



PROGRAMMA WORKSHOP

La filiera dell'innovazione varietale in frutticoltura: dal germoplasma alla varietà

Scuola di Agraria dell'Alma Mater – Università degli Studi di Bologna 19 Giugno 2018



Ore 14:00 Brevi interventi sintetici

1 Aspetti legali	Stefano Borrini	SIB Società Italiana Brevetti
2 Germoplasma	Ignazio Verde	CREA Roma
3 Miglioramento genetico classico	Raffaele Testolin	Università di Udine
4 New breeding technologies	Vittoria Brambilla	Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Milano
5 Prove varietali	Lorenzo Berra	Agrion Piemonte
6 Vivaismo	Alessio Martinelli	
7 Variety management	Giampaolo Dalpane	Dalpane Vivai
8 Organizzazioni dei Produttori	Luca Lovatti	CIF Consorzio Innovazione Frutta Trentino
Consumatori	Lidia Lozano	Centro di Sperimentazione Laimburg

Ore 16:00 – 16:30 Coffe break

9 Distribuzione	Claudio Mazzini (intervento registrato)	Coop Italia
-----------------	---	-------------

A seguire: tavola rotonda con i relatori diretta da Walter Guerra Centro di Sperimentazione Laimburg

Ore 18:00 Conclusione dei lavori

WORKSHOP

*La filiera dell'innovazione varietale in frutticoltura: dal
germoplasma alla varietà*

Stefano Borrini
Società Italiana Brevetti

Bologna 19 giugno 2018

I brevetti in agroindustria



....qualcosa di (veramente) nuovo?

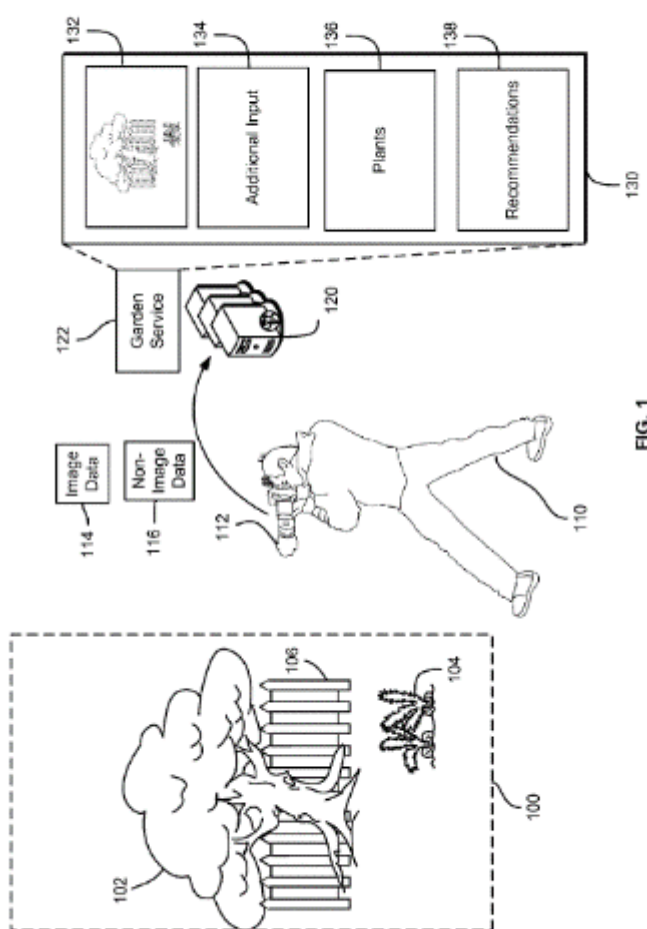


FIG. 1

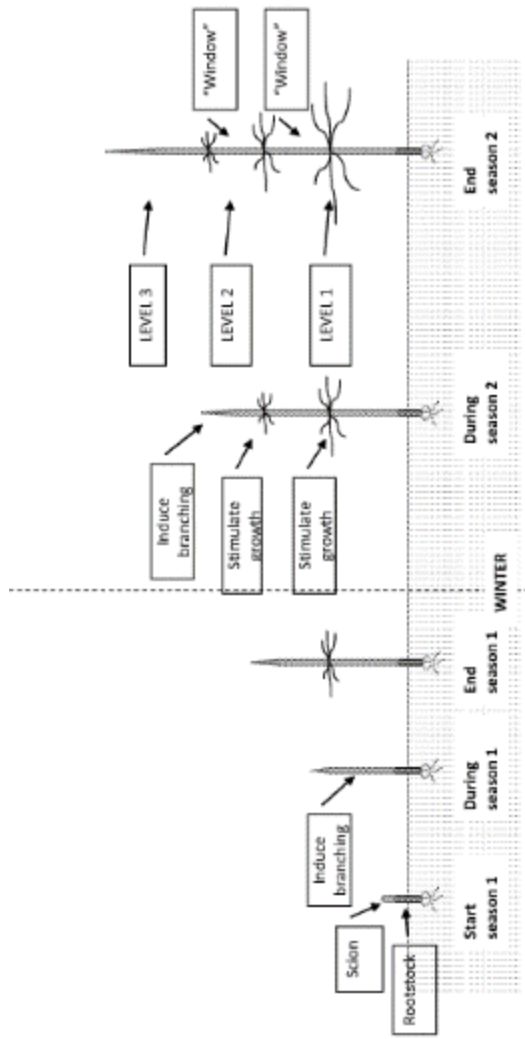
FIELD OF THE INVENTION

5

[0001] The present invention is situated in the field of horticultural methods of obtaining productive fruit trees, more in particular methods for making nursery trees with improved fruit producing capacity when planted in orchards, and such nursery trees and the orchard trees developing therefrom as such.

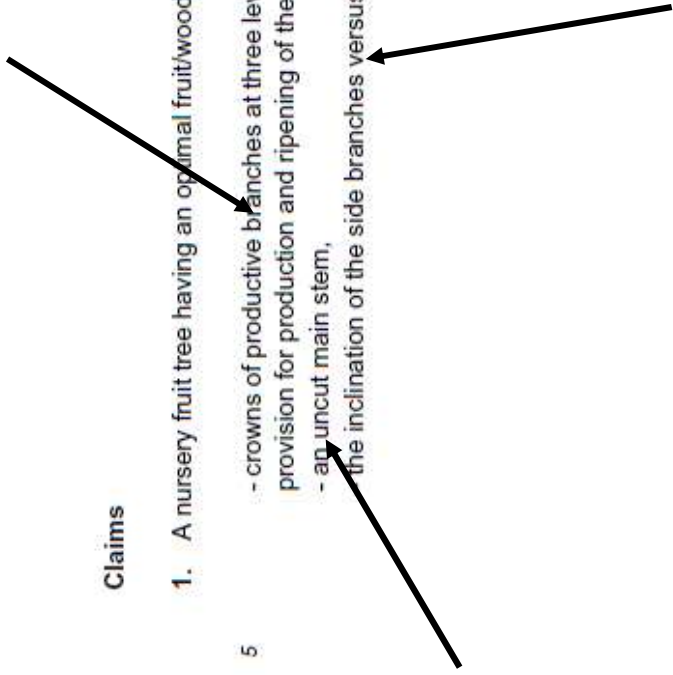
Table 1: Advantages of new tree according to the invention over the known knip tree

	Knip tree	New tree
5		
10	In tree nursery stage: heavy pruning in first year resulting in strong new growth in the second year	Continuous, balanced growth
15	Negative effects of severe pruning in tree nursery stage are carried over to the orchard and will last for the entire life of the tree (15-20 years)	Positive effects of balanced growth in the tree nursery stage are carried over to the orchard and will last for the entire life of the tree (15-20 years)
20	Long side branches are required to achieve sufficient fruit-producing wood	Shorter side branches deliver the required amount of fruit-producing wood
25	Long side branches means wide spacing in the orchard, resulting in the need to accumulate a lot of new wood in the top of the tree in order to fill up the volume, resulting in problems with light penetration	Closer planting distances, better light penetration and as a result better fruit quality and fruit color
30	Higher planting densities can be obtained by heavy pruning upon planting in the orchard but result in a disturbed balance between vegetative and generative structures	No need to prune to reduce tree width in high density planting
35	Need for intensive pruning after planting, for many years, in order to achieve and maintain the desired tree architecture	No need for intensive and prolonged pruning over the life span of the orchard
	Fertilization has to be optimized to allow vegetative growth and fruit formation at the same time	Fertilization focuses on fruit production only
	Labor-intensive	Less pruning means less labor cost
	Constant risk of disequilibrium between vegetative and generative growth, resulting in competition for nutrients between fruit and branches, as such increasing the occurrence of physiological disorders and the sensitivity to pests and diseases, including post-harvest diseases	Better fruit quality



Claims

1. A nursery fruit tree having an optimal fruit/wood production balance having the following characteristics:
 - crowns of productive branches at three levels, separated by windows sufficiently large to enable optimal light provision for production and ripening of the fruit,
 - an uncut main stem,
 - the inclination of the side branches versus the stem approaching 90° .



I possibili effetti delle (proposte di)
nuove normative

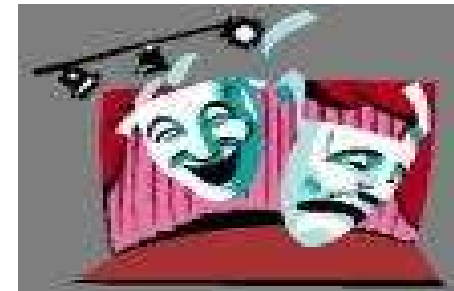


Distintività

Una varietà si considera distinta quando è chiaramente distinguibile, mediante l'espressione dei caratteri risultanti da un particolare genotipo o combinazione di genotipi, da qualsiasi altra varietà la cui esistenza è notoriamente conosciuta alla data di presentazione della domanda determinata in virtù dell'Articolo 51.

Nella pratica due varietà sono
chiaramente distinguibili

e pertanto distinte



Se le differenze tra le caratteristiche osservate sono

consistenti

e

chiare

		purple	Rafzubin	7
20:	20:	Flower diameter with petals pressed into horizontal position	Frederic, Spätkühender Tafelfeig	4
QN	QN	very small	Jonafree	3
		small	Cox's Orange Pippin	5
		medium	Schone van Boskoop	2
		large		
21:	21:	Flower arrangement of petals	Worcester Pearmain	4
		free	Golden Delicious, Jonagold, Topaz	3
		intermediate	Schone van Boskoop	2
		overlapping		
22:	22:	Flower position of stigma relative to anthers	Allamona	4
		below	Cox's Orange Pippin	2
		same level	Golden Delicious	3
		above		
23:	23:	Young fruit extent of anthocyanin overcolor	Grenadier, Northey	4
		absent or very small	Fuji	3
		small	Idared	5
		medium	Elise	2
		large	Weinroze	9
		very large		

TG/14/9

UPOV

ORIGINAL: English

DATE: 2005-04-06

INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF NEW VARIETIES OF PLANT
GENEVA

