



PROSPECT

GENE EDITING
SUSTAINABLE
AGRICULTURE

***Nuove tecniche di miglioramento genetico per
la produzione di genotipi resistenti
a patogeni in specie di interesse commerciale
per il settore orticolo piemontese***

A CURA DI:

- Cinzia Comino, Andrea Moglia, Valerio Pompili, Sergio Lanteri
e Alberto Acquadro, DISAFA, Genetica vegetale, Università degli Studi di Torino
- Simone Monge, Confagricoltura Cuneo
- Cristiano Carli, Agrion Fondazione per la Ricerca
e lo Sviluppo tecnologico dell'agricoltura piemontese

FINANZIATO DA:

Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo (Bando Agroalimentare 4.0)

II GENE EDITING e la tecnologia CRISPR/CAS9

Che cos'è l'editing del genoma

L'editing del genoma (in terminologia anglosassone 'gene editing') è una strategia innovativa che consente di modificare il DNA di un organismo in modo mirato e preciso, senza causare nessun'altra alterazione o modifica dell'informazione genetica complessiva. Tra le diverse tecniche disponibili la più veloce, economica ed accurata si è dimostrata quella definita CRISPR-Cas9, acronimo di *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Mojica et al 2005), associate alla proteina Cas9, un enzima (nucleasi) in grado di tagliare il DNA. La tecnica è stata ribattezzata "forbice genetica" e la sua messa a punto è valsa nel 2020 il premio Nobel per la chimica alle due ricercatrici Jennifer A. Doudna e Emmanuelle Charpentier (<https://youtu.be/1CSYHLTPVzq>).

La tecnologia CRISPR-Cas9 sfrutta un sistema naturale di difesa dei batteri nei confronti delle infezioni da parte di virus chiamati batteriofagi (Barrangou et al 2007). Un virus non è in grado di moltiplicarsi autonomamente e per farlo deve infettare la cellula batterica inserendo al suo interno il proprio DNA. Il DNA si replica e vengono sintetizzati componenti del virus che si uniscono fra loro (si assemblano) per formare nuovi virus. Ogni batterio infettato dal virus si trasforma, così, in una fabbrica di nuovi virus e, al termine del processo, il batterio va incontro ad un processo di lisi cellulare e a liberazione di molte particelle virali che vanno ad infettare altri batteri.

Alcuni batteri sono, tuttavia, dotati di un meccanismo di difesa nei confronti degli attacchi da parte dei virus perché sono in grado di integrare nel loro genoma piccoli frammenti del DNA virale (protospacer), intervallati da brevi sequenze ripetute in successione (in tandem) in una regione definita CRISPR array (Mojica et al 2005). Gli array CRISPR rappresentano pertanto una 'banca di memoria' di brevi sequenze di DNA di virus con cui il batterio è entrato precedentemente in contatto.

Se si verifica nuovamente un'infezione del batterio da parte della stessa tipologia di virus, il batterio è in grado di riconoscere il DNA del virus come estraneo e di tagliarlo/degradarlo grazie all'enzima Cas9, bloccando così l'infezione. Tale processo è guidato dalla sintesi di molecole di RNA proprio a partire dalle regioni CRISPR descritte in precedenza (**Figura 1**).

