

Utilizzo delle NBT in Italia e uno sguardo agli scenari futuri di applicazione

Bologna 9.12.2015

Fabio Fornara

Dipartimento di Bioscienze

Università di Milano, Italy

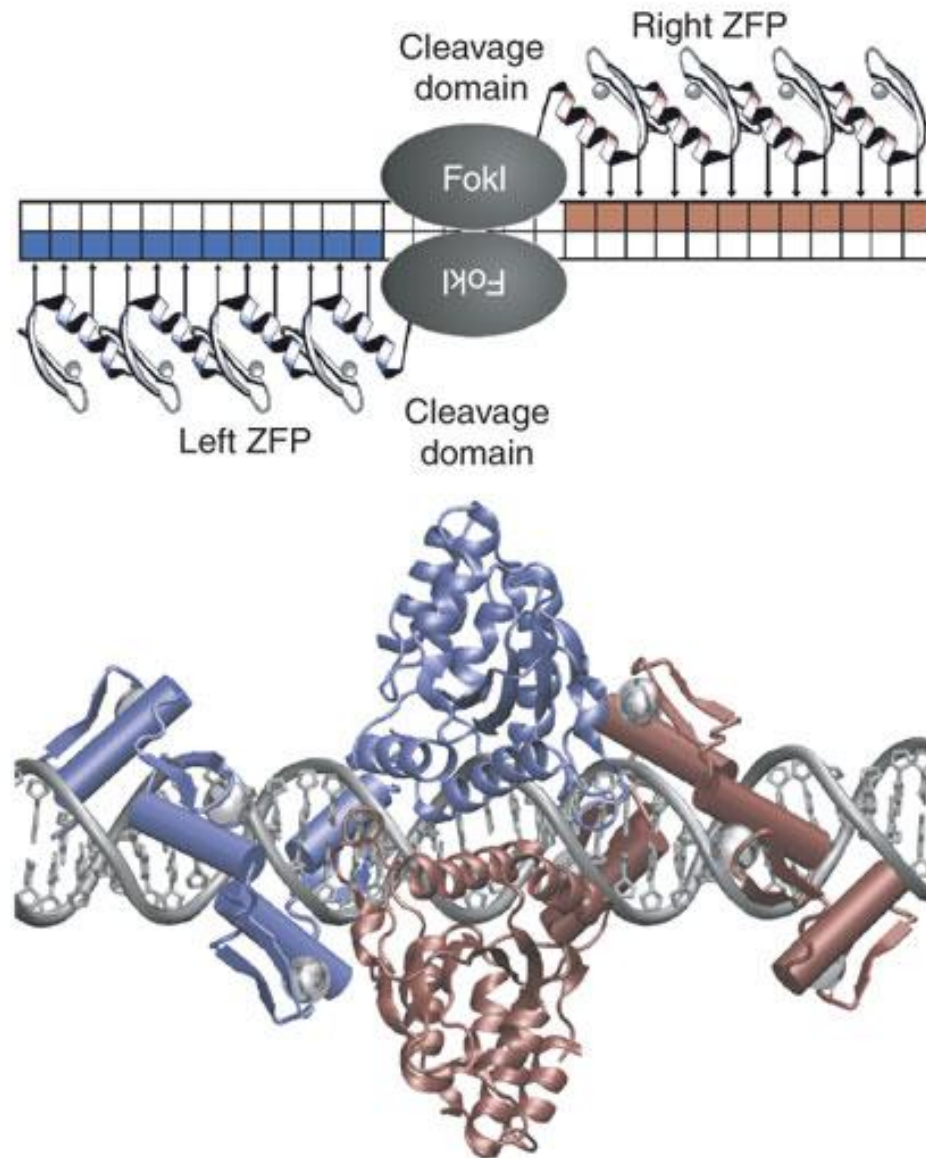
<http://users.unimi.it/fornaralab/>



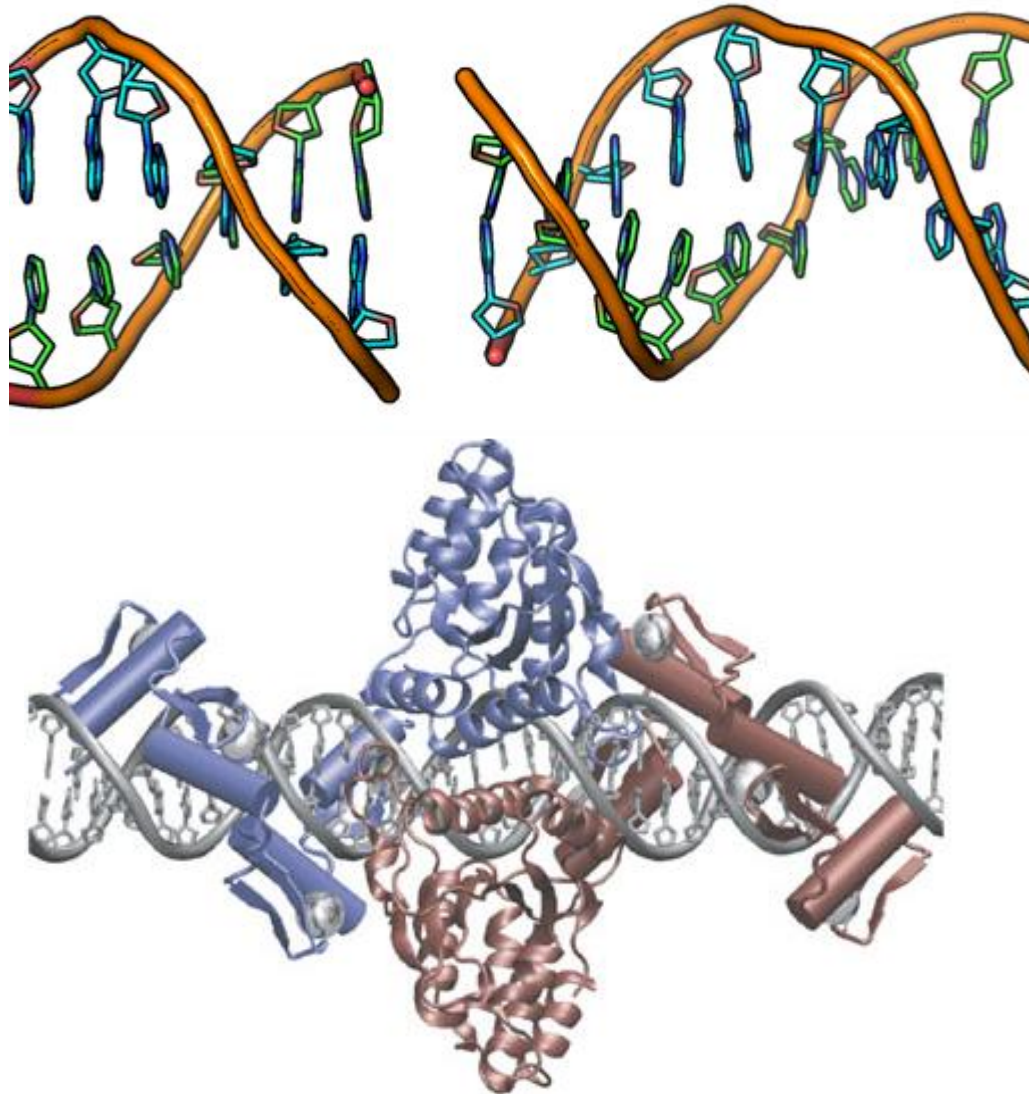
Le tecnologie di *genome editing*

- Tecnologie diverse ma che hanno in comune la possibilità di modificare il DNA in modo specifico, cambiandolo come si fa con un testo.
- Diversi approcci disponibili (ODM, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9)
- La tecnologia più promettente (perché semplice da usare) è il sistema CRISPR/Cas9
- Consentono di introdurre mutazioni nelle piante in tempi brevissimi
- Altamente specifiche per il gene di interesse, non alterano il genotipo con mutazioni casuali
- La mutazione è ereditata in modo stabile
- La modificazione è inizialmente causata da transgene ma il prodotto finale è transgene-free