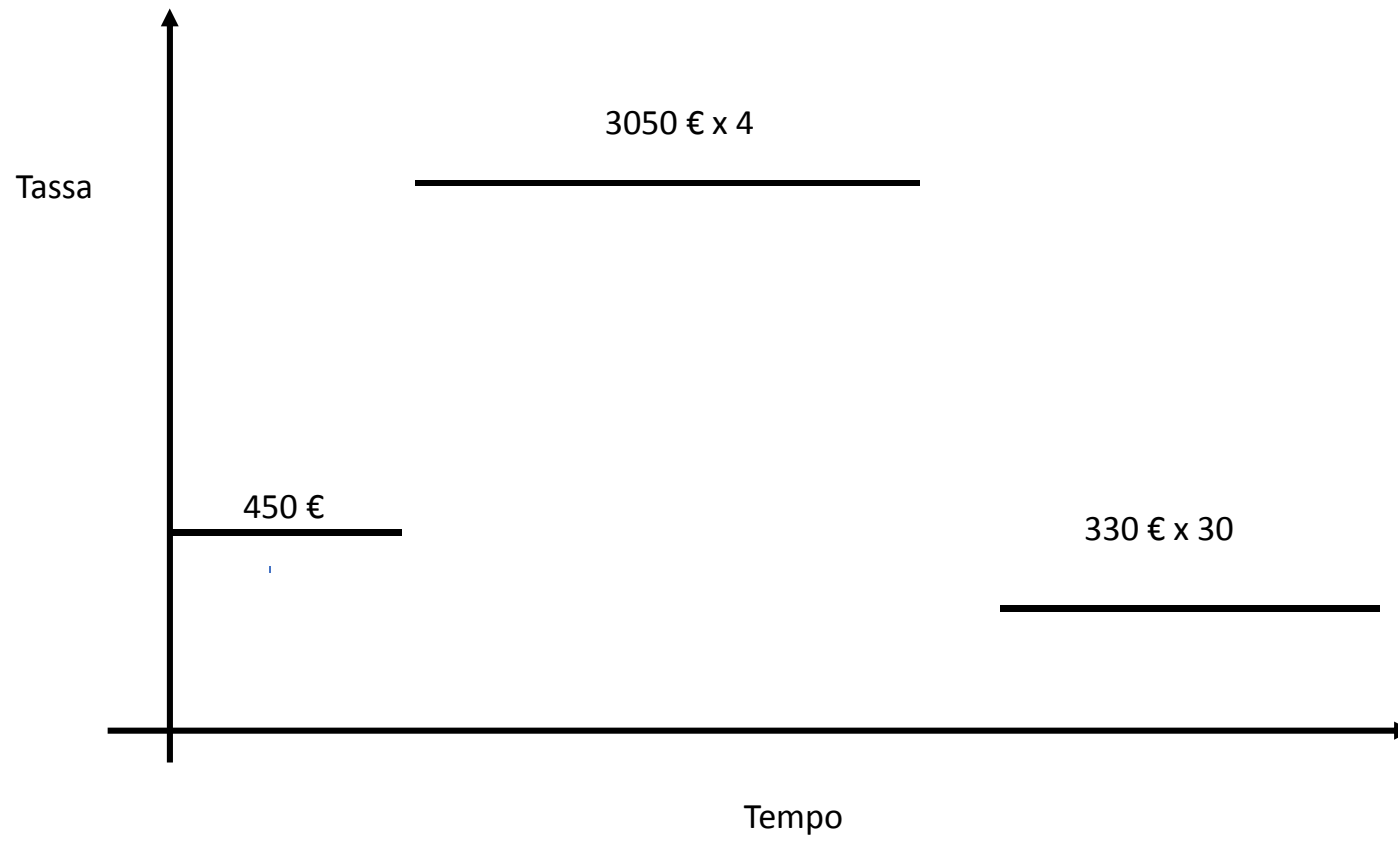
*

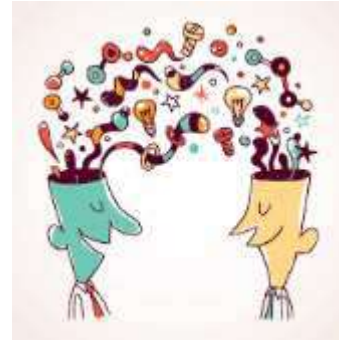
<p>APPLE (Fruit Varieties)</p> <p>UPOV Code: MALUS_DOM (<i>Malus domestica</i> Borkh.)</p>

GUIDELINES

FOR THE CONDUCT OF TESTS
FOR DISTINCTNESS, UNIFORMITY AND STABILITY

		100%	75%	50%	25%	0%
7r	One-year-old shoot: colour on sunny side		greenish-brown		Granny-Smith	4
PQ			reddish-brown		Viking	2
			light brown		Arkcharm	3
			medium brown		Golden-Delicious	4
			dark brown		Ingrid-Marie	5
8r	One-year-old shoot: pubescence (on distal half of shoot)		absent or very weak		Exton's Fortune, Rewena	7
QN			weak		Golden-Delicious	3
			medium		Gos's Orange-Pippin	5
			strong		Bramley's Seedling	7
			very strong		Rambour d'Hiver	9
9r	One-year-old shoot: number of lenticels		few		Arkmore, Bramley's Seedling	3
QN			medium		Gos's Orange-Pippin	5
			many		Mutsu	7
10r	Leaf-blade attitude in relation to shoot		upwards		Katja, Redbeaves	4
(+)			outwards		Bramley's Seedling	2
QN			downwards		Granny-Smith, Schone-van-Boskoop	3





La comunicazione efficace



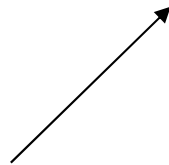
Fonte: W. Guerra



Denominazione varietale o
marchio?

RUBENS®

Marchio



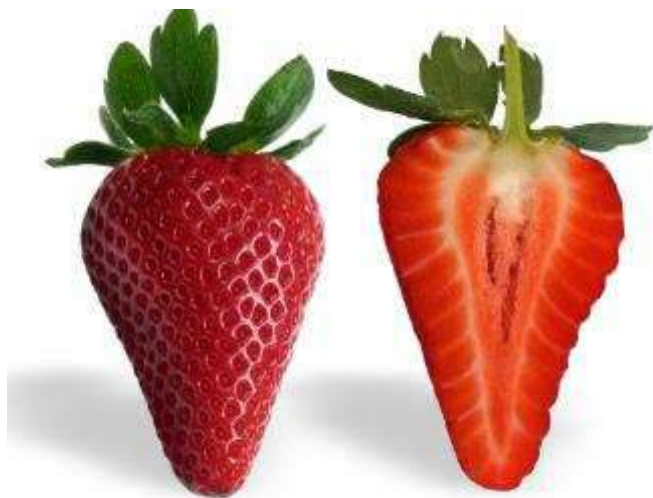
civni*

Denominazione varietale



1. La varietà deve essere designata con una denominazione destinata ad essere la sua designazione generica.

2. La denominazione deve permettere di identificare la varietà. Essa non può consistere unicamente di cifre, a meno che non si tratti di una prassi stabilita per designare talune varietà. Essa non deve essere suscettibile di indurre in errore o di creare confusione quanto alle sue caratteristiche, al valore o alla identità della varietà o alla identità del costituente. In particolare, essa deve essere diversa da ogni altra denominazione che designi, sul territorio di uno Stato aderente all'Unione per la protezione delle nuove varietà vegetali (UPOV), una varietà preesistente della stessa specie vegetale o di una specie simile, a meno che quest'altra varietà non esista più e la sua denominazione non abbia assunto alcuna importanza particolare.



Candongga

Marchio

Sabrosa
Denominazione
varietale

Le denominazioni nel mondo

Larry / Barry

Lion / Raion



Grazie per l'attenzione



Agrobiodiversità: una risorsa per il miglioramento genetico delle specie da frutto

Ignazio Verde

CREA - Centro di ricerca olivicoltura, frutticoltura e agrumicoltura
(CREA OFA - Roma)

XII Giornate Scientifiche SOI Bologna 19-22 giugno 2018

- **Collezioni (FAO- 2017):**
 - 1.750 genebanks
 - 7,4 milioni di accessioni tra piante coltivate e specie affini (crop wild relatives), ridondanza
- **Reperimento e Mantenimento:**
 - Specie arboree, grandi dimensioni, Ridondanza (il 20-50% in media sono uniche),
- **Caratterizzazione:**
 - Fenotipica e genotipica (diversità genetica, struttura etc)
- **Valorizzazione:**
 - individuazione di alleli favorevoli (GWAS, mapping) per il miglioramento genetico.
 - Favorire lo scambio e la disponibilità del materiale.

- Scambio con altre collezioni
 - ✓ Passaporto (dati essenziali)
 - ✓ Stato sanitario (malattie da quarantena)

- Reperimento nelle zone di origine
 - ✓ Spedizioni
 - ✓ Specie coltivate (selvatiche)
 - ✓ Crop wild relatives
 - ✓ 1079 crop wild taxa (Gene Pool 1 e 2)

- **Le piante arboree**

- ✓ Propagate clonalmente
- ✓ Altamente eterozigoti
- ✓ Dimensioni notevoli

- **Conservazione in vivo**

- ✓ *Costi di mantenimento 75-100 \$ per pianta per anno (Stima USDA)*

- *Es CREA OFA 7100 accessioni x 2 piante 14.200 piante consideriamo 65 € a pianta = **923.000 euro per anno***

- **Crioconservazione**

- ✓ *1 euro a campione per anno (più infrastrutture)*

- Risorse genetiche
 - Germoplasma frutticolo (CREA OFA)
 - Fruttiferi (pomacee, drupacee, kiwi, frutti minori)
 - ✓ 24 specie; ~ 6000 accessioni
 - ✓ Centro Nazionale Germoplasma Frutticolo
 - Agrumi
 - ✓ 50 specie, 700 accessioni
 - Olivo
 - ✓ 1 specie, 460 accessioni
 - Totale: 75 specie, ~7100 accessioni



I marcatori molecolari sono:

- indipendenti dall'ambiente, dalle fasi di sviluppo e dalle fasi fenologiche della pianta
- Alto potere di risoluzione
- Sono abbondanti nel genoma

ARTICLE

Seed Banks and Molecular Maps: Unlocking Genetic Potential from the Wild

Steven D. Tanksley and Susan R. McCouch

Nearly a century has been spent collecting and preserving genetic diversity in plants. Germplasm banks—living seed collections that serve as repositories of genetic variation—have been established as a source of genes for improving agricultural crops. Genetic linkage maps have made it possible to study the chromosomal locations of genes for improving yield and other complex traits important to agriculture. **The tools of genome research may finally unleash the genetic potential of our wild and cultivated germplasm resources for the benefit of society.**

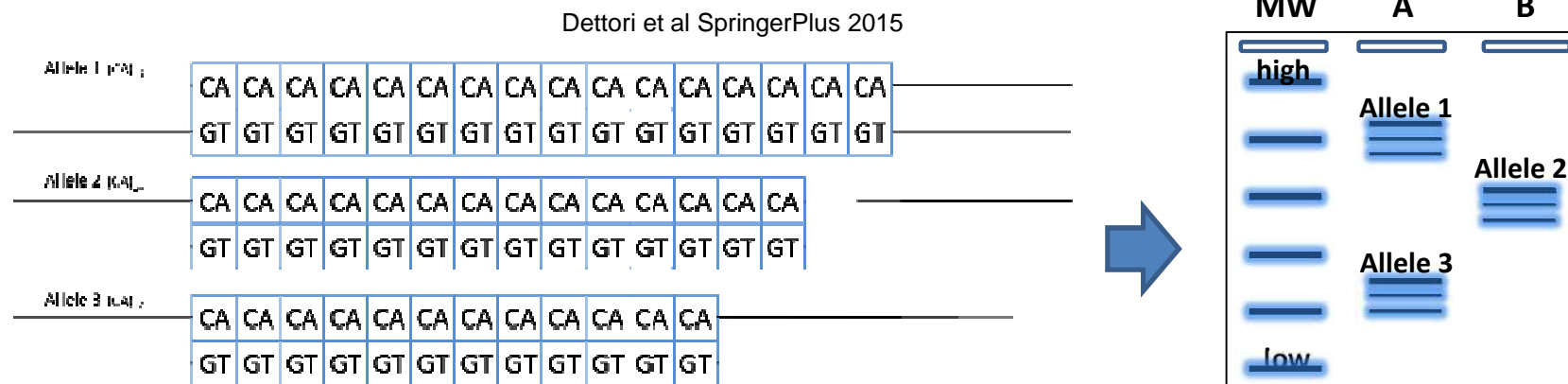
variable, but less productive, primitive ancestors are excluded. Soybeans and wheat are good examples of crops with very narrow genetic bases. Virtually all modern U.S. soybean varieties can be traced back to a dozen strains from a small area in northeastern China, and the majority of hard red

SCIENCE (1997) 277: 1063-1066

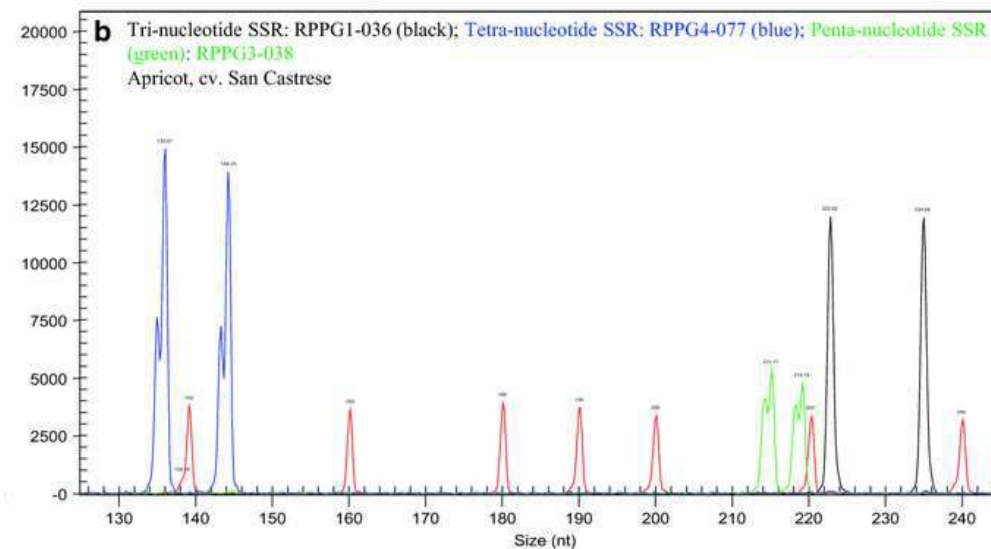
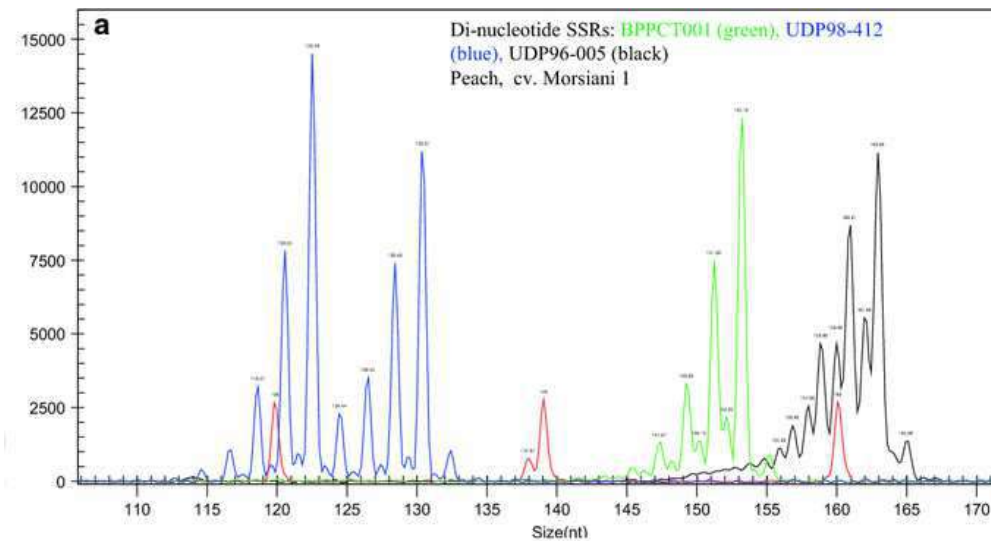
Microsatelliti o SSR (Simple Sequence Repeats)