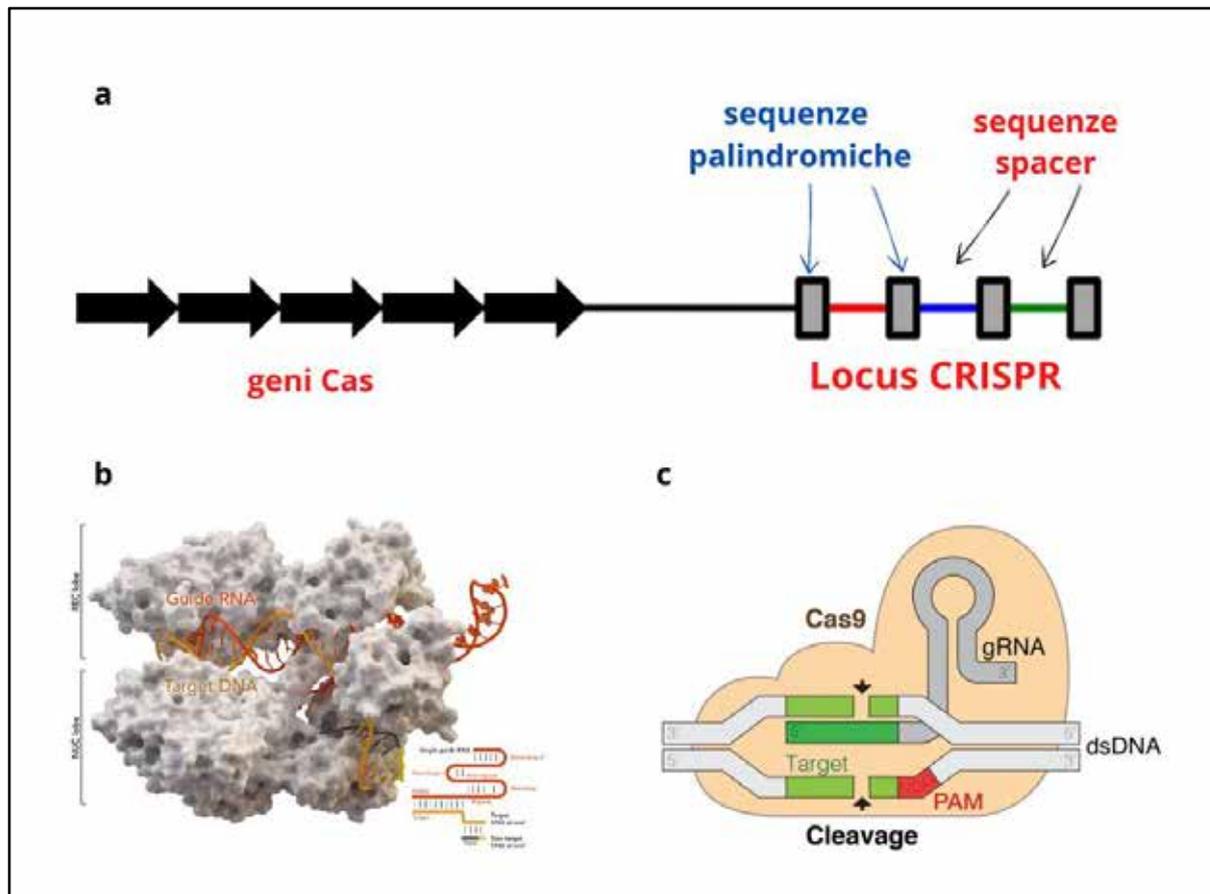


Figura 1 - a) Struttura di una regione CRISPR e dei geni CAS in un genoma batterico; b) Modello molecolare 3D del complesso CRISPR/Cas9. c) Meccanismo molecolare con cui il complesso CRISPR/Cas9 agisce. Cas9, complessata con un sgRNA è in grado di riconoscere in modo preciso una regione specifica del genoma e di indurre un taglio ("cleavage") a monte di una regione chiamata PAM (NGG). Figure tratte da: b) <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GRNA-Cas9-colourfriendly.png> e c) https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cas9_5AXW.png

Applicazioni del gene editing

Charpentier e Doudna hanno adattato questo sistema di difesa immunitaria batterica *ante litteram* (Jinek et al 2012) per creare una tecnologia in grado di modificare il DNA di qualsiasi organismo (e.g.: animali e piante). Nella sua applicazione pratica, si inserisce all'interno di una cellula un breve frammento nucleotidico, chiamato sequenza "guida" (sgRNA, single guide RNA) che, legandosi all'enzima Cas9, è in grado di riconoscere e appaiarsi a una specifica sequenza del DNA (**Figura 1a**). In un secondo momento, l'enzima Cas9 effettua un taglio in corrispondenza della sequenza del DNA riconosciuto (sequenza target), simulando lo stesso processo che avviene in natura nei batteri. Una volta che è stato effettuato il taglio sul doppio filamento di DNA (DSB, *Double Strand Break*, **Figura 1b**), la cellula cerca di riparare il danno, che altrimenti sarebbe deleterio per la sua sopravvivenza, introducendo o eliminando dei nucleotidi: ciò nella maggior parte dei casi causa alterazioni del DNA

(mutazioni) che disattivano la funzionalità del gene¹. La tecnica permette anche di modificare in maniera mirata il DNA o inserire elementi genetici in corrispondenza del taglio.

L'editing del genoma è di grande interesse nella prevenzione e nel trattamento delle malattie umane (Li et al 2020). Attualmente è usato in cellule e modelli animali, nei laboratori di ricerca per comprendere le malattie ed è sperimentato in studi clinici per un'ampia varietà di malattie (malattie ereditarie come la fibrosi cistica, l'emofilia e l'anemia falciforme). È un approccio promettente per il trattamento e la prevenzione di malattie più complesse, come il cancro, le malattie cardiache e l'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV). L'editing del genoma ha molte possibili applicazioni in campo umano e animale così come in campo vegetale in quanto permette di migliorare geneticamente le specie di interesse agrario in modo molto più mirato e preciso rispetto alle tecniche precedentemente utilizzate per manipolare geneticamente le piante, intervenendo direttamente sui geni che controllano caratteri d'interesse (<https://www.eu-sage.eu>).

Attualmente siamo ancora nelle fasi iniziali dell'applicazione del gene editing nelle piante (AA.VV. 2021). È possibile intervenire solo su uno o pochi geni contemporaneamente e la maggior parte delle mutazioni comportano la perdita della funzione del gene ("*loss of function*"). I nuovi sviluppi tecnologici, tuttavia, promettono di rendere possibile l'editing genico su più ampia scala consentendo di migliorare la quantità e qualità della produzione, la resistenza a stress ambientali (siccità, salinità del suolo, alte temperature) e a patogeni, nell'ottica di un'agricoltura sostenibile e adattata ai cambiamenti climatici in corso (Zhu et al 2020).

L'insieme delle tecniche di gene editing e cisgenesi² applicate alle piante è stato recentemente ridefinito utilizzando l'acronimo TEA: Tecnologie di Evoluzione Assistita. Questa espressione proposta dalla SIGA (Società Italiana di Genetica Agraria) introduce il concetto che tali tecniche "*si limitano a facilitare processi di adattamento che hanno gli stessi esiti di quelli che possono verificarsi con le mutazioni spontanee e con l'incrocio tra varietà della stessa specie o tra specie sessualmente compatibili. Conseguentemente, l'adozione di tecnologie di genome editing e cisgenesi introducono cambiamenti genetici mirati e sostanzialmente assistono un'evoluzione guidata*" (<http://www.geneticagraria.it>).