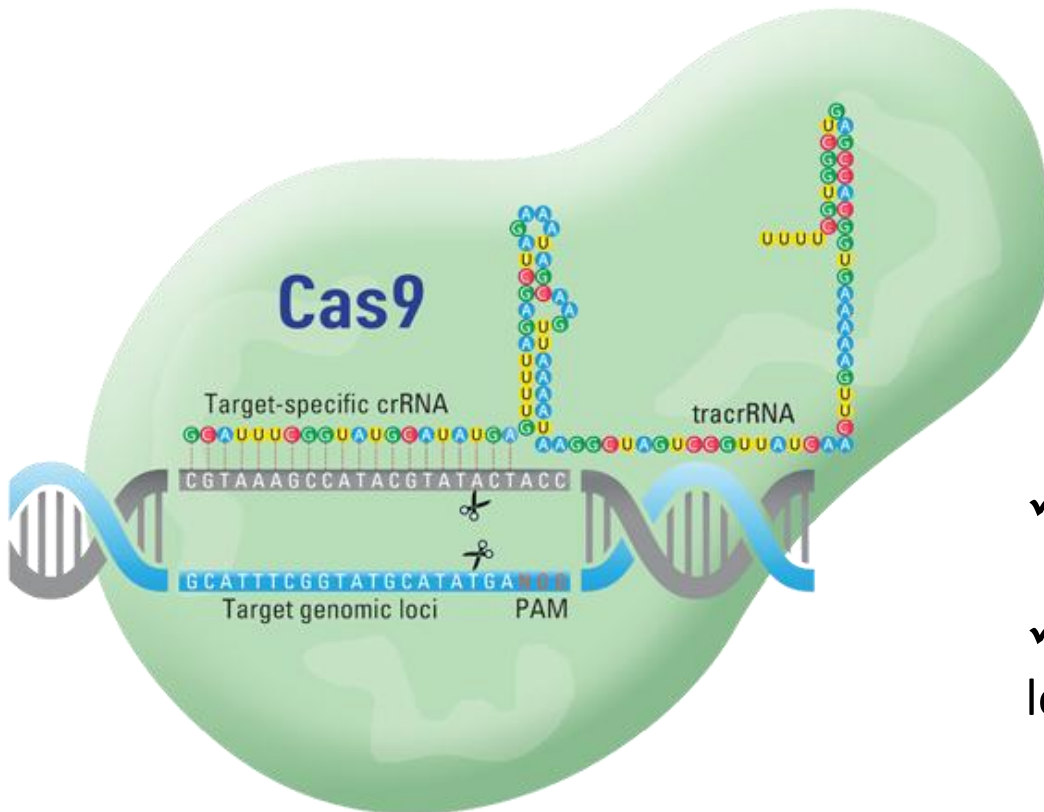
Le tecnologie di *genome editing*



Gli enzimi per l'*editing* rompono il DNA in punti precisi del genoma



Il sistema CRISPR/Cas9

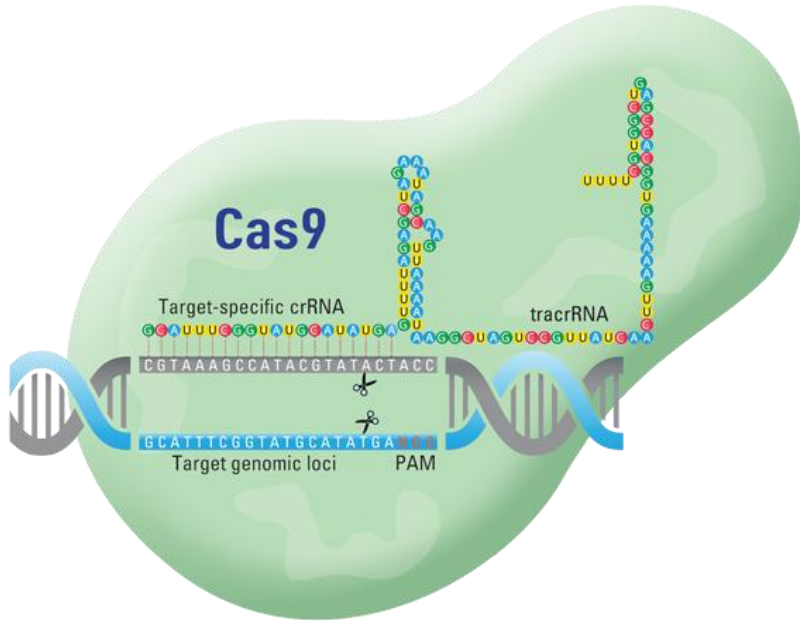


- ✓ Tecnicamente semplice da utilizzare
- ✓ Funziona in modo efficiente in tutte le specie in cui è stata provata
- ✓ Richiede una proteina (Cas9) finora introdotta mediante trasformazione stabile
- ✓ Ora può essere introdotta in modo transiente (NON ORIGINA UN OGM)

genome editing vs. tecnologie convenzionali

Editing	Mutagenesi o MAS
Il gene che controlla il tratto di interesse deve essere noto	Il gene non è necessariamente noto
Veloce	Lento
Piccole modifiche del genoma	Ampie modifiche o linkage drag
Sistema mirato al singolo locus	Sistema non mirato

Genome editing in riso con CRISPR/Cas9



- Cas9 ottimizzata per riso
- Introdotta mediante trasformazione stabile
- Piante rigenerate mostrano editing bi-allelico già alla prima generazione
- La mutazione è ereditata nella progenie



CCCTCTCCAGGCGGCGGTCTCCTTCCATTCCTCCGGGAAGAGGCGGCGGCGGCGGCACG (wt)

CCCTCTCCAGGCGGCGGTCTCCTTCCATTC-TCCGGGAAGAGGCGGCGGCGGCGGCACG (-1nt)

CCCTCTCCAGGCGGCGCGTCTCCTTCC-----TCCGGGAAGAGGCGGCGGCGGCGGCACG (-5nt)

CCCTCTCCAGGCGGCG-----GCGGCACG (-36nt)