Corti motivi di 2-6 nucleotidi (CA, ACA, GATA) **ripetuti** in tandem

- Codominanti e a singolo *locus* 😊
- Elevata variabilità (molti alleli per *locus*, in pesco fino a 18 alleli) 😊
- Basso livello di **analisi** massive (multiplexing di circa 10 SSR) 😞

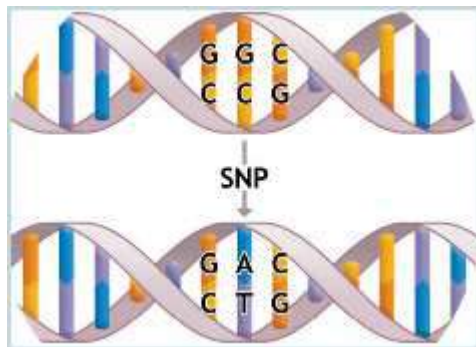


Microsatelliti: dinucleotidici vs long core



XII Giornate Scientifiche SOI Bologna 19-22 giugno 2018

Differenze di un singolo nucleotide



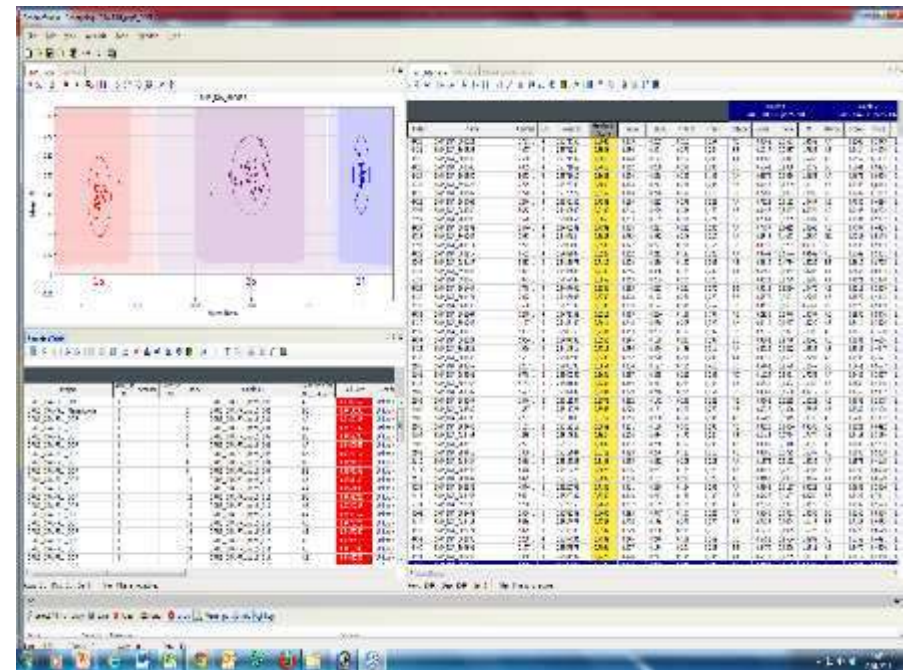
Campione 1

Campione 2

Bi-allelici (meno variabili) e codominanti

Sono i più abbondanti nei genomi

Alta processività (migliaia di marcatori per singola reazione)



- **Melo**

- ✓ 8k (Chagné et al 2012)
- ✓ 20 K (Chagné 2014)
- ✓ 480 K (Bianco et al 2016)

- **Pesco**

- ✓ 9 K (Verde et al 2012)
- ✓ 18 K (in valutazione)

- **Fragola**

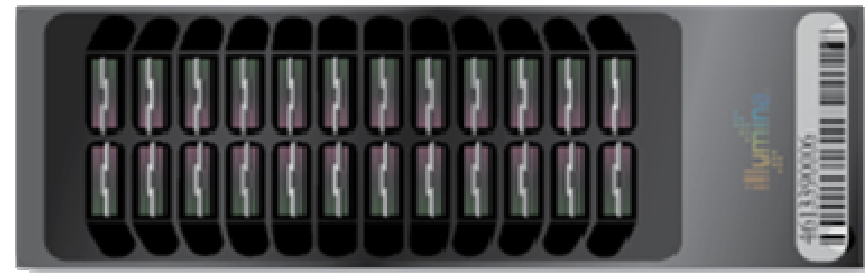
- ✓ 90 K (Bassil et al 2015)

- **Ciliegio**

- ✓ 6K (Peace et al 2012)

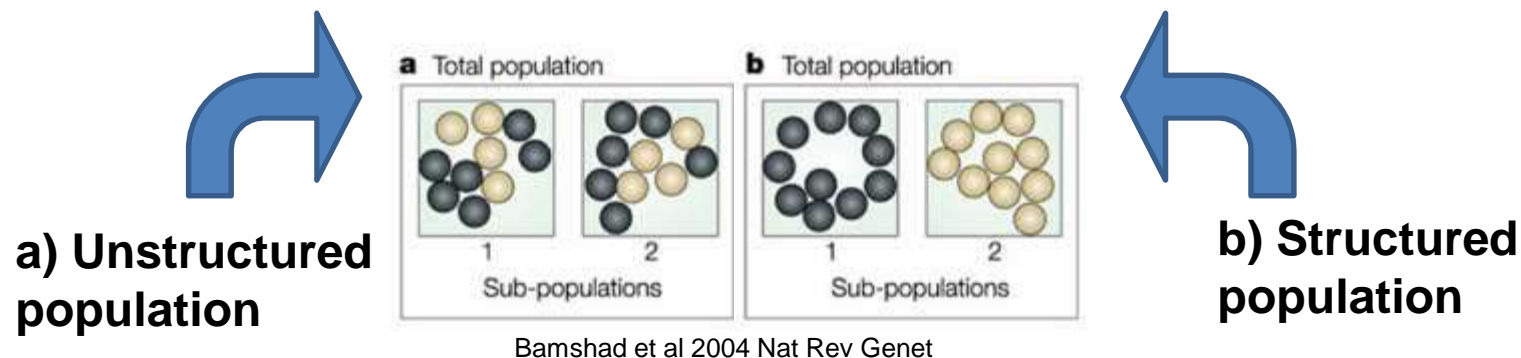
- **Vite**

- ✓ 18 K (Le Paslier et al 2013)



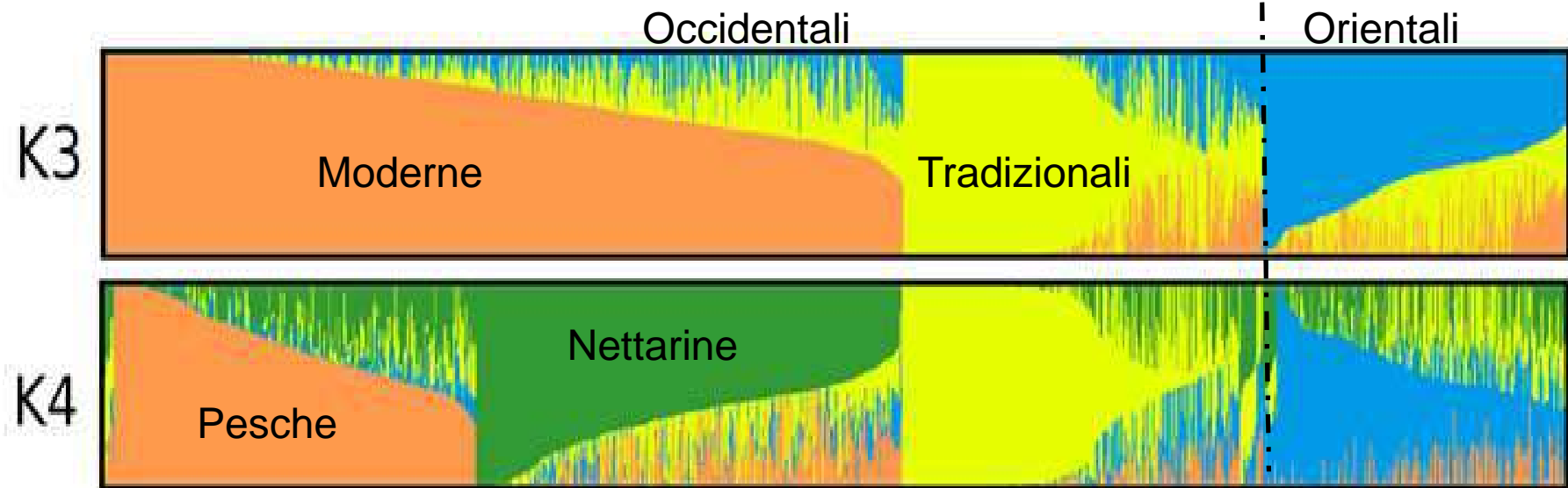
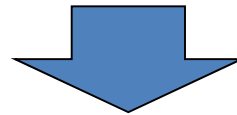
- Diversità genetica
 - N. alleli, frequenza, eterozigosità, diversità nucleotidica,
- Struttura di popolazione
 - differenze sistematiche nella frequenza allelica tra sottopopolazioni all'interno di una popolazione
- Studi d'Associazione (GWAS)
 - Individuazione delle regioni cromosomiche e dei marcatori associati per caratteri agronomici
- Disegno di *core collection*
 - Individuazione di un sub-set di accessioni che massimizzi la diversità genetica

- **Struttura o stratificazione:** differenze sistematiche nelle frequenze alleliche tra sottopopolazioni. L'intera popolazione è stratificata in 2 o più sottopopolazioni con frequenze alleliche differenti
 - ✓ Isolamento di lungo periodo (e.g. Eastern vs. Western pool)
 - ✓ Breeding per caratteri particolari (e.g. Peach vs. Nectarine)



Analisi della struttura di popolazione: pesco

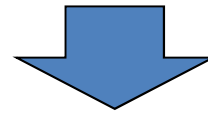
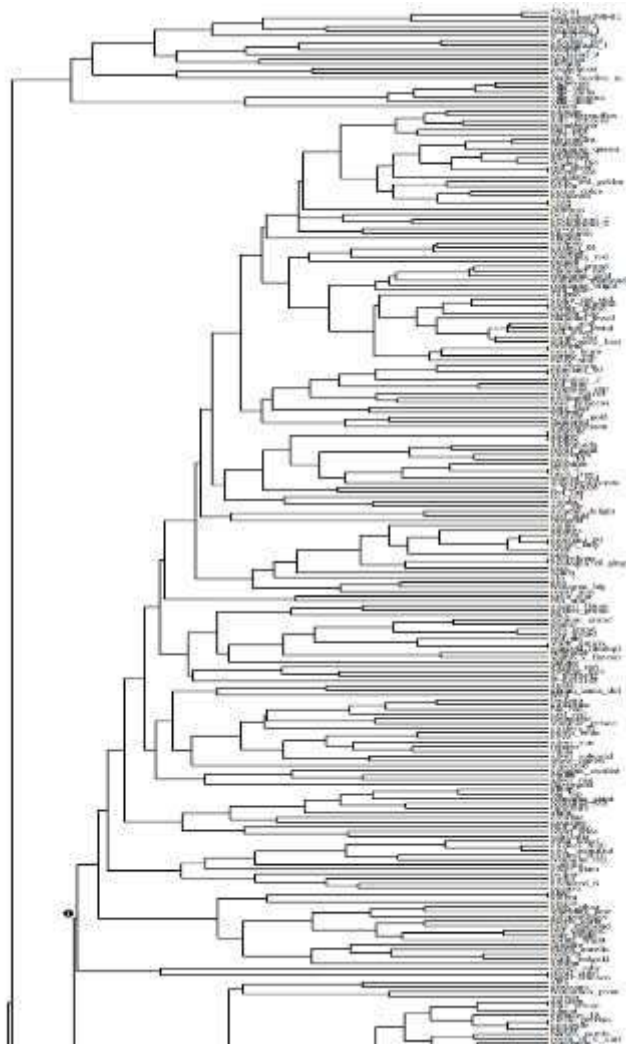
- 1500 accessioni di pesco (Italia, Spagna, Francia, Cina)
- 4200 SNP polimorfici (IPSC 9K)