¹ Una animazione esemplificativa del meccanismo di funzionamento della tecnologia CRISPR è disponibile al link: <https://www.nature.com/collections/txhdfslxzh/videos>.

² La cisgenesi prevede il trasferimento genico di uno o più cisgeni, geni appartenenti alla stessa specie o anche a specie diverse, ma affini e sessualmente compatibili (definizione tratta da: <https://www.giannibarcaccia.com/wp-content/uploads/2019/05/Barcaccia-e-Lucchin-2016-Dal-Seme-2-36-42-ISSN-2039-7569.pdf>).

IL PROGETTO PROSPECT: LE MALATTIE CONSIDERATE

Le attività di PROSPECT si sono focalizzate su tre colture ampiamente diffuse in Piemonte: la patata, il pomodoro da mensa e il peperone, con l'obiettivo di ottenere piante non suscettibili alla peronospora (patata e pomodoro) e all'oidio (peperone).

La peronospora (*Phytophthora infestans*) rappresenta per la patata la più grave e dannosa patologia responsabile di elevate perdite di produzione (Fry et al 2008). Può colpire tutti gli organi della pianta (**Figura 2**) ad eccezione delle radici. Colpisce inizialmente le foglie basali che appaiono pallide ed in seguito evidenziano la necrotizzazione dei tessuti mentre, sulla pagina inferiore, si ha la comparsa del micelio fungino (visibile al microscopio). In caso di attacchi gravi e precoci l'apparato fogliare può essere totalmente compromesso. Sul fusto si osservano macchie allungate di colorazione grigio-brunastra con formazione, in presenza di umidità, del micelio fungino, gli steli perdono di resistenza e si spezzano con facilità (AA.VV. 2011). A carico del tubero si ha la formazione di aree depresse bluastre, di consistenza spugnosa. Con l'espansione dell'infezione la parte colpita inscurisce e la buccia tende a screpolarsi.

L'infezione ha origine dai tuberi o residui colturali infetti dopo un periodo di umidità (pioggia o rugiada) di almeno 12 ore seguito da condizioni di temperatura compresa tra 10 e 24 °C e umidità relativa maggiore del 75%. Vento e acqua sono i principali mezzi di diffusione del fungo, che penetra nelle foglie attraverso le aperture stomatiche ed ha un periodo di incubazione influenzato dalle temperature compreso tra 2 e 6 giorni.

Anche per il pomodoro sono interessati tutti gli organi vegetativi con sintomatologia simile alla patata (AA.VV. 2010). Pur non essendo il patogeno più dannoso del pomodoro da mensa, in alcuni contesti o annate favorevoli, può rappresentare una patologia in grado di incidere pesantemente sulla produttività dell'impianto.

L'approccio alla difesa parte dalla gestione agronomica con l'applicazione delle rotazioni colturali, che permettono di ridurre il potenziale di inoculo ma che, nei contesti aziendali attuali, non sempre sono realizzabili. Il controllo della sanità del materiale di propagazione è un altro utile mezzo di prevenzione, soprattutto per quanto riguarda la patata così come l'impiego di varietà tolleranti. Anche per quanto riguarda la difesa chimica, la lotta si basa sulla prevenzione con l'applicazione degli agrofarmaci in prossimità di eventi potenzialmente favorevoli allo sviluppo del fungo.





Figura 2. Foglia, fusto e frutto colpiti da peronospora. Necrosi fogliare e tubero danneggiato da attacchi di *Phytophthora infestans*

L'oidio (*Leveillula taurica*) interessa principalmente il peperone (Pollini, 2008). Si sviluppa all'esterno della lamina fogliare in condizioni di temperatura di 20-25 °C e umidità relativa pari al 70-75%. L'infezione interessa generalmente le foglie delle piante a fine ciclo produttivo. La pagina superiore si ricopre di macchie clorotiche con contorni sfumati (**Figura 3**) che successivamente necrotizzano. Le foglie colpite si accartocciano verso il basso e disseccano. In corrispondenza delle clorosi fogliari, sulla pagina inferiore, compare un'efflorescenza farinosa biancastra che corrisponde all'invasione del patogeno. A livello agronomico la gestione della fertilizzazione e l'arieggiamento della vegetazione agevolano il contenimento, mentre sono ancora poche le varietà dotate di geni di resistenza.



Figura 3 -Foglia colpita da oidio.

IL PROGETTO PROSPEC: OBIETTIVI

Lo scopo principale dell'agricoltura sostenibile è quello di minimizzare l'impatto delle pratiche agricole a livello ambientale. I fitopatogeni limitano fortemente la resa produttiva e rappresentano una forte minaccia per la sostenibilità alimentare a livello globale. In assenza di cultivar resistenti, la produzione agricola è fortemente dipendente dal controllo chimico dei patogeni mediante fitofarmaci. Ridurre la dipendenza della produzione alimentare dal controllo chimico è quindi un obiettivo chiave al fine di evitare gli impatti ambientali negativi causati dalle pratiche agricole correnti. Tale obiettivo è in linea con la strategia Farm to Fork nel quadro del New Green Deal dell'UE: un patto fra agricoltori e consumatori per raggiungere target ambiziosi, come la riduzione del 50% nell'utilizzo di fitofarmaci.

