-#CREA su #vitivinicoltura e primi risultati progetto #BIOTECH (19/07/22)



L'INNOVAZIONE AL CREA CENTRO GENOMICA E BIOINFORMATICA



Molte sono state anche le attività destinate al mondo politico e imprenditoriale, tra cui:



Luigi Cattivelli ha illustrato il progetto BIOTECH al convegno «BIOTECH: il futuro migliore» organizzato da AssoBiotech sullo stato delle biotecnologie in Italia (22 giugno 2022)

Luigi Cattivelli ha illustrato il progetto BIOTECH al 10th G20 Meeting of Agricultural Chief Scientists (15 luglio 2021).



Luigi Cattivelli ha illustrato il progetto BIOTECH alla commissione Agricoltura del Senato (16 luglio 2019).



Luigi Cattivelli (a destra) illustra il progetto BIOTECH al sottosegretario del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA) Dr. Ted A. McKinney (al centro, 30 gennaio 2020).

Il progetto BIOTECH ha contribuito alla stesura del position paper sulle biotecnologie redatto da Custer CLAN e AssoBiotech (2022),

Impatto

L'azione di promozione delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) ha contribuito a far crescere il dibattito sulle TEA in Italia ed ha informato i cittadini sul ruolo della scienza genetica per la moderna agricoltura. Complessivamente, il progetto BIOTECH ha organizzato o partecipato ad oltre 40 eventi, pubblicazioni divulgative, incontri con stakeholder, pubblici dibattiti, ecc. In particolare, diversi contributi sulle specie d'interesse del progetto sono contenuti nel fascicolo "Tecnologie di Evoluzione Assistita, la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana", supplemento all'Informatore Agrario n. 27/2021.

Pubblicazioni divulgative

1. Intervista a Cattivelli L. (2018) A Fiorenzuola l'avanguardia che porterà il Biotech nel piatto. Il Sole24ORE 11/12/2018
2. Cardi T., Cattivelli L., Gentile A., Pisante M. (2018) Per rigenerare l'agricoltura serve il *genome editing*. Terra e Vita n. 34-2018, 76-78
3. Licciardello C., Caruso P., Russo G., Russo M.P., Caruso M. (2018) Le nuove frontiere delle biotecnologie no-GM a sostegno di una "sana" agricoltura. Frutticoltura n.1/2
4. Meldolesi A. (2019) Biotecnologie per il Made In Italy. Le Scienze 7, 72-77, (presentazione del progetto Biotech su «Le Scienze»)
5. Cardi T., Nicolia A., Tripodi P. (2020) Vecchie e nuove biotecnologie per le specie ortofloricole. Colture Protette n. 10 – 2020, 48-53
6. Forleo L.R., Moffa L., Giudice G., D'amico M., Nerva L., Chitarra W., Bergamini C., Cardone M.F., Velasco R. - (2020) Verso un Glera resistente. - Il Corriere Vitivinicolo, Vol 11, fascicolo Vite Pag. 3-7
7. CREAfuturo Rivista online del CREA (2021) Numero speciale dedicato al progetto BIOTECH. [Numero 1: Maggio 2021 | CREA futuro](#)
8. Battaglia R. Maccaferri M., Masci S., Sestili F., Tondelli A. (2021) Il rilancio della cerealicoltura passa anche dalle TEA. In "Tecnologie di Evoluzione Assistita, la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana", L'Informatore Agrario Supp. vol. 27, 11-13
9. Balconi C., Fornara F., Salvi S., Vaccino P., Varotto S. (2021) Mais e riso più competitivi grazie alle TEA. In "Tecnologie di Evoluzione Assistita, la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana", L'Informatore Agrario Supp. vol. 27, 14-16
10. Cardi T., Filippone E., Volpi C. (2021) Colture orticole: le TEA per rispondere ai cambiamenti. In "Tecnologie di Evoluzione Assistita, la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana", L'Informatore Agrario Supp. vol. 27, 17-20
11. Aversano R, Cardone M. F., Morgante M., Moser C., Perrone I., Velasco R., Zenoni S. (2021) Le TEA porteranno a viti più resistenti alle avversità. In "Tecnologie di Evoluzione Assistita, la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana", L'Informatore Agrario Supp. vol. 27, 23-25
12. Malnoy M., Micali S., Minervini A.P., Pavan S., Ricciardi L., Vendramin E., Verde I. (2021) Grazie alle TEA la frutticoltura può essere 2.0. In "Tecnologie di Evoluzione Assistita, la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana", L'Informatore Agrario Supp. vol. 27, 26-27
13. Gentile A., Licciardello C., Lo Piero A. R. (2021) Anche gli agrumi in corsa verso le TEA. In "Tecnologie di Evoluzione Assistita, la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana", L'Informatore Agrario Supp. vol. 27, 28-30
14. AA.VV. (2021) Progetto Biotech. Il futuro dell'agricoltura è adesso. Creafuturo 1, <https://creafuturo.crea.gov.it/2602/>
15. Intervista a Cattivelli L. (2022) Con le nuove tecniche TEA si produce di più con meno acqua. Gli Agricoltori Veneti 5, 22-23

16. Intervista a Cattivelli L. (2022) Una strada tutta italiana per lo sviluppo delle Tea Terra & Vita [Una strada tutta italiana per lo sviluppo delle Tea - Terra e Vita \(edagricole.it\)](http://www.edagricole.it)
17. Sabbadini S., Mezzetti B. (2022) Intragenesi e cisgenesi, il miglioramento genetico è in linea con la bio-sicurezza. Frutticoltura, N.3, ISSN 0392-954x, pp. 30-34.
18. Articolo/intervista a Lucio Conti sui temi inerenti le risposte vegetali alla siccità. <https://www.the-scientist.com/news-opinion/severe-drought-heat-upended-research-this-summer-70623>
19. Contributo in un pod cast intitolato “AAA acqua cercasi – episodio 6 “ nell’ambito della raccolta Azzurro Verde Marrone affidata alla giornalista Barbara Righini <https://www.spreaker.com/user/15381030/azzurroverdemarron-puntata6-def>
20. Contributo in un podcast intitolato “Precisi è meglio! Puntata 6“ nell’ambito del progetto PartecipAC – Con i piedi in campo affidato alla giornalista Barbara Righini <https://www.spreaker.com/user/15381030/conipiediincampo-puntata6-def>
21. «Biotech-CISGET e Biotech-GEO: applicazioni delle tecnologie di evoluzione assistita al miglioramento genetico del pomodoro e del basilico» Earth Tech Expo di Firenze Il contributo di ricerca del crea per una agricoltura sostenibile, innovativa e resiliente al clima che cambia - 5/8 ottobre 2022 (Presentazione orale di A. Nicolìa)
22. «Il miglioramento genetico in agricoltura e il Progetto Biotech: interventi di Luigi Cattivelli, coordinatore di Biotech e Alessandro Nicolìa, ricercatore di CREA Orticoltura e Florovivaiismo» MacFruit - Convegno pubblico congiunto tra Cia-Agricoltori Italiani e Crea 3-5 maggio 2022
23. Video pubblicato sulla pagina Youtube del CREA - D’Orso F., Augelletti F., Possenti M., Ambrosini F. (2022) Innovazione BIOTECH per un agroalimentare SMART: sostenibile e salutare. <https://www.youtube.com/watch?v=Fees7-OJe-U> (CISGET)
24. Ciacciulli A., Salonia F., Poles L., Malnoy M., Pappalardo H.D., Pindo M., Caruso M., Licciardello M. (2023). Le tecnologie di evoluzione assistita contribuiscono a produrre agrumi ricchi in sostanze antiossidanti e senza semi. Frutticoltura n1/2
25. Articolo /intervista a Chiara Tonelli e Lucio Conti sui temi inerenti le risposte vegetali alla siccità. Autore: Anna Meldolesi. In fase di pubblicazione su agriscienze.it <https://agriscienza.it/la-genetica-vegetale-e-la-lotta-alla-siccita/>

Micali M.¹, Vendramin E.¹, Caboni E.¹, Monticelli S.¹, Gentile A.¹, Lucioi S.¹, Michelotti V.², Della Costa L.³, Bertinelli G.⁴, Dondini L.⁵, Domenichini C.⁵, Sabbadini S.⁶, Ilardi V.⁴, Tacconi G.², Mezzetti B.⁶, Tartarini S.⁵, Malnoy M.³, Verde I.¹

¹CREA Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura- Roma; ²CREA Centro di Ricerca Genomica e Bioinformatica – Fiorenzuola D'Arda; ³FEM-Fondazione Edmund Mach; ⁴CREA Centro di Ricerca Difesa e Certificazione – Roma; ⁵Università di Bologna- Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari - DISTAL; ⁶Università Politecnica delle Marche - Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences

Abstract

La frutticoltura rappresenta un settore di importanza fondamentale per il comparto agroalimentare del nostro Paese. Nel 2013 ha fatturato quasi 3,9 miliardi di euro, pari al 7,4% dell'intero sistema agricolo.

Il progetto BIOSOSFRU contempla 7 specie frutticole: 3 drupacee (pesco, albicocco e ciliegio), 2 pomacee (melo e pero), il kiwi e la fragola. Esso si pone l'obiettivo primario di migliorare la sostenibilità del comparto modificando alcuni geni coinvolti in processi chiave come la resistenza a stress abiotici, il miglioramento della produttività e degli aspetti qualitativi.

I risultati raggiunti riguardano il miglioramento dei protocolli di rigenerazione in *Prunus* e l'ottenimento di piante cisgeniche in melo (resistenza a ticchiolatura e afuoco batterico), pero (resistenza a fuoco batterico) e fragola (piante che esprimono i geni per la rifioritura) e di piante editate in pero (autocompatibilità) e in kiwi (putativa resistenza a PSA).

Impatto:

L'impatto maggiore del progetto riguarda la disponibilità di genotipi resistenti a malattie fungine e batteriche. In particolare la resistenza a ticchiolatura in melo se confermata nelle prove in campo sarebbe altamente auspicabile perché permetterebbe di ridurre in maniera considerevole i trattamenti che vengono effettuati (fino a 25-30 all'anno). Lo stesso per i patogeni batterici che affliggono pero e kiwi. In questo caso le malattie sono difficilmente controllabili chimicamente. Un altro impatto positivo riguarda la produttività e la stabilità delle produzioni che possono essere ottenute con cultivar di pero autocompatibili e con cultivar rifiorenti di fragola.

Risultati : Pomacee

L'approccio di cisgenesi e modifica del genoma è stato applicato in *Malus* e *Pyrus* per affrontare importanti aspetti legati alla resistenza a stress biotici e abiotici. Per la resistenza a ticchiolatura nel melo, è stato sviluppato un vettore cisgenico per sovraesprimere il gene di resistenza sotto il proprio promotore e terminatore. Vettori simili sono stati sviluppati per la resistenza al fuoco batterico nel pero. Diversi vettori CRISPR/Cas9 sono stati sviluppati per il *knock-out* di fattori di suscettibilità dell'ospite (*DIPM* e *HIPM*), coinvolti nell'interazione pianta-*Erwinia amylovora*. Per indurre l'autocompatibilità nel pero (SI), sono stati creati due costrutti per il *knock-out* del gene che codifica per una RNasi, con o senza il gene per il *knock-out* del gene per l'induzione precoce della fioritura (gene Terminal flowering; TF). I tessuti delle foglie di melo (cv 'Gala') e pero (cv 'Conference') sono stati infettati con ceppi di *Agrobacterium* ingegnerizzati con i diversi costrutti. Sono state ottenute diverse linee cisgeniche e modificate di pero e melo. I risultati preliminari mostrano che l'aggiunta del gene della ticchiolatura in 'Gala' migliora la resistenza alla ticchiolatura.

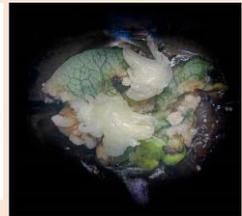
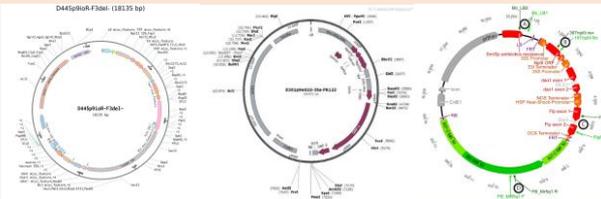


Figura 1. Esempio di plasmidi realizzati per il *knock-out* dei geni di interesse e per introdurre geni di resistenza a malattie via cisgenesi.

Codice esperimento	Tecnica	Target	Efficienza di rigenerazione (%)	Efficienza di trasformazione (%)
CIS-D034	Cisgenesi	<i>FB_Mfu10</i>	2	0.6
CIS-A021	Cisgenesi	<i>FB_Mr5</i>	22.5	17.9
CRISPR-DB63	DNA-editing	<i>S-RNasi</i>	1.9	0.5
CRISPR-E444	DNA-editing	<i>S-RNasi</i> e <i>TFL1.1</i>	3	0.9



Tabella 1. Vettori utilizzati negli esperimenti di trasformazione di 'Conference' e relative efficienze di rigenerazione e trasformazione.



Figura 2. Sintomi di ticchiolatura sulle foglie di linee transgeniche e non cv 'Gala' infettate con *Venturia inaequalis*



Figura 3. Rigenerazione e proliferazione di germogli trasformati di pero (cv 'Conference')

Risultati: Prunus

L'approccio *genome-editing* è stato applicato nel genere *Prunus* per affrontare importanti problematiche agronomiche. Per la resistenza a Sharka vettori CRISPR/cas9 a guida singola sono stati realizzati per il knock-out del fattore di suscettibilità *eIFiso4E* dell'ospite, coinvolto nell'interazione pianta-virus. Per indurre portamento colonnare, per favorire l'intercettazione luminosa e la densità di impianto, è stato realizzato un costrutto per il knock-out del gene *PpeTAC1*, responsabile del carattere Pillar. Per l'induzione precoce della fioritura è stata realizzato un costrutto a doppia guida per il knock-out del gene *PpeTFL*. Tessuti adulti di pesco, GF677, albicocco e ciliegio (foglie con picciolo, nodi e/o calli basali) ed embrionali immaturi di pesco sono stati infettati con ceppi di *Agrobacterium* ingegnerizzati con i diversi costrutti (Fig. 1). Sono stati implementati protocolli di rigenerazione, per questo genere recalcitrante, mediante l'impiego di diverse tipologie di espianto, di strategia di selezione, di condizioni colturali (Tab. 1; Fig. 2, 3). L'insufficiente efficienza di trasformazione non ha consentito l'ottenimento di eventi di *editing*. È stato sviluppato e validato un metodo (RT-droplet digital PCR) per la diagnosi quantitativa assoluta di plum pox virus (PPV) agente causale della sharka.

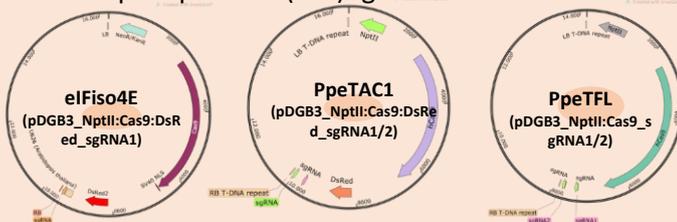


Figura 1. Plasmidi realizzati per il knock-out dei geni di interesse

Tabella 1. Percentuali di rigenerazione ottenute, per tipo di espianto

Specie	Genotipo	Espianto	Percentuale di rigenerazione
Pesco	Independence	Picciolo	19
		Picciolo	32
	Rich Lady	Epicotile	100
		Cotiledone	<0,5
Albicocco	Bocciucci a spinosa	Foglia	100
		Picciolo	50
	Bella di Imola	Foglia	1
		Picciolo	18
Pesco x mandorlo	GF677	Picciolo	30
		Nodo	100
		Callo	70
Ciliegio	Stella	Nodo	31



Figura 2. Rigenerazioni avventizie su cotiledone di 'Rich Lady'.



Figura 3. Rigenerazioni avventizie da piccioli di foglie di 'Independence'.

Risultati: Actinidia

La strategia del *genome-editing* è stata utilizzata in *Actinidia chinensis* per cercare di indurre la resistenza al cancro batterico. Il knock-out di un fattore di trascrizione AP2/ERF, implicato nel processo di suscettibilità, è stato realizzato costruendo vettori binari PTG/Cas9 contenenti combinazioni delle 4 guide selezionate nella porzione codificante del gene. Espianti fogliari di due varietà di *Actinidia chinensis*, con diversa suscettibilità alla malattia, sono stati utilizzati per la trasformazione stabile con il ceppo EHA105 di *A. tumefaciens* ingegnerizzato con i diversi costrutti descritti precedentemente. Il rapporto medio di rigenerazione su terreno selettivo contenente kanamicina è stato del 10% circa. Sono state ottenute complessivamente 7 linee trasformate di cui tre con un chiaro evento di editing a carico del gene selezionato.

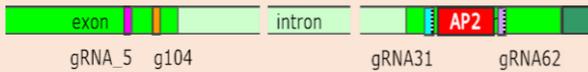


Figura 1. Rappresentazione schematica del gene e della posizione delle guide

Figura 2. Rappresentazione schematica del vettore PTG/cas9AtU6 contenente le guide separate da un tRNA^{Gly}



Tabella 1. Percentuali di rigenerazione ottenute

Cultivar	Costrutto	n. espianti totali	n. espianti rigenerati	n. espianti su kn 50
Soreli	A	576	17	2
Hort16a	(PTG/Cas9)	584	18	-
Soreli	B	593	17	3
Hort16a	(PTG/Cas9)	576	9	-
Soreli	C	1136	107	-
Hort16a	(PTG/Cas9)	940	58	-
Soreli	D	1044	73	-
Hort16a	(PTG/Cas9)	1023	56	2

- (A) sgRNA-PTG/cas9N:A (gRNA5, gRNA31)
- (B) sgRNA-PTG/cas9N:B (gRNA104, gRNA31)
- (C) sgRNA-PTG/cas9N:C (gRNA5, gRNA104)
- (D) sgRNA-PTG/cas9N:D (gRNA62, gRNA31)

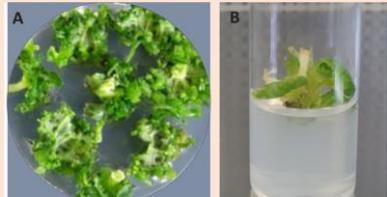


Figura 3. Rigenerazioni avventizie (A); S73 in kanamicina a 12 settimane dalla trasformazione (B)

Figura 4. Rappresentazione schematica degli eventi di editing ottenuti nelle linee S71B, S73B e Z228D



Risultati: Fragola

In questo studio, per ottenere cultivar di *Fragaria x ananassa* con il carattere di rifiorenza, il florigene *Flowering locus T2* di *F. vesca* (*FvFT2*) (Gaston et al., 2021) è stato inserito in tre nuovi costrutti cisgenici composti da sequenze derivanti da fragola (promotori costitutivi pAPA1-R2 e pUBCE2, e il gene marker *FaEPSPS*), o di origine vegetale (gene reporter *MdMYB10*). Foglie in vitro delle cv Romina e/o Sveva sono stati usati come espianti di partenza per le prove di trasformazione mediate da *A. tumefaciens* (ceppi AGLO e C58C1). Il solo costrutto *FT2::FaEPSPs*, grazie alla selezione attraverso gliofosato, ha permesso l'individuazione di 13 linee trasformate, che sono in corso di caratterizzazione per l'acquisizione del fenotipo rifiorente.



Figure 1. Identificazione e validazione del florigene in *Fragaria x ananassa* cv Romina mediante sovraespressione del costrutto *35S::FveFT2::NPTII* (Gaston et al., 2021)



Figure 3. a-c) Rigenerazione e d) proliferazione di linee cisgeniche della cv Romina e Sveva trasformate con il costrutto *Ft2::FaEPSPs*

Figura 4. PCR (PHIRE PLANT DIRECT PCR) su linee trasformate con il costrutto *Ft2::FaEPSPs*. Sequenza amplificata tra il promotore pAPA1R2 e il gene *FvFT2* (394 bp). Ladder: 1 kb (Invitrogen™); A= linee infettate con *A. tumefaciens* AGLO; C= linee infettate con *A. tumefaciens* C58C1; WT= wild type; (-) = controllo negativo; (+) = plasmide; R= Cv Romina; S=Sveva.

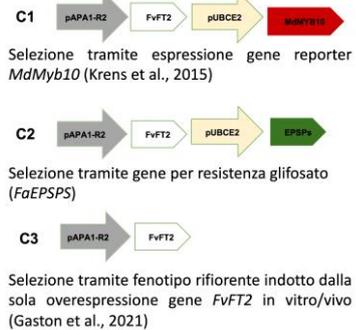
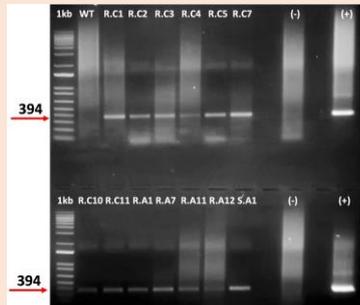


Figure 2. Rappresentazione schematica dei tre costrutti cisgenici utilizzati nelle prove di trasformazione mediate da *A. tumefaciens*.



Pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali

1. Gaston, A., Potier, A., Alonso, M., Sabbadini, S., Delmas, F., Tenreira, T., Cochtel, N., Labadie, M., Prévost, P., Folta, K. M., Mezzetti, B., Hernould, M., Rothan, C., Denoyes, B. (2021). The FveFT2 florigen/FveTFL1 antiflorigen balance is critical for the control of seasonal flowering in strawberry while FveFT3 modulates axillary meristem fate and yield. *New Phytologist*, 232(1), 372-387.
2. Bertinelli G., L. Tizzani, M. Luigi, V. Ilardi (2022) Reverse transcription-droplet digital PCR for plum pox virus detection and quantification. *Journal of Plant Pathology* 104: 1213–1214
3. Michelotti, V.; Urbinati, G.; Gentile, A.; Luciola, S.; Caboni, E.; Tacconi, G. (2022) Preliminary results on the development of a genome editing protocol in *Actinidia chinensis* var. *chinensis* as Psa resistance approach. *Acta Hort.* 1332, 111–116.
4. Domenichini C., Negri P., Defrancesco M., Alessandri S., Bergonzoni L., Verde I., Malnoy M., Broggin G.A.L., Patocchi A., Peil A., Emeriewen O.F., Dondini L., Tartarini S. (2022). New breeding technology approaches to improve apple and pear varieties. *Acta Horticulturae* (in press)
5. Miccoli C., Gambacorta G., Urbinati G., Santiago-Reyes M., Gentile A., Monticelli S., Caboni E., Prieto H., Verde I., Decroocq V., Vendramin E., Micali S. (2022). Novel breeding strategies for tackling present and future challenges in *Prunus* species: the case of peach. *Acta Hort.* 1352, 419-425.
6. Nerva, L., Dalla Costa, L., Ciacciulli, A., Sabbadini, S., Pavese, V., Dondini, L., Vendramin E., Caboni E., Perrone I., Moglia A., Zenoni S., Michelotti V., Micali S., La Malfa S., Gentile A., Stefano T., Mezzetti B., Botta R., Verde I., Velasco R., Malnoy M.A., and & Licciardello, C. (2023). The Role of Italy in the Use of Advanced Plant Genomic Techniques on Fruit Trees: State of the Art and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 977.