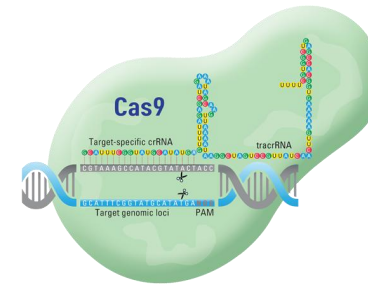
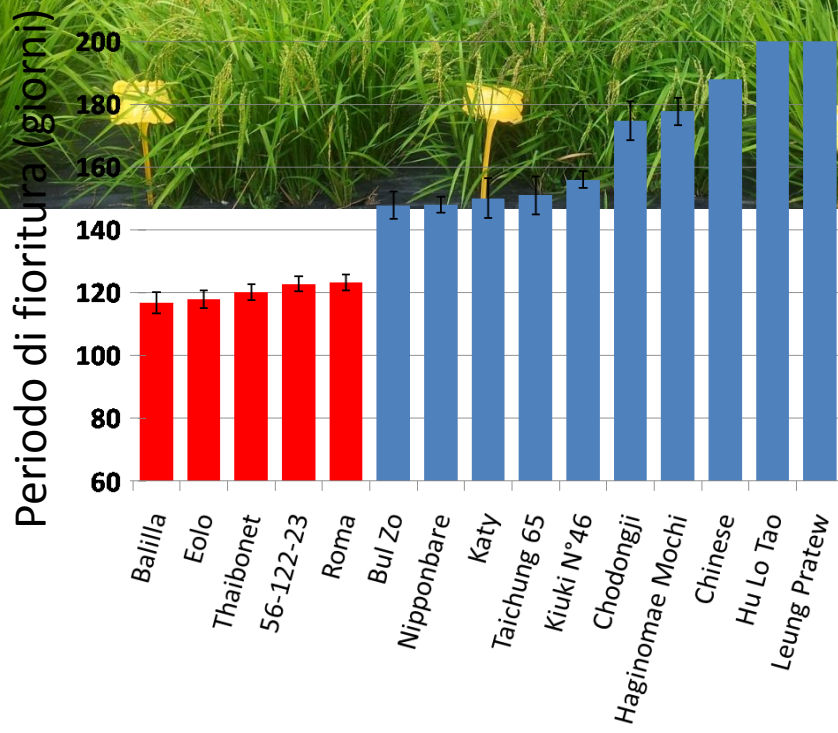
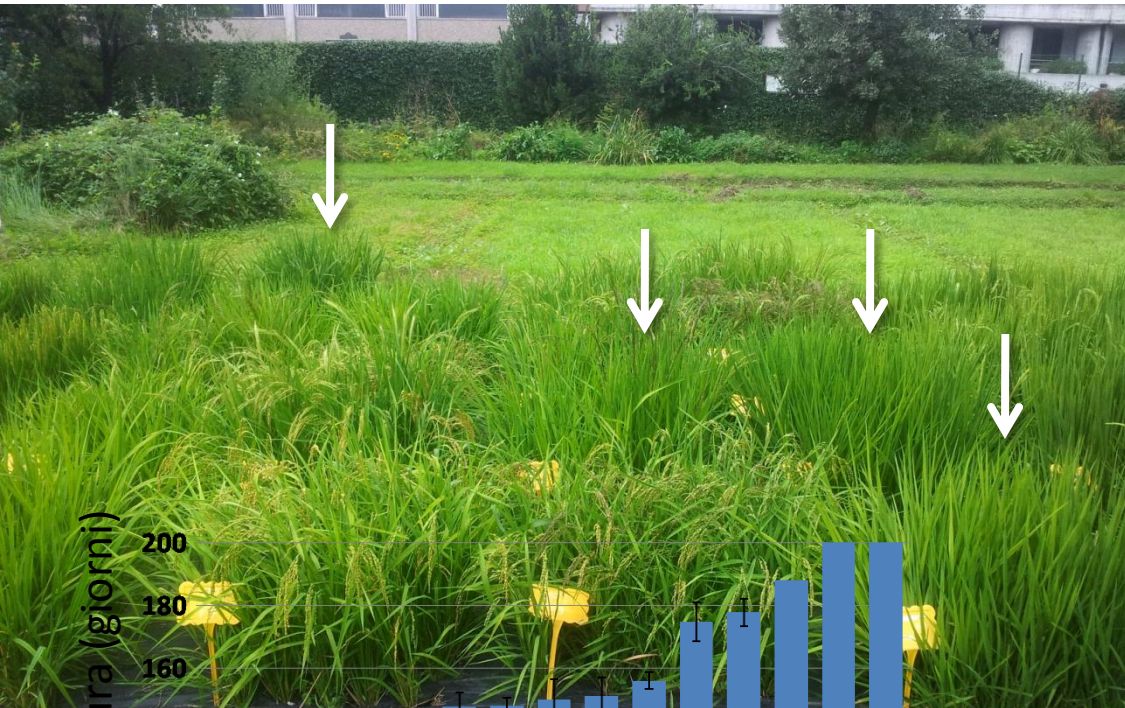
CCCTCTCCAGGCGGCGGTCTCCTTCCATTCCATCCGGGAAGAGGCGGCGGCGGCGGCACG (+1nt)

