

Editing genomico di *Ocimum basilicum* L. tramite CRISPR/Cas9 per indurre resistenza al patogeno *Peronospora belbahrii*

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

marco.savona@crea.gov.it

¹CREA Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, C.so Inglesi 508, 18038 Sanremo (IM)

²IPSP CNR Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino (FI)

³CREA Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Via di Fioranello 52, 00134 Roma

La peronospora del basilico (*Ocimum basilicum*) è causata dal fungo oomicete *Peronospora belbahrii*, ed è una fitopatia molto diffusa. I sintomi sono a carico dell'intero apparato fogliare, con clorosi e lesioni della foglia in prossimità della venatura centrale e la comparsa, sulla pagina inferiore, di un'abbondante sporulazione di colore grigio. Le foglie diventano gradualmente necrotiche e cadono (fase necrotrofica). Le coltivazioni del basilico effettuate in serra e in pieno campo, destinate rispettivamente al consumo fresco e trasformato, sono ormai da un decennio pesantemente danneggiate da infezioni di *Peronospora belbahrii* (Minuto *et al.*, 2004), causando perdite di raccolto prossime al 100%.

L'uso sempre maggiore di agenti chimici per contrastare queste avversità non si adegua alla prospettiva di un'agricoltura indirizzata sempre più a un modello sostenibile. Per questo motivo, conferire resistenza ai patogeni rappresenta una priorità nei programmi di miglioramento genetico delle specie vegetali. Con il recente sviluppo delle tecnologie di genome editing, in particolare il sistema CRISPR/Cas9, si è in grado di intervenire a livello genetico in modo rapido ed efficiente, modificando caratteri di interesse agrario, come ad esempio spegnere geni che rendono basilico vulnerabile ai patogeni. Di particolare interesse è il gene di suscettibilità *DMR6* (*downy mildew resistance 6*) la cui mutazione ha dimostrato conferire resistenza a oomiceti, in *Arabidopsis thaliana* (Zeilmaker *et al.*, 2015) e in *Solanum lycopersicum* (Thomazella *et al.*, 2016). Il presente lavoro descrive l'isolamento dell'intera sequenza ortologa di *DMR6* (*ObDMR6*, 1260bp), in *Ocimum basilicum* cv. 'FT Italiko' e l'applicazione di genome editing mediante la tecnologia CRISPR/Cas9.

A tale scopo è stato utilizzato il vettore binario pDirect_22c (Cermak *et al.*, 2017), ottimizzato per creare knockout genetici singoli o multipli. Sono stati identificati due siti target (gRNA) sull'esone 2 di *ObDMR6*, utilizzando il tool CRISPRdirect (Naito *et al.*, 2015) e utilizzati per la creazione di una cassetta di clonaggio per l'espressione contemporanea dei 2 gRNA, a partire da un singolo trascritto, per ottenere mutazioni mirate in due punti del gene. Il costrutto ottenuto è stato utilizzato in esperimenti di trasformazione genetica di *O. basilicum* mediata da *Agrobacterium rhizogenes* e *tumefaciens*, che hanno portato, rispettivamente, all'ottenimento del 96% di hairy roots positive all'integrazione di Cas9 e del 82,3% di piante rigenerate editate. Dovrà essere valutata la resistenza dei cloni editati al patogeno *P. belbahrii* attraverso saggi di infezione *in vitro* e l'identificazione di mutazioni off-target.

Parole chiave: CRISPR/Cas9, genome editing, *Ocimum basilicum*, sostenibilità, peronospora.