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Micali S., et al . New Breeding Techniques in fruit crop species: challenges and tools for a sustainable fruit culture. Book of abstracts Plant & Genome XXVII, The International Conference on the status of plant & animal genome research, San Diego, California (USA), January 12-16 2019. Poster abstract PO0625
2. Monticelli S., et al . Implementing the CRISPR/CAS9 system for targeting Sharka resistance in peach. Proceedings of the LXIII SIGA Annual Congress Napoli, Italy – 10/13 September, 2019 ISBN 978-88-904570-9-8 Poster Communication Abstract – 8.18
3. Miccoli C., et al. . Application of new breeding techniques to improve important agronomical traits in *Prunus* species Proceedings of the LXIV SIGA Annual Congress Online, 14/16 September, 2021 ISBN: 978-88-944843-2-8 Poster Communication Abstract – 4.24

Task 1.1: Cuccurullo A.¹, D'Agostino N.², Camerlengo F.¹, Contaldi F.¹, Festa G.¹, Cardi T.^{1,3}, Nicolia A.¹

¹ CREA – Research center for vegetable and ornamental crops, Pontecagnano, Italy; ² Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, Portici (NA), Italy; ³ CNR-IBBR, Institute of Biosciences and Bioresources, Portici (NA), Italy

Task 1.2: Punzo P.^{1,2}, Ruggiero A.¹, D'Agostino N.³, Grillo S.¹, Cardi T.^{1,2}, Nicolia A.², Batelli G.¹

¹ CNR-IBBR, Institute of Biosciences and Bioresources, Portici (NA), Italy; ² CREA – Research center for vegetable and ornamental crops, Pontecagnano, Italy; ⁵ Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, Portici (NA), Italy;

Task 1.3: Colanero S.¹, Landoni M.¹, Martignolo D.¹, Bosc A.¹, Cioffi S.¹, Galbiati M.², Tonelli C.¹, Conti L.¹

¹ University of Milan, Italy; ² CNR-IBBA, Institute of Biology and Biotechnology in Agriculture, Milan, Italy;

Task 2.1: D'Orso F.¹, Possenti M.¹, Forte V.¹, Augelletti F.¹, Felici B.¹, Baima S.¹, Morelli G.¹

¹ CREA Research Centre for Genomics and Bioinformatics, Rome, Italy.

Task 2.2: Palma D.¹, Platani C.¹, Sestili S.¹

¹ CREA – Research center for vegetable and ornamental crops, Pontecagnano, Italy;

Task 2.3: Rigano M.M.¹, D'Agostino N.¹, Barone A.¹

¹ Department of Agricultural Sciences, University of Naples Federico II, Portici (NA), Italy;

Task 3.1: Guardini Z.¹, Gomez R.L.¹, Dall'Osto L.¹, Bassi R.¹

¹ Laboratory of Photosynthesis, Biotechnology Department, University of Verona, Italy.

* Responsabile scientifico Dott. Alessandro Nicolia – CREA Centro di ricerca orticoltura e florovivaismo, Pontecagnano, Salerno (Italy). Email: alessandro.nicolia@crea.gov.it

Abstract Le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) *cisgenesis* e *genome editing* sono state applicate al miglioramento genetico del pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) con obiettivi articolati su tre *work package* (WP): tolleranza a stress (WP1), qualità nutrizionale e *shelf-life* (WP2) e modulazione del processo fotosintetico (WP3).

Nel WP1 sono stati prodotti: a) genotipi resistenti a piante parassite mediante il *knock-out* (*ko*) dei geni della biosintesi degli strigolattoni (*D27*, *CCD7*, *CCD8*, *MAX1*) (Fig. 1 – Task 1.1); b) genotipi tolleranti alla salinità mediante la rimozione di un dominio autoinibitorio da un gene antiporto Na^+/H^+ (*SOS1*) (Fig. 2 – Task 1.2); c) genotipi tolleranti allo stress idrico mediante il *ko* di una deidrogenasi coinvolta nel catabolismo della prolina (*P5CDH*) (Fig. 2 – Task 1.2), di un gene regolatore negativo del segnale ABA (*SIPP2C* - fosfatasi di tipo 2C) e di un fattore di trascrizione regolatore positivo dell'apertura stomatica (*SIMYB60*) (Fig. 3 – Task 1.3). Nel WP2 sono stati prodotti: a) genotipi con prolungata fase produttiva rimuovendo la regione regolativa del fattore di trascrizione *LeHB1* (Fig. 4 - Task 2.1); b) genotipi con alterato profilo metabolico mediante il *ko* del gene *SIHQ7* coinvolto nella biosintesi dell'acido clorogenico (Fig. 5 - Task 2.1); c) genotipi con frutti arricchiti in 7-deidrocolesterolo (precursore Vit. D) mediante il *ko* del gene *7-DR2* (Fig. 6 - Task 2.1); c) genotipi con frutti a più alto °Brix mediante alterazione del gene *LIN5* (invertasi apoplastica) (Fig. 7. – Task 2.2); genotipi con frutti arricchiti in acido ascorbico (Vit. C) mediante il *ko* di un gene inibitore della fosfometiltransferasi (*PMEI*) (Fig. 8 – Task 2.3). Nel WP3 sono stati prodotti: a) genotipi più produttivi e precoci in cui è stato modificato il meccanismo di fuga dei cloroplasti dalla luce mediante il *ko* del gene *PHOT2*; b) genotipi in cui è stato modificato il meccanismo NPQ (Non-Photochemical Quenching) mediante il *ko* del gene *PSBS* (Fig. 9 – Task 3.1).

Risultati WP1 – Tolleranza a stress

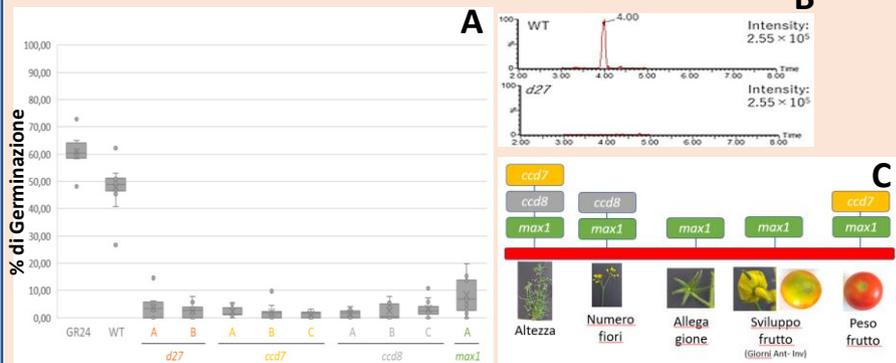


Fig. 1 Saggi di germinazione di *P. ramosa* e analisi fenotipiche dei mutanti per i geni della biosintesi degli strigolattoni (SL). La germinazione di semi della pianta parassita *P. ramosa* è ridotta, rispetto all'utilizzo di essudati di piante *wild type* (WT), dal 60% al 90% utilizzando essudati radicali di diversi mutanti *ko* (CRISPR/Cas9) indipendenti per ogni gene dalla biosintesi degli SL (*d27*, *ccd7*, *ccd8*, *max1*) (A). Le analisi fenotipiche (C) su frutti hanno verificato l'influenza specifica di alcuni geni in determinati aspetti fisiologici (es. *max1* e allegagione), non rilevando alterazioni significative a carico del mutante *d27*. Quest'ultimo, non avendo SL rilevabili negli essudati radicali (B) ed inducendo bassissima germinazione di *P. ramosa* (A), risulta quindi un ottimo ed innovativo candidato per la resistenza a piante parassite in pomodoro. (Si ringrazia per la collaborazione: Yoneyama K., Ehime University, Japan).

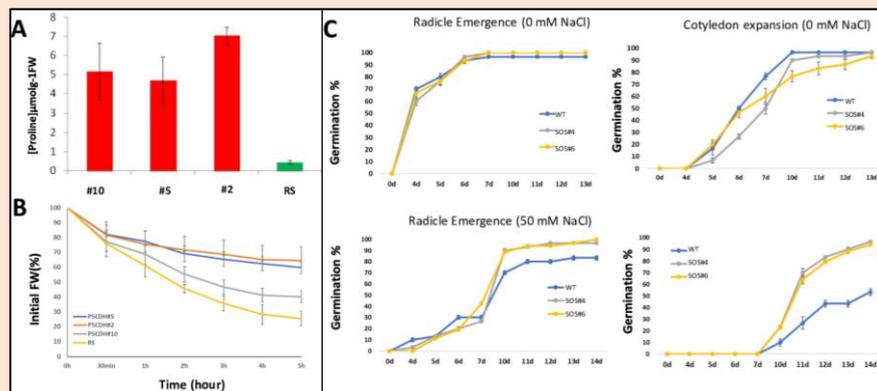
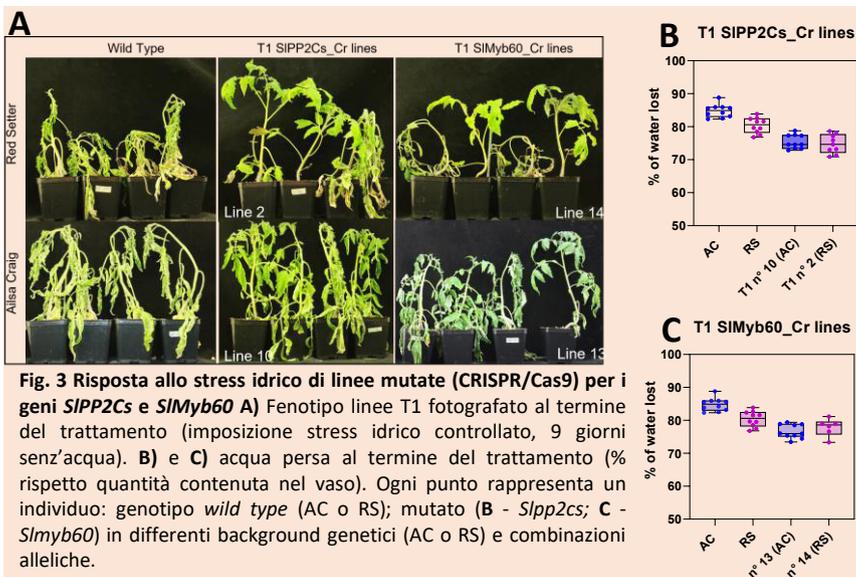


Fig. 2 Risposta a stress idrico e salino su tre mutanti indipendenti *p5cdh* e *sos1*. Le linee *ko* (CRISPR/Cas9) *p5cdh* (#10, #5, #2) presentano un maggiore contenuto di prolina (circa 10 volte) rispetto al *wild type* (RS) (A) e una inferiore perdita di acqua traspirazionale conservando dopo 5 ore circa il 70% e il 40% del loro peso fresco fogliare iniziale (B) rispetto a RS. C) Le due linee mutanti *sos1* (#4, #6), ottenute rimuovendo tramite CRISPR/Cas9 un dominio autoinibitorio, mostrano una maggiore efficienza germinativa in presenza di sale rispetto ad RS. La percentuale di germinazione è stata valutata in termini di emergenza radicale ed espansione cotiledonare in presenza di NaCl 50 mM e in condizioni controllo (0 mM NaCl).



Risultati WP2 - Qualità nutrizionale e shelf-life



Fig. 4 Longevità dei linee mutanti (CRISPR/Cas9) *delta-uorf-lehb1* Tre mutanti indipendenti omozigoti con una delezione della regione regolativa uORF nel gene *LeHB1*, che ha consentito un potenziamento dell'espressione, mostrano una maggiore longevità rispetto al *wild type* (figura a sinistra)

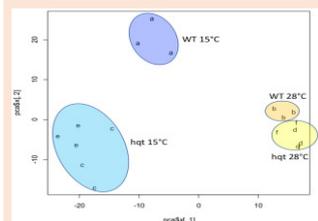


Fig. 5 Analisi metabolica di mutanti *ko* (CRISPR/Cas9) del gene *SIHQT*. L'analisi ha evidenziato un contenuto quasi nullo di acido clorogenico e un complesso riarrangiamento del metabolismo dei fenilpropanoidi sia in condizioni di crescita ottimali che di stress da basse temperature. Questi risultati aprono a possibili utilizzi dell'approccio *ko* del gene in altre specie.

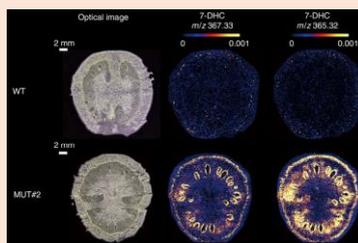


Fig. 6 MALDI di bacche del mutante (CRISPR/Cas9) *7-dhc*. Il mutante *7-dhc* MUT#2 accumula 7-deidrocolesterolo (7-DHC; m/z 367.33), precursore della vitamina D, e del suo derivato laser-indotto (m/z 365.32), rispetto al *wild type* (WT) (Li et al., 2022).

T1 CREA-SAAB	°Brix	Acidità	T1 L.276	°Brix	Acidità
SH3_5_16	7,97	0,66	G#1-2_8	8,40	0,89
SH3_5_14	6,87	0,83	G#1-1_5	8,00	0,75
SH3_3_2	6,67	0,45	G#1-5_4	8,00	0,68
SH3_3_8	6,57	0,66	G-CT	6,61	0,61
SH3_5_7	6,23	0,71			
S-CT	5,25	0,67			

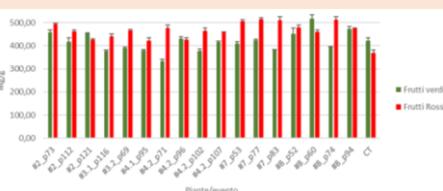


Fig. 7 °Brix e contenuto in zuccheri in linee editate per il gene *LINS*. Aumento °Brix in linee T1 editate (CRISPR/Cas9) del genotipo CREA-SAAB e L.276 rispetto al controllo (S-CT, G-CT rispettivamente; tabelle a sinistra). Aumento del contenuto in zuccheri in frutti rossi e verdi in linee T1 editate (CRISPR/Cfp1) del genotipo Ailsa Craig rispetto al controllo (CT; grafico a destra). (Si ringrazia per la collaborazione Fabio D’Orso, CREA Genomica e Bioinformatica, Roma, Italia)

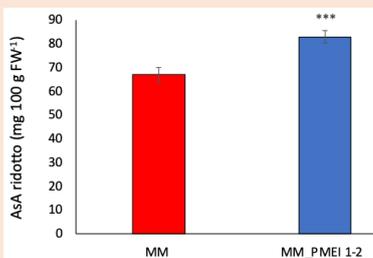


Fig. 8 Aumento del contenuto in acido ascorbico (AsA) in una linea *ko* (CRISPR/Cas9) per il gene *PMEI*. Il pomodoro è una delle principali fonti di antiossidanti, tra cui l’acido ascorbico (AsA), al mondo. Frutti di un mutante *ko* per un gene inibitore della fosfometilesterasi (*PMEI*) (in blu) contengono circa il 20% in più di AsA rispetto al genotipo controllo MoneyMaker (MM, in rosso). Analisi preliminari in *hairy root* supportano anche il ruolo del gene dell’ascorbato ossidasi (AO) nell’accumulo di AsA.

Risultati WP3 – Modulazione processo fotosintetico

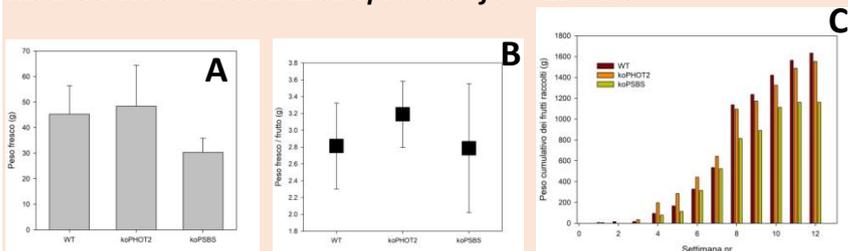


Fig. 9 Fenotipizzazione mutanti *ko* (CRISPR/Cas9) per i geni *PHOT2* e *PSBS*. Le linee *ko phot2* hanno mostrato una crescita vegetativa simile alla linea controllo, mentre nelle piante *ko psbs* l’accumulo di biomassa è risultato significativamente ridotto (A). La linea *ko phot2* si è distinta per frutti di massa mediamente maggiore rispetto al genotipo controllo (B) e per produzione anticipata (C). Entrambi i mutanti sperimentano un livello di stress ossidativo “basale” maggiore delle piante controllo, sarà quindi interessante valutare l’accumulo di metaboliti aromatici nei frutti.

Impatto

- *know-how* diffuso sull’applicazione delle TEA in pomodoro (metodi, protocolli e tecniche);
- ampio repertorio di materiali biologi unici in pomodoro potenzialmente utili per il miglioramento genetico del pomodoro (stress biotici, abiotici, qualità);
- materiali disponibili per prove sperimentali di campo.

Publicazioni su riviste scientifiche internazionali

1. Carabelli M., Turchi L., Morelli G., Østergaard L., Ruberti I. & Moubayidin L. (2021) Coordination of biradial-to-radial symmetry and tissue polarity by HD-ZIP II proteins. *Nat Commun* 12, 4321.
2. Tognacca R.S., Carabelli M., Morelli G., Ruberti I. & Botto J.F. (2021) ATHB2 is a negative regulator of germination in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Sci Rep* 11, 9688.
3. Luciola A., Tavazza R., Baima S., Fatyol K., Burgyan J. & Tavazza M. (2022) CRISPR-Cas9 Targeting of the eIF4E1 Gene Extends the Potato Virus Y Resistance Spectrum of the *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée. *Front. Microbiol.* 13, 873930.
4. D'Amelia V., Staiti A., D'Orso F., Maisto M., Piccolo V., Aversano R., & Carputo D. (2022). Targeted mutagenesis of StISAC stabilizes the production of anthocyanins in potato cell culture. *Plant Direct*, 6, e433.
5. Nicolìa A., Andersson M., Hofvander P., Festa G. & Cardi T. (2021) Tomato protoplasts as cell target for ribonucleoprotein (RNP)-mediated multiplexed genome editing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 144, 463–467
6. Li J., Scarano A., Mora Gonzales N., D'Orso F. et al. (2022) Biofortified tomatoes provide a new route to vitamin D sufficiency. *Nat. Plants* 8, 611–616.
7. Cuccurullo A., Nicolìa A., Vurro M. & Cardi T. (2022) Genetic and agronomic approaches to control *Orobanche* and *Phelipanche* spp. parasitic weeds in vegetables and legumes. *Rom. J. Hortic.* III, 63-82.
8. Liu Y., Andersson M., Granell A., Cardi T., Hofvander P. & Nicolìa A. (2022). Establishment of a DNA-free genome editing and protoplast regeneration method in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Reports*, 41, 1843–1852.
9. Cuccurullo A., Nicolìa A. & Cardi T. (2022). Resistance against broomrapes (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) in vegetables: a comprehensive view on classical and innovative breeding efforts. *Euphytica*, 218, 82.
10. Baima S., De Giacomo M., Giovannelli V., Ilardi V., Pietrangeli B. & Rastelli, V. (2023). Cisgenesis: A European Union (EU) Perspective. In: Chaurasia, A., Kole, C. (eds) *Cisgenic Crops: Safety, Legal and Social Issues. Concepts and Strategies in Plant Sciences*. Springer, Cham.
11. Verslues P.E, Bailey-Serres J., Brodersen C., Buckley T.N., Conti L. et al. (2023) Burning questions for a warming world: 15 unknowns in plant abiotic stress. *The Plant Cell*, 35, 67–108.
12. Demurtas O.C., Nicolìa A., & Diretto G. (2023). Terpenoid Transport in Plants: How Far from the Final Picture? *Plants*, 12, 634.
13. Krukowski P.K., Colanero S., Sutti A., Martignago D., Conti L., How changes in ABA accumulation and signalling influence tomato drought responses and reproductive development. *Articolo in valutazione in IJPB*
14. D'Orso F., Hill L., Appelhagen I., Lawrenson T., Possenti M., Li J., Harwood W., Morelli G., Martin C. Exploring the metabolic and physiological roles of HQT in *S. lycopersicum* by gene editing. *Articolo sottomesso e in fase di revisione*