Micheletti et al. 2015

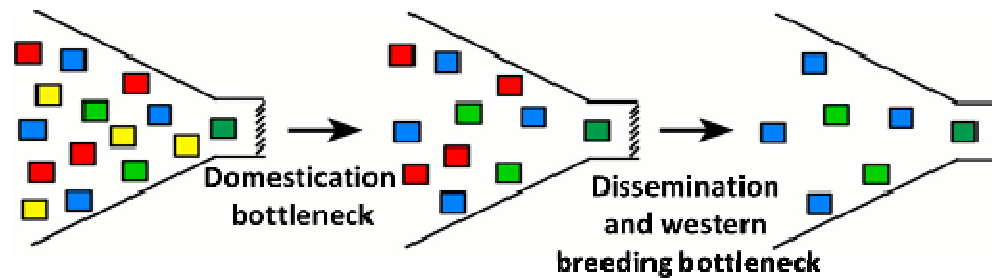
XII Giornate Scientifiche SOI Bologna 19-22 giugno 2018

Confronto dei profili genetici ottenuti con i marcatori molecolari



- studiare le relazioni esistenti tra le accessioni analizzate
 - ✓ Individuare dei parentali più idonei
- Stima della diversità genetica (eterozigosità, diversità nucleotidica).
- identificare i casi di **omonimia** (varietà con nome uguale e differenti profili genetici) e **sinonimia** (varietà con nome diverso e profilo genetico identico)

- 1 milione di SNP (risequenziamento)
- Stima della perdita di diversità genetica nel processo di domesticazione e breeding



P. davidiana
 $\pi = 4.8 \times 10^{-3}$

Asian Accessions
 $\pi = 1.6 \times 10^{-3}$

Western Accessions
 $\pi = 1.1 \times 10^{-3}$

Perdita di diversità genetica:
~80%

Verde et al 2013 Nat Genet

Π = nucleotide diversity

XII Giornate Scientifiche SOI Bologna 19-22 giugno 2018

Sottogruppo di accessioni contenenti la diversità genetica dell'intera collezione

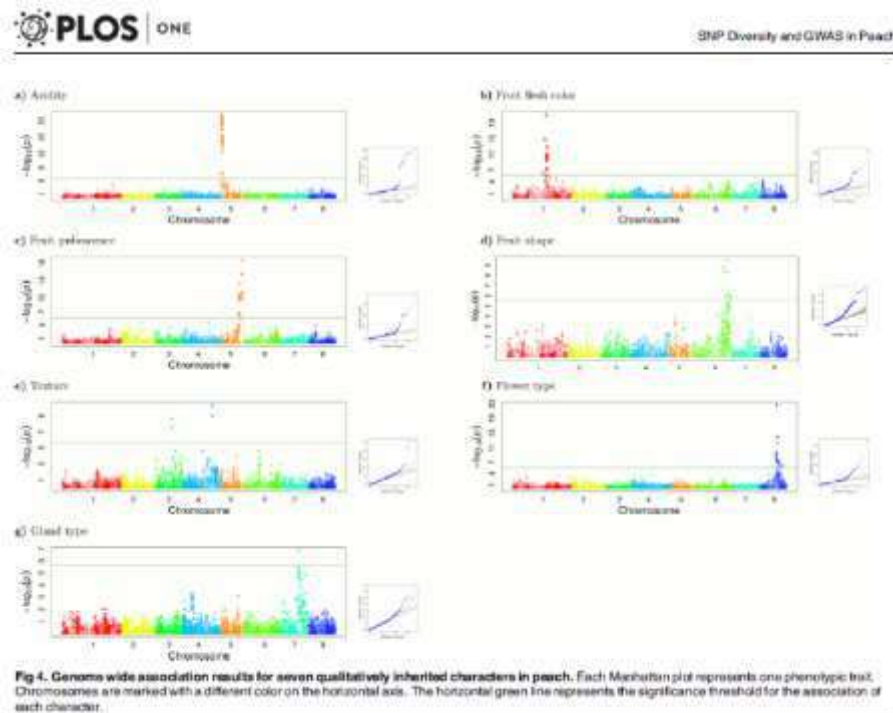
Criteri di selezione

- Rappresentatività dei alleli totali (M strategy, dati molecolari)
 - ✓ ~60 accessioni raccoglievano la diversità dell'intera collezione di pesco (EU Core)
- Breeding value (ragioni economiche, storiche ecc.)
- Struttura della popolazione
- Ridondanza 'controllata' per studi genetici (GWAS)

Collezione di pesco (Reference Collection): circa 160 accessioni non solo per la conservazione ma anche per analisi di tipo genetico (GWAS). A dimora in diversi siti.

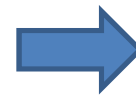
- Visible Light (Monochromatic or Color) Imaging
- Infrared and Hyperspectral Imaging
- Fluorescence Imaging
- 3D (Three-Dimensional) Imaging
- Magnetic Resonance Imaging (MRI)
- Positron Emission Tomography (PET)
- Field-Based Plant Phenomics
- Field-Based Phenotyping Using Static
- Sensor or Movable Vehicle

Identificazione dei geni casuali e dei marcatori associati a caratteri di interesse

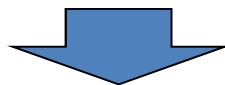


doi:10.1371/journal.pone.0136003.g004

Micheletti et al. 2015



I marcatori/aplotipi diagnostici potranno essere utilizzati per il **breeding assistito** da marcatori molecolari.



Identificazione dei geni causali per approcci di tipo **biotecnologico**:

- **Cisgenesi**
- Genome editing mediante **CRISPR-Cas9**

XII Giornate Scientifiche SOI Bologna 19-22 giugno 2018

Grazie per
l'attenzione

IL BREEDING CLASSICO IN FRUTTICOLTURA

Raffaele Testolin

Università di Udine



Giornate Scientifiche SOI Bologna 19 giugno 2018
Workshop «Filiera dell'Innovazione varietale in Frutticoltura»

IL BREEDING DEI FRUTTIFERI NEL MONDO E IL CONTRIBUTO DELL'ITALIA (1980-2008)

Specie (a)	Totale (n)	Italiane (n)	Italiane (%)	Note
Actinidia	335	39	11,6	Varie specie
Albicocco	625	65	10,4	Varie specie
Ciliegio	580	27	4,7	Ciliegio dolce e acido
Fragola	925	74	8,0	
Melo	1.561	59	3,8	
Pero	563	16	2,8	Varie specie
Pesco	2.768	321	11,6	Pesche e nettarine
Susino	892	26	2,9	Susino europeo e ibridi
Uva da tavola	540	21	3,9	
TOTALE	8.789	648	7,4	

[Della Strada e Fideghelli 2009]

I PROBLEMI DEL *BREEDING* LEGATI ALLA BIOLOGIA RIPRODUTTIVA DELLE SPECIE DA FRUTTO

Caratteristiche	Conseguenze
autoincompatibilità e depressione da inbreeding	<ul style="list-style-type: none">• impossibili le autofecondazioni• quando è possibile l'autofecondazione è comunque impossibile arrivare a produrre linee omozigoti
genomi altamente eterozigoti	<ul style="list-style-type: none">• difficile prevedere i risultati degli incroci a causa della ricombinazione
lunga fase giovanile (6-10 anni)	<ul style="list-style-type: none">• lunghe generazioni da seme a seme (6-10 anni o più)• pochi cicli di incrocio nella vita di un <i>breeder</i>• riluttanza dei <i>breeders</i> a preparare parentali per gli incroci
larghi spazi richiesti dalle piante in selezione	<ul style="list-style-type: none">• poche combinazioni di incrocio per ciascun programma• famiglie di piccole dimensioni (100-1000 individui/incrocio)• scarsa probabilità di trovare ricombinanti interessanti

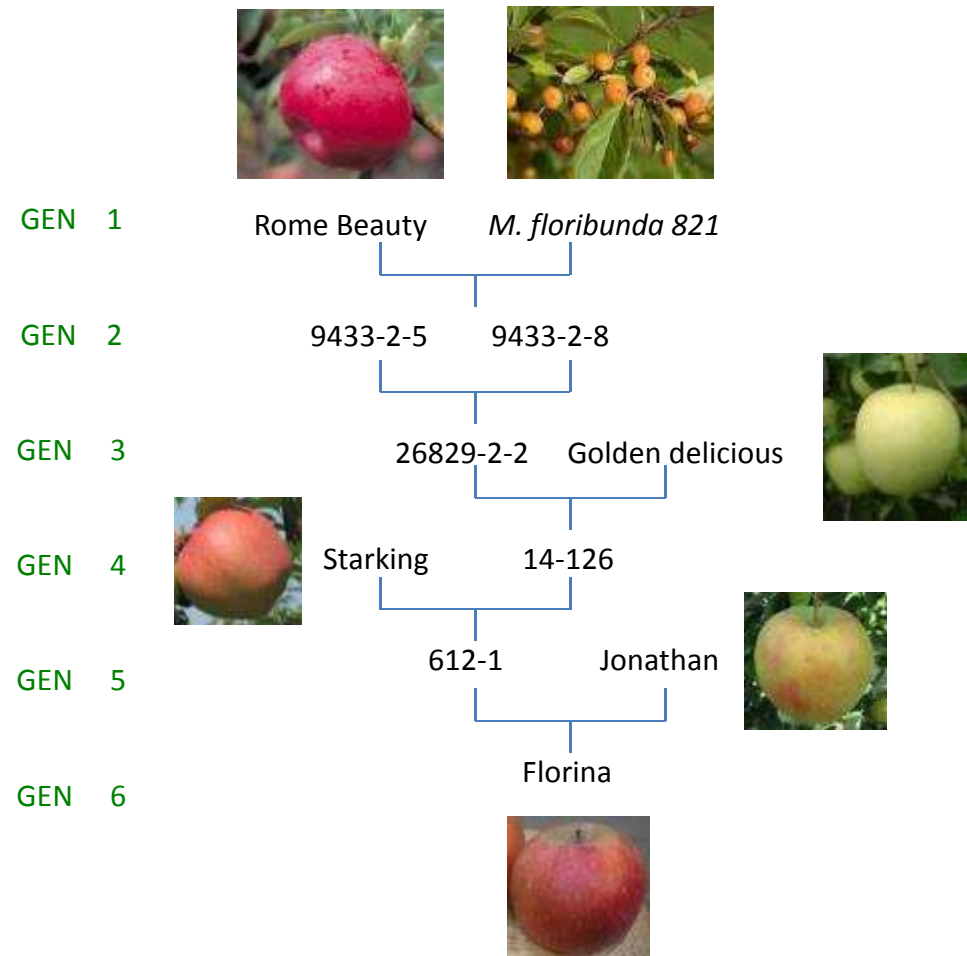
il breeding facile: la selezione di mutanti naturali



Royal Gala Galaxy Brookfield Gala Obrogala Gala Schniga

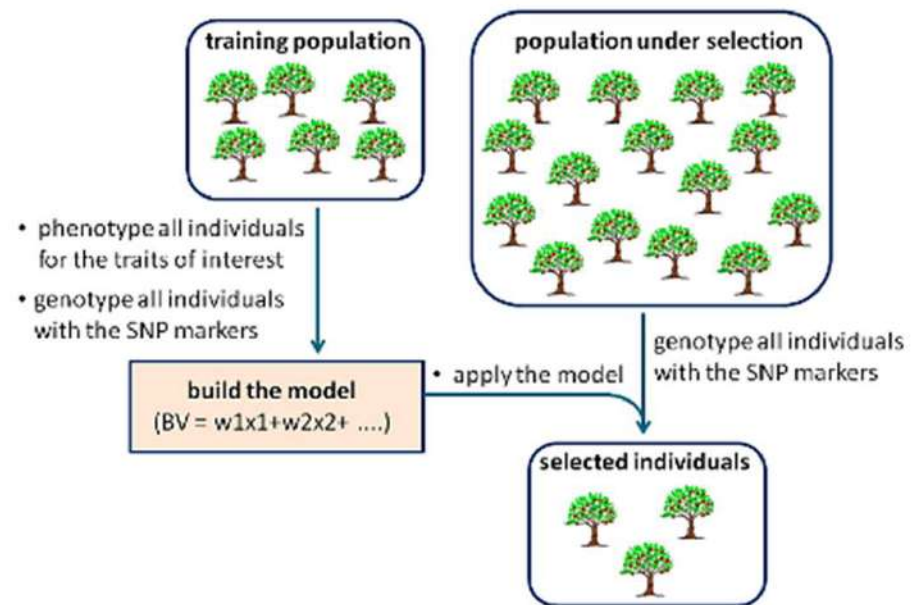
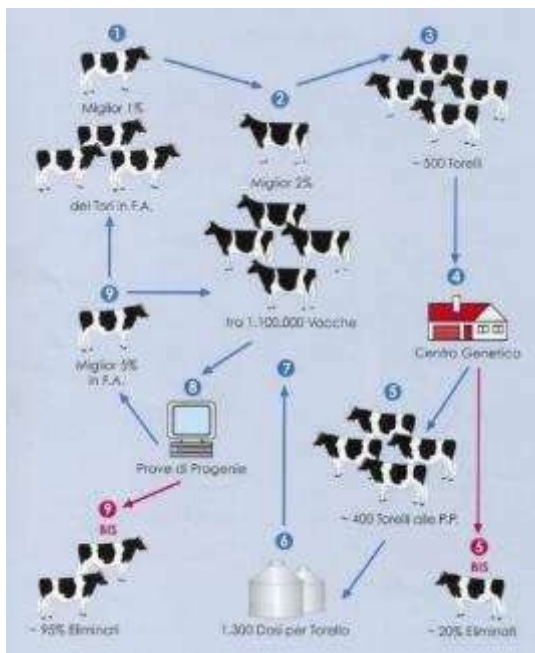
- mutazioni frequenti di certi caratteri in certe specie
- costo di realizzazione della varietà quasi nullo
- questioni sulla PI delle varietà essenzialmente derivate

la *golden track* del breeder per specie che soffrono di depressione da inbreeding: pseudo F2 e pseudo back-cross



il toolbox del breeder

- piani di incrocio (dialelico, NCM2 ...)
- ereditabilità dei caratteri (h^2)
- attitudine combinatoria generale e speciale (GCA, SCA) / progeny test
- GWEBV Genome-wide estimation of breeding value of individuals



ereditabilità dei caratteri

ragionevole quantità di informazioni in letteratura
numero di combinazioni spesso sufficientemente ampio
ereditabilità in senso stretto (h^2_{narrow})