Il progetto **PROSPEC** (<https://www.crispr-plants.unito.it/projects>), finanziato dalla Fondazione CRC (bando Agroalimentare 4.0), nasce con lo scopo principale di aumentare la tolleranza all'infezione da parte di agenti patogeni fungini nelle specie orticole di interesse commerciale in Piemonte (patata, pomodoro e peperone). Partner del progetto sono il DISAFA (Genetica vegetale), il settore Plant Breeding della Wageningen University (WUR), la Fondazione Agrion e Confagricoltura Cuneo. Attualmente, la strategia di difesa contro le malattie come la peronospora e l'oidio per queste specie si basa sull'uso massiccio della lotta chimica. PROSPEC si propone di affrontare il problema dal punto di vista genetico contribuendo a creare varietà tolleranti alle malattie.

La malattia in una pianta nasce da un'interazione "compatibile" tra pianta e patogeno. La maggior parte dei microrganismi patogeni richiede la collaborazione dell'ospite per stabilire tale interazione "compatibile". Permettere ad un patogeno di insediarsi significa infatti consentirgli di stabilire delle strutture di alimentazione (e.g.: formazione di austori) all'interno della cellula ospite al fine di ottenere dei nutrienti. Tutti i geni delle piante che facilitino l'infezione e supportino la "compatibilità" con il patogeno possono essere considerati geni di suscettibilità (geni S, van Schie et al 2014). Una mutazione deleteria su un gene S può, pertanto, limitare la capacità del patogeno di causare una malattia. La resistenza/tolleranza conferita dalla perdita o dall'alterazione di uno o più geni S è generalmente considerata recessiva, mentre i geni di resistenza (geni R) sono tipicamente dominanti.

I geni di suscettibilità selezionati nel progetto per la disattivazione tramite CRISPR/Cas9 sono già stati identificati in patata, pomodoro e peperone e sono MLO, PRM4, DND1 e DMR6. Tali geni sono in grado di conferire tolleranza principalmente a peronospora o all'oidio in pomodoro e patata, ma anche ad altri patogeni senza alcun rischio di effetto collaterale. In peperone è stato identificato un gene chiave MLO (CaMLO2) in grado di conferire resistenza all'oidio.

Nell'ambito del progetto in pomodoro e patata si è deciso di disattivare due geni (PRM4 e DMR6), mentre in peperone solo uno (MLO), considerando la difficoltà di rigenerazione *in vitro* della specie.

Gli obiettivi principali perseguiti nel progetto PROSPECT sono stati i seguenti:

- i) mettere a punto la tecnica tecnica CRISPR/Cas9 in patata, pomodoro e peperone;
- ii) approfondire le conoscenze relative ai geni di suscettibilità su due dei patogeni: peronospora e oidio, in tre specie di Solanacee chiave per l'agricoltura piemontese;
- iii) sviluppare genotipi meno suscettibili a oidio e peronospora in pomodoro, patata e peperone, preservando la loro qualità commerciale e organolettica;
- iv) ridurre l'utilizzo di fitofarmaci nella coltivazione di varietà commerciali di peperone, pomodoro e patata, rilevanti per il sistema agricolo piemontese.

Le attività sono state organizzate in cinque Working package (WP; **Figura 4**).