CCCTCTCCAGGCGGCGCGTC-----TCCGGAAGAGGCGGCGGCGGCGGCACG (-12nt)

Mutazioni mirate al locus *DDT1* alterano la crescita degli internodi



Genome editing per l'adattamento rapido di riso alle latitudini settentrionali

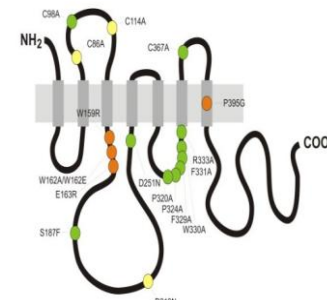


TCCTTCCATTCTCCTCCGGGAAGAGGCGGCGG (*Hd1*)
 TGGACAACGAGTCCGGCGAGGCGGCGGCGG (*Ghd8*)
 GCGGCGCCGACGGTGGCGGCTGTTGCTCCC (*Ghd7*)
 CTCCGGTGTGCAGCCGGCCACCGCAGGTCTG (*PRR37*)

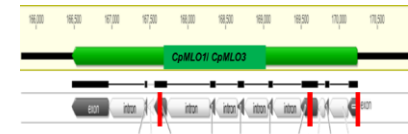
Editing of zucchini genome for powdery mildew resistance



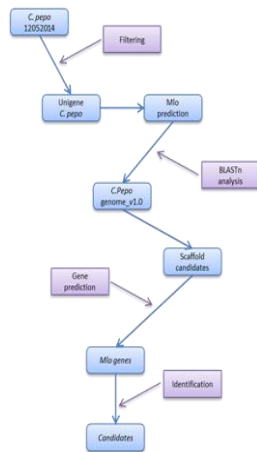
A common disease is powdery mildew caused by *Erysiphe chioracearum* (Ec) and *Sphaerotheca fuliginea* (Sf)



Several studies revealed that specific members of the Mildew Locus O (MLO) gene family act as powdery mildew susceptibility factors

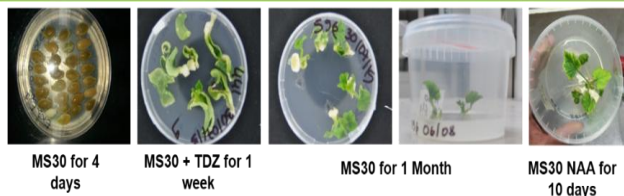


Single and double targets MLO Crispr-Cas9 constructs were developed
Patent 102015000063332