$h^2 < 0.2$ bassa $0.2-0.5$ intermedia > 0.5 alta

ereditabilità di alcuni caratteri in melo

Variabile	n. parentali	n. incroci	n. individui	h^2	riferimento
Dimensione frutti	n.r.	213	11,465	0.33 ± 0.05	Durel et al 1998
Epoca maturazione	13	36	10,296	0.94 ± 0.07	Tancred et al 1995
Forma del frutto	13	82	1,253	0.80 ± 0.15	Currie et al 2000
Rammollimento	20	38	614	0.54 ± 0.19	Iwanamy et al 2008

la predizione dell'ereditabilità dipende ovviamente dai genotipi allo studio!
più alta la diversità genetica dei parentali, migliore la precisione della stima

attitudine combinatoria generale (GCA) e specifica (SCA)

pochi esempi in letteratura
il cambio frequente di ideotipo limita l'utilità dell'informazione

GCA/SCA dell'epoca di maturazione del melo (gg da Jonathan) (Tancred et al 1995)

Cultivar	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1. Milton		-5.7	1.6				
2. Early McIntosh	-0.2						
3. William's favourite		-3.1				5.6	
4. Jonathan	1.5	1.6				-1.6	
5. Delicious	2.8	-1.3	-1.8	2.4		0.7	1.7
6. Golden delicious		-1.6		0.0			
7. Granny Smith		1.9					
GCA	-11.7	-9.3	-9.6	8.3	13.8	14.7	36.8

sono riportate 7 delle 13 cultivar di melo usate come parentali nelle combinazioni di incrocio
mancano alcune combinazioni di incrocio, GCA calcolata rispetto alla media della varietà in colonna

la scelta dei parentali maschili nelle specie dioiche

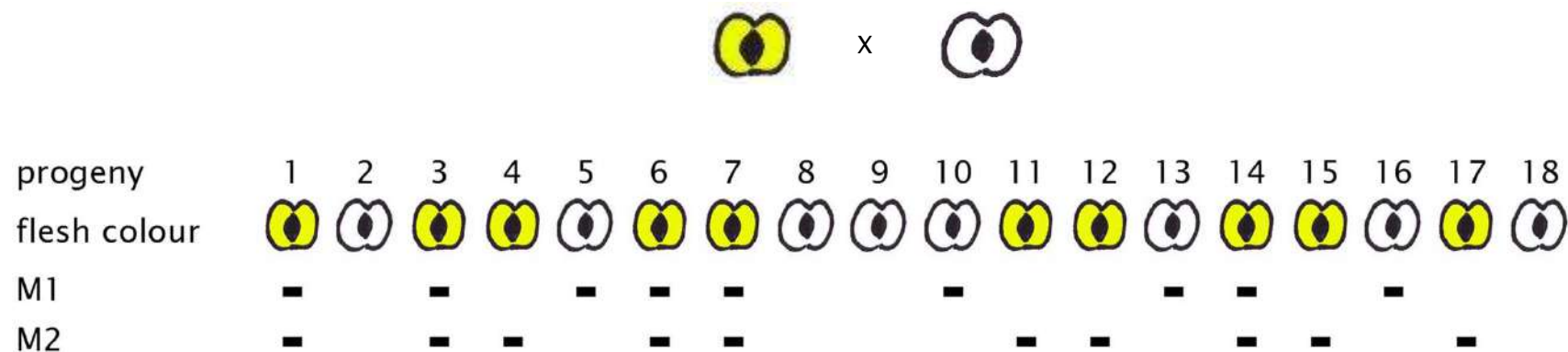
I parentali maschili non portano frutti
il *progeny test* aiuta a valutare il loro background genetico per quanto riguarda i
geni legati alla produzione e alla qualità dei frutti
diversamente, si rinuncia a sfruttare il 50 % del potenziale valore genetico dei
parentali (si rinuncia al valore genetico del parentale maschile)



è lo stesso problema
che hanno i breeders
che lavorano con gli animali
quando devono selezionare i tori
e l'obiettivo è la produzione di
latte (delle femmine)

selezione assistita da marcatori (MAS)

marcatori SSR e più recentemente SNP
approccio alla selezione molto 'trendy'
adatta per caratteri a controllo mendeliano
adatta anche per major QTLs



il marcatore M2 è strettamente associato al gene che controlla il colore giallo della polpa

(Testolin et al 2012)

perché selezionare per il marcatore e non per il carattere fenotipico?

carattere legato alla riproduzione (caratteristiche del frutto...)
geni piramidati per lo stesso carattere (es. resistenze)

Aa bb x **aa Bb**

Aa Bb R



Aa bb R



aa Bb R

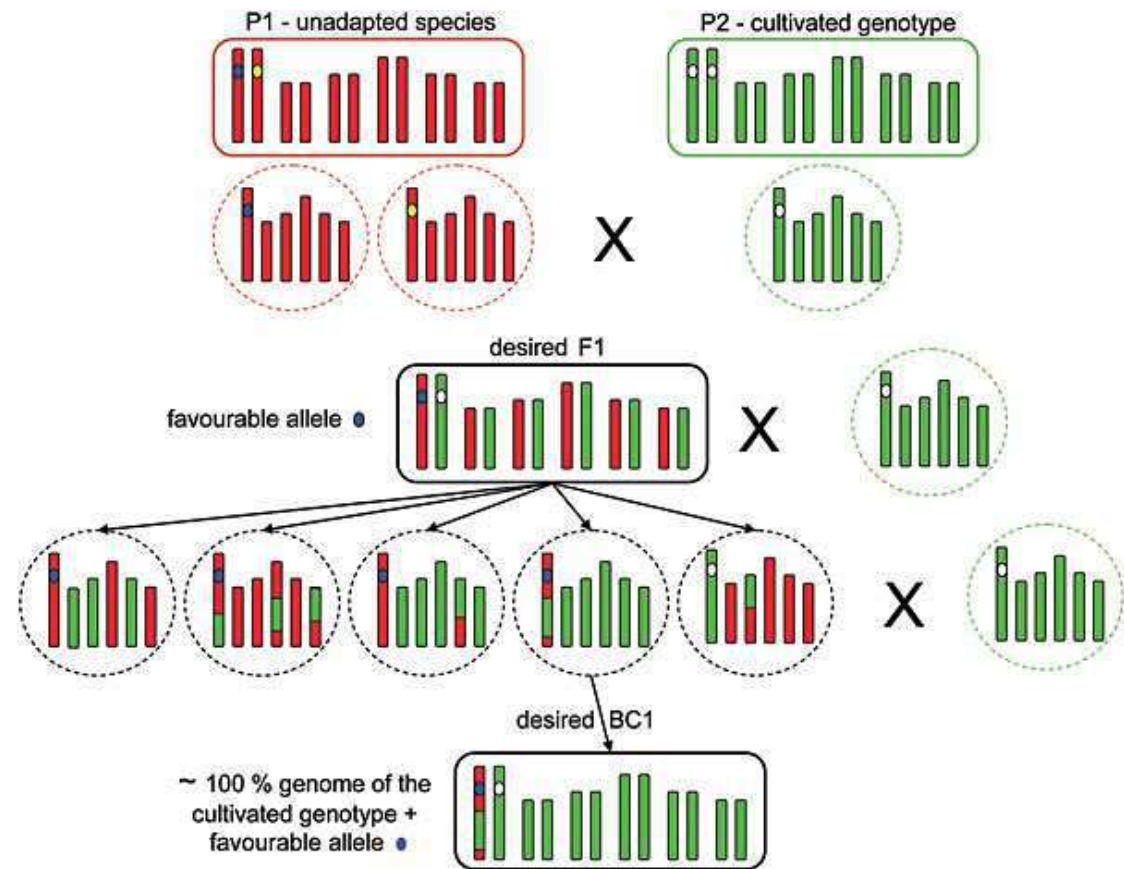
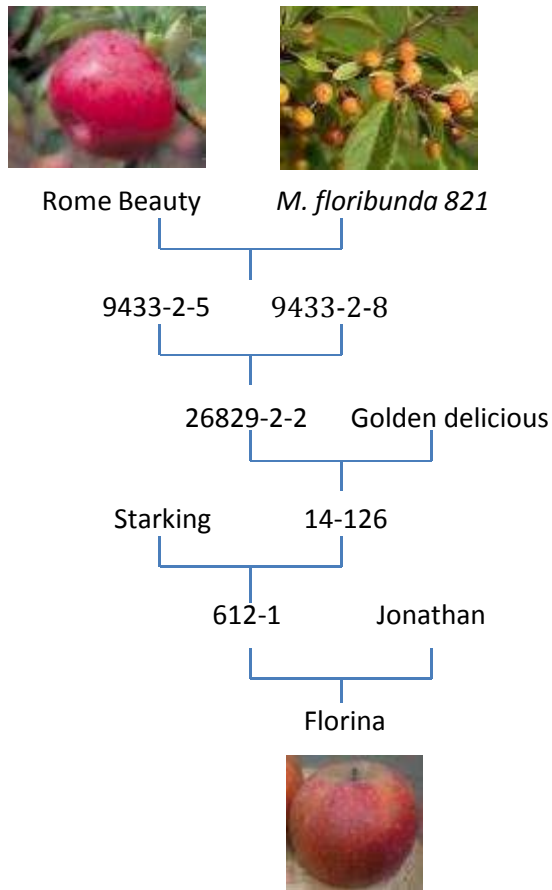


aa bb S



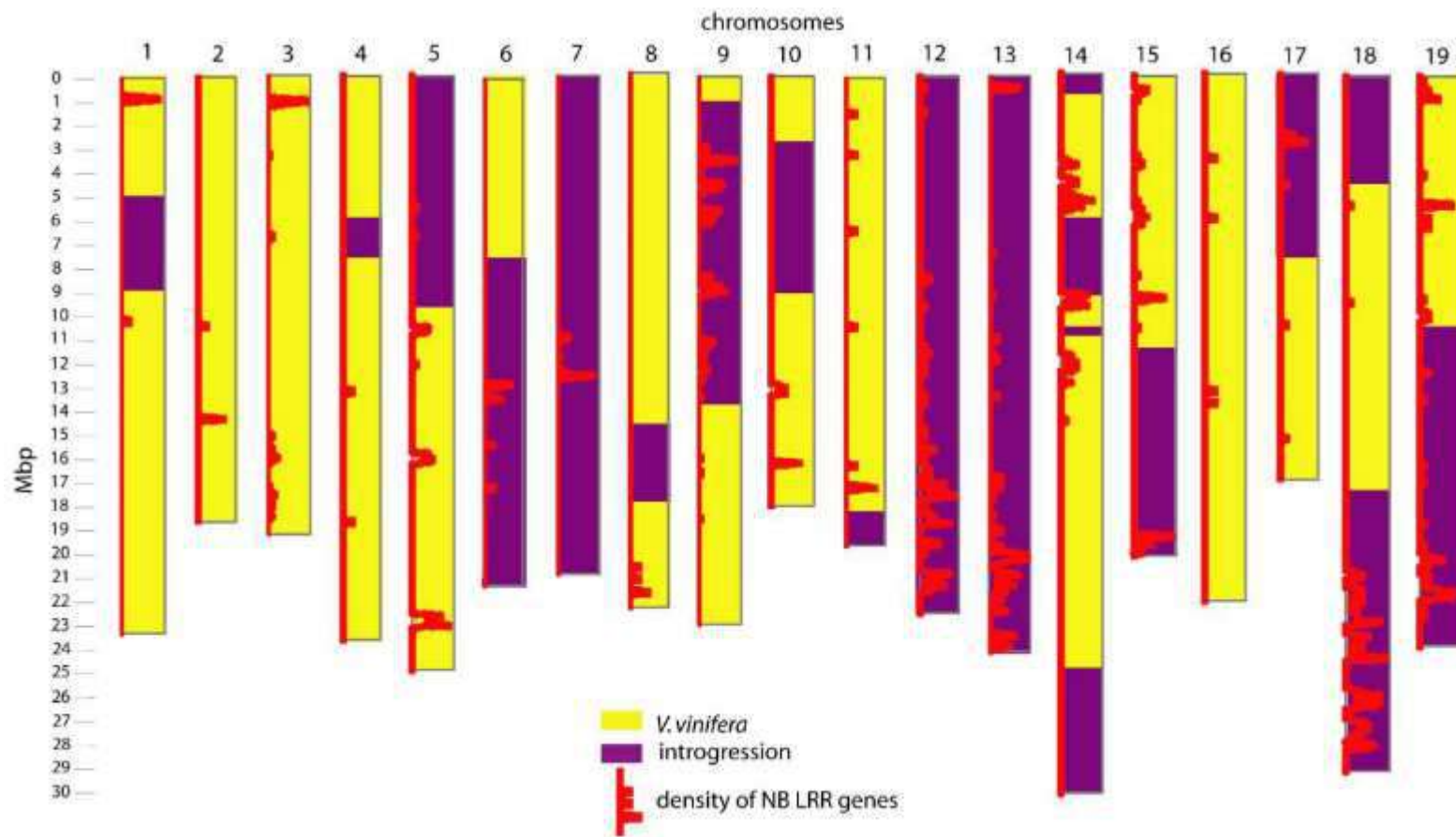
il back-cross assistito da marcatori

fondamentale quando si introduce un carattere da genotipi *wild* ancora poco frequente nel breeding frutticolo