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Punzo P., Boccia M., D'Agostino N., Nicolìa A., Cardi T. "Improving tomato osmotic stress resistance by editing key component of the proline catabolism" Proceedings of the 63th Annual Congress of the Italian society of Agricultural Genetics, Napoli, Italy, 10-13 Settembre 2019
2. Palma D., Sestili S., Nicolìa A., D'Agostino N. & Cardi T. Agro-vector development in tomato to increase solid soluble content via cisgenesis. 63 SIGA Annual Congress Napoli, 10 -13 Settembre 2019 (Poster)
3. Contaldi F., Nicolìa A., Festa G., D'Agostino N., Facchiano A., Scafuri B., Camerlengo F. & Cardi T. 2019 Investigating broomrape resistance in tomato by CRISPR/Cas9 genome editing. 63 SIGA Annual Congress Napoli, 10 -13 Settembre 2019 (Poster)
4. D'Orso F., Hill L., Appelhagen I., Lawrenson T., Possenti M., Li J., Harwood W., Morelli G., & Martin C. Evaluating biochemical and physiological effect of CRISPR/Cas9-mediated HQT gene editing in *S. lycopersicum*. SOL International Online Meeting 2020. 09-11 Novembre 2020 (Poster)
5. Principio L., Francesca S., Barone A. & Rigano M. M. Higher Yield and Fruit Quality of a *Solanum pennellii* Introgression Line. IECAG 2021 The 1st International Electronic conference on agronomy, 3-17 Maggio 2021 (Poster)
6. Cuccurullo A., Yoneyama K., Bouwmeester H., D'Agostino N., Festa G., Camerlengo F., Contaldi F., Cardi T. & Nicolìa A. CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis as a Strategy to Develop Resistant Tomato Plants against Parasitic Weeds. IECAG 2021 The 1st International Electronic conference on agronomy, 3-17 Maggio 2021 (Presentazione orale)
7. Nicolìa A., Cuccurullo A., Contaldi F., Navarro Garcia A., Festa G., Camerlengo F., D'Agostino N., Facchiano A., Scafuri B., Rigano M., Vurro M. & Cardi T. Approcci genetici innovativi per il controllo di Orobanche in pomodoro, XIII Giornate Scientifiche SOI "I traguardi di Agenda 2030 per l'ortoflorofrutticoltura italiana", Catania, 22-23 Giugno 2021, Acta Italus Hortus 26: 23 (Presentazione orale)
8. Punzo P., Ruggiero A., D'Agostino N., Grillo S., Cardi T., Nicolìa A. & Batelli G. "Improving abiotic stress tolerance in tomato by CRISPR/Cas9 editing of key stress response regulators" Proceedings of the Plant Biology Europe (PBE) Congress, Torino, 28 Giugno – 1 Luglio 2021 (Poster)
9. Principio L., Barone A., D'ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G. & Rigano M.M. Improving the nutritional quality of tomato fruits using genome editing technologies. Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology, 14-15 Settembre 2021 (Poster)
10. Olivieri F., Francesca S., Svevi F., Chiaiese P., Barone A., D'Agostino N. & Rigano M.M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis to improve the nutritional quality of tomato fruits. 64 SIGA Annual Congress, Online, 14-16 Settembre 2021(Poster)
11. Cuccurullo A., Contaldi F., Camerlengo F., Festa G., Yoneyama K., D'Agostino N., Rigano M.M., Olivieri F., Navarro A., Cardi T., Facchiano A., Scafuri B., Vurro M. & Nicolìa A. 2021 Innovative genetic approaches to explore resistance against the parasitic weed *Phelipanche ramosa* in tomato. 64 SIGA Annual Congress, Online, 14-16 Settembre 2021 (Poster)

12. Principio L., Barone A., D'ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G., Rigano M.M., CRISPR/Cas9 editing for improving the nutritional quality of tomato fruits. 64 SIGA Annual Congress, Online, 14-16 Settembre 2021 (Poster)
13. Nicolìa A., Cuccurullo A., Contaldi F., Yoneyama K., Camerlengo F., Festa G., Navarro A., D'Agostino N., Facchiano A., Scafuri B. & Cardi T., CRISPR/Cas9-Mediated mutagenesis as a strategy to develop resistant tomato plants against Orobanche, COST Action CA18111 (PlantEd), 2nd PlantEd Conference, Lecce, 20-22 Settembre 2021 (Presentazione orale)
14. D'Orso F., Possenti M., Baima S., Morelli G., Effective CRISPR-mediated knockout mutations in plants requires translation reinitiation avoidance. COST Action CA18111 (PlantEd), 2nd PlantEd Conference, Lecce, 20-22 Settembre 2021 (Presentazione orale)
15. Punzo P., Ruggiero A., D'Agostino N., Grillo S., Cardi T., Nicolìa A., Batelli G. "CRISPR/Cas9 Editing Of Proline Metabolism And SOS Pathway Genes For Improving Abiotic Stress Tolerance In Tomato" COST Action CA18111 (PlantEd), 2nd PlantEd Conference, Lecce, 20-22 Settembre 2021 (Presentazione orale)
16. Principio L., Barone A., D'Ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G. & Rigano M.M. CRISPR/Cas9 editing for improving the nutritional quality of tomato fruits. Workshop "The colors and antioxidants of fruits and vegetables: what genes and horticultural practices can do", SOI – SIGA, 30 Settembre, 2021 Online (Poster)
17. Cuccurullo A., Yoneyama K., Bouwmeester H., D'Agostino N., Festa G., Camerlengo F., Contaldi F., Cardi T. & Nicolìa A. 2022 Resistance against broomrapes (Orobanche and Phelipanche spp.) in tomato: phenotypic comparison of CRISPR/Cas9 tomato mutants targeting genes responsible for the biosynthesis of strigolactones. XVI FISV Congress, Reggia di Portici, Napoli, 14 – 16 Settembre 2022 (Poster)
18. Principio L., Barone A., D'Ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G. & Rigano M.M. Use of CRISPR/Cas9 to study ascorbic acid metabolism in a *S. pennellii* introgression subline. XVI FISV Congress 2022, Reggia di Portici, Napoli, 14 – 16 Settembre 2022 (Poster)
19. Cuccurullo A., Yoneyama K., Bouwmeester H., D'Agostino N., Festa G., Camerlengo F., Contaldi F., Cardi T. & Nicolìa A., Phenotypic comparison of Crispr/cas9 tomato mutants targeting genes responsible for the biosynthesis of strigolactones, 65 Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Piacenza, 6-9 Settembre 2022 (Presentazione orale)
20. Palma D., D'Orso F., D'Agostino N., Morelli G., Cardi T. & Sestili S. Evaluation of gRNAs and validation of dCAPS for the editing of the LIN5 gene in tomato. 65 Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Piacenza, 6-9 Settembre 2022 (Poster)
21. Colanero S., Landoni M., Damiano M., Bosc A., Cioffi S., Galbiati M., Tonelli C. & Conti L., Engineering water use in tomato by generating novel allelic variation for ABA signaling genes via Crispr-Cas9. 65 Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Piacenza, 6-9 Settembre 2022 (Poster)

22. Nicolia A., Cuccurullo A., Andersson M., Yoneyama K., Contaldi F., Camerlengo F., D'Agostino N., Festa G., Hofvander P. & Cardi T., CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis in tomato: application to parasitic plant resistance, technical developments, and future perspectives, XX EUCARPIA Meeting of the Tomato Working Group, Valencia, Spagna, 31 Maggio – 3 Giugno 2022 (Presentazione orale)
23. Punzo P., Ruggiero A., Cirillo V., Maggio A., D'Agostino N., Cardi T., Nicolia A., Grillo S. & Batelli G. Gene editing of key effectors improves tomato abiotic stress tolerance” Proceeding of the XX EUCARPIA Meeting of the Tomato Working Group, Valencia, Spagna, 31 Maggio- 3 Giugno 2022 (Poster)
24. Principio L., Barone A., D'Ambrosio C., Stigliani A.L., Giorio G. & Rigano M.M. Use of CRISPR/Cas9 to study ascorbic acid metabolism in a *S. pennellii* introgression subline, XX EUCARPIA Meeting of the Tomato Working Group, Valencia, Spagna 31 Maggio- 3 Giugno 2022 (Poster)
25. Li J., Scarano A., Gonzales N., D'Orso F., Yue Y., Nemeth K., Saalbach G., Hill L., Martins C. de O., Moran R., Santino A. & Martin C. CRISPR/Cas9 mediated genome editing to develop Vitamin D-biofortified tomatoes., COST Action CA18111 (PlantEd), 3rd PlantEd Conference. Dusseldorf, Germania, 5-7 Settembre 2022. (Presentazione Orale)
26. Scarano A., Li J., D'Orso F., Santino A. & Martin C., CRISPR/Cas9-mediated genome editing for VitaminD biofortification in Solanaceous species, COST Action CA18111 (PlantEd), 3rd PlantEd Conference. Dusseldorf, Germania, 5-7 Settembre 2022. (Presentazione Orale)
27. Colanero S., Landoni M., Damiano M., Bosc A., Cioffi S., Galbiati M., Tonelli C. & Conti L., Engineering water use in tomato by generating novel allelic variation for ABA signaling genes via Crispr-Cas9, XVI FISV Congress 2022, Reggio di Portici, Napoli, 14 – 16 Settembre 2022 (Poster)

Ciaciulli A.¹, Salonia F.^{1,2}, Poles L.^{1,2}, Pappalardo H.D.¹, Malnoy A.³, Pindo M.³, Di Stefano G.², Di Guardo M.², Bennici S.², Russo M.P.¹, Caruso M.¹, Caruso P.¹, Gentile A.², La Malfa S.², Licciardello C.¹

1 CREA Centro di ricerca Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura (Acireale, Catania); 2 Di3A Università di Catania; 3 Centro Ricerca e Innovazione, Fondazione Edmund Mach (S. Michele all'Adige, Trento).

Abstract: Per rispondere alla domanda dei consumatori che richiedono agrumi arricchiti in sostanze antiossidanti e mandarini senza semi, sono state utilizzate le tecnologie di evoluzione assistita per (WP1) coniugare antocianine e licopene in un unico agrume e (WP2) ridurre il numero o la dimensione dei semi. WP1: sono stati sintetizzati costrutti cisgenici marker-free per *Ruby*, marcatore della pigmentazione antocianica (collab. FEM), utilizzati per trasformare varietà di agrumi con licopene. Parallelamente è stato prodotto un costrutto di genome editing per β -*LCY2*, responsabile della conversione di licopene in beta-carotene, per editare varietà di arancio a polpa rossa. Inoltre, attraverso un'analisi comparativa tra varietà di arancio con e senza licopene, è stato individuato il gene candidato *GTP binding protein*, che è stato utilizzato per editare pomodoro (collab. CREA-GB) e agrumi. È stato sintetizzato un costrutto a singola guida per editare contemporaneamente due geni *CEN-like* per anticipare la fioritura in arancio e Carrizo, da associare, in prospettiva, a tutti i costrutti per migliorare caratteri del frutto. WP2: È stato editato *lku1* (omologo di *Arabidopsis*, noto per ridurre la dimensione dei semi) in varietà di arancio e pompelmo ricche in semi. È stato prodotto un costrutto per prime editing per il gene *sRNasi* tutt'ora in validazione. Il Di3A ha prodotto un costrutto di genome editing per *Sm-Rnasi*. Il gene è derivato dal sequenziamento del mandarino Monreal (autocompatibile) e Comune (autoincompatibile).

Risultati WP1. I 5 costrutti cisgenici per *Ruby* differiscono tra loro per la resistenza a kanamicina (*nptII*), per il gene marcatore visivo *VvMYBA1*, alcuni includono anche la cassetta Cas9-*CEN-like*, il tutto racchiuso tra i siti FRT/Flp, che attraverso uno shock termico (es. 48 °C per 2h) consente l'attivazione della Flippasi e la conseguente eliminazione della cassetta (Fig. 1; Tab. 1). I fenotipi degli espianti evidenziano il successo dell'utilizzo di *VvMYBA1* (Fig. 2). Le piantine cisgeniche innestate su Carrizo e su semenzali di Carrizo sono in fase di valutazione (Fig. 3)



Fig. 1. Costrutti cisgenici per *Ruby*.

Costrutto	Espianti positivi (# per varietà)	Piantine cisgeniche (# per varietà)	Piantine marker-free (# per varietà)
D862		4-SR, 26-VS	1-SR, 4-VS
E936	47-SR, 25-RB, 23-OV, 16-VS	10-SR, 16-RB, 2-VS	
E526		6-VS	1-BB, 1-VS, 1-SR
E527		3-VS, 2-BB	1-BB
RubMyc	11-SR	5-SR	

Tab. 1. Risultati costrutti cisgenici. SR = pompelmo “Star Ruby”; VS, BB, OV = arancio “Vaniglia sanguigno”, “Bud Blood”, “Ovale”; RB = pompelmo “RedBlush”.



Fig. 2. Espianti di SR cisgenici per E936 con marker visivo *VvMYBA1*.
A) non chimerico.
B) chimerico.

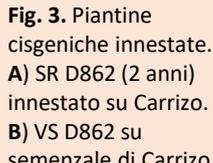
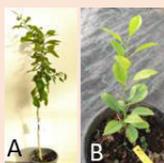


Fig. 3. Piantine cisgeniche innestate.
A) SR D862 (2 anni) innestato su Carrizo.
B) VS D862 su semenzale di Carrizo.

Al fine di far accumulare licopene in arance con antocianine, si è optato per un costrutto di **genome editing a doppia guida per β -LCY2**. Questo si è rivelato un approccio di successo perché, oltre a indurre l’editing in una o entrambe le sgrNAS, ha causato anche la delezione e/o l’inversione della regione tra i siti di taglio delle sgrNAS, ma soprattutto è stato più facile individuare gli editati sin dalla prima amplificazione grazie alla differente taglia visualizzata su gel. Sono state prodotte 29 piante di arancio pigmentate, attualmente in valutazione in serra (Fig. 4). L’editing di **GTP binding protein (GTP_bp)** è stato fatto su pomodoro (pianta modello) che ha mostrato già in T0, frutti a maturazione ritardata e tomentosità (Fig. 5). In arancio e mandarino sono state ottenute piante trasformate, sebbene l’editing sia ancora da verificare. Questi risultati sono stati possibili grazie all’ottimizzazione di due processi fondamentali, che in *Citrus*, fino ad oggi, hanno rappresentato essere un fattore limitante, ovvero la rigenerazione di varietà di arancio e mandarino pigmentato (mai valutate prima), e il mininnesto (Fig. 6).



Fig. 4. Piante in serra di arancio DS, BB, Vaccaro, Tarocco TDV e Lempsò, editate in β -LCY2.



Fig. 5. Pomodoro editato in GTP_bp.

Nesto – varietà editata o cisgenica



Carrizo - portinnesto

Fig. 6. Dettaglio miniinnesto a “Z”

È stato sintetizzato un costrutto di **Prime editing per Sm-RNasi** (Fig. 11). La sgRNA e l'RT Template sono stati disegnati sul gene *Cs_ont_1g028030* per correggere una piccola delezione, e quindi il frame di lettura, ristabilendo così la funzionalità della proteina S-Rnasi e l'autoincompatibilità. Il costrutto marker-free (FLP-Frt) è equipaggiato con il marcatore visivo *VvmybA1*, il gene per la fioritura anticipata *FT3* sotto promotore floematico CBL. Le trasformazioni sono tutt'ora in corso.

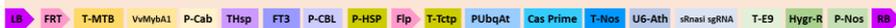


Fig. 11 Costrutto Prime editing.

WP2-Di3A. Attraverso il sequenziamento del clementine Monreal e Comune, sono stati caratterizzati i geni candidati coinvolti nel meccanismo di sterilità in *Citrus*. 7781 regioni geniche presentano SNPs di cui 2110 hanno un effetto significativo sulla sequenza. La validazione dei geni candidati coinvolti nel processo riproduttivo mediante RNAseq ha confermato che le due cultivar condividono il genotipo per S_7S_{11} ; negli stili di Monreal è assente l'espressione dell'S-Rnasi S_7 (Fig. 12), mentre nessuna differenza è presente per S_{11} . Sono stati messi a punto protocolli di rigenerazione e trasformazione di espianti di agrumi, sia da tessuti giovani che maturi di diverse varietà di mandarino e clementine. È stato prodotto un costrutto di genome editing per il gene *Sm-Rnasi* di arancio che contiene anche la cassetta per l'espressione del gene *Ft* per ridurre il periodo di giovanilità delle piante ottenute.



Fig. 12. Confronto reads di clementine Comune e Monreal allineate sul gene S_7 -Rnasi.

Attualmente si dispongono 10 piante innestate *nptII* e *Cas9* positive (Fig. 13), il cui sequenziamento per la verifica degli eventi di editing è in corso.

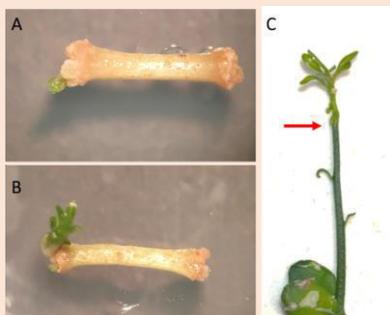


Fig. 13. Internodi di Doppio Sanguigno con germogli rigenerati a 1 (A) e 2 (B) mesi dalla trasformazione; innesto su citrange “Carrizo” (C).

Impatto: I risultati di CITRUS trovano riscontro a diversi livelli di impatto. Il primo è di tipo **tecnico**. L’ottimizzazione dei protocolli di (a) rigenerazione di varietà di arancio e mandarino con antocianine, altre con licopene, anche all’interno di pompelmo e pummelo (tutte mai valutate prima), (b) trasformazione partendo da espianti diversi dai più usati internodi, e (c) il mininnesto avrà un impatto sulla comunità scientifica che si occupa di biotecnologie in agrumi, in quanto ha superato quelli che rappresentano tra i colli di bottiglia più importanti. Dal punto di vista **scientifico**, i risultati prodotti sono i primi che in agrumi riferiscono l’utilizzo delle tecnologie di evoluzione assistita applicate per il miglioramento della qualità dei frutti, i primi che hanno sviluppato costrutti cisgenici marker-free. Relativamente ai caratteri studiati, sia il miglioramento nutrizionale dei frutti sia la produzione di frutti apireni potrà avere un impatto sui **consumatori**, ma anche sui **produttori** che potranno mantenere le varietà di pregio e le tecniche colturali annesse, ma con frutti migliorati. Infine disporre di piante editate dalla potenziale fioritura anticipata consentirà di accelerare la fenotipizzazione dei caratteri che attraverso la cisgenesi e il genome editing riguarderanno i frutti e i fiori.

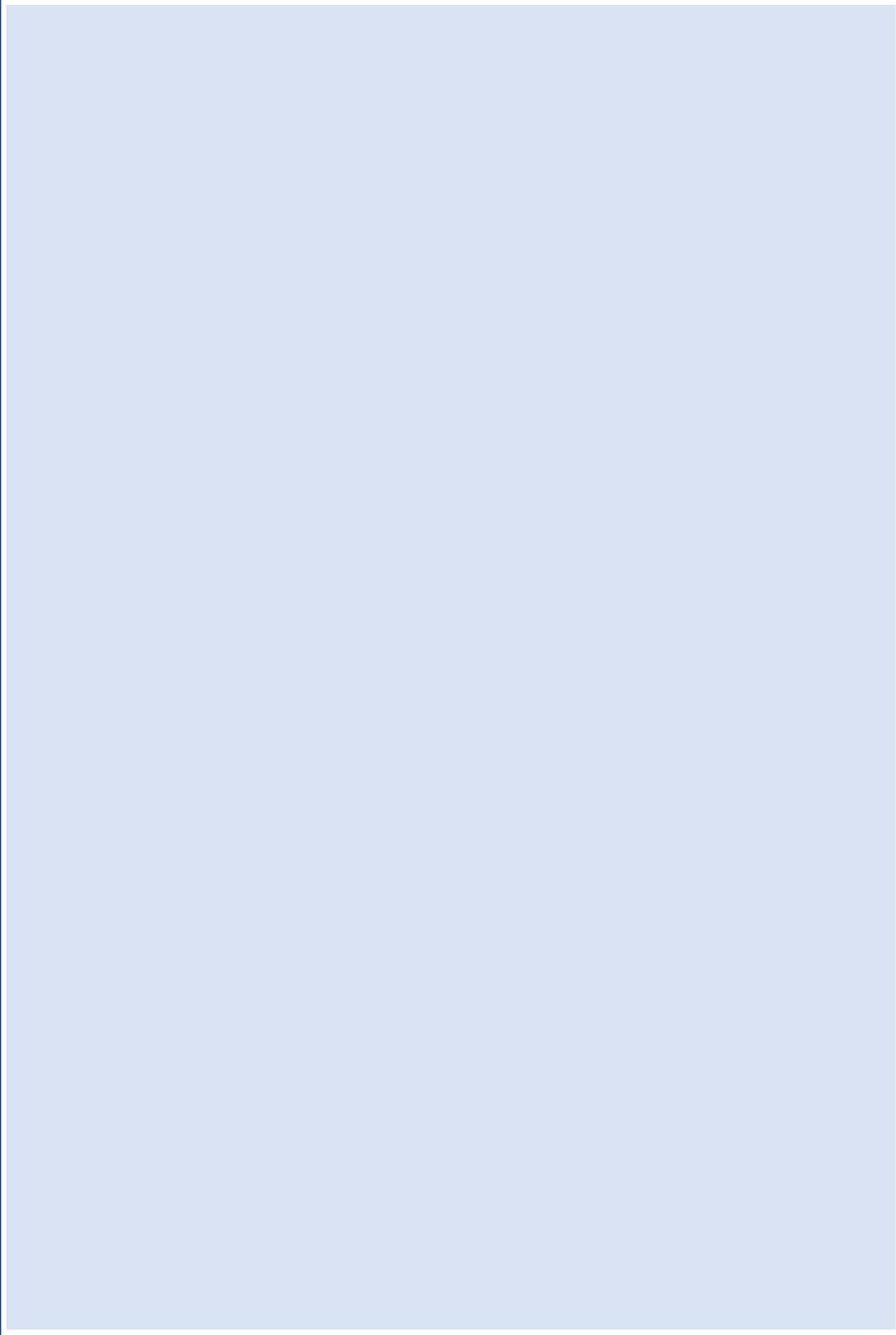
Publicazioni su riviste internazionali

1. Poles L, ..., La Malfa S. (2020) Recent Advances of In Vitro Culture for the Application of New Breeding Techniques in Citrus. *Plants* 9, 938
2. Catalano C., ..., Licciardello C. (2020) Target-Genes Reveal Species and Genotypic Specificity of Anthocyanin Pigmentation in Citrus and Related Genera. *Genes* 11, 807
3. Salonia F., ..., Licciardello C. 2020. New Plant Breeding Techniques in Citrus for the Improvement of Important Agronomic Traits. A Review. *Frontiers in Plant Science* 11, 1-15
4. Salonia F, ..., Licciardello C. (2022) A dual sgRNA-directed CRISPR/Cas9 construct for editing the fruit-specific β -cyclase 2 gene in pigmented citrus fruits. *Frontiers in Plant Science* 13, 975917
5. Ciacciulli A., ..., Licciardello C. A marker-free cisgenesis/genome editing system, a new tool to produce fortified citrus fruits. *Acta horticulturae* 2023 in press
6. Nerva L., ..., Licciardello C. (2023) The role of Italy in the use of advanced plant breeding techniques on fruit trees: state of the art and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 977
7. Poles L., ..., Licciardello C. (2023) Genome editing of IKU1 applied to induce seedlessness in citrus (Submitted to *Frontiers in Plant Science*)

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Salonia F., ..., Licciardello C. – Poster: Target and base editing approaches to induce lycopene accumulation in anthocyanin-rich sweet oranges. 7th International Horticulture Research conference 1-30.07.2020 (on line)
2. Ciacciulli A., ..., Licciardello C. – Poster: The base editing approach to enrich orange fruit in nutraceuticals. 7th International Horticulture Research conference 1-30.07.2020 (on line)
3. Pappalardo H.D., ..., Licciardello C. – Poster: Preliminary results on the regeneration and transformation of citrus varieties addressed to produce fruits with improved traits. 7th International Horticulture Research conference 1-30.07.2020 (on line)
4. Salonia F., ..., Licciardello C. - Poster - Analisi quali-quantitativa di frutti di arancio, pompelmo e pummelo caratterizzati dalla presenza di licopene. XIII Giornate SOI. Catania 22-23.06.2021