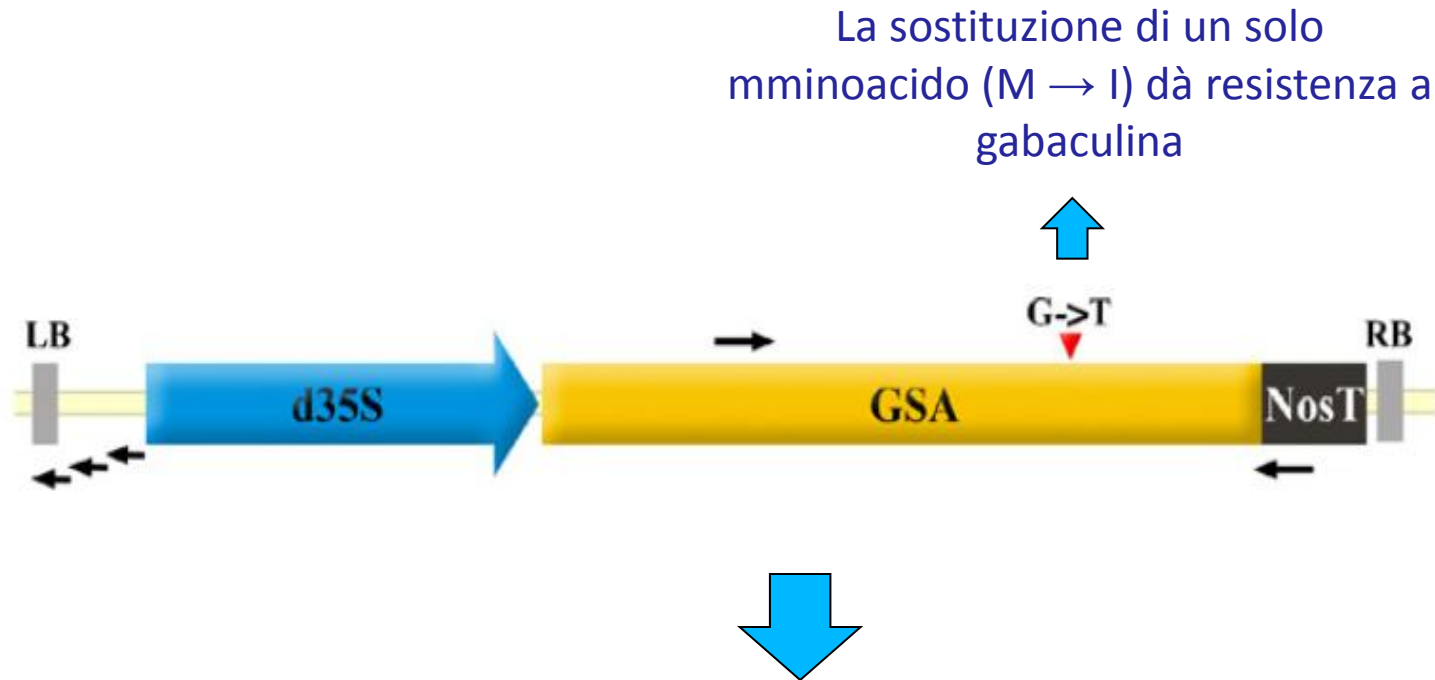
MLO-like gene sequences were identified in the genome of *C. pepo* by using an in-house-built pipeline

Zucchini stable transformation were obtained



In the next future a powdery mildew resistant zucchini cultivar

Un gene vegetale (GSA di erba medica) permette di non utilizzare antibiotici per ottenere piante modificate



Selezione cisgenica per modificare il genoma delle piante coltivate

species	technology	effect	reference
Rice	ODM	herbicide tolerance	Okuzaki and Toriyama, 2003
	TALEN	bacterial blight resistance	Li et al., 2012
	TALEN	rice fragrance	Shan et al., 2015
	TALEN	multiplex gene editing	Shan et al., 2013a
	CRISPR	multiplex gene editing	Ma et al., 2015
	CRISPR	bacterial blight resistance	Zhou et al., 2015
	CRISPR	blast resistance	Jiang et al., 2013
Maize	ODM	herbicide tolerance	Zhu et al., 2000
	EMN	male sterility	Djukanovic et al., 2013
	ZFN	herbicide tolerance	Shukla et al., 2009
	ZFN	herbicide tolerance	Ainly et al., 2013
Tobacco	ODM	herbicide tolerance	Kocherenko et al., 2003
	ODM	herbicide tolerance	Beethan et al., 1999
	ZFN	herbicide tolerance	Townsend et al., 2009
	TALEN	herbicide tolerance	Zhang et al., 2013
Wheat	TALEN	powdery mildew resistance	Wang et al., 2014
Canola	ODM	herbicide tolerance	Pratt et al., 2014
Cotton	EMN	herbicide tolerance	D'halluin et al., 2013
Soybean	ZFN	multiplex gene editing	Curtin et al., 2013
	TALEN	high oleic acid oil content	Haun et al., 2014
	CRISPR	herbicide tolerance	Li et al., 2015
	CRISPR	multiplex gene editing	Cai et al., 2015
Barley	TALEN	herbicide tolerance	Wendt et al., 2013
Tomato	TALEN	organ dimension	Lor et al., 2014
Potato	TALEN	low reducing sugars and acrylamide	Clasen et al., 2015
	CRISPR	herbicide tolerance	Wang et al., 2015