(Di Gaspero & Cattonaro 2010)

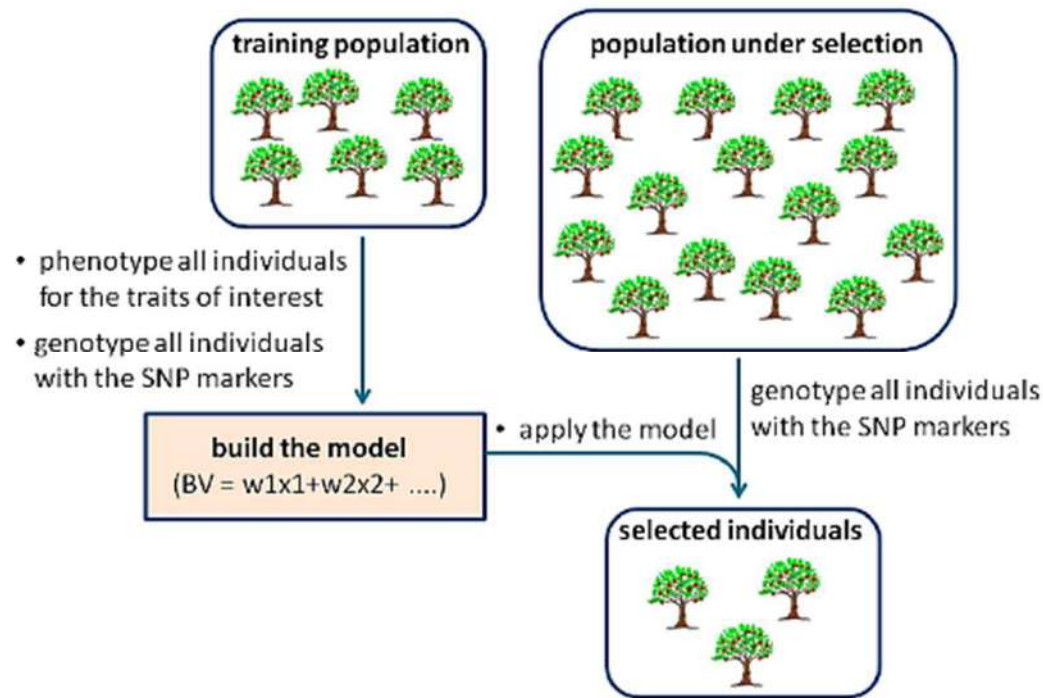
il back-cross sul ricorrente 'buono' non garantisce sempre il recupero di percentuali elevate del genoma del ricorrente



5 generazioni dopo l'ultimo intervento di una specie non-vinifera, la percentuale di genoma non-vinifera è ancora elevato (blu) (Foria 2015 tesi PhD)

stima 'genome-wide' del valore genetico (GWEBV)

strumento potente per stimare il valore genetico degli individui
servono numeri elevati di marcatori SNP (10.000-1.000.000)
fenotipizzazione degli individui richiesta solamente per la *training population*
l'uso di nuovo materiale genetico indebolisce la robustezza del modello



(adattato da Goddard and Hayes, 2007)

NEW PLANT BREEDING TECHNOLOGIES

Vittoria Brambilla

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali

Università degli Studi di Milano

WORKSHOP SOI

BOLOGNA 19 6 18



New breeding technologies

- Permettono di **inserire cambiamenti nel genoma per modificare un carattere.**
- Queste includono:
 - 1) **CISGENESI** e **INTRAGENESI** – introduzione di sequenze geniche da specie compatibili (cisgenesi) o introduzione di varianti alleliche (intragenesi) – in UE è al momento regolamentato come GMO
 - 2) **GENOME EDITING** – mutagenesi “biologica” – IN EU non è ancora regolamentato

CISGENESI E INTRAGENESI

- Introdurre **geni di resistenza** da **specie selvatiche interfertili**
- Stessi loci coinvolti nel miglioramento genetico classico
- Rapido
- Non apporta ulteriori modifiche alla varietà recettrice
- **REGOLAMENTAZIONE**: deve essere presente una sola copia del cisgene e non devono esserci marker selettivi

CISGENESI in melo

Plant Biotechnology Journal (2014) **12**, pp. 2–9

doi: 10.1111/pbi.12110

Molecular characterization of cisgenic lines of apple 'Gala' carrying the *Rvi6* scab resistance gene

Thalia Vanblaere¹, Henryk Flachowsky², Cesare Gessler¹ and Giovanni A. L. Brogini^{1,*}

¹*Plant Pathology, Institute of Integrative Biology (IBZ), ETH Zurich, Zurich, Switzerland*

²*Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Horticultural and Fruit Crops, Pillnitzer Platz 3a, Dresden, Germany*

- Acquisizione di resistenza alla ticchiolatura del melo data dal fungo *Venturia inaequalis*
- Trasformazione mediata da *A.tumefaciens* del gene *Rvi6* della mela resistente "Florina" in *Malus floribunda*.
- Selezione delle linee cisgeniche:
 - -assenza dei marker di selettivi
 - - un solo transgene
 - -mappatura regione di inserzione del transgene

CISGENESI in melo

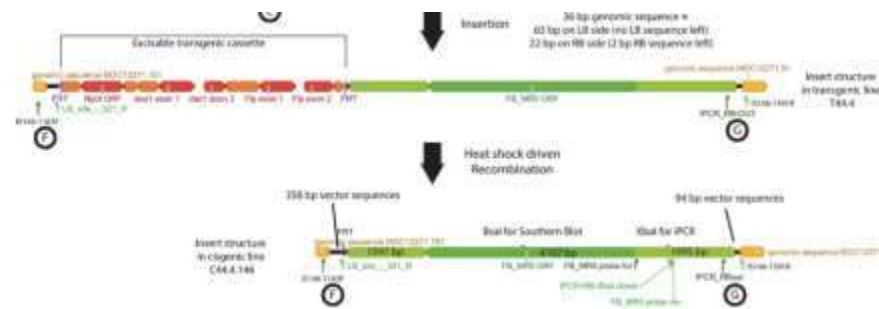
RESEARCH ARTICLE

Development of the First Cisgenic Apple with Increased Resistance to Fire Blight 2015

Thomas D. Kost¹, Cesare Gessler¹, Melanie Jänsch², Henryk Flachowsky³,
Andrea Patocchi², Giovanni A. L. Brogini^{1,2*}

¹ Plant Pathology, Institute of Integrative Biology (IBZ), ETH Zurich, Zurich, Switzerland, ² Agroscope, Institute for Plant Production Sciences, Wädenswil, Switzerland, ³ Julius Kühn-Institut (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Breeding Research on Fruit Crops, Dresden, Germany

- Trasformazione mediata da *A.tumefaciens* del gene FB-MR5 della mela selvatica *Malus x robusta*5 in “Gala Galaxy”
- Conferisce resistenza al “fuoco batterico” dato dal batterio *Erwinia amylovora*



GENOME EDITING



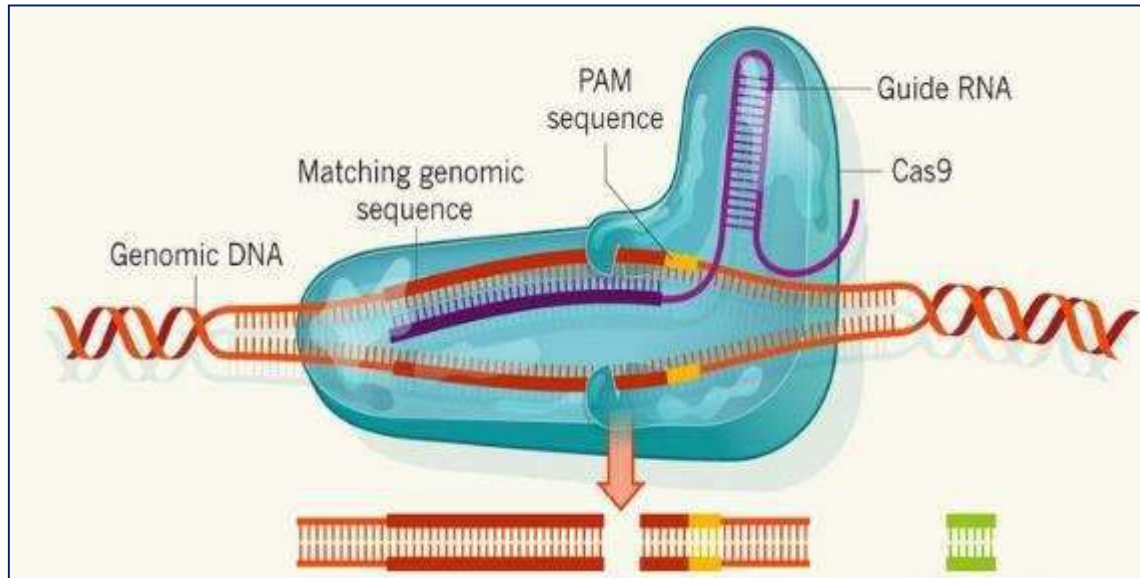
permette di inserire specifiche
modificazioni in un genoma

- OLIGONUCLEOTIDI (ODM)

- NUCLEASI:

1. MEGANUCLEASI
2. NUCLEASI A DITA DI ZINCO (zinc-finger nuclease ZFNs)
3. TALEN (transcription activator-like effector nucleases)
4. **CRISPR-Cas9** (*e successive modifiche*)

CRISPR/Cas9

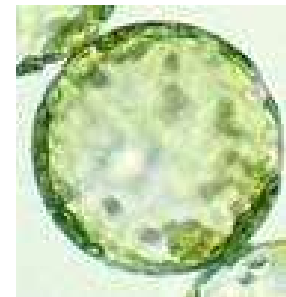


La nucleasi Cas9 viene portata sul sito di taglio nel genoma da un **RNA guida**.

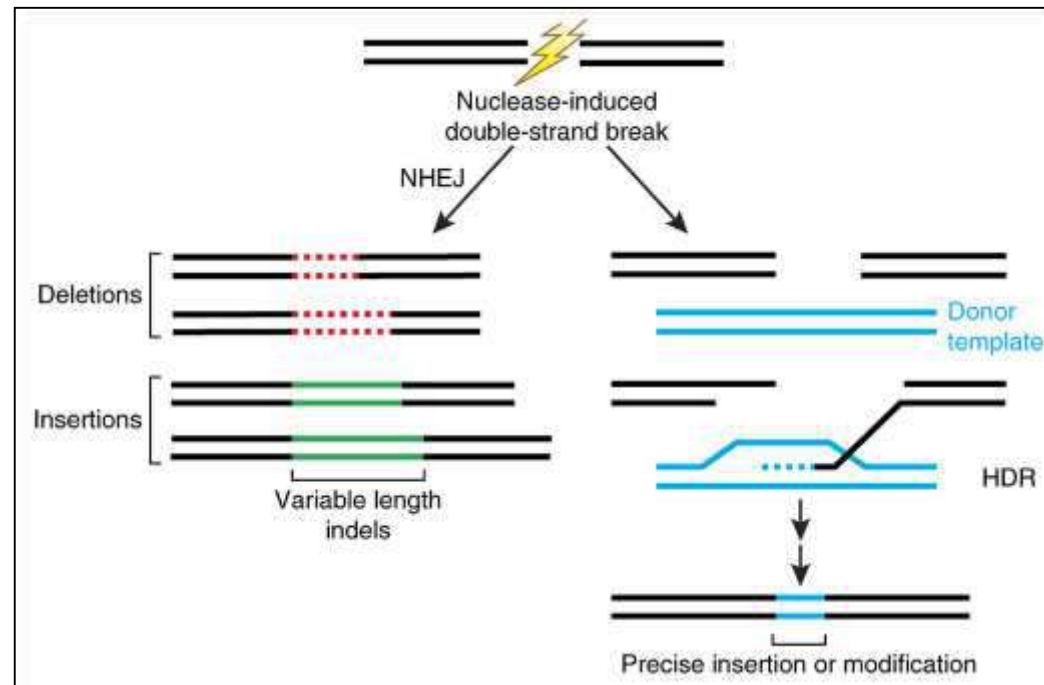
Crea un **double strand break** sito specifico nel DNA

Come si può introdurre Cas9 in pianta?