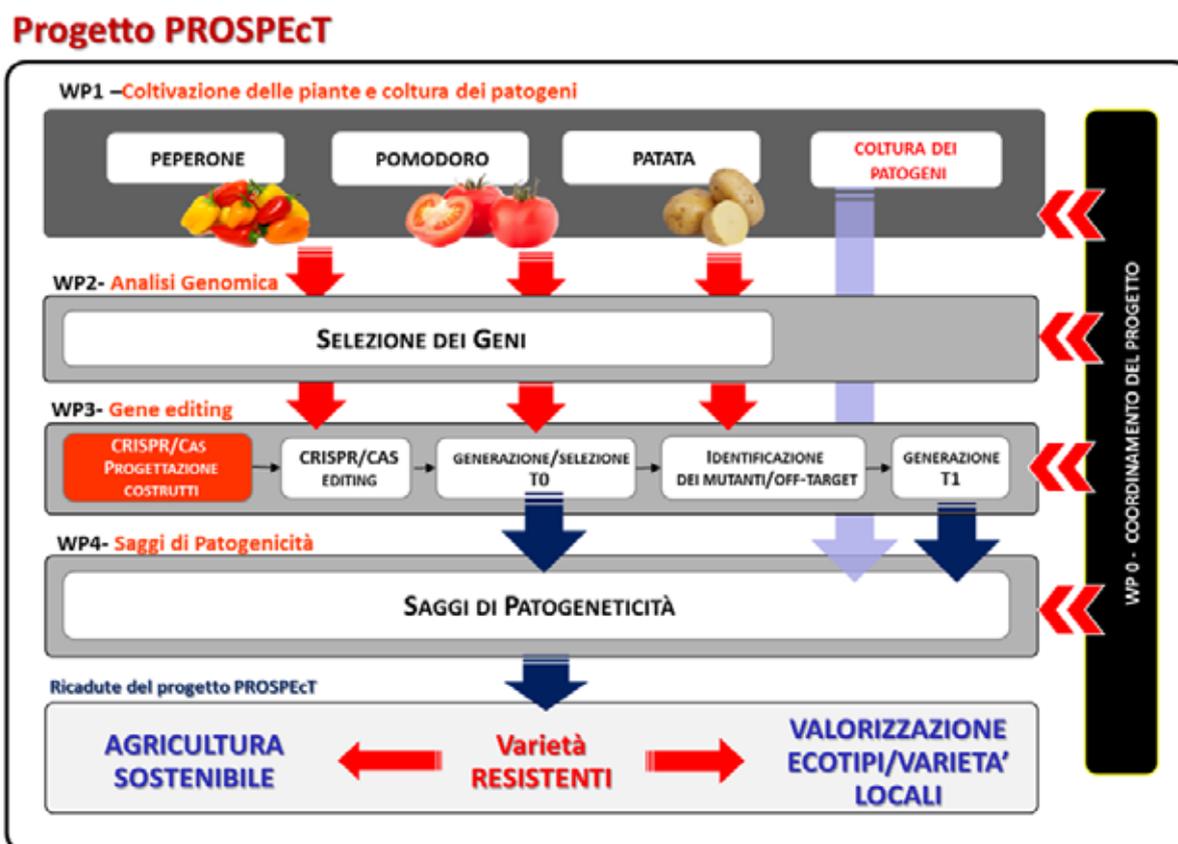


Figura 4 - Diagramma delle attività del progetto PROSPECT (bando Agroalimentare 4.0, Fondazione CRC)

I risultati innovativi conseguiti nell'ambito del progetto permetteranno di sviluppare cultivar meno suscettibili all'attacco di patogeni non solo in patata, pomodoro e peperone, ma rappresenteranno un modello per lo sviluppo anche in altre colture orticole. Tale approccio consentirà inoltre di contribuire a salvaguardare e valorizzare gli ecotipi locali rendendoli maggiormente competitivi nei confronti di varietà di interesse commerciale.

PIANTE RESISTENTI ALLA PERONOSPORA

L'agente causale della peronospora è *Phytophthora infestans*, un oomicete che in pomodoro e peperone provoca lesioni alle foglie, allo stelo e alle bacche che mostrano, nella fase finale, un danno simile al danno da gelo (Fry et al 2008). Nei casi più gravi, la pianta perde tutte le sue foglie inferiori e muore. In patata la pianta mostra sintomi analoghi, mentre l'infezione tardiva nel tubero è caratterizzata da aree di forma irregolare, lesioni leggermente depresse, di colore variabile dal grigio-bluastro-bruno e di consistenza spugnosa.

Questo patogeno è in grado di utilizzare i geni di suscettibilità (S) delle piante (ad es. DMR6 e PMR4) per facilitare la propria proliferazione e dare luogo all'infezione. È stato osservato che disabilitando uno o più geni di suscettibilità (S) nella pianta si può indurre una difesa nella pianta ad ampio spettro e durevole nel tempo.

Pomodoro: Knock-out di DMR6

L'obiettivo dell'attività di ricerca è stato quello di indurre mutazioni nella sequenza genica dei geni DMR6 (Downy Mildew Resistance 6) per disabilitarli, nell'ottica dell'ottenimento di varietà di pomodoro (Cv San Marzano) tolleranti alla Peronospora.

L'acido salicilico svolge un ruolo chiave nell'attivazione dei meccanismi di difesa a seguito di attacco di patogeni. Molti studi hanno evidenziato che tale componente è responsabile dell'attivazione della Resistenza Sistemica Acquisita (SAR). In un lavoro recente è stato dimostrato che la mutazione di un singolo gene di suscettibilità DMR6, associato all'omeostasi dell'acido salicilico, è in grado di conferire resistenza a diversi tipi di patogeni in *Arabidopsis* (van Damme et al 2008) e in pomodoro. Il suo silenziamento in patata si traduce inoltre in resistenza a *P. infestans* (Sun et al. 2016), mentre il suo knock-out nel pomodoro è in grado di condurre ad un aumento della resistenza contro diversi patogeni, tra cui *P. capsici* e *P. syringae* (Thomazella et al 2021)

In una prima fase del lavoro sono stati identificati all'interno del genoma di pomodoro due geni omologhi (che svolgono analoga funzione) di DMR6: *dmr6-1* e *dmr6-2*. Sulla base dell'attivazione della trascrizione, cioè l'entità dell'espressione del gene in risposta all'infezione da agenti patogeni, è stato selezionato il primo gene per esperimenti di editing genetico. Per indurre la mutazione knock-out in *dmr6-1* sono state inserite all'interno del vettore di trasformazione genetica tre *single guide RNA* (sgRNA) in grado di riconoscere differenti porzioni del gene e di guidare l'enzima Cas9 a tagliare il filamento di DNA.

Il sequenziamento condotto tramite la tecnologia Illumina (*amplicon sequencing*) sulle linee mutanti T₀ ha messo in luce l'effettivo editing genomico a livello delle

regioni di due gRNA con la predominanza di piccole inserzioni/delezioni (indel). Piante della generazione T₀ sono state quindi sottoposte ad autofecondazione e ciò ha consentito di ottenere piante della generazione successiva (T₁): le analisi molecolari hanno evidenziato il trasferimento della mutazione nelle linee T₁.