5. Salonia F., ..., Licciardello C. – Poster: Dati preliminari sull'utilizzo di due approcci di editing genico al fine di coniugare la presenza di licopene e di antocianine in frutti di arancio dolce. XIII Giornate SOI Catania 22-23.06.2021
6. Poles L., ..., Licciardello C. – Poster: Genome editing applicato agli agrumi per l'induzione di apirenia nei mandarini. XIII Giornate SOI. Catania 22-23.06.2021
7. Ciacciulli A., ..., Licciardello C. – Poster: The effect of the light on the control of anthocyanin pigmentation of fruits, flowers, and shoots of Citrus and relatives. 64° SIGA. On line 14-16.09.2021
8. Salonia F., Licciardello C. – Orale: CRISPR/CAS9 to improve sweet oranges fruit quality combining anthocyanins and lycopene. 64° SIGA. On line 14-16.09.2021
9. Poles L., ..., Licciardello C. – Poster: Genome editing applied to citrus to induce seedlessness. 64° SIGA. On line 14-16.09.2021
10. Ciacciulli A., ..., Licciardello C. – Orale: A marker-free cisgenesis/genome editing system, a new tool to produce fortified citrus fruits. IHC2022 14-19.08.2022, Angers (Francia)
11. Ciacciulli A., Licciardello C. – Orale: Colourimetric, genetic, transcriptomic and metabolomic approaches on four lycopene-rich citrus varieties for broad applications in biotechnology. LXV SIGA, Piacenza, 6-9.09.2022
12. Poles L., ..., Licciardello C. – Poster: Genome editing of IKU1 to obtain citrus seedless fruits. ICC2022 5-9.11.2022 Mersin (Turchia)
13. Bennici S., ..., La Malfa S. – Orale: Next-generation sequencing technologies reveal novel candidate genes responsible for self-incompatibility in Citrus clementina. ICC2022 5-9.11.2022 Mersin (Turchia)
14. Ciacciulli A., ..., Licciardello C. – Orale: The use of modern biotechnology approaches to improve citrus fruit quality. Plant & Animal Genome 2023. (Fruit&Nuts) 14-18.01.2023, S. Diego (California)



Zelasco S¹., Bashir M.A¹., Carbone F.¹, Salimonti A.¹, Romano E.¹, Pellegrino M¹., Scalabrin S.², Scaglione D.²

1 I CREA Centro di ricerca Olivicoltura Frutticoltura Agricoltura , Rende, Italy. 2 IGA Technology Services, Udine, Italy

Abstract

Il miglioramento genetico dell'olivo è di difficile attuazione a causa dei lunghi tempi di generazione della specie. Quindi per questa specie l'editing genomico rappresenta uno degli strumenti più efficaci per l'inserimento puntuale di tratti di interesse. Tuttavia, l'olivo è recalcitrante alla rigenerazione. Inoltre, sono pochi i geni in olivo ben caratterizzati. L'obiettivo generale è stato quello di creare i presupposti per l'applicazione del genome editing anche in olivo, attraverso lo sviluppo di un protocollo di rigenerazione e l'individuazione di varianti alleliche editabili. È stato messo a punto un protocollo di rigenerazione via embriogenesi somatica da tessuto adulto. L'approccio mirato di RNAseq su un panel di 257 geni delle vie biosintetiche degli acidi grassi e dei fenilpropanoidi ha permesso di individuare almeno 2 geni potenzialmente editabili. Dati fenotipici di composizione chimica dell'olio sono stati raccolti per 4 anni ed è stato selezionato un panel di 136 varietà per il GWAS. È stato prodotto un panel di circa 1000 geni sequenziati con tecnologia SPET per il GWAS che è in fase di ultimazione.

Risultati

È stato messo a punto un protocollo di rigenerazione via embriogenesi somatica da tessuto adulto sui genotipi indicati in Fig.1 e Fig.2. La rigenerazione è illustrata in Fig.3. Il metodo è descritto in sintesi nella Tab.1. Il protocollo è stato recentemente pubblicato (Bashir et al., 2022).



Figura 1
genotipo CS3-T *in vitro*



Figure 2
plantule da incrocio controllato *in vitro*

Descrizione protocollo	
Stabilizzazione germogli	Apici del germoglio OM medium, mannitolo 3.6%, L-Glutammina 2.2 g/L, Zeatina (4.56 M) GA3 1.44 M
Induzione ES	Espianto: apici del germoglio Terreno liquido, 4 giorni in agitazione (100rpm) MS half-strength, vitamine MS full -strength, 100 mg/L myo-inositol, 30 μM TDZ 0.54 μM NAA
Espressione fase di maturazione	Terreno ECO modificato , contenente 1/4 macro-OM; 1/4 micro-MS; 1/2 NN vitamine; 1g/L caseina idrolizzata; 0.55g/L di L-glutammina, 2% saccarosio 0.4 M of benzylaminopurine (BAP), 0.49 of M 6-, -dimethylallylamino) purine (2iP), 0.25 M indole-3-butyrac acid (IBA) e cefotaxime (200mg/L). Inibitore di etilene Nitrato di Argento (AgNO3) 40 μM



Figure 3. Rigenerazione del genotipo CS3-T via embriogenesi somatica

Risultati

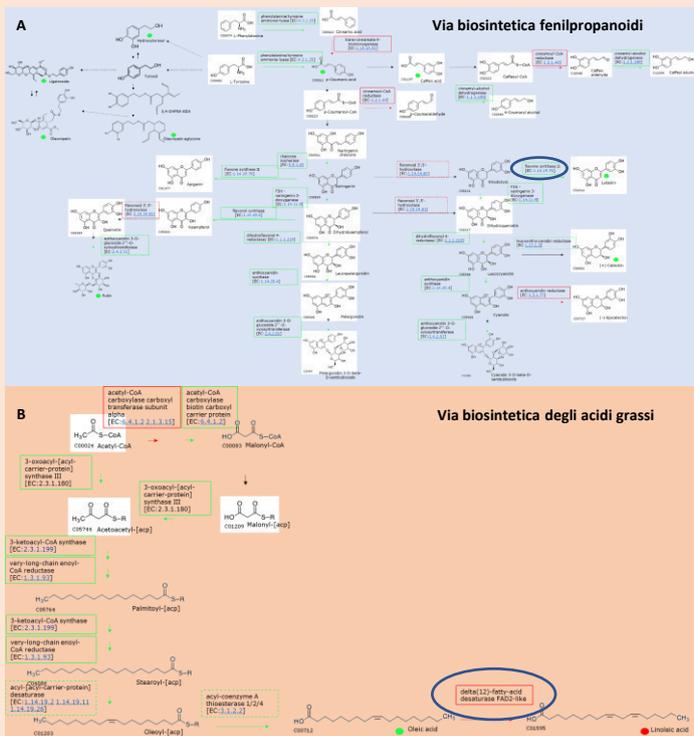


Figura 4: i geni sovraespressi nella biosintesi dei fenilpropanoidi (A) e acidi grassi (B) nelle varietà Cellina di Nardo' (alto contenuto di fenoli) e Ruvèia (alto contenuto di acido oleico) sono indicati in verde così come l'accumulo del corrispondente metabolita. In rosso sono indicati i geni sotto-regolati. I geni potenzialmente editabili sono evidenziati in blu

Impatto:

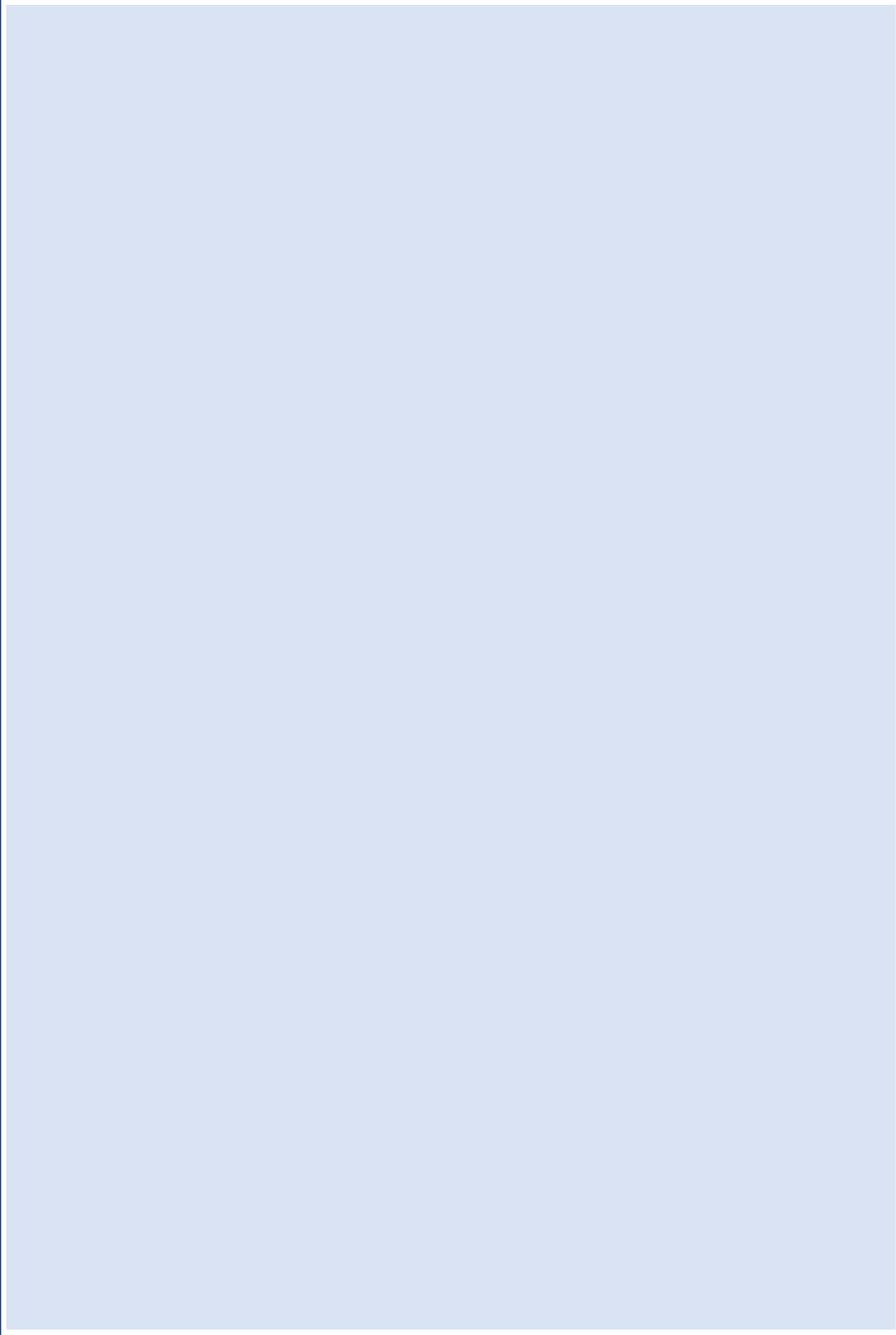
La messa a punto del protocollo di rigenerazione in olivo apre la porta all'editing genomico anche per questa specie, attraverso la trasformazione genetica stabile. L'individuazione di geni candidati potenzialmente editabili di alcune vie biosintetiche cruciali per la qualità dell'olio, ha permesso l'avanzamento dello stato delle conoscenze in olivo per la regolazione delle pathways di composti di elevato valore nutraceutico (acido oleico, luteolina) e per il miglioramento della qualità dell'olio attraverso l'approccio di editing.

Publicazioni su riviste scientifiche internazionali

1. Bashir M.A., Silvestri C., Salimonti A., Rugini E., Cristofori V., Zelasco S. (2022) Can Ethylene Inhibitors Enhance the Success of Olive Somatic Embryogenesis? *Plants*, 11, 168.
2. Sirangelo T.M., Forgione I., Zelasco S., benincasa C., Perri E., Vendramin E., Angilè F., Fanizzi F.P., Sunseri F., Salimonti A., Carbone F.* (2023) Combined transcriptomic and metabolomic approach revealed a close relationship between light biological control, fatty acids and phenylpropanoids biosynthesis in olive (Submitted to *Plant Physiology and Biochemistry*)

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Bashir M.A., Silvestri C., Salimonti A., Zelasco S., Rugini E. Can ethylene inhibitors enhance the success of olive somatic embryogenesis? LXIII Siga Annual Congress, Napoli, 10-13 september 2019.
2. Angilè F., Girelli C.R., Del Coco L., Calò F., Zelasco S., Pellegrino M., Salimonti A., Romano E., Fanizzi F.P. 6th International Conference of Foodomics. 14-16 October 2020, Cesena, Italy
3. Angilè F., Foianini I., Fanizzi F.P., Pellegrino M., Romano E., Ripoli A.G., Pellicori V., Lo Feudo G., Santilli E., Benincasa C., Mancini S., Cattivelli L., Di Gaspero G., Scaglione D., Scalabrin S., Morgante M., Zelasco S. 2021 Population genetic structure and phenotyping of Italian varieties aiming to a genome wide association study for olive oil chemical composition. LXIV SIGA Annual Congress, 14-16 September 2021, online
4. Sirangelo T.M., Salimonti A., Forgione I., Zelasco S., Vendramin E., Angilè F., Fanizzi F.P., Benincasa C., Carbone F. (2021) Genetic and development factors affect the expression of genes involved in fatty acid and phenylpropanoid biosynthesis and in light signal transduction in olive fruits. Proc. LXIV Congresso SIGA (Società Italiana di Genetica Agraria), 14-16 Settembre 2021, Poster 4.10
5. Carbone F. 2021 Influenza della luce sul processo di sviluppo dell'olivo: identificazione di geni associati per la selezione di cultivar più produttive e di qualità. Relatore al webinar "La filiera olivicoloolearia, un sistema agroalimentare sostenibile da ampliare e potenziare", organizzato nell'ambito delle celebrazioni della Giornata Mondiale dell'alimentazione 29 ottobre 2021.
6. Bashir M.A., Zelasco S., Salimonti A., Atrouz K., Cristofori V., Silvestri C. Allestimento in coltura *in vitro*, moltiplicazione e radicazione per la propagazione e conservazione di varietà e accessioni della biodiversità olivicola IV Convegno Nazionale sulla micropropagazione. Bari 12-14 ottobre 2022
7. Zelasco S., Medda S., Marchese A., Caruso T., Marra F. P., Vatrano T. P., Cesari G., Santilli E., Angilè F., Fanizzi F. P., Carbone F., Salimonti A., Perri E., Scalabrin S., Morgante M., Cattivelli L., Baldoni L., Conforti F. L., Mulas M. Caratterizzazione genetica di antichi olivi italiani Proc. V Convegno nazionale dell'Olivo e dell'Olio, Alghero (SS), 26-28 ottobre 2022, Poster 53, ISBN 978-88-903404-7-5



Laura M. ¹, Forti C. ^{1,2}, Barberini S. ^{1,3}, Ciorba R. ^{1,4}, Mascarello C. ¹,
Giovannini A. ¹, Ruffoni B. ¹, Savona M. ¹

1 CREA Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Sanremo; 2 Istituto di Biologia e Biotechnologia Agraria (IBBA CNR), Milano; 3 Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP- CNR), Sesto fiorentino; 4 CREA Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Roma.

Abstract:

Il miglioramento della resistenza a *Peronospora belbaharii* nella cv di basilico FT Italiko (utilizzata per la produzione del pesto Genovese DOP), è stato ottenuto attraverso il sistema CRISPR-Cas9 per la mutazione sito specifica del gene di suscettibilità *ObDMR6*, che codifica per una 2OG-Fe(II) ossigenasi. Sono stati identificati geni e *pathways* coinvolti nella risposta all'infezione al patogeno mediante analisi di sequenziamento dell'RNA e assemblaggio del trascrittoma, sfruttando le differenze di risposta tra una cultivar resistente e una suscettibile (Prospera e Italiko FT).

Risultati

Genome Editing: Il gene *ObDMR6* di 'FT italiko' è stato sequenziato (NCBI GenBank: MT319764). È stato messo a punto un protocollo efficiente di rigenerazione diretta *in vitro* da Nodi Cotiledonari (CN) (Fig. 1). 82,3% degli *shoots* T0, ottenuti da trasformazione con *A. tumefaciens*, risultano editati (Tabella 1). È stato confermato che il 60% dei mutanti T0 presenta mutazioni frameshift che causano il knock-out del gene *ObDMR6* (Fig. 2) e la cessazione prematura del prodotto genico. Le piante T0 sono state caratterizzate per tratti morfologici e autofecondate per l'ottenimento di piante T1.

AGL1_pDirect_22C_sg442-462

% rig.	82,2
% (Cas9 ⁺)	84,6
% Shoots editati	82,3

Tabella 1 % di rigenerazione, trasformazione ed editing



Fig. 1 Rigenerazione da CN



Fig. 2 Editing del gene *ObDMR6* nelle piante T0

L'analisi dei cromatogrammi delle piante T1 rivela che le mutazioni delle piante T0 sono state ereditate e segregate. La pianta T1_22B_6 (Cas9⁺), mostra omozigosi per la mutazione di *ObDMR6* nel tratto analizzato (Fig. 3).

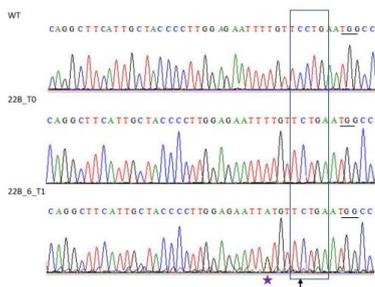


Fig. 3 Confronto dei cromatogrammi di un frammento di *ObDMR6* di piante WT, T0 e T1.

Le piante T0 sono state infettate per valutare la resistenza acquisita. A 7 DPI, il clone 22B non ha mostrato alcun sintomo di infezione (0%) e a 14 DPI il 41,7% di foglie infette, rispetto al WT, risultando essere un clone promettente (Tabella 2).

Tabella 2 % di foglie infette delle piante T0

Cloni	7 DPI	10 DPI	14 DPI
WT	10.0 ab	96.7 e	100.0 b
17A2	10.0 ab	93.3 e	100.0 b
47C	50.0 d	75.0 d	100.0 b
21D	23.1 c	48.7 c	100.0 b
45B	20.0 bc	23.3 b	50.0 a
22B	0.0 a	6.7 a	41.7 a

Risultati trascrittoma: è stato ottenuto un unico *de novo* assembling del trascrittoma delle due cvs. Il 30% dei trascritti è differenzialmente espresso nei 3 tempi di infezione, nelle 2 cvs considerate indipendentemente (Tabella 3). L'analisi ha evidenziato alcuni geni di suscettibilità differenzialmente espressi (DEG) nelle 2 cvs (es. DMR6, DMR1, SNI1, EDR1, EDR2, SWEET) (Fig.4).

Tabella 3 N° di DEG.

Sign. threshold	Ft Italiko	Prospera
Padj < 0.01	8,540	12,073
Padj < 0.05	12,408	15,853

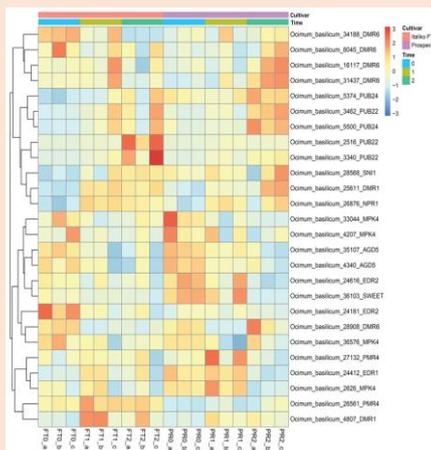


Fig. 4 Differenti profili di espressione dei geni S

Impatto:

L'ottenimento di una cv di élite migliorata per la resistenza a un patogeno, mantenendo la sua 'identità genetica', è di grande interesse commerciale. L'applicazione con successo del GE in basilico apre la possibilità di migliorare altri caratteri.