- *Agrobacterium tumefaciens*: **TRASFORMAZIONE STABILE IN PIANTA**. Segregazione della nucleasi dopo la mutazione.
- Sistema biolistico: **TRASFORMAZIONE STABILE O TRANSIENTE**. Segregazione dopo mutazione della nucleasi se stabile.
- Trasfezione in protoplasti: **EDITING TRAMITE INTRODUZIONE DELLA NUCLEASI**. Non vi è introduzione di DNA nella pianta.



Cas9 guida tagli specifici nel genoma innescando i meccanismi di riparazione cellulari



indurre **MUTAZIONI** in siti specifici (inattivanti di funzioni geniche)

SDN-1

Guidare la **MODIFICAZIONE** specifica di geni- introdurre varianti alleliche...

SDN-2

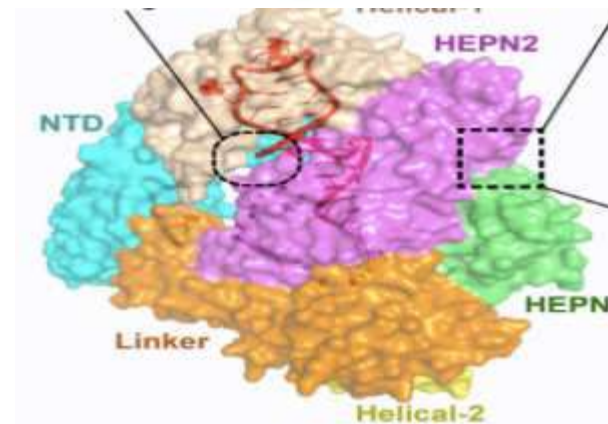
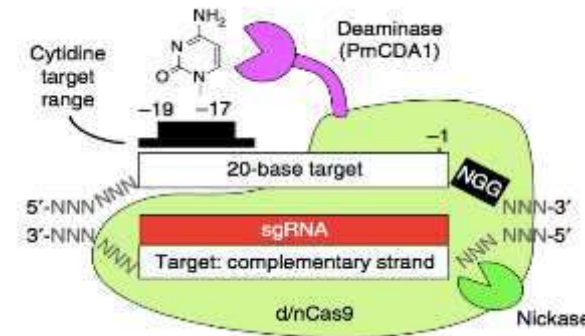
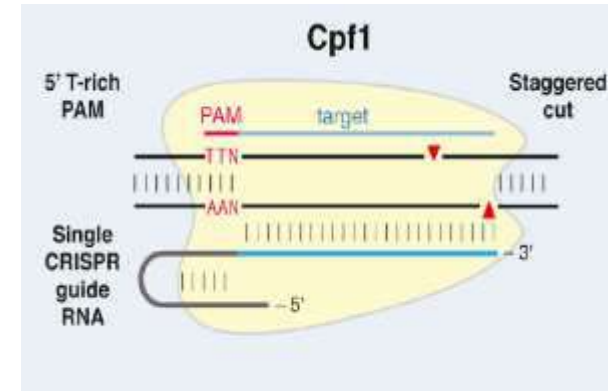
SDN-3

VARIANTI DELLA NUCLEASI CAS9

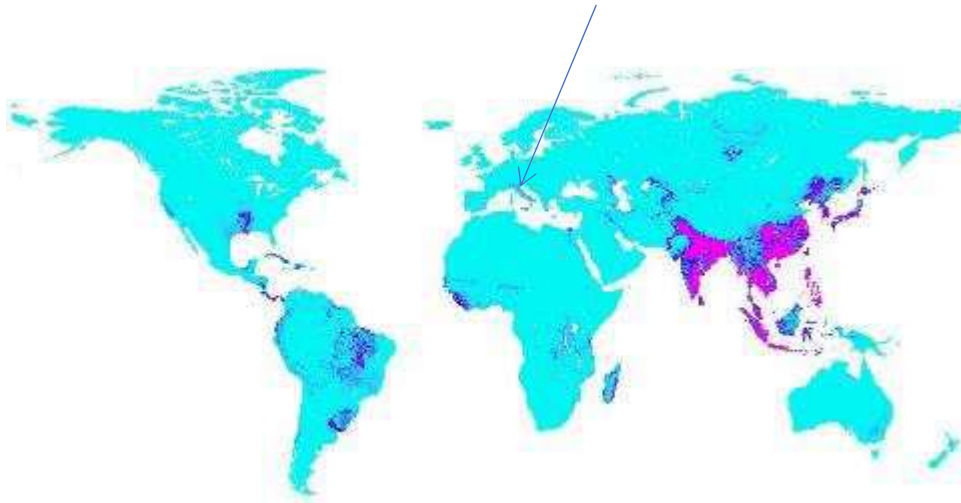
Cpf1: **più piccola** di Cas9, ugualmente efficiente. Taglia dove Cas9 non può tagliare.

Cas9 troncata e fusa a Citidin Deaminasi, non taglia il DNA ma ne cambia solo una base (da C a T)
Mutazioni puntiformi specifiche.

C2c2 taglia l'RNA



Applicazioni del genome editing: ACCORCIARE IL CICLO COLTURALE DI RISO



E' un tratto importante per la coltivazione di riso in Italia
Permette di ritardare la semina o anticipare il raccolto

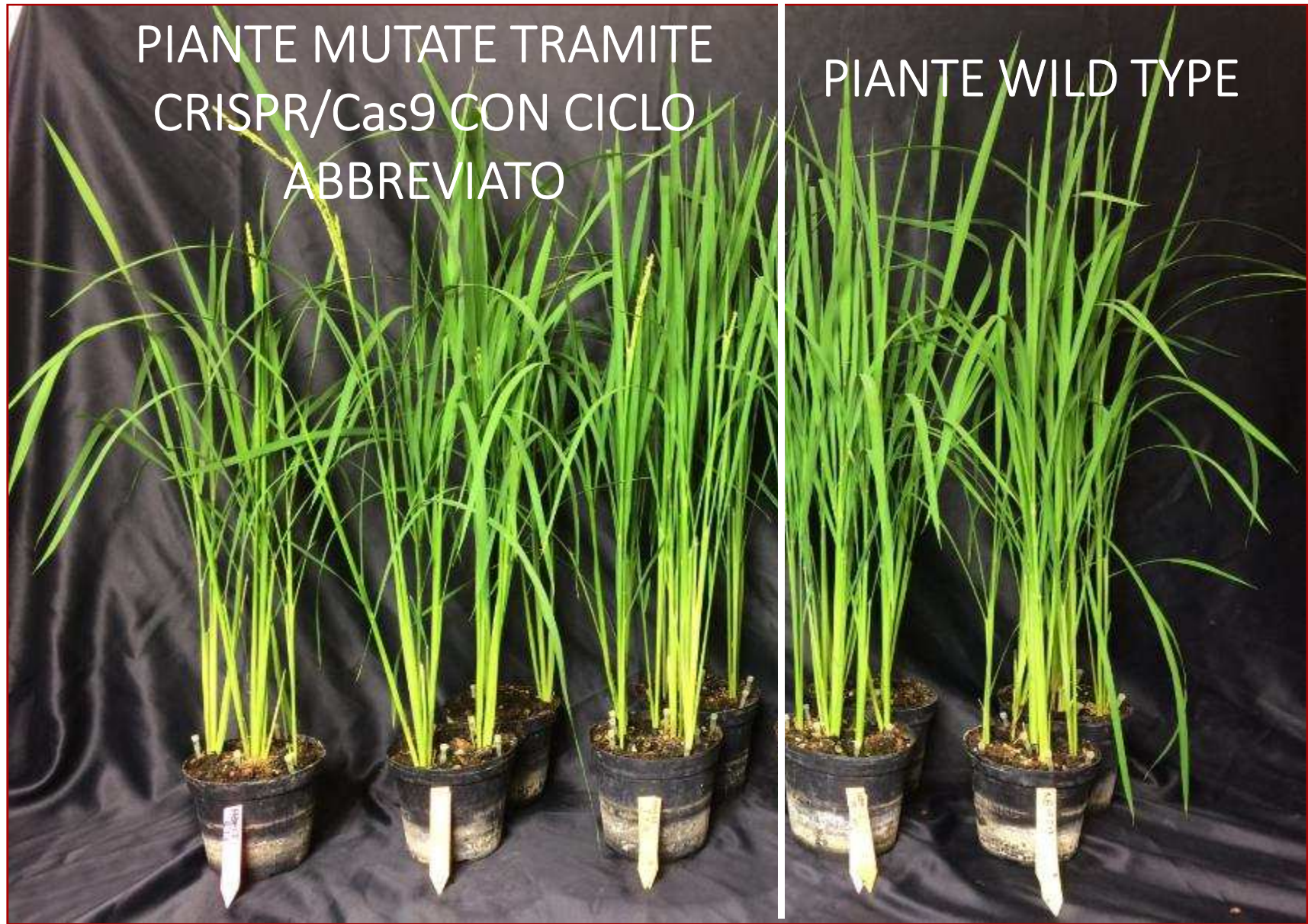
Applicazioni del genome editing:

ACCORCIARE IL CICLO COLTURALE DI RISO

1. abbiamo identificato 2 geni che ritardano il ciclo di coltura
2. li abbiamo mutati tramite CRISPR/Cas9

RNA guida

BZIP42	250	ATCAGCGGGGCCAGTC---TCAGCGCGGCCCTGAGGCTGCAGCGCCAGGGAGCATCACGATG	306
BZIP9	268	CCGCCTGAGCTCAGCAAGAAGACGGGTGGACGAGGTGTGGAAGGGGATCCAGSCTGTCCG	327
BZIP42	307	CCTCCGAGCTGAGCAAGAAGACGGGTGCATCAGCTGTCCAGGCCATCCAGCATCTCCCG	366
BZIP9	328	AAGAGGAATGCCGAAAaggggggggggggggggggggggggaggtcgadggcgagAGAGAGGCAG	387
BZIP42	367	AAGAGGGTGTCTGAGGAGGCTGGC-----CGCTGGAGG-----CGGGAGAGGCAG	411
BZIP9	388	CCGACGCTTGGGGAGGTGACGCTCGAGGATT CCTGGTCAAAGCTGGGGTTGTCA CCCAA	447
BZIP42	412	CCGACGCTTGGGGAGGTGACGCTCGAGGATT CCTGGTCAAAGCTGGGGTTGTCA	467
BZIP9	448	GGATCTCTCAAGGAGCTTAGTGATGTAGGCAATGTGGATCCGGTGGGAAGAGGTGTTACA	507
BZIP42	460	GGATCCG--AAGCA--TTTGCC--GSAACATGATGTGGTAGGGGGCGCTGCTGCG	519
BZIP9	508	GC---AACCAGGACTTGGATCTGGCAGCTGGATCACACTGGATAGAGCAGTATAAGCAG	564
BZIP42	520	GCTGCAGCTGATACGGTCTGATTTGAAATGCGGAGCACAGTGGCTACAGCAGTATCACCAG	579
BZIP9	565	CAGATTGCATCTACTGATGCTCATCACCATGCGGCAGCAAGGTGTGCAGGGTGCCTATTTT	624
BZIP42	580	CAG---GCTT----TGGAGCCC--CAGCATCCA-AGCATAG-ATGC----TCGTTACATG	624
BZIP9	625	CCGAATCGATTGGTCCCTCAGCCACTTAATGTTGGCCCCGGTGTCTTCTGGAGCCATCC	684
BZIP42	635	GCAACTCACCTGGCAGCTCAGCCATTAGCTGTTGCTACAGGTGCTGTTTGGATCCAAAT	684
BZIP9	695	TACTCTGATGGCCAGACTTCTTCAGGAATGATCGGGGAATGTCCGATTCGCAGAGCCCT	744
BZIP42	695	TACTCCGATGGCCAGACTTCTTCAGGAATGATCGGGGAATGTCCGATTCGCAGAGCCCT	744
BZIP9	745	GGAGGAAGCCAGGCATGTCCAGGGATGTGGCAGATAAGTTGATGGAGAGAGGCAGAG	804
BZIP42	745	GGAGGAAGCCAGGCATGTCCAGGGATGTGGCAGATAAGTTGATGGAGAGAGGCAGAG	804
BZIP9	805	AGGATGATCAAGAACAGGGAGTCAGCTGCCCGTTCAAGAGCCAGGAAGCAGGCCTACACT	864
BZIP42	805	AGGATGATCAAGAACAGGGAGTCAGCTGCCCGTTCAAGAGCCAGGAAGCAGGCCTACACT	864