Una delle piante della generazione T₁ (T1_21) è risultata caratterizzata da una mutazione in omozigosi a livello del gene target *dmr6* e dall'assenza del gene Cas9. Al fine di approfondire il profilo genomico di tale linea il suo genoma è stato sequenziato completamente con la tecnologia Illumina mediante un approccio di *Whole Genome Sequencing* (**Figura 5A**). Il risequenziamento dell'intero genoma ha confermato l'assenza di DNA esogeno e la presenza di piccole mutazioni (indels) a livello del locus bersaglio DMR6 (**Figura 5B**). Inoltre, non sono state osservate in questa pianta mutazioni in regioni genomiche off-target selezionate tramite appositi programmi bioinformatici in base alla similarità con il gene *dmr6*. Si è, quindi, riscontrata una sostanziale equivalenza dal punto di vista genomico di questa pianta editata in confronto con la pianta *wild type*.

I genotipi editati per *dmr6-1* sono stati valutati con un test di patogenicità (**Figura 5C**) su foglia (Detached Leaf assay, DLA) utilizzando *Phytophthora infestans* come patogeno. È stata osservata una riduzione significativa della suscettibilità in tutte le linee mutate rispetto alle piante di controllo (nelle linee T1_34 e T1_42 addirittura superiore all'80%, **Figura 5D**). Tali linee sono in fase di valutazione non solo per la potenziale resistenza ad altri patogeni, ma anche per la loro tolleranza a stress idrico/salino.

La linea T₁ selezionata all'interno di tale progetto (T1_21), che si distingue dalla pianta *wild type* solamente per piccole mutazioni puntiformi a livello del locus genico DMR6, rappresenta un ottimo materiale per strategie future di miglioramento genetico e risulta indistinguibile dalle piante che potrebbero essere ottenute tramite mutazioni naturali o miglioramento genetico convenzionale. In molti altri Paesi non è ancora stata presa una decisione definitiva sulla regolamentazione di tali piante, anche se in diversi casi è stato proposto che queste non debbano essere considerate geneticamente modificate se non contengono DNA estraneo (EFSA panel, 2020).

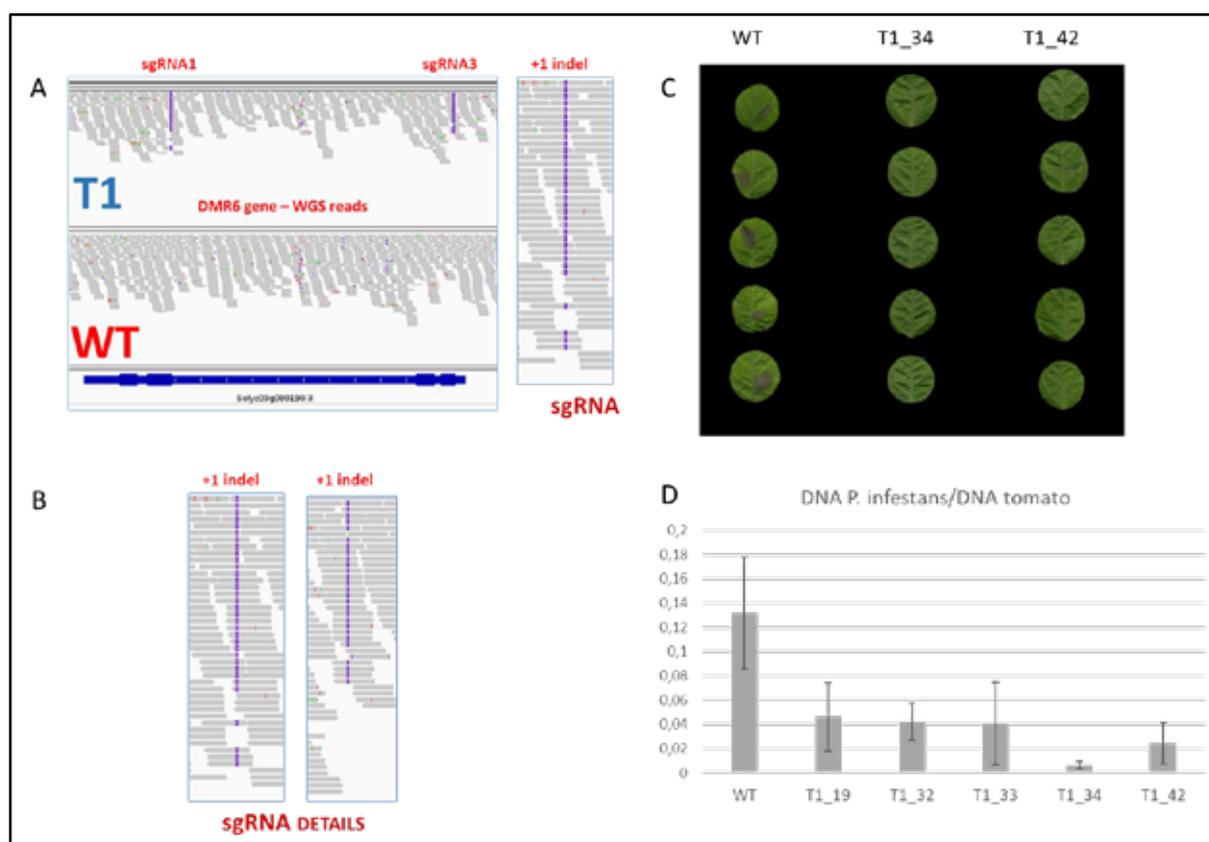


Figura 5: (A e B) sequenziamento genomico Whole Genome Sequencing condotto sulla linea T1_21; (C e D) saggio di patogenicità con *P. infestans* condotto sulle linee T1 mutanti.