Publicazioni su riviste internazionali

1. Giovannini A., Laura M., Nesi B., Savona M., Cardi T. (2020) Genes and genome editing tools for breeding desirable phenotypes in ornamentals. *Plant Cell Report* 40, 461-478

Altre pubblicazioni

1. Chiara Forti C., Barberini S., Laura M., Ciorba R., Mascarello C., Giovannini A., Ruffoni B., Savona M. (2022) «Messa a punto di protocolli di rigenerazione *in vitro* in *Ocimum basilicum* cv. FT Italiko, finalizzati al miglioramento genetico via genome editing» - sottomesso a *Acta Italus Hortus*

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Würtz M., Pavese V., Laura M., Giovannini A., Savona M. «Effetti della sterilizzazione e delle tipologie di substrato sulla germinazione dei semi di *Ocimum basilicum* L.» – XII Giornate Scientifiche SOI 2018 Bologna 13-15 giugno 2018 (poster)
2. Savona M., Laura M., Ruffoni B., Giovannini A., Mascarello C., Cassetti A. «Il progetto Biotech GEO – Basilico resistente alla Peronospora» PastaPestoDay Sanremo (IM) 24 novembre 2018 (orale)
3. Laura M. e Savona M. «Ottenimento di piante e di sementali *Ocimum basilicum* esenti da *Peronospora belbahrii* mediante approcci biotecnologici» - Nuove sementi orticole: incontro tra CREA ed Assosementi - Monsampolo del Tronto 24 gennaio 2019 (orale)
4. Barberini S., Giovannini A., Ruffoni B., Savona M. «Improving oomycetes resistance in *Ocimum basilicum* by genome editing technology» SIGA-LXIII Convegno Annuale, Science and innovation for sustainable agriculture intensification: the contribution of plant genetics and breeding - Napoli 10-13 settembre 2019 (poster)
5. Laura M., Forti C., Barberini S., Ciorba R., Mascarello C., Cassetti A., Giovannini A., Ruffoni B., Savona M. «Editing genomico di *Ocimum basilicum* L. tramite CRISPR/Cas9 per indurre resistenza al patogeno *Peronospora belbahrii*» - XIII Giornate Scientifiche SOI “I traguardi di Agenda 2030 per l’ortoflorofrutticoltura italiana - Catania 22/23 giugno 2021 On line (poster)
6. Laura M., Forti C., Barberini S., Ciorba R., Mascarello C., Cassetti A., Giovannini A., Ruffoni B., Savona M. «Highly efficient CRISP/CAS9 mediated gene editing in *Ocimum basilicum* cv. FT Italiko to induce resistance to *Peronospora belbahrii*» - LXIV SIGA Annual Congress, Plant genetic innovation for food security in a climate change scenario - 14/16 settembre 2021 On line (poster)
7. Laura M., Forti C., Barberini S., Ciorba R., Mascarello C., Cassetti A., Giovannini A., Ruffoni B., Savona M. «Genome editing of *Ocimum basilicum* L. through CRISPR / Cas9 to induce resistance to the pathogen *Peronospora belbahrii*» - 2nd PlantEd conference Plant genome editing-the wide range of applications - Lecce 20/22 settembre 2021 On line (poster)

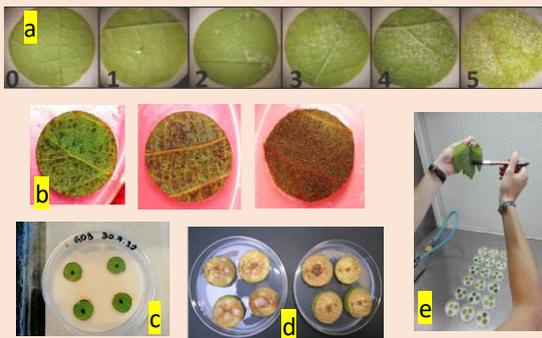
8. Laura M., Forti C., Barberini S., Ciorba R., Mascarello C., Giovannini A., Cassetti A., Ruffoni B., Savona M. «Applicazione dell'editing genomico per il miglioramento della qualità in basilico» - I° Convegno Nazionale Orticoltura e Floricoltura, Pisa 14-16 giugno 2022 (poster)
9. Barberini S., Chiara Forti C., Laura M., Ciorba R., Mascarello C., Giovannini A., Ruffoni B., Savona M. «Messa a punto di protocolli di rigenerazione *in vitro* in *Ocimum basilicum* cv. FT Italiko, finalizzati al miglioramento genetico via genome editing» - IV Convegno Nazionale Sulla Micropropagazione: Un Incontro tra gli operatori di settore e della ricerca - Bari, 12-14 ottobre 2022 (poster)

Infantino A., Aragona M., Valente M.T., La Torre A., Pilotti M., Brunetti A., Scala V., Pucci N., Lucchesi S., Loreti S. CREA-Centro di ricerca Difesa e Certificazione - Roma

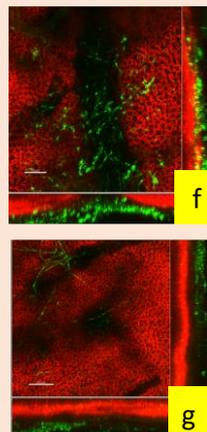
Abstract: Sono state messe a punto tecniche di screening *in vitro* per la valutazione della resistenza a patogeni fungini e batterici di piante geneticamente modificate di vite, kiwi e melo sviluppate nel progetto BIOTECH. Un isolato virulento di *Venturia inaequalis* è stato trasformato con GFP per studiare la sua interazione con meli resistenti e suscettibili alla malattia. Lo studio della efficacia di induttori di resistenza nella risposta dell'actinidia al *Psa*, ha consentito di definire il migliore protocollo per la loro applicazione. Infine, è stato applicato un approccio di metabarcoding per la definizione delle più importanti specie fungine associate alle malattie fogliari dei portinnesti della vite.

Risultati

1) Sono stati messi a punto saggi di inoculazione su dischi fogliari per valutare la resistenza delle seguenti coppie ospite/patogeno: vite/*P. viticola* (a); kiwi/*P.s. pv. actinidiae* (b); melo/*V. inaequalis* (c); pero/*E. amylovora* (d); vite/*E. necator* (e).



2) È stato sviluppato un sistema di trasformazione di *V. inaequalis* mediato da *A. tumefaciens* con l'introduzione del gene che codifica per la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Mediante microscopia confocale laser sono state analizzate le differenze nelle prime fasi di infezione e colonizzazione della pianta ospite (a 3 e 6 days post inoculation (dpi) tra una varietà suscettibile (f) e una resistente (g) (6 dpi).



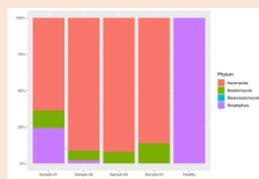
3) Kiwi – *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa)

a) È stato evidenziato l'effetto biostimolante del fosfito di alluminio e del BABA e sulla crescita della parte epigea ed ipogea del kiwi. Inoltre si è rilevato un severo effetto fitotossico del BTH sulla vegetazione (forte diminuzione della crescita, necrosi fogliari, filloptosi) e sull'apparato radicale (diminuzione della biomassa e perdita del capillizio radicale) con possibile effetto letale. (3 prove in due anni diversi. Periodo di osservazione: 7 mesi).

b) È stato rilevato l'effetto protettivo del BABA su piantine di kiwi inoculate con Psa.

c) È stata effettuata l'analisi bioinformatica del trascrittoma di kiwi sottoposto a trattamento con fosfito di alluminio e inoculazione con Psa (articolo in preparazione).

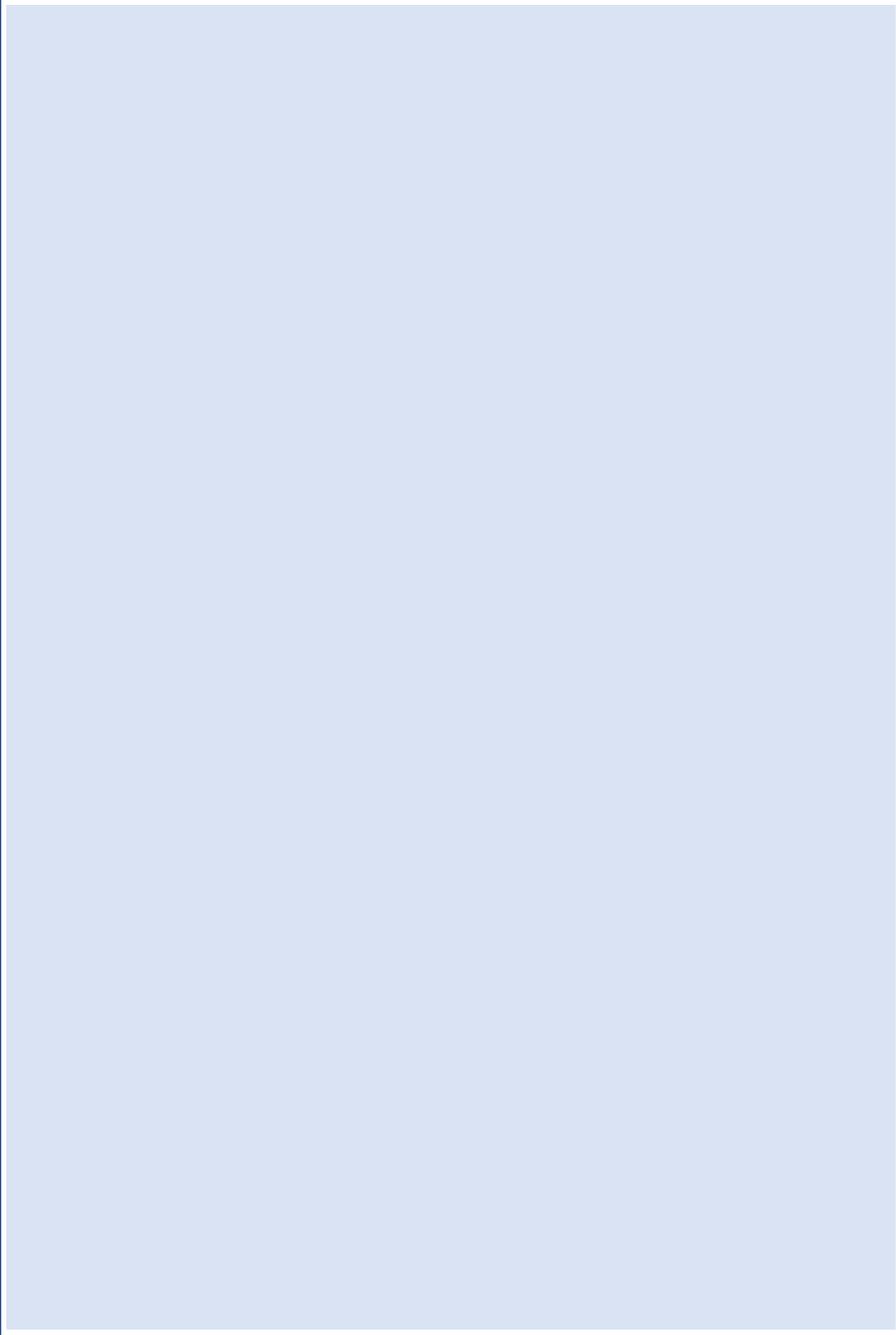
4) Mediante analisi del microbiota di foglie sintomatiche di viti portinnesto con tecnologia Illumina, sono state identificate 110 Amplicon Sequence Variants (ASVs). Tra le 13 con un'incidenza $\geq 1\%$, pari all'89.7% del totale, la più rappresentata è stata *Pseudopezizula tracheiphila*, agente del 'red fire' della vite, insieme ad altre specie fitopatogene della vite, appartenenti ai generi *Cladosporium* sp. e *Alternaria*.



Impatto: la valutazione della resistenza a stress biotici di materiale *Genome Edited* con metodiche altamente standardizzate (scelta dell'isolato idoneo, metodi di screening rapidi e riproducibili) rappresenta l'ultimo, ma decisivo step prima del loro rilascio commerciale. L'aumento delle conoscenze sui meccanismi di resistenza alla ticchiolatura in melo e sull'utilizzo di induttori di resistenza nei confronti del cancro batterico del kiwi permettono di implementare le strategie a basso impatto ambientale disponibili per il loro controllo.

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Infantino A., Kutya K., D'Arcangelo M.E.M., Biselli C., Zombardo A., Pirone L., Grottoli A., Valente M.T., 2022. Survey on the presence of fungal epiphytic, saprophytes, and leaf pathogens present on a collection of grapevine rootstocks in Italy. Abstracts of presentations at the XXVII SIPaV Congress, September 21-23, 2022, Palermo, Italy



Carra A.¹, Zaina G.², Calligari P.¹, Guerra D.³, Tacconi G.³, Nervo G.¹

¹ CREA Centro di ricerca Foreste e Legno (Casale Monferrato, Italy); ² Università di Udine (Italy);

³ CREA- Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica (Fiorenzuola d'Arda, Italy)

Abstract: Obiettivo dell'attività svolta è stato l'ottenimento di nuovi cloni di pioppo modificati per il portamento della pianta ed il contenuto in cellulosa e lignina per impieghi industriali e bioenergetici. Per la cisgenesi sono stati clonati nei vettori *marker-free* pNS13 e pMF1 i geni GA20ox7 e DUF266; per *genome editing* sono stati inseriti nel vettore pYLCRISPR/cas9P35S-B gRNA per i geni CAD1 e C3H. Dall'approccio di cisgenesi sono state ottenute 41 linee di *P. nigra* mentre 82 linee di *P. alba* sono state ottenute da *genome editing*.

Risultati di attività svolta in *Populus nigra* mediante cisgenesi

Frammenti genomici di GA20ox7 e di DUF266 comprendenti la CDS e circa 2.000 bp a monte e 1.000 bp a valle sono stati amplificati da DNA di *P. trichocarpa*, clonati nei vettori pNS13 e pMF1, e inseriti in *Agrobacterium* EHA105 per essere utilizzati nei lavori di trasformazione. I germogli di *P. nigra* rigenerati su terreno selettivo sono stati fatti radicare e acclimatati in ambiente confinato; campioni fogliari sono stati utilizzati per estrazione di DNA e analisi PCR. Nelle Figure 1 e 2 e in Tabella 1 si riportano i risultati ottenuti.



Fig. 1 Piantine modificate di *P. nigra*

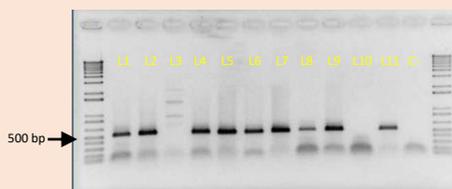


Fig. 2 Verifica trasformazione (amplificazione di rec-LBD) di linee cisgeniche di *P. nigra*

Tabella 1 Linee di *P. nigra* (J. Pourtet) modificate con i diversi costrutti

	PMF1 GA20 ox7	PNS13 GA20 ox7	PMF1 DUF 266
Linee di <i>P. nigra</i> ottenute	15	13	13
Linee di <i>P. nigra</i> verificate e positive	3	1	6
Linee di <i>P. nigra</i> da verificare con PCR	12	10	7

Risultati di attività di «genome editing» svolta in *Populus alba*

Singoli RNA guida per C3H (3) e due RNA guida consecutivi per CAD1 sono stati disegnati utilizzando Cas-Designer ed inseriti nel vettore pYLCRISPR e quindi inseriti in *Agrobacterium* EHA105 per essere utilizzati nei lavori di *editing*. I germogli di *P. alba* rigenerati sono stati fatti radicare e acclimatati in ambiente confinato; campioni fogliari sono stati utilizzati per estrazione di DNA e analisi PCR. Nelle Figure 3 e 4 e in Tabella 2 si riportano i risultati ottenuti.



Fig. 3 Piantine editate di *P. alba*

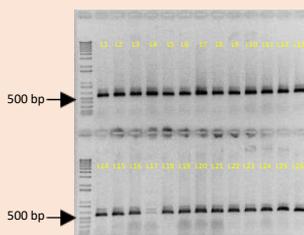


Fig. 4. Verifica trasformazione (amplificazione di Cas9) di linee editate di *P. alba*

Tabella 2. Linee di *P. alba* (Villafranca) ottenute per *genome editing* con 4 costrutti

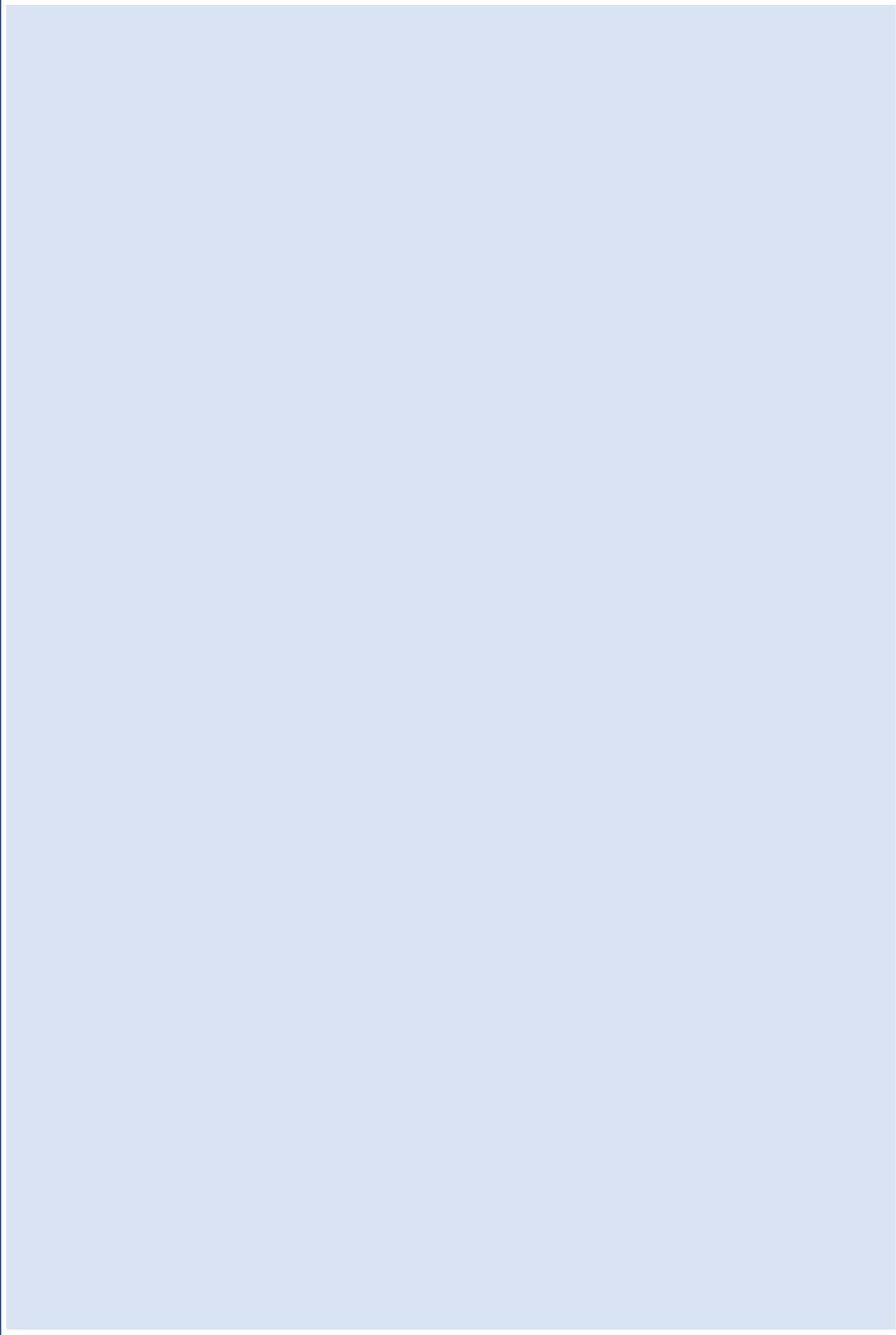
	CAD1-dx	C3H-04	C3H-06	C3H-07
Linee di <i>P. alba</i> ottenute	20	6	18	38
Linee di <i>P. alba</i> verificate e positive	18	5	11	18
Linee di <i>P. alba</i> da verificare con PCR	0	1	7	19

Impatto

Nuovi cloni di *P. nigra* e *P. alba*, ottenuti rispettivamente mediante cisgenesi e genome editing, potenzialmente modificati per il contenuto in fitormoni (giberelline), cellulosa e lignina sono in fase di ulteriore valutazione per altri aspetti fenotipici e per le caratteristiche tecnologiche del legno per applicazioni nel settore bioenergetico e dei biopolimeri.

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Zaina G., Carra A., Calligari P., Guerra D., Tacconi G., Cattivelli L., Nervo G., Application of Cisgenesis and Genome Editing In Poplar: Preliminary Results. 26th Session IPC, 5-8 October 2021, Roma.



WP1, Induzione di partenocarpia in melanzana mediante approcci di cisgenesi e genome editing

Rotino¹, Gattolin^{1,2}, Toppino¹, Mangino¹, Biswas¹, Tassone¹, Azzimonti¹

¹CREA, Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica, 26836 Montanaso Lombardo (LO), Italy

² CNR, Consiglio Nazionale della Ricerca – Istituto di Agricoltura Biologia e Biotecnologie - IBBA (UOS Lodi), Italy

Abstract La partenocarpia (ottenimento di frutti in assenza di fecondazione e, quindi, senza semi) è un tratto fenotipico molto apprezzato nelle orticole, poiché migliora la qualità del frutto e permette di avere produzione in condizioni climatiche sfavorevoli all'impollinazione. I livelli di auxina giocano un ruolo fondamentale nel processo di sviluppo del frutto. In condizioni normali, è la fecondazione dell'uovo a scatenare l'incremento del contenuto di auxina, causandone aumento nell'ovario e inducendo pertanto lo sviluppo del frutto. Per indurre la partenocarpia, si è scelto di agire a livello di geni sia regolatori negativi che di sintesi, utilizzando costrutti per silenziamento genico mediato da CRISPR-Cas9 di numerosi geni coinvolti nel metabolismo-trasporto delle auxine (*AUCSIA1-2*, *IAA9*, *AGL6*, *ARF8*, *AGL11*, *PIN4* e *PAD-1*), il cui silenziamento è noto in letteratura causare formazione di frutti partenocarpici, nonché un approccio cisgenico per aumentare la sintesi di auxina (*Yucca*).

Risultati

Sono stati prodotti costrutti CRISPR/Cas9 con guide contro il primo esone dei geni target, più due costrutti cisgenici per overesprimere *smFZY6* e *smFZY7* (*YUCCA 1,8*) e impiegati per trasformare circa 800 cotiledoni di due linee di melanzana.

Per *AUCSIA1-2*, *IAA9* e *AGL6* sono state ottenute piante T₀ che portano differenti mutazioni nei geni target confermate mediante sequenziamento. Per gli altri costrutti molti calli sono attualmente in rigenerazione



Fig. 1 fiori di piante editate T₀ per *AGL6* a sviluppo precoce dell'ovario



Fig. 2 frutti di piante editate T₀ per *AGL6* e *IAA9*

A causa di numerose mutazioni bialleliche/omozigote nonsense, i frutti ottenuti dalle piante T₀ editate per *AGL6*, *AUCSIA1-2* e *IAA9* hanno mostrato accrescimento precoce (Fig. 1) ed assenza di semi (Fig. 2). Solo per *AUCSIA2* sono stati ottenuti pochi semi da autofecondazione. Per *AGL6* e *IAA9*, progenie BC1 con piante Cas9-free sono state ottenute da reincrocio con WT.

Il polline delle piante T₀ *AGL6* e *IAA9* ha mostrato una ridotta vitalità e presenza di editing nei geni target. Per *AGL6*, analisi qPCR e localizzazione *in situ* (Fig. 3) hanno evidenziato l'espressione oltre che in ovario anche in antera, avvalorando l'ipotesi di un effetto negativo dell'editing sul polline.

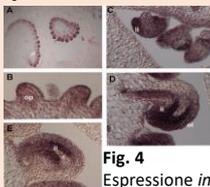


Fig. 4 Espressione *in situ* di *AUCSIA2* nei fiori

Piante T1 *CAS9-free* con mutazione omozigote di *AUCSIA2* hanno confermato lo sviluppo partenocarpico del frutto (Fig. 4), evidenziando una riduzione di espressione del gene target nei fiori (Fig. 5).



Fig 3

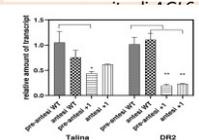


Fig. 5 analisi di espressione di *AUCSIA2*

WP2, Inattivazione di PPO per ridurre l'imbrunimento in carciofo

Pompili V.¹, Mazzocchi E.¹, Moglia A.¹, Acquadro A.¹, Comino C.¹, Rotino G.L.², Lanteri S.¹

¹ Università degli Studi di Torino – DISAFA, Plant Genetics and Breeding., Grugliasco, Torino, Italy.

² CREA, Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica - Montanaso Lombardo, Lodi, Italy.