Brambilla et al., 2017 The Plant Cell

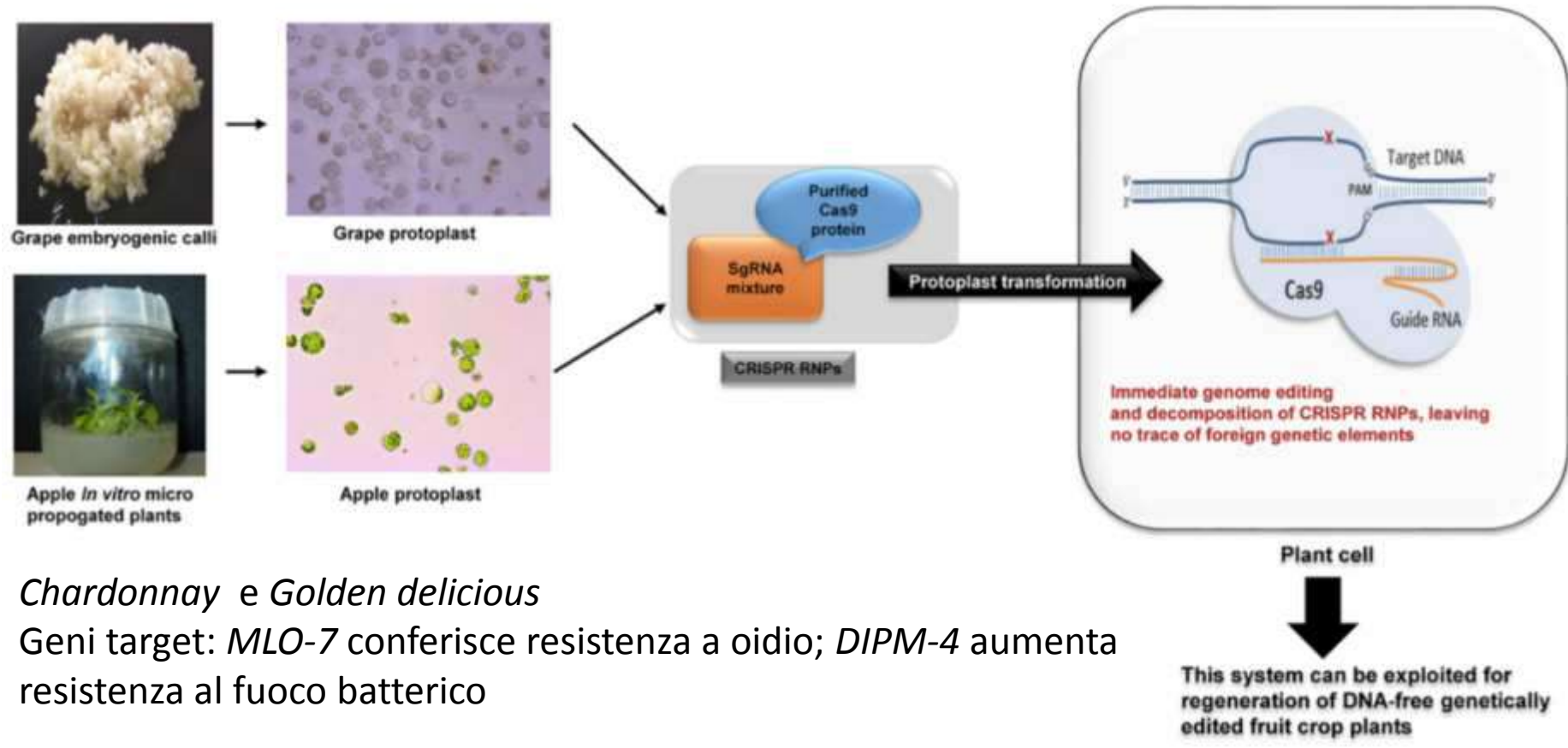
IN 6 MESI

GENOME EDITING IN PROTOPLASTI DI MELO E VITE

DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins

Mickael Malnoy^{1*}, Roberto Viola¹, Min-Hee Jung², Ok-Jae Koo², Seokjoong Kim², Jin-Soo Kim^{3,4}, Riccardo Velasco¹ and Chidananda Nagamangala Kanchiswamy^{1*}

¹ Research and Innovation Centre, Genomics and Biology of Fruit Crop Department, Fondazione Edmund Mach, Trento, Italy, ² ToolGen Inc., Seoul, Republic of Korea, ³ Center for Genome Engineering, Institute for Basic Science, Seoul, Republic of Korea, ⁴ Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea



Chardonnay e Golden delicious

Geni target: *MLO-7* conferisce resistenza a oidio; *DIPM-4* aumenta resistenza al fuoco batterico

This system can be exploited for regeneration of DNA-free genetically edited fruit crop plants

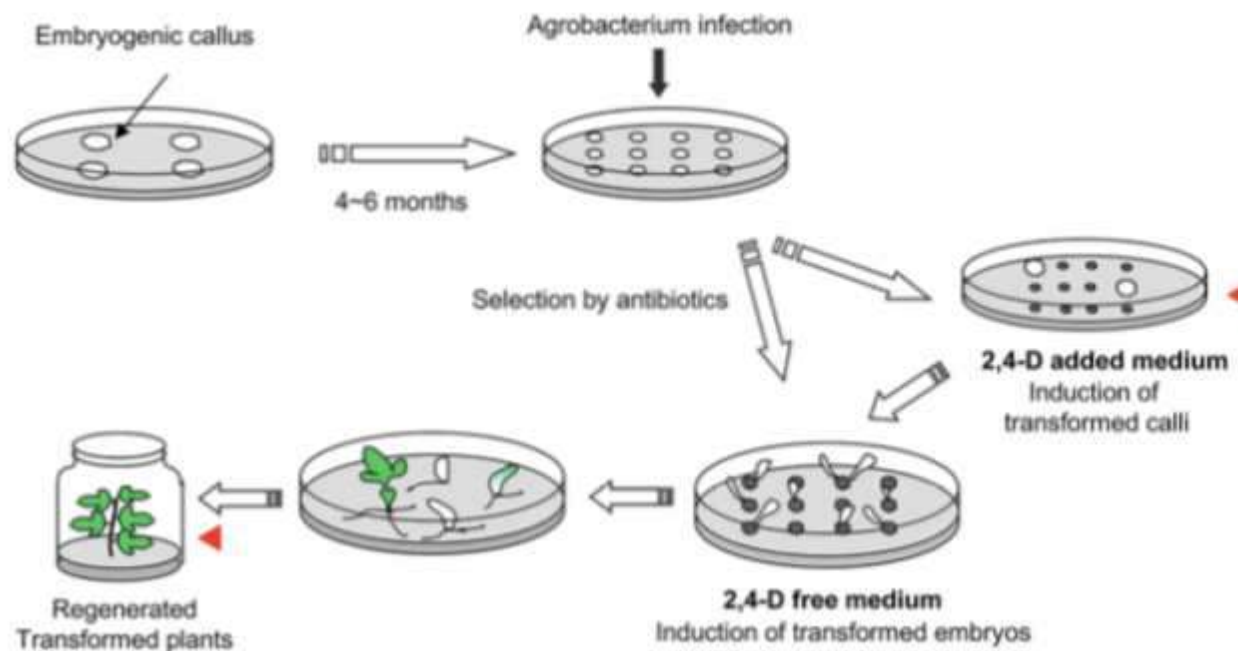
RIGENERAZIONE DI PIANTE DI VITE EDITATE

RESEARCH ARTICLE

CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape

2017

Ikuko Nakajima¹*, Yusuke Ban¹*, Akifumi Azuma¹, Noriyuki Onoue¹, Takaya Moriguchi¹,
Toshiya Yamamoto¹, Seiichi Toki^{2,3,4}, Masaki Endo²* *



Vitis vinifera L., cv. Neo Muscat mutata per il gene che codifica per phytoene desaturase (VvPDS)

RIGENERAZIONE DI PIANTE DI VITE “EDITATE”

Plant Biotechnology Journal (2018) 16, pp. 844–855

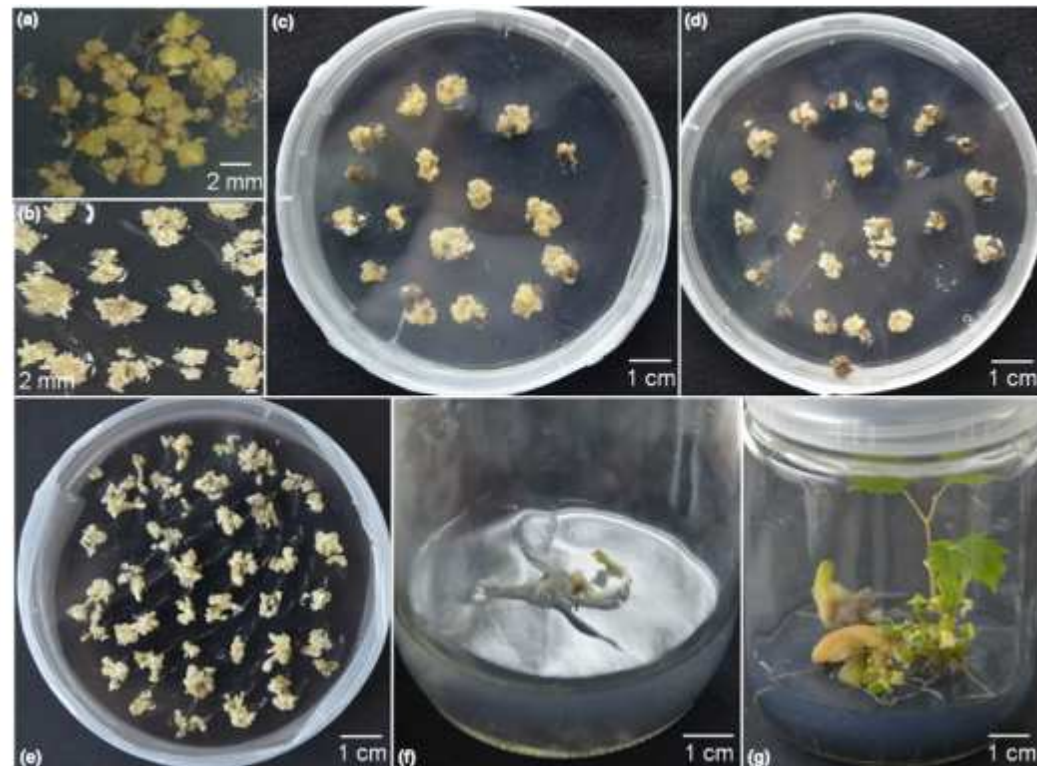
doi: 10.1111/pbi.12832

CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation

2018

Xianhang Wang^{1,2,†}, Mingxing Tu^{1,2,†}, Dejun Wang^{1,2}, Jianwei Liu^{1,2}, Yajuan Li^{1,2}, Zhi Li^{1,2}, Yuejin Wang^{1,2} and Xiping Wang^{1,2,*}

- Mutazioni bialleliche in VvWRKY52 nella prima generazione
- Resistenza a *Botrytis cinerea*



Thompson Seedless cultivar

RIGENERAZIONE DI PIANTE DI MELO EDITATE

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system

Chikako Nishitani¹, Narumi Hira¹, Sadao Komori², Masato Wada³, Kazuma Okada³,
Keishi Osakabe⁴, Toshiya Yamamoto¹ & Yuriko Osakabe⁴

Mutazione nella
fitoene desaturasi

Piante editate
prodotte in 8 mesi



La mela Artic[®] GMO potrebbe essere fatta con genome editing

NEWS IN FOCUS

LAB LIFE Salary survey finds wild swings in pay for US postdocs p.150

POPULATION BIOLOGY New orangutan species spotted in Indonesia p.151

PARTICLE PHYSICS Dark matter search comes up empty — again p.153



AGRICULTURE The bitter battle over the world's most popular insecticide p.156

©MAGNET/REDACT/FRUIT, INC.



wt



polyphenol oxidase (PPO) RNAi

ABBREVIAMENTO DEL CICLO PER VELOCIZZARE IL BREEDING CLASSICO

- **Overespressione di omologhi di *FLOWERING LOCUS T (FT)*** in *Malus* (Kotoda et al. 2010), *Citrus* (Endo et al. 2005), pioppo (Hsu et al. 2006), pruno (Srinivasan et al. 2012), e eucalipto (Klocko et al. 2016).
- **Mutazione di *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)***, in mela (Kotoda et al. 2006) e pera (Freiman et al. 2012).
- **Overespressione sotto promotore inducibile di *FT*** di pioppo (*Populus trichocarpa*) (Wenzel et al. 2013).
- **Espressione tramite vettori virali di *FT*** (Virus-Induced Flowering, VIF). (McGarry et al. 2017). In melone (*Cucurbita moschata*, Lin et al. 2007).
- **Overespressione di *MADS4*** di *Betula pendula* in mela (Schlathölter 2018).

Grazie a tutti per l'attenzione