Pomodoro: Knock-out di PMR4

Il gene PMR4 (Powdery Mildew Resistant 4) è un gene S ed è stato utilizzato nel progetto poiché studi precedenti in *Arabidopsis* (Vogel and Somerville 2000) e nella varietà di pomodoro 'Moneymaker' hanno mostrato l'induzione di tolleranza a oidio in piante con il gene *pmr4* disabilitato (Santillán Martínez et al 2020). Per ottenere un livello di resistenza/tolleranza simile in altre varietà e per dimostrare che tale fenomeno non dipende dal background genetico, il gene PMR4 è stato disabilitato in due varietà ampiamente coltivate, 'San Marzano' (SM) e 'Cuore di Bue' (CB).

L'editing è stato effettuato utilizzando 4 sgRNA che riconoscono le regioni nucleotidiche che codificano per il dominio FKS1dom1 e quello Glucano-sintetasi della proteina PMR4. In tutto, sono stati ottenuti 87 trasformanti di pomodoro *pmr4* (generazione T₀) di cui 70 in San Marzano (SM) e 17 in Cuore di bue (CB). Ventisei mutanti SM e 9 CB sono stati sottoposti ad analisi molecolare e sono risultati positivi per l'integrazione del gene Cas9. In media, l'efficienza di editing è risultata variabile in un intervallo tra il 22,1% e il 90,5%, considerando separatamente le quattro regioni bersaglio dei sgRNA in SIPMR4. Tutti i genotipi editati sono stati poi valutati con un test di patogenicità su foglia (Detached Leaf assay, DLA) utilizzando *Phytophthora infestans* come agente patogeno (**Figura 6A**). Nella maggior parte dei casi, è stata

osservata una riduzione significativa della suscettibilità rispetto alle piante di controllo evidenziata da un minore tasso di lesioni (**Figura 6B**).

In una seconda fase della ricerca, allo scopo di approfondire il profilo genomico, i mutanti più promettenti sono state selezionati ed il loro genoma è stato sequenziato completamente (Whole Genome Sequencing, WGS) tramite la tecnologia Illumina. Tale analisi ha confermato l'effettivo editing a livello delle regioni dei gRNAs ed ha escluso l'emergenza di eventi off-target, cioè di induzione di mutazioni a carico di altre regioni del genoma.

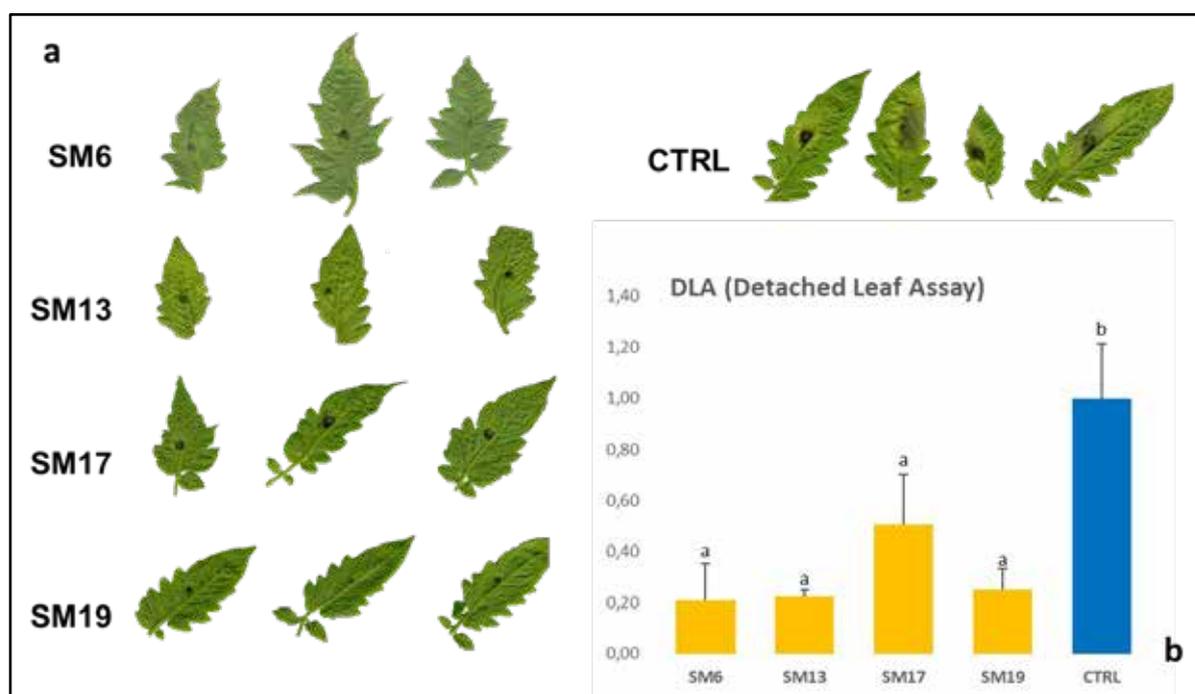


Figura 6 - a) Test DLA in pomodoro con *P. infestans* eseguito su quattro mutanti pmr4 (San Marzano) e una pianta wild type come gruppo di controllo. b) Nell'istogramma, sono riportati per ogni genotipo i valori normalizzati di Area fogliare danneggiata (LAD%). In ordinata è indicato il rapporto espresso in LAD (%) del mutante rispetto al controllo; le barre rappresentano la deviazione standard (sd). Le differenze statistiche tra mutanti/controllo sono state analizzate con un test t a due code ($P < 0,05$). I confronti multipli sono stati eseguiti usando il test t di Student a due code con la correzione post-hoc di Bonferroni.