Abstract Le polifenolossidasi (PPO) catalizzano l'ossidazione dei polifenoli causando l'imbrunimento dei tessuti del carciofo. Il knockout dei geni PPO può ridurre questo fenomeno nei capolini dopo il taglio e durante la lavorazione industriale. Sono stati individuati 11 geni PPO e le loro varianti alleliche in 4 tipi varietali. Sulla base di RTqPCR, PPO6, PPO7 e PPO11 sono stati trovati significativamente sovraespressi nei capolini 15 minuti dopo il taglio ed in callo. Al fine di creare un efficiente sistema di editing genetico per inattivare questi 3 geni, un costrutto CRISPR/Cas9 per il gene PDS è stato utilizzato per trasformare espianti fogliari mediante *Agrobacterium* mostrando un'efficienza di editing del 98,5%.

Risultati

Fig. 1 Genomica

11 geni PPO identificati sulla base del genoma di riferimento del carciofo v. 2.0.

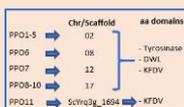


Fig. 2 Filogenesi

Le 11 PPO di carciofo e quelle identificate in 9 specie di Asteraceae, danno origine a 5 cluster. L'analisi ha rivelato la presenza di gruppi funzionali associati a stimoli fisici (pH, calore, luce).



Fig. 3 Varianti alleliche

Il profilo SNPs/Indels del 'Violetto di Toscana', 'Violetto di Sicilia', 'Romanesco C3' e 'Spinoso di Palermo' ha evidenziato 600-700 polimorfismi/tipo varietale

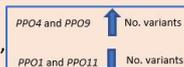


Fig. 4 Analisi dei promotori

L'analisi degli 11 promotori ha identificato numerosi putativi siti di legami di fattori di trascrizione inclusi quelli coinvolti nella regolazione dell'espressione delle PPO



Fig. 5 Espressione tessuto- ed organo-specifica dei geni PPO

Dopo 15 min dal taglio, PPO6 e PPO7 sono sovra-espressi nel ricettacolo mentre la PPO11 è sovra-espressa nelle brattee interne; tutte e tre queste PPO sono significativamente sovra-esprese nei calli con imbrunimento ossidativo rispetto a quelli verdi e bianchi

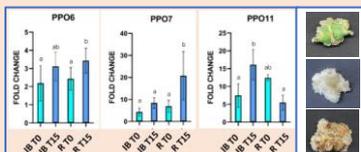
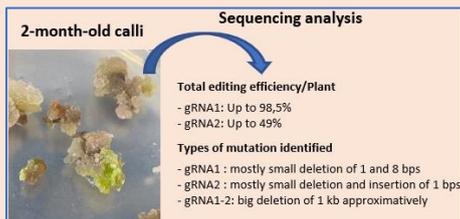


Fig. 6 CRISPR/Cas9 editing

Un costrutto CRISPR/Cas9 con due gRNA mirati al primo (gRNA1) e al terzo (gRNA2) esone del gene PDS è stato utilizzato per trasformare espianti fogliari mediante *Agrobacterium tumefaciens*.



WP3 - Individuazione di loci e geni di resistenza a *F. oxysporum*

Rotino¹, Gattolin^{1,2}, Toppino¹, Sirangelo, Bagnaresi¹, Tassone¹, Azzimonti¹

¹ CREA, Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica, 26836 Montanaso Lombardo (LO), Italy

² CNR, Consiglio Nazionale della Ricerca – Istituto di Agricoltura Biologica e Biotecnologie - IBBA (UOS Lodi), Italy

Abstract La resistenza al fungo tracheomicotico *F. oxysporum* (Fom) è un carattere di estremo interesse per il breeding in melanzana poiché consente di mantenere alte le performance delle coltivazioni limitando l'impiego di antiparassitari. La linea 67/3 possiede una delle poche fonti di resistenza parziale a *Fom* presenti nel germoplasma di melanzana. Fonti di resistenza totale sono state identificate in specie affini e introgredite in melanzana mediante fusione di protoplasti e reincroci per ottenere breeding lines resistenti tra cui la linea 305E40. Obiettivo è l'identificazione mediante mappaggio, sequenziamento e analisi di espressione dei frammenti cromosomici e dei geni responsabili di questi due tratti di resistenza a *Fom*, la loro caratterizzazione e la preparazione di costrutti per il loro silenziamento.

Risultati

Utilizzando una popolazione di mappa RIL e una mappa GBS è stato mappato il tratto di resistenza a *Fom* che ha confermato la presenza (e ridotto la dimensione) dei QTL su CH02 e CH11 associati a resistenza totale e parziale, rispettivamente. Per il tratto sul CH11, sono stati disegnati nuovi marcatori molecolari per il mappaggio fine del locus.

È stata prodotta una nuova sequenza del genoma ONT della linea 305E40. il suo confronto con il reference 67/3 ha confermato una porzione introgressa di quasi 50Mb su CH02 (Fig. 1) che ospita il tratto di resistenza

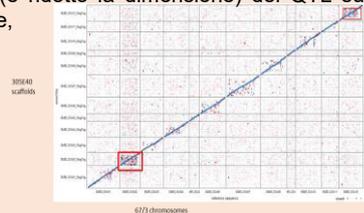


Fig. 1 Confronto tra le sequenze di 305E40 e 67/3 rivela due regioni di incongruenza

L'analisi BSA-seq utilizzando i pool di dati di risequenziamento (Fig. 2) in delle RILs resistenti, sensibili e tolleranti entrambe le regioni QTL ha rivelato la presenza di regioni differenzialmente rappresentate e, al loro interno, di numerosi geni candidati

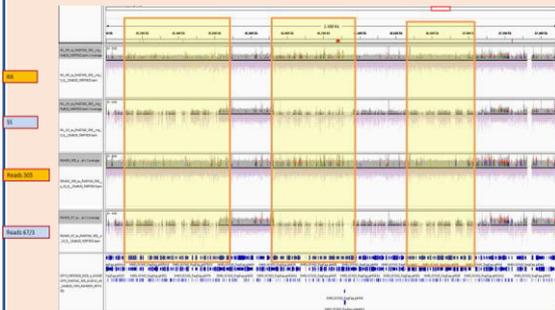


Fig. 2 Esempio di BSA-seq mapping lungo il ch02

I dati di espressione RNAseq hanno permesso di identificare **10 geni unici di 305E40 nel tratto sul CH02** e **8 unici di 67/3 nel tratto sul CH11**. Analisi di coespressione utilizzando questi come *bait* hanno evidenziato *pathways* di geni coinvolti in entrambi i meccanismi di risposta. **Sono stati sviluppati costrutti silenziamento mediante ge per la validazione funzionale dei 5 migliori candidati e la trasformazione attraverso *A. tumefaciens* è in corso.**

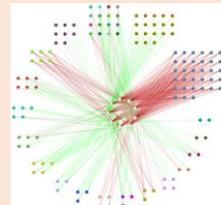


Fig. 3 Analisi di coespressione genica in risposta a *Fom* usando come *bait*s I candidati sul CH02

WP3 – individuazione di geni di virulenza in *F. oxysporum*

Rose Haegi A, Grotoli A

CREA, Centro di ricerca Difesa e Certificazione

Risultati

Sono stati individuati otto geni candidati come effettori della virulenza/patogenicità di *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (FOMG), dove per effettore si intende una molecola che determina la virulenza del patogeno e che interagisce direttamente o indirettamente con i fattori di resistenza della pianta.

L'identificazione dei geni effettori è stata ottenuta tramite analisi bioinformatica del genoma dell'isolato FOMG 2267 sequenziato con ONT Nanopore MinION + Illumina® (Fig. 1) e l'analisi di espressione dei geni fungini durante l'interazione di FOMG con la pianta tramite RNA-Seq prima e Real-time poi (Fig. 1 e 2).

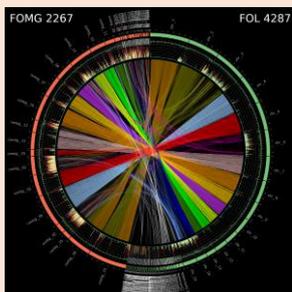


Fig. 1 Mappa di sintenia tra i genomi di FOMG (rosso) e FOL (verde).



Fig. 2 Espressione differenziale dei geni candidati effettori ai tempi 0-5-9 dai (day after inoculation).

Nome	Omologia	Lunghezza bp
MAN4	None	800
MAN8	22% putative LTR	920
G18449	40% effector FO apii	750
MAN9	60% effector FO apii	576
MAN11	19% DNA-helicase	2630
MAN2	20% Pogo TE like	2688
MAN3	75% TE like	467
g18448	90% G-spermidine Synthase	1421

Tabella 1 Geni candidati individuati e loro caratteristiche

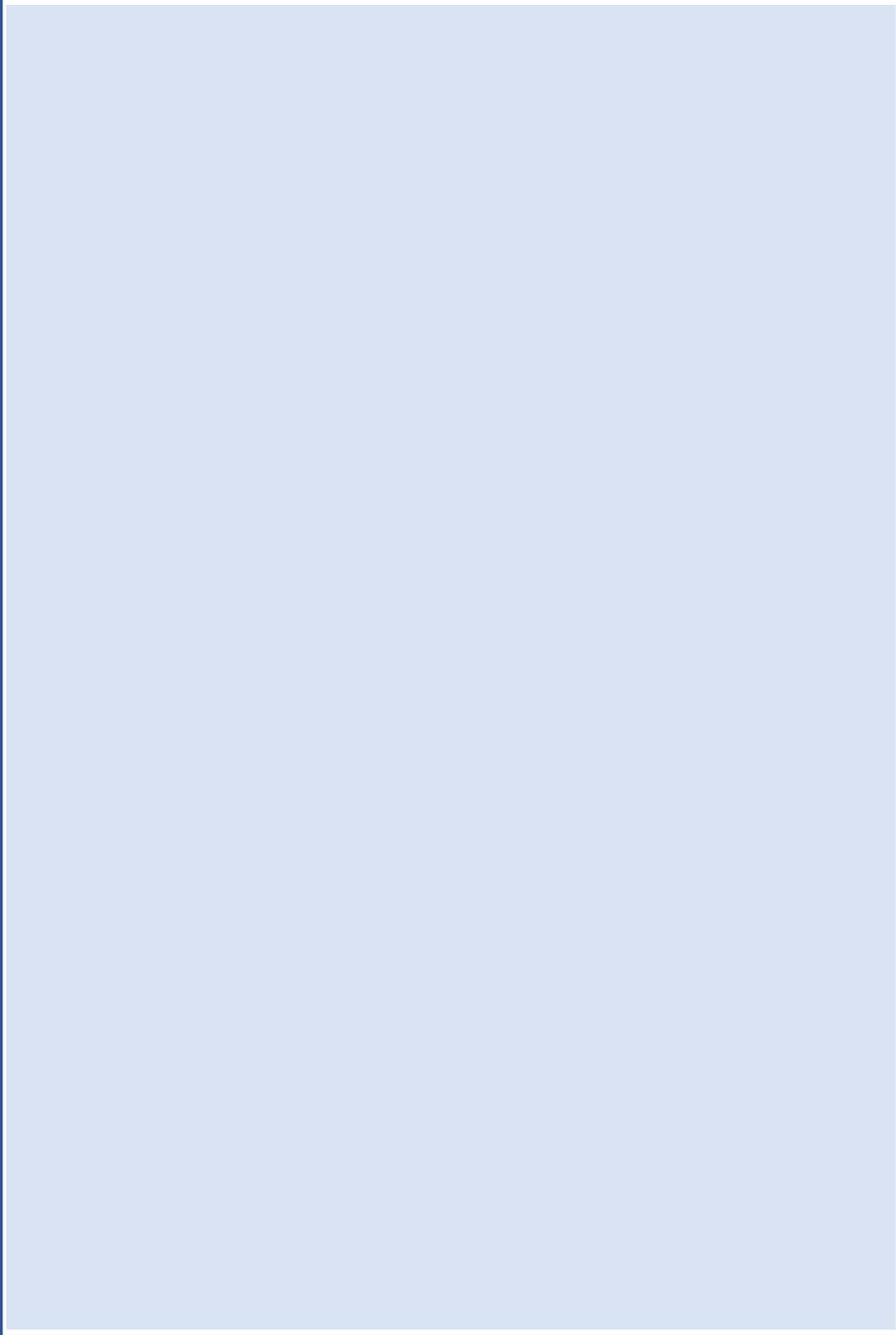
E' stato messo a punto in FOMG un sistema di trasformazione CRISPR-Cas9 per il knock-out dei geni individuati, che agevolerà la ricerca dei geni di resistenza della pianta tramite studi di interazione

Publicazioni su riviste scientifiche internazionali

1. Tassone, M. R., Bagnaresi, P., Desiderio, F., Bassolino, L., Barchi, L., Florio, F. E., Sunseri F., Sirangelo T.M., Rotino G. L., Toppino, L. (2022) A Genomic BSaseq Approach for the Characterization of QTLs Underlying Resistance to *Fusarium oxysporum* in Eggplant. *Cells* 11, 2548
2. Pompili V, Mazzocchi E, Moglia A, Acquadro A, Comino C, Rotino GL, Lanteri S. Structural and functional analysis of polyphenol oxidases involved in globe artichoke (*C. cardunculus* var. *scolymus* L.) tissue browning. (Sottomesso a Sci Report).

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Toppino L., Sirangelo T. M., Tassone M. R., Bagnaresi P., Lopatriello G., Delledonne M., Rotino G. L. Genomic and transcriptomic investigation about *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* resistance in '305E40' eggplant line. Proceedings of the LXV SIGA Annual Congress. Piacenza, 6/9 September, 2022. ISBN: 978-88-944843-3-5. Oral Communication Abstract – 4.02
2. Gattolin S., Toppino L., Biswas A., Mangino G., Azzimonti M. T., Tassone M. R., Rotino G. L. Generation Of Parthenocarpic *Solanum Melongena* Plants Using Crispr-Cas9 - mediated Editing. Proceedings of the LXV SIGA Annual Congress. Piacenza, 6/9 September, 2022. ISBN: 978-88-944843-3-5. Poster Communication Abstract – 3.08
3. Pompili V, Mazzocchi E, Moglia A, Acquadro A, Comino C, Rotino GL, Lanteri S. Globe artichoke polyphenol oxidase gene mining: characterization and expression profile with a view of their knockout to avoid capitula browning after cutting. Poster presentation at: 65th SIGA Annual Congress; Piacenza, 6-9 September 2022.
4. Grottoli A., Infantino A., Vitale S., Luongo L., Haegi A. Pathogenicity assay and genome assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* that causes Fusarium wilt in eggplant'. Abstracts of presentations at the XXVII Congress of the Italian Phytopathological Society (SIPaV). 22-25 September 2022 *J Plant Pathol* p1238. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01234-8>
5. Pompili V., Mazzocchi E., Moglia A., Acquadro A., Comino C., Rotino G.L., Lanteri S. Characterization and expression profile of the polyphenol oxidase gene family in globe artichoke: a target for gene-editing knockout aimed at reducing after-cutting capitula browning. Accepted for Oral presentation: XI International Symposium on Artichoke, Cardoon and their relatives; Molfetta, 18-21 April 2023.



Federica DeMaria¹, Annalisa Zezza.¹

¹ CREA Centro di ricerca Politiche e Bioeconomia - Roma

Abstract: Il lavoro analizza l'accettazione delle nuove tecniche di miglioramento genetico (NBT) nel settore agroalimentare da parte dei consumatori. Lo studio è incentrato sul ruolo svolto dall'informazione nel plasmare l'atteggiamento dei consumatori nei confronti degli alimenti geneticamente modificati e delle NBT nella produzione agricola. Per analizzare i cambiamenti o le conferme di pareri precedenti sui problemi di sicurezza alimentare e sui rischi ambientali associati alle moderne biotecnologie, una volta fornite informazioni scientifiche, è stato impiegato un modello Logit Multinomiale. I risultati mostrano un processo di convergenza verso l'informazione ricevuta nel caso delle questioni legate alla sicurezza alimentare, confermando l'ipotesi bayesiana. Nel caso dei rischi per l'ambiente, invece, le persone sono meno disposte a cambiare le loro idee o convinzioni.

Risultati:

Articolazione del questionario

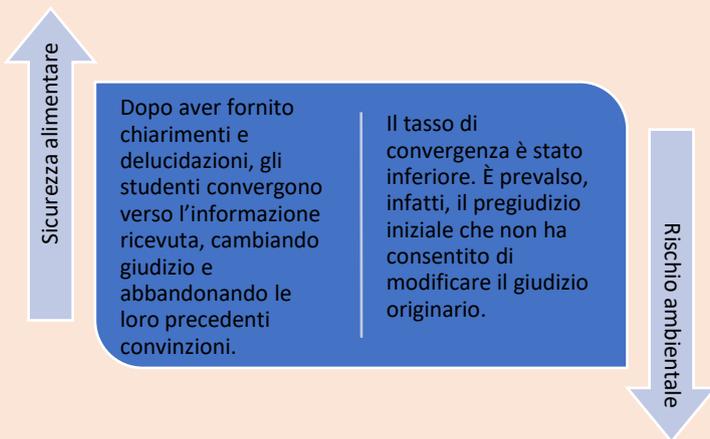


	conservative			convergent			divergent		
	dy/dx	Std. Err.		dy/dx	Std. Err.		dy/dx	Std. Err.	
Believers	0.217	0.056	***	-0.357	0.053	***	0.140	0.025	***
Deniers	-0.127	0.065	**	0.280	0.063	***	-0.156	0.018	***
Perceived_k	0.086	0.035	**	0.009	0.029		-0.096	0.024	***
Change_k	0.033	0.027		0.021	0.022		-0.055	0.019	**
Education	0.090	0.046	**	-0.058	0.037		-0.031	0.031	
Gender	-0.021	0.043		0.043	0.035		-0.022	0.030	
EU centric	-0.024	0.041		-0.023	0.034		0.047	0.029	

Effetti marginali sulla sicurezza alimentare

Effetti Marginali sui Rischi ambientali

	conservative			convergent			divergent		
	dy/dx	Std. Err.		dy/dx	Std. Err.		dy/dx	Std. Err.	
Believers	0.313	0.044	***	-0.353	0.024	***	-0.040	0.399	
Deniers	-0.053	0.055		0.130	0.044	**	-0.184	0.044	***
Perceived_k	0.073	0.037	*	-0.037	0.032		-0.036	0.018	
Change_k	0.053	0.028	*	-0.022	0.023		-0.031	0.026	*
Education	0.008	0.045		-0.071	0.040	*	0.030	0.029	
Gender	-0.040	0.047		-0.037	0.038		-0.046	0.028	
EU centric	-0.057	0.043		-0.107	0.037	**	0.049	0.027	*



Altre attività in corso: a) Delphy Analysis; b) Valutazione economica.

L'analisi Delphy si è appena conclusa. Si sta procedendo alla disamina dei risultati e alla stesura del paper.

1° Round	<ul style="list-style-type: none"> • Accordo sui concetti • Slide e opportunità
2° Round	<ul style="list-style-type: none"> • Revisione dei concetti • Graduatoria delle opportunità • Graduatoria sui rischi

Per l'analisi sulla valutazione economica e gli impatti derivanti dall'applicazione del GE per il Melo, la Vite e il Pomodoro si stanno elaborando i dati attraverso il modello di programmazione matematica positiva. La fine dell'attività è prevista con la data di chiusura del progetto.

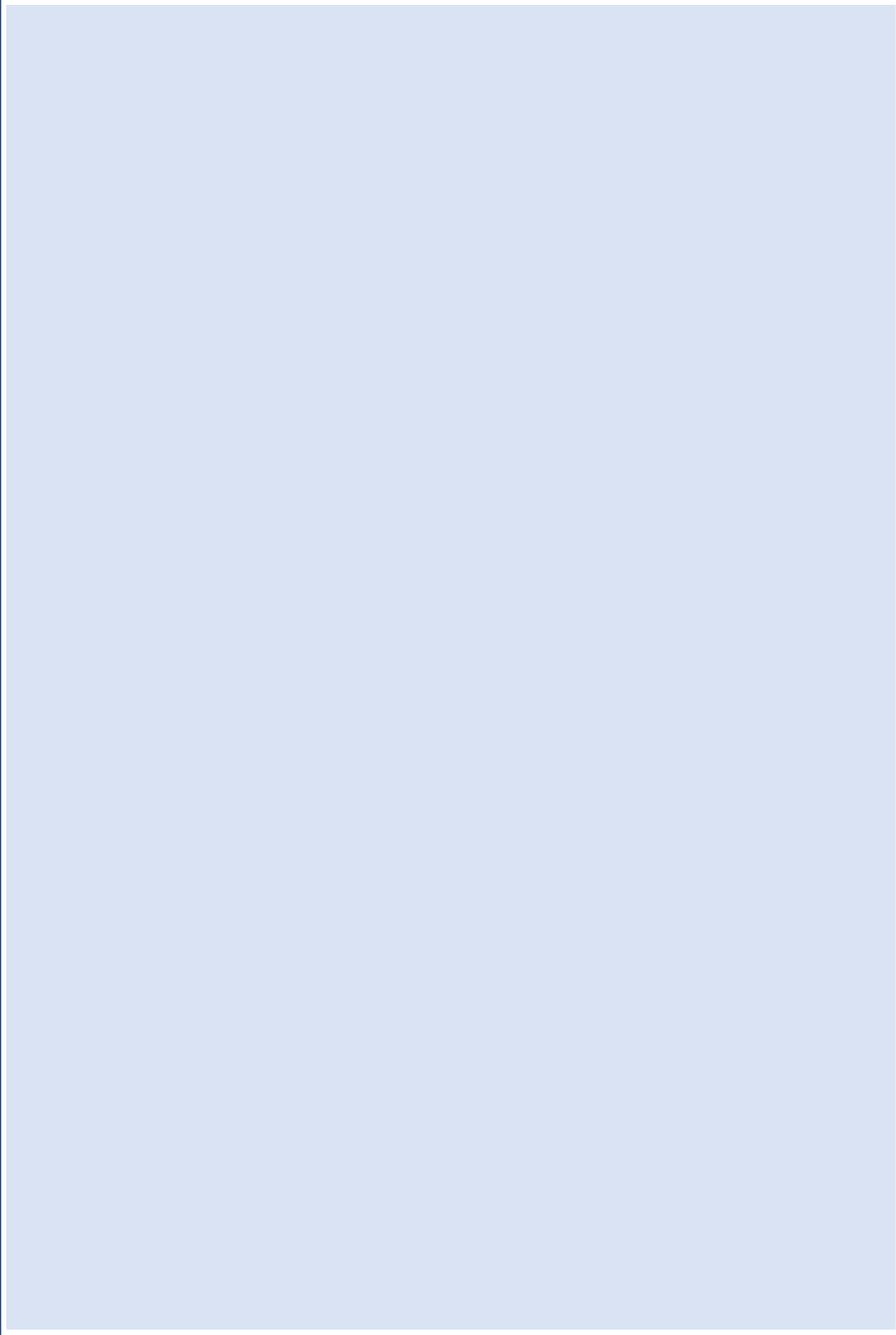
Impatto: Centrale è il ruolo della comunicazione e della diffusione dei risultati al fine di ottenere il sostegno pubblico per attuare i cambiamenti legislativi che consentono la coltivazione di colture ottenute attraverso l'uso delle NBT. La comunicazione dovrebbe affrontare con attenzione le preoccupazioni delle persone sui potenziali impatti ambientali per evitare il rifiuto da parte dei consumatori dei prodotti GM e delle NBT.

Publicazioni su riviste scientifiche internazionali

1. DeMaria F. & Zezza A. (2022) Scientific information and cognitive bias in the case of New Breeding Techniques: exploring Millennials behaviour in Italy. *Italian Review of Agricultural Economics* 77, 41-60

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. DeMaria F. & Zezza A. (2021) "Exploring Attitude Towards Genetically Modified Foods and new breeding techniques: bad or positive view of the Millennials". Italian Association of Agricultural and Applied: Agriculture, Food and Global Value Chains: Issues, Methods and Challenges. *Economics* 9-11 June 2021, Rome, Italy



IPA1 è un gene pleiotropico che regola l'architettura della pianta, con culmi di accostamento meno numerosi e più robusti e maggior numero di semi/pannocchia. La sua espressione è regolata negativamente dal miRNA156. Obiettivo dell'*editing* è stato la mutazione del sito di legame del miRNA, con accumulo del prodotto di IPA1. Non si è ottenuta trasformazione in Vialone Nano; in Roma l'efficienza di trasformazione è stata dell'1.5% e sono state ottenute 9 piante trasformate. Le mutazioni hanno riguardato inserzioni/delezioni adiacenti al sito di legame (Fig. 2).

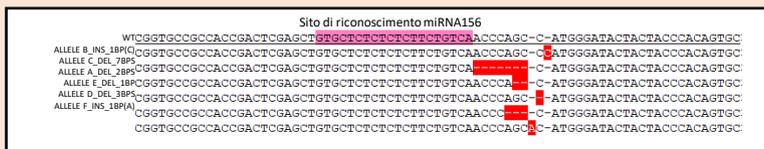
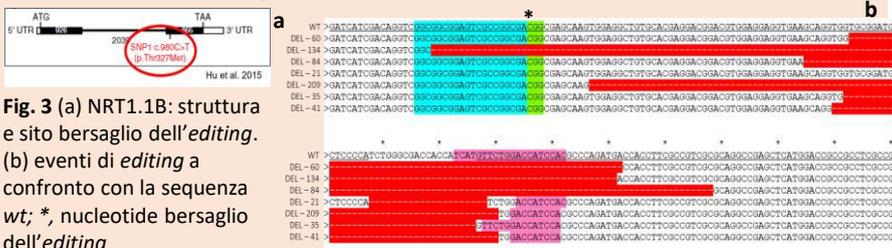


Fig. 2 IPA1: eventi di *editing* a confronto con la sequenza wt

NRT1.1B codifica per un trasportatore del nitrato, più efficiente nei risi indica rispetto agli japonica. L'*editing* del gene era rivolto alla sostituzione di un nucleotide nella sequenza codificante, mediante *prime-editing*, al fine di indurre nelle due varietà japonica la stessa mutazione Thr327Met delle varietà indica (Fig. 3a). Cinque (5) piante sono state editate in Roma, nessuna in Vialone Nano. Le mutazioni ottenute sono costituite da delezioni, due delle quali, DEL-134 e DEL-209, in omozigosi (Fig. 3b). Le analisi sul loro fenotipo sono in corso.



Impatto Il progetto ha consentito di instaurare una collaborazione stabile con il gruppo di ricerca del professor Forlani di UniMI e porterà alla pubblicazione di tre articoli scientifici. Sono stati sviluppati costrutti e protocolli specifici per il *genome editing* nelle varietà di riso italiane del CREA. La fenotipizzazione delle piante editate, in corso in ambiente controllato, consentirà di verificare l'effetto dell'*editing*, ma essenziale sarà la verifica produttiva in campo. Step successivo sarà l'incrocio, per il *pyramiding* dei caratteri di sostenibilità e resilienza in un unico genotipo.

Bergamini C.¹, Cardone M.F.¹, Chitarra W.², D'Amico M.¹, Forleo L.R.¹, Moffa L.², Nerva L.², Velasco R.²

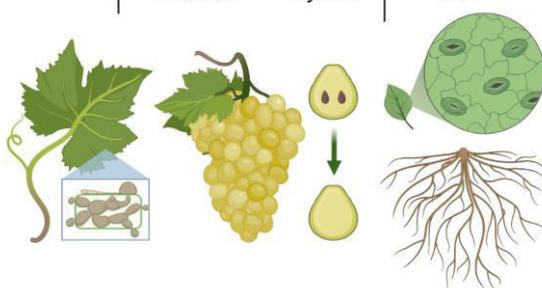
CREA Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia, ¹Turi (BA), ²Conegliano (TV) - Italy.

Coll. Esterne: De Lorenzis G.³, Di Gaspero G.⁴, Malnoy M.⁵, Perrone I.⁶, Zenoni S.⁷

³Università degli Studi di Milano; ⁴IGA-Istituto di Genomica Applicata; ⁵FEM-Fondazione Edmund Mach; ⁶CNR-Torino; ⁷Università degli Studi di Verona.

Abstract L'editing e la cisgenesi delle varietà di vite da vino, da tavola e dei portinnesti non è stata mai riportata in letteratura se non come sporadici casi studio e senza concreti risvolti pratici. Le potenzialità e i benefici ottenibili sono enormi dato il valore della coltura, tuttavia le difficoltà a causa della recalcitranza della specie alla rigenerazione, ad eccezione di pochissimi genotipi, hanno richiesto la ricerca di diverse soluzioni e approcci.

Obiettivi Acquisire le tecnologie abilitanti per fare editing genomico e cisgenica per migliorare: 1) le performance verso stress biotici di varietà pregiate di uva da vino; 2) le caratteristiche qualitative (apirenia) di varietà pregiate di uva da tavola; 3) le performance verso stress abiotici (idrico) di genotipi di portinnesti.

Stress biotici		Qualità		Stress abiotici	
Gene/i	Genotipo/i	Gene/i	Genotipo/i	Gene/i	Genotipo/i
<i>editing</i> MLO6-7 NPR3	<i>editing</i> Chardonnay Pinot noir Sangiovese Glera	<i>DNA-free editing</i> AGL11	<i>DNA-free editing</i> Italia Victoria	<i>editing</i> PME1-3 GST40-30 Myb60	<i>editing</i> Chardonnay 110 Richter S04
<i>DNA-free editing</i> miR3632 miR3623 miR482	<i>DNA-free editing</i> Nebbiolo Brachetto				
<i>cis-genesi</i> RPV3-1	<i>cis-genesi</i> Chardonnay Sangiovese Glera				

Risultati

Tra le prime difficoltà affrontate dal progetto VITECH c'è stata la recalcitranza di alcuni genotipi alla produzione di callo embriogenico in quantità sufficiente e/o alla recalcitranza del callo di produrre embrioni vitali. In questo frangente si riporta come risultato di grande impatto la messa a punto di protocolli che garantiscono la produzione di materiale embriogenico da genotipi di elevata rilevanza nazionale come ad esempio la cultivar Glera (utilizzata per la produzione del vino Prosecco) e la cultivar di uva da tavola Italia.

Per quanto riguarda il primo obiettivo, che prevedeva l'individuazione di geni per migliorare la tolleranza a diversi stress biotici si è proceduto con diversi approcci: sono stati individuati due geni responsabili della suscettibilità all'oidio (MLO6 e MLO7) e sono stati editati per inattivarli. Sono state ottenute 30 piante trasformate di cui 15 sono risultate editate per entrambi i geni. In parallelo, per aumentare la resilienza ai patogeni in modo più generico è stato identificato un gene coinvolto nella repressione del sistema immunitario (NPR3) che è stato editato. Da questo approccio sono state ottenute 42 piante di cui 16 sono risultate editate. Le piante editate sono attualmente in fase di moltiplicazione per procedere alla verifica della tolleranza. In aggiunta alla strategia di editing, in collaborazione con il partner IGA che ha fornito le sequenze, si è proceduto con una strategia di cisgenesi di due geni appartenenti al locus RVP3-1. La strategia prevedeva lo sfruttamento di un costrutto con cassetta di escissione inducibile per eliminare le sequenze del marker di selezione. Allo stato attuale sono state ottenute 5 piante che risultano essere cisgeniche in senso stretto (non contengono più le sequenze del gene di selezione). Infine, grazie al supporto del partner CNR-IPSP è stato possibile sviluppare un protocollo per editing utilizzando la tecnica dei protoplasti ed evitando quindi l'inserimento di qualsiasi sequenza di DNA nel genoma di riferimento. Protoplasti di 'Nebbiolo' e 'Brachetto' sono stati trasfettati mediante lipofectamine per l'editing del gene PDS. Questo sistema di delivery è risultato decisamente meno tossico per le cellule rispetto al PEG, permettendo l'ottenimento di una quantità più alta di rigeneranti. Inoltre, protoplasti di 'Nebbiolo', trasfettati sempre mediante lipofectamine, per l'editing di tre miRNA coinvolti nella regolazione del sistema immunitario sono in coltura e l'editing è già stato confermato per alcuni embrioni mediante sequenziamento Sanger e software Tide e con analisi HRM (Fig. 1).

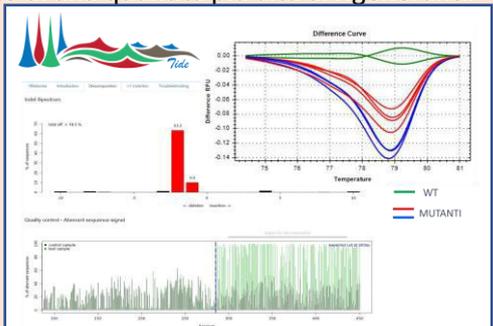


Fig. 1 Analisi di conferma dell'editing su embrioni di Nebbiolo con metodica HRM e con metodica Sanger (Tide).

Messa a punto della tecniche di editing o cisgenesi che prevedono l'uso di ribonucleoproteine (RNPs) purificate e la rigenerazione da protoplasto. Con tale approccio le piante rigenerate sono prive di chimerismi e di qualsiasi marker indesiderato dato il mancato uso di qualsivoglia DNA esogeno. Il gene target selezionato è VviAGL11, un fattore di trascrizione delle famiglia dei MADS-box responsabile della

manifestazione dell'apirenia stenospermocar-pica nella Sultanina e in tutte le varietà da essa derivate. Lo studio svolto in collaborazione con il partner UNIVR, ha permesso di dimostrare il ruolo causale di una mutazione missenso nell'esone 7 del gene che causa un'alterata attività regolatoria del fattore di trascrizione verso se stesso e verso i geni target a valle. Sono state prodotte e purificate in laboratorio le ribonucleoproteine CAS9 e CAS12RR e questo ha permesso di poterle utilizzare in gran quantità. Sono state sintetizzate guide per targhettare l'esone 1 e l'esone 7 del gene, in particolare la CAS12RR permette di tagliare esattamente in corrispondenza dello SNP causale mentre la CAS9 permette di tagliare con alta efficienza. Sono state testate molte varianti di protocolli per produrre protoplasti vitali, trasferirli con RNPs e riuscire ad ottenere rigenerazione completa. In collaborazione con i partner CNR-IPSP e UNIVR, è stato messo a punto il miglior protocollo che ha consentito

per la prima volta l'ottenimento di protoplasti vitali e in grado di rigenerare anche da varietà altamente recalcitranti quali la Italia. La verifica dell'editing per sequenziamento è in corso d'opera.



Fig. 2 Pianta di Victoria rigenerata da protoplasto dopo editing

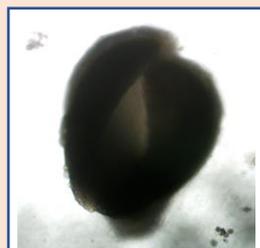


Fig. 3 Embrione di 60 giorni in rigenerazione

Genotipi	N° protoplasti	Embrioni rigenerati	Piante rigenerate
Italia	>10 ⁶	51	2
Victoria	>10 ⁶	>1000	280

Tabella 1 Lista dei genotipi di uva da tavola su cui è stata concentrata l'attività di produzione di protoplasti e rigenerazione da essi dopo editing.

Per quanto riguarda la resilienza agli stress abiotici sono stati identificati alcuni geni target grazie allo sfruttamento di informazioni disponibili sulle banche dati internazionali. A tal proposito, sono risultati target di interesse quattro geni, due appartenenti alle pectin-metil esterasi (PME) e due al gruppo delle glutatione S-transferasi (GST).



Fig. 4 Piante edite in moltiplicazione.

Per queste ultime si è preceduto ad una valutazione preliminare utilizzando la metodica dello *spray-induced gene silencing* (SIGS). Per entrambi i gruppi di geni si è proceduto alla trasformazione di diversi genotipi (sia vinifera che portinnesti). Le piante rigenerate per cui è stato confermato l'editing sono in fase di moltiplicazione e verranno valutate dal punto di vista fenotipico, in termini di resilienza allo stress idrico, grazie a collaborazioni con piattaforme di fenotipizzazione.

Genotipo	Gene/geni target	Piante rigenerate	Piante edite
Chardonnay	<i>MLO6, MLO7</i>	30	15
Chardonnay	<i>NPR3</i>	42	16
Chardonnay	<i>GST30, GST40</i>	12	5
110 Richter	<i>PME1, PME3</i>	14	2*

* editing soltanto sul gene PME1

Tabella 2 Lista delle piante rigenerate su cui è stato confermato l'evento di editing per migliorare la tolleranza agli stress biotici e abiotici. Per ogni gene almeno 5 eventi di editing sono stati selezionati.

Impatto I risultati del progetto VITECH hanno permesso di sviluppare protocolli funzionali per genotipi di grande interesse a livello nazionale ed internazionale. I risultati ottenuti finora dal punto di vista molecolare andranno confermati con la caratterizzazione fenotipica ma risultano un requisito fondamentale per migliorare le strategie di breeding e per velocizzare gli approcci di miglioramento genetico che oggi richiedono risorse e tempistiche importanti.

Publicazioni su riviste internazionali

1. Giudice G., Moffa L., Varotto S., Cardone M.F., Bergamini C., De Lorenzis G., Velasco R., Nerva L., Chitarra W. (2021) Novel and emerging biotechnological crop protection approaches. *Plant Biotechnology Journal* 19, 1495-1510.
2. Forleo, L.R. D'Amico M., Basile T., Marsico A.D., Cardone M.F., Maggiolini F.A.M., Velasco R., and Bergamini C. (2021) Somatic Embryogenesis in Vitis for Genome Editing: Optimization of Protocols for Recalcitrant Genotypes. *Horticulturae*, 7, 511.
3. Nerva, L., Guaschino M., Pagliarani C., De Rosso M., Lovisolo C., Chitarra W. (2022). Spray-induced gene silencing targeting a glutathione S-transferase gene improves resilience to drought in grapevine. *Plant, Cell & Environment* 45, 347-361.1.
4. Amato A., Cardone M.F., Ocarez N., Alagna F., Ruperti B., Fattorini C., Velasco R., Zenoni S., Bergamini C. (2022) VviAGL11 self-regulates and targets hormone- and secondary metabolism-related genes during seed development. *Horticulture Research* 9, uhac133
5. Nerva L. et al, (2023). The Role of Italy in the Use of Advanced Plant Genomic Techniques on Fruit Trees: State of the Art and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 977

Altre pubblicazioni

1. Forleo L.R., D'Amico M., Cardone M.F., Maggiolini F., Basile T., Salerno A., Marsico A.D., Perniola R., Velasco R., Bergamini C. (2023). Ottimizzazione dei protocolli di embriogenesi somatica e rigenerazione da protoplasti per l'applicazione delle New Plant Breeding Techniques (NPBTs) nel miglioramento genetico della Vite. *Acta Italus Hortus* in press

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Amato A.; Bergamini C.; Cardone M.F.; Ruperti B.; Trevisan S.; Zenoni S. Dissecting the underlying molecular mechanism between VviAGL11 and seedlessness in table grape. Poster e Abstract in Atti di Convegno: LXIII SIGA Annual Congress Napoli, Italy – 10/13 September, 2019
2. Moffa, L., Spada, A., Nerva, L., Chitarra, W., De Nardi, B., Velasco, R. (2019). Bioinformatic approaches to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas genome editing of *Vitis vinifera*. Proceedings of The Sixth International Horticulture Research Conference, Venezia 30 September – 5 Ottobre 2019
3. Guaschino, M., Nerva, L., Pagliarani, C., Giudice, G., Gaiotti, F., Lovisolo, C., Chitarra, W. (2020). Improving grapevine water stress resilience by a spray induced gene silencing (SIGS) approach on two glutathione transferase genes. Proceedings of the SIGA-SEI-SIBV-SIPAV Web Workshop "Young Scientists for Plant Health". ISBN 978-88-944843-1-1 Poster Communication Abstract – PH.34.

4. Moffa, L., Giudice, G., Gambino, G., Perrone, I., Pagliarani, C., Velasco, R., Chitarra, W., Nerva, L. (2020). New plant breeding technologies toward a more sustainable viticulture. Proceedings of the SIGA-SEI-SIBV-SIPAV Web Workshop "Young Scientists for Plant Health". ISBN 978-88-944843-1-1 Poster Communication Abstract – PH.45.
5. D'Amico M.; Bergamini C.; Maggiolini F.; L'Abbate A.; Basile T.; Cardone M. F.; Forleo L.R.; Velasco R. (2021) Messa a punto delle biotecnologie abilitanti per l'applicazione delle TEA nel miglioramento genetico dell'uva da tavola – 2021 - Acta Italus Hortus -XIII Giornate Scientifiche SOI - 22-23 Giugno 2021 – Catania
6. Nerva, L., Guaschino, M., Moffa, L., Velasco, R., Chitarra, W. (2021). RNAi applied for plant protection and plant endogenous gene regulation. American Society for Plant Biology Workshop, "The Biotechnology Of HIGS And SIGS For Pest and Pathogen Resistance: What Works, What Doesn't, What's New". Web meeting, 18 luglio 2021.
7. Nerva, L., Guaschino, M., Pagliarani, C., De Rosso, M., Lovisolo, C., Chitarra, W. (2022). Spray-induced gene silencing to improve drought resilience in grapevine. Proceedings of the Plant Biology 2022, Portland, Oregon 9-13/07/2022.
8. Nerva, L., Moffa, L., Giudice, G., Gambino, G., Perrone, I., Pagliarani, C., Chitarra, W. (2022). New Plant Breeding Techniques (NPBTs) for a sustainable and resilient agriculture. III Convegno AISSA#under40, Bolzano 14-15 luglio 2022.
9. Bergamini C., Nerva L., D'Amico M., Moffa L., Forleo L.R., Cardone M.F., Chitarra W., Velasco R. (2022) Genome editing in Grapevine: a Great Opportunity or only a Dream? XIII International Symposium on Grapevine Breeding and Genetics, Landau, Germany 10th July - 15th July 2022
10. D'Amico M., Forleo L.R., Cardone M.F., Maggiolini F.A.M., L'Abbate A., Marsico A.D., Perniola R., Velasco R., Bergamini C. Technological implementations toward successful application of marker-free genome editing in *Vitis vinifera* – 2022 – Poster e Abstract del XIII. International Symposium on Grapevine Breeding and Genetics, Siebeldingen, Germany, 10th July - 15th July 2022
11. Moffa, L., Giudice, G., Gambino, G., Perrone, I., Pagliarani, C., Velasco, R., Chitarra, W., Nerva, L. (2022). Potential of new plant breeding techniques for grapevine breeding. 3rd PlantEd Conference – Germany, 5-7 Settembre 2022.
12. Forleo L.R., D'Amico M., Cardone M.F., Maggiolini F.A.M., Basile T., Salerno A., Marsico A.D., Perniola R., Velasco R. e Bergamini C. Ottimizzazione dei protocolli di embriogenesi somatica e rigenerazione da protoplasti per l'applicazione delle New Plant Breeding Techniques (NPBTs) nel miglioramento genetico della vite – 2(022) – Presentazione al IV Convegno Nazionale sulla Micropropagazione-VitroSOI 2022 Bari, 12-14 Ottobre 2022

Battaglia R.¹, Crosatti C.¹, Mica E.¹, Michelotti V.¹, Guerra D.¹, Gadaleta A.², Nigro D.², e Cattivelli L.¹.

¹ CREA – Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica. Fiorenzuola d’Arda (PC) - Italy . ² Dipartimento di Agricoltura e Scienze ambientali, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, 70121 Bari, Italy.

Abstract

La resa in granella è un carattere influenzato da diversi geni e dalle condizioni di crescita delle piante. Uno dei maggiori ostacoli quando si vuole migliorare questo carattere è rappresentato dalla correlazione negativa che esiste tra alcune componenti della resa come il numero e la dimensione dei semi.

Attraverso il progetto WHEADIT ci siamo proposti di approfondire i meccanismi molecolari che influenzano le componenti della resa potenziale in orzo e frumento duro con un doppio approccio: la caratterizzazione funzionale di geni noti che determinano le dimensioni del seme, e la ricerca di geni coinvolti nella morfologia della spiga tramite QTL mapping. Abbiamo sviluppato, tramite genome editing ed espressione ectopica, specifici modelli mutanti che ci permettessero di studiare il trasporto di glucosio nel fiore (gene SWEET4 di orzo), la determinazione della lunghezza dei semi (geni GRF4 e LAC12 in orzo) e il peso dei semi in frumento duro (gene FUWA). Ciò ha permesso di capire nel dettaglio in quali meccanismi molecolari operano i geni selezionati e quali fattori chiave possono essere modulati per intervenire sulle dimensioni dei semi e la morfologia della spiga.



Il gene FUWA controlla il numero di culmi in frumento duro

La funzione del gene FUWA di frumento duro cv Svevo è stata studiata sviluppando piante modificate tramite genome editing e caratterizzandone il fenotipo.

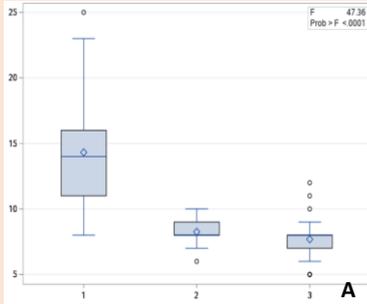


Fig. 1 A. Piante editate nel gene FUWA (1) sviluppano un maggior numero di culmi rispetto alle piante in cui la mutazione è in eterozigosi (2) o assente (3). **B.** Queste piante (*fuwa-1*) mostrano un ritardo nel tempo di fioritura e sono più basse rispetto alle piante wt.