Patata e geni S

Analogamente a quanto accade nella coltura del pomodoro, il patogeno *Phytophthora infestans* è in grado di arrecare gravi danni alla coltura della patata in pieno campo e per questa ragione, la patata è stata oggetto di miglioramento genetico per la tolleranza ai patogeni utilizzando i geni di suscettibilità (Sun et al. 2016, 2017). In particolare, la down-regolazione del gene PMR4 mediante RNAi (RNA interference) ha mostrato un incremento della tolleranza a peronospora, botrite e ad oidio. Il silenziamento di DMR6-1 condotto tramite RNAi e il knockdown condotto mediante CRISPR/Cas hanno evidenziato un incremento della resistenza nei confronti di *P. infestans*. Nel caso della patata (cultivar 'Desirée' e 'Penelope') si è

scelto nell'ambito del progetto di disabilitare mediante tecnologia CRISPR/Cas9 due geni: DMR6 e PMR4.

Patata: Knock-out del gene PMR4

Il costrutto usato per indurre mutazioni nel gene PMR4 è stato lo stesso utilizzato per l'editing in pomodoro, sulla base dell'elevata similarità di sequenza tra le specie entro la famiglia botanica delle Solanacee.

In tutto, sono stati ottenuti 33 trasformanti di patata (generazione T₀), di cui 24 in nella cultivar 'Desirée' e 9 nella 'Penelope' e di questi 32 sono risultati positivi per l'integrazione del gene Cas9, in seguito a saggio PCR. Di tutti questi genotipi sono stati ottenuti tuberi che sono stati il punto di partenza per rigenerare le piante per le successive analisi. Tutti i mutanti sono in corso di valutazione utilizzando un test di patogenesi su foglia (Detached Leaf assay, DLA) a seguito di infezione con *Phytophthora infestans*.

Patata: Knock-out del gene DMR6

Per tale gene, i mutanti del gene DMR6 sono stati generati utilizzando due costrutti ciascuno dei quali dotato di 4 gRNA (due in grado di bersagliare DMR6-1 e due DMR6-2) nell'ottica del knock out simultaneo dei geni. Il primo costrutto è caratterizzato da gRNA disegnati sulla porzione iniziale del gene e il secondo sulla parte terminale del gene.

In tutto, sono stati ottenuti 57 trasformanti di patata (generazione T₀), di cui 37 nella cultivar 'Desirée' e 20 nella 'Penelope'. Diciannove genotipi della varietà 'Desirée' sono risultati positivi per l'integrazione del gene Cas9. Di 35 mutanti sono stati ottenuti tuberi che sono stati il punto di partenza per rigenerare le piante per le successive analisi. Tutti i mutanti sono in corso di valutazione utilizzando un test di patogenesi su foglia (Detached Leaf assay, DLA) con *Phytophthora infestans* come patogeno.

PIANTE RESISTENTI ALL'OIDIO

Gli agenti responsabili dell'oidio sono funghi ascomiceti appartenenti all'ordine delle *Erysiphales*. Le foglie colpite dal patogeno diventano gialle, poi marroni e quindi seccano. Generalmente, le foglie basali vengono colpite per prime e la malattia si sposta gradualmente verso l'alto, causando la defogliazione. La perdita di aree fogliari fotosintetiche rallenta la crescita delle piante e lo sviluppo delle bacche/tuberi, con conseguente riduzione della resa. In pomodoro e peperone la defogliazione totale/parziale espone il frutto alla luce solare diretta, che porta alla scottatura del frutto e alla perdita del suo valore commerciale.

Negli ultimi anni, la comunità scientifica ha effettuato numerosi sforzi, sia per identificare i meccanismi molecolari responsabili dell'interazione pianta-oidio (in termini di resistenza/ suscettibilità della pianta al patogeno), sia per utilizzare tali informazioni in approcci di miglioramento genetico (basati soprattutto sul gene editing via CRISPR/Cas9) volti alla produzione di varietà élite potenziate in specie di interesse agrario. Con riferimento alla suscettibilità della pianta, le proteine MLO sono state identificate come mediatori chiave della suscettibilità a oidio sia nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* (Consonni et al 2006), sia in specie di interesse agrario quali orzo (Jørgensen 1992) e pomodoro (Bai et al 2008). Recentemente, l'inattivazione attraverso CRISPR/Cas9 di geni *MLO* in frumento (Wang et al 2014) e vite (Wan et al 2020) ha permesso di generare varietà resistenti alla malattia e prive di effetti secondari indesiderati.

Peperone e gene editing

Come per patata e pomodoro, in peperone una consistente riduzione della quantità e qualità della produzione è causata da attacchi di funghi patogeni, in particolar modo l'oidio (*Powdery Mildew*). In peperone, il gene *CaMLO2* è risultato particolarmente associato alla suscettibilità della pianta alla malattia (Kim and Hwang 2012). Tuttavia, ad oggi, l'applicazione del *gene editing* in peperone (o in generale approcci di trasferimento genico) risulta fortemente limitata a causa della recalcitranza della pianta