Identificazione di QTL associati alla morfologia della spiga

L'analisi di associazione condotta per i caratteri "numero spighette per spiga (TSS)" e "numero fiori per spighetta (TFS)", in una popolazione RIL segregante (T. durum cv Latino x T. dicoccum MG5323) ha permesso di identificare 30 e 20 QTL rispettivamente. Considerando i QTL più stabili, confermati nei 4 ambienti analizzati, la regione di maggior interesse è localizzata sul cromosoma 4A, associato al TFS, in cui ricadono solo 17 geni annotati, tra cui diversi fattori di trascrizione o geni che rispondono alla presenza di etilene.

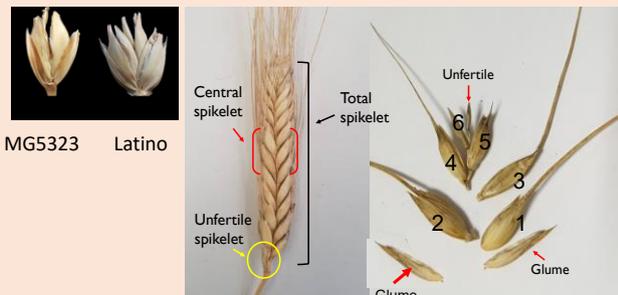


Fig. 2 Spighette delle linee parentali MG5323 e Latino e descrizione dei caratteri quantificati

Il gene *HvSW4* controlla lo sviluppo delle antere in orzo

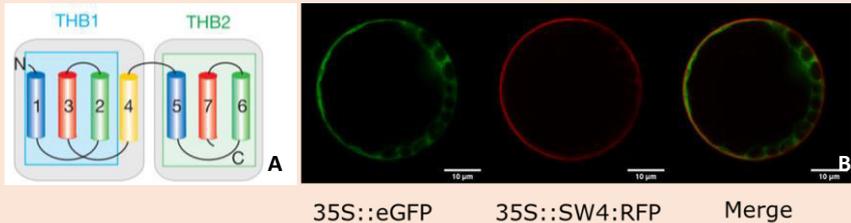


Fig. 3 Il gene *HvSW4* appartiene ad una famiglia di trasportatori degli zuccheri, la proteina è composta da sette eliche transmembrana (A) ed è localizzata sulla membrana plasmatica come indicato dai risultati di trasformazione transiente di protoplasti di tabacco (B).

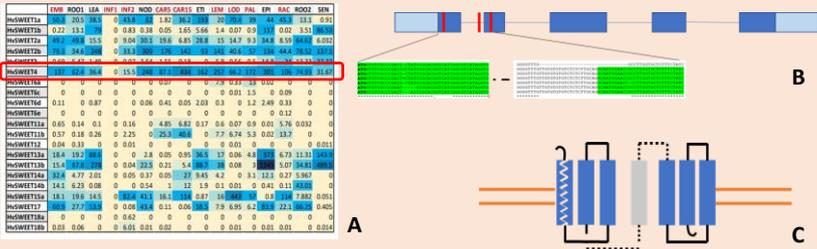


Fig. 4 *HvSW4* è espresso in tutti i tessuti (rettangolo rosso), l'espressione maggiore si osserva nelle cariossidi (A). Abbiamo sviluppato diversi alleli mutanti tramite genome editing (B); ci aspettiamo che le mutazioni interrompano la proteina a livello del primo dominio transmembrana (C).

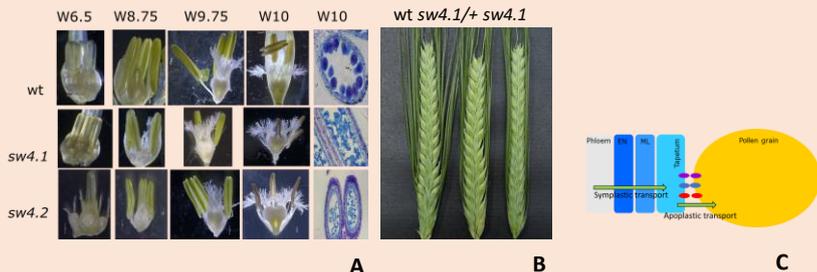


Fig. 5 Le piante con due diversi alleli mutati (*sw4.1* e *sw4.2*) sono risultate sterili a causa di difetti nello sviluppo del polline (A). Poiché il fenotipo è visibile solo nelle piante omozigoti (B) abbiamo concluso che la funzione del gene *HvSW4* è esercitata nelle antere, *SW4* è probabilmente necessario a trasportare lo zucchero dal tappeto verso i granuli pollinici (C).

I geni *HvLAC12* e *HvGRF4* regolano la dimensione del seme in orzo

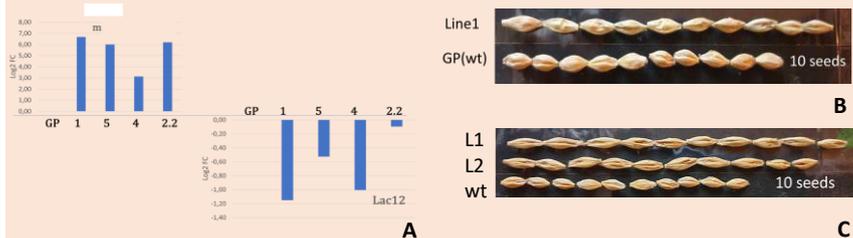


Fig. 6 Il gene *HvLAC12* codifica per una proteina laccasi e la sua espressione è regolata dal miR397a. L'espressione ectopica del gene mi397a determina una diminuzione dei trascritti di *LAC12* (A) e lo sviluppo di semi più lunghi rispetto al wild-type (B). Osserviamo lo stesso fenotipo in piante in cui abbiamo silenziato l'attività di *LAC12* tramite genome editing (L1 e L2 in figura C).

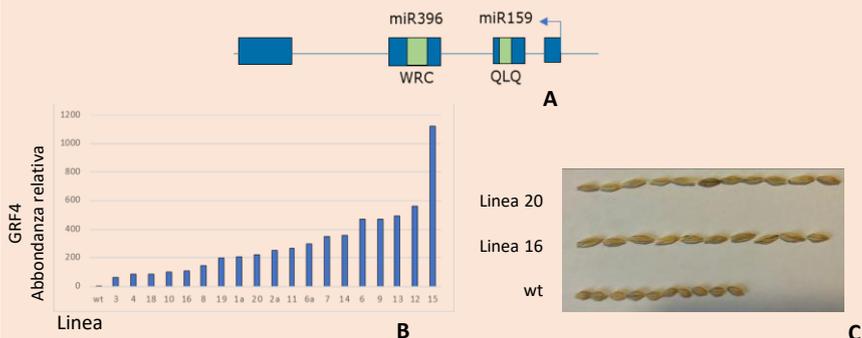


Fig. 7 Il gene *HvGRF4* codifica per un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia dei "Growth Regulating Factor". L'espressione di *GRF4* è regolata dall'attività di miR396 e miR159 (A) e la sua espressione ectopica (B) determina lo sviluppo di semi più lunghi rispetto al wt (C). E' in corso la caratterizzazione di piante mutanti ottenute tramite genome editing.

Impatto

I risultati raggiunti dal progetto WHEADIT hanno permesso di capire nel dettaglio la funzione molecolare di geni che influenzano le componenti della resa in orzo e frumento duro. Queste informazioni sono un requisito fondamentale per progettare approcci di «pyramiding» in modo da sviluppare ideotipi di cereali che riuniscano in un solo genotipo più alleli favorevoli.

Publicazioni su riviste scientifiche internazionali

1. Bagnaresi P, Cattivelli L, (2020). *Ab-initio* GO-based mining for tandem duplicate functional clusters in three model plant diploid genomes. PLoS One 15, e0234782.
2. Caselli F, Zanarello F, Kater MM, Battaglia R, Gregis V. (2020) Crop reproductive meristems in the genomic era: a brief overview. *Biochem Soc Trans.* 30, 853-865.
3. Mastrangelo AM, Cattivelli L, (2021). What makes bread and durum wheat different? *Trends in Plant Science* 26, 677-684

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Mica E., Michelotti V., Gregori G., Ventrelli C., Rossi R., Cornaro L., Masiero S., Crosatti C., Brunoud G., Battaglia R. Functional dissection of starch turnover during barley inflorescence and seed development. (Poster) Proceedings of the LXII SIGA Annual Congress Verona, Italy – 25/28 settembre, 2018 ISBN 978-88-904570-8-1
2. Kiros AY, Guerra D, Desiderio F, Michelotti V, Ghidotti S, Mazzucotelli E, Battaglia R, Mica E. Approaching the identification of grain yield components controlling genes in durum wheat. (Poster) Proceedings of the LXIII SIGA Annual Congress Napoli, Italy –10/13 Settembre, 2019 ISBN 978-88-904570-9-8
3. R. Rossi, M. Michelotti, E. Mica, C. Crosatti, S. Masiero, L. Cornaro, M. Baslam, A. Tafuri, R. Battaglia. (Orale) Sugar transport in barley, the role of the SWEET4 gene. Proceedings of the LXIII SIGA Annual Congress Napoli, Italy –10/13 Settembre, 2019.
4. Crosatti C., Michelotti V., Tafuri A., Gazzetti K., Rossi R., Migliorini C., Guerra D., Cattivelli L., Mica E., Battaglia R. (Orale) Identification and functional characterization of key genes influencing yield potential in barley. LXIV SIGA Annual Congress "Plant genetic innovation for food security in a climate change scenario" 14/16 settembre 2021. Congresso online
5. R. Battaglia. (Orale) Modulating yield components in barley. 2nd PlantED Conference. 20/22 settembre 2021. Lecce
6. Crosatti C., Tafuri A., Battaglia R., Gazzetti K., Branchi A., Guerra D., Mica E., Cattivelli L. The MiRNA397a/Laccase regulatory module control kernel size and shape in Barley. (Poster) Proceedings of the LXV SIGA Annual Congress Piacenza, 6/9 Settembre, 2022 ISBN: 978-88-944843-3-5

7. Kiros A.Y., Dell'Acqua M., Pe' E., Mica E., Desiderio F., Cattivelli L. Identification of the quantitative trait loci controlling spike-related traits in durum wheat. (Poster) Proceedings of the LXV SIGA Annual Congress Piacenza, 6/9 Settembre, 2022 ISBN: 978-88-944843-3-5
8. Mica E., Crosatti C., Gazzetti K., Guerra D., Battaglia R., Cattivelli L. Investigating The Role Of Grf4 In Barley Seed Size Determination. (Poster) Proceedings of the LXV SIGA Annual Congress Piacenza, 6/9 September, 2022 ISBN: 978-88-944843-3-5
9. Kiros A. Y., Desiderio F, Mica E, Dell'Acqua M, Pè E, Cattivelli L. Identification of the quantitative trait loci controlling spike-related traits in durum wheat. From seed to pasta IV- International Conference- A sustainable durum wheat chain for food security and healthy lives. (Poster) 26 – 29 Ottobre 2022, Bologna.
10. Cristina Crosatti, Vania Michelotti, Andrea Tafuri, Katia Gazzetti, Davide Guerra, Luigi Cattivelli, Erica Mica and Raffaella Battaglia. Identification and Functional Characterization of Key Genes Influencing Yield Potential in Barley . (Poster) PAG30 13/18 Gennaio 2023, San Diego USA
11. Vania Michelotti, Roberta Rossi, Cristina Crosatti, Aya Kitajima-Koga, Monica Colombo, Davide Guerra, Luigi Cattivelli Raffaella Battaglia. Sporophytic control of male fertility, the role of the HvSWEET4 gene. (Poster) IBGS 3/7 luglio, Riga – Lettonia

Trono D.¹, Borrelli G.M.¹, Ficco D.B.M.¹, Paris R.², De Simone V.¹, Mores A.¹, Giovanniello V.¹, Mastrangelo A.M.¹, Marone D.¹, Pecchioni N.¹

1 CREA Centro di ricerca Colture Industriali, S.S. 673, Km 25,200, 71122 Foggia, Italy. 2 CREA Centro di ricerca Colture Industriali, Via di Corticella 133, 40128 Bologna, Italy.

Abstract Nel sottoprogetto Wh-ITALY sono state utilizzate le nuove tecnologie di breeding per ottenere linee migliorate di frumento duro. A questo scopo è stata utilizzata la cv. Svevo il cui genoma è completamente sequenziato.

Tolleranza al glutine. Mediante genome editing è stato convertito l'epitopo tossico QQPQQPFPQ, presente nelle γ -gliadine, nell'epitopo protettivo QQPQR^{RPQ}QPFPQ, naturalmente presente nelle ω -secaline e in grado di proteggere la mucosa intestinale dagli effetti tossici dei peptidi gliadinici. Sono state ottenute 5 linee T0 editate.

Resistenza durevole a patogeni fungini. Mediante cisgenesi è stato introdotto il gene *Lr67* che conferisce resistenza durevole alle ruggini e all'oidio. Sono state identificate 25 linee T0 cisgeniche. Sulle generazioni successive (T1-T3) sono state condotte due prove di fenotipizzazione che hanno permesso di identificare piante completamente resistenti all'oidio. Una prova di resistenza con un isolato specifico di ruggine nera ha evidenziato, invece, suscettibilità delle piante cisgeniche (T1-T2).

Tolleranza a stress abiotici. Mediante genome editing è stato silenziato il gene codificante per la E3 ligasi (PRT6), che già in precedenza si era dimostrato efficace nell'incrementare la tolleranza a stress abiotici in orzo. Sono state ottenute 5 linee T0 editate.

Attualmente, tutte le linee cisgeniche/editate sono sottoposte a cicli di autofecondazione per l'ottenimento di linee omozigoti.

Risultati

Tolleranza al glutine. Per l'editing delle γ -gliadine è stata inizialmente scelta la γ 1a-gli, perché maggiormente espressa nella cv. Svevo. Mediante ricombinazione omologa, il gene codificante per la γ 1a-gli è stato sostituito con un gene (DNA donore) codificante per la gliadina γ 1a-gli_SuperRPQ contenente 8 peptidi protettivi al posto degli epitopi tossici (Fig. 1).

Gliadina γ 1a-gli_SuperRPQ

```
MKTLILTIHVAVALTTTANIQVDPSPGQVQWPQQQQPFSQPQQPFSQPQRRPQQPFPQPQQT
FPHQPQAQFPQPQQTFFHQPQQQFPQPQPQRRPQQPFPQPQPQRRPQQPFPQPQQQFPRP
QPQRRPQQPFPQPQPQRRPQQPFPQPQPQRRPQQPFPQPQPQRRPQQPFPQLQPQRRPQQPFP
QPQSQPQFSQQQSLIQPYLQQQMNPKNYLLQQCNVSLVSSLVSMILPRSDCQVMRQ
QCCQQLAQIPQLCAAIHGVVHSIIMQQEQQQQGIQIMRPLFQLIQGGIHPQPPAQLE
VIRSLVLGTLPTMCNVFVPEECSTTKAPFASIVADIGGG
```

Fig. 1 Sequenza della proteina γ 1a-gli contenente gli 8 peptidi protettivi.

In collaborazione con i colleghi del CREA-GB della sede di Roma sono stati disegnati e sintetizzati due costrutti virali contenenti lo stesso DNA donore ma due guide diverse. I due costrutti sono stati utilizzati per trasformare, mediante metodo biolistico, calli ottenuti da embrioni espantati sia da cariocidi mature che immature (Tabella 1).

Tabella 1 Dettagli dei due esperimenti di editing.

COSTRUTTO	N. DI EMBRIONI ESPANTATI	N. DI CALLI BOMBARDATI	N. DI PIANTE RIGENERATE	N. DI PIANTE EDITATE
pTRANS_253+Cas9+ sgRNA_E+γ3aSuperRPQ	4640	956	308	2
pTRANS_253+Cas9+ sgRNA_B+γ3aSuperRPQ	6220	2335	871*	3

*Ad oggi sono state screenate solo un terzo delle piante rigenerate.

La PCR di screening sulle piante rigenerate ha permesso di individuare 5 piante positive. Il sequenziamento ha confermato la presenza in queste piante del gene *γ1a-gli_SuperRPQ*. Attualmente sono stati avviati i cicli di autofecondazione per individuare linee omozigoti su cui effettuare i test di fenotipizzazione.

In collaborazione con la Scuola Superiore Sant'Anna di Pisa sono stati, inoltre, disegnati e sintetizzati due costrutti, pTRANS_253+Cas9+sgRNA_3+γ5a6aSuperRPQ e pTRANS_253+Cas9+sgRNA_5+γ5a6aSuperRPQ per inserire 7 peptidi protettivi nelle gliadine γ3a-gli e γ4a-gli (Fig. 2) i cui geni presentano tra loro un'omologia del 99%. Con ciascun costrutto sono stati bombardati circa 200 calli che sono attualmente in fase di recovery.

Gliadine γ3a-gli_SupRPQ e γ4a-gli_SupRPQ

MKTLFILAMATTIATANMQVDPSGQVQWPQQQPFROQPFYQQPQRPOQPFPOPPQQTFFHPQQQQ
 FPQPQQPQRPOQPFPOPPQOPQRPOQPFPOPPQAQLPFPQQOPQRPOQPFPOPPQOPQRPOQPFPOPPQOPQR
 POQPFPOPPQOPQPFPOPPQQLIPIYLLQQMNPCKNYLLQQCNVSLVSSLVSMILPRSDCQVMQQCC
 QQLAQIPRQLQCAAIHSVHVSIV(M)MQEQQQGIQLRPLFLI(N)QQGHIQPPQPAQYEVIRSLVLRTPN
 MCNVYVRPDCSTINAPFASIVAGISGQ

Fig. 2 Sequenza delle proteine γ3a-gli e γ4a-gli contenenti i 7 peptidi protettivi. In giallo sono evidenziati gli aminoacidi che differiscono tra le due proteine.

Resistenza durevole a patogeni fungini.

Sono stati condotti tre diversi esperimenti di trasformazione utilizzando la cassetta minima di espressione (promotore, sequenza codificante e terminatore) del gene *Lr67* (7133 bp), e 25 piante T0

Tabella 1 Dettagli dei tre esperimenti di trasformazione.

Esperimento	Luglio 2019	Dicembre 2019	Maggio 2020
N° embrioni isolati	7121	6700	8210
N° calli indotti	2627	2545	1345
% induzione callo	37	38	16.4
N° calli bombardati	2536	2495	1345
N° piante rigenerate	1123	40	109
% rigenerazione	44	1.6	8.1

Tolleranza agli stress abiotici. Analogamente all'editing delle γ -gliadine, anche per i geni omeologhi *TdPRT6a* e *TdPRT6b* è stato utilizzato un costrutto virale, il pTRANS_253+Cas9+sgRNA_4 la cui guida sgRNA4 è potenzialmente in grado di bersagliare l'esone 2 dei suddetti geni determinandone la disattivazione mediante ricombinazione non omologa del sito di taglio. Il costrutto è stato veicolato nel genoma di Svevo utilizzando due distinti protocolli 1) infezione di embrioni immaturi con *Agrobacterium tumefaciens*, 2) bombardamento di calli derivanti da embrioni immaturi. La trasformazione mediata da *A. tumefaciens* ha prodotto un totale di 30 plantule che sono state sottoposte ad una PCR di screening con primer specifici disegnati sul gene *TdPRT6* e successivo sequenziamento del frammento amplificato. Cinque piante hanno mostrato un identico polimorfismo in posizione -1 rispetto al sito target che consiste in una transizione C->T (Figura 1). I cromatogrammi suggeriscono che sia stato bersagliato uno solo dei due geni omeologhi.

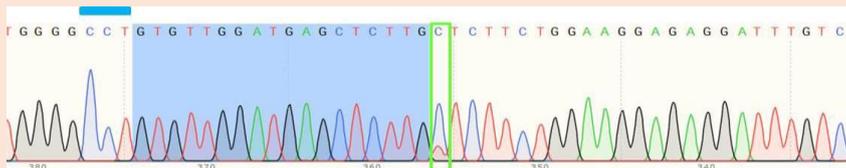


Fig. 1 Esito dell'editing del gene *TdPRT6*. Il cromatogramma mostra la posizione del PAM (barra blu) e della mutazione puntiforme rilevata (riquadro verde).

Mediante metodo biolistico sono stati bombardati 900 calli che sono attualmente in fase di rigenerazione.

Impatto

L'ottenimento di piante di frumento duro migliorate per tolleranza al glutine può rappresentare una nuova strategia terapeutica per il morbo celiaco ed altre intolleranze al glutine. L'ottenimento di piante di frumento duro migliorate per la resistenza a diversi patogeni fungini e agli stress abiotici può avere un impatto notevole sulla sostenibilità economica e ambientale, oltre che un impatto sugli agricoltori che coltivando piante resistenti possono ridurre le perdite di produzione dovute a malattie o condizioni ambientali avverse.

Publicazioni su riviste internazionali

1. Paris R., Petruzzino G., Savino M., De Simone V., Ficco D.B.M., Trono D. (2021) Genome-wide identification, characterization and expression pattern analysis of the γ -gliadin gene family in the durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivar Svevo. *Genes* 12, 1743.
2. Marone D., Russo M.A., Mores A., Ficco D.B.M., Laidò G., Mastrangelo A.M., Borrelli G.M. (2021) Importance of landraces in cereal breeding for stress tolerance. *Plants* 10, 1267.
3. Mores A., Borrelli G.M., Laidò G., Petruzzino G., Pecchioni N., Amoroso L.G.M., Desiderio F., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Marone D. (2021) Genomic approaches to identify molecular bases of crop resistance to diseases and to develop future breeding strategies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 5423.
4. Trono D. and Pecchioni N. (2022) Candidate genes associated with abiotic stress response in plants as tools to engineer tolerance to drought, salinity and extreme temperatures in wheat: An overview. *Plants* 11, 3358.

Presentazioni Orali/Poster a congressi nazionali e internazionali

1. Mores A., Mastrangelo A.M., De Simone V., Giovanniello V., Giove S., Giancaspro A., Gadaleta A., Pecchioni N., Borrelli GM, Marone M. Production of durum wheat lines with improved durable resistance to multiple fungal diseases. FSTP, Bologna, 26-29 Ottobre 2022.
2. Mores A, Mastrangelo A.M., De Simone V., Giovanniello V., Giove S., Giancaspro A., Gadaleta A., Pecchioni N., Borrelli G.M., Marone M. Production of durum wheat lines with improved durable resistance to multiple fungal diseases. PAG 30, San Diego, 12-18 Gennaio 2023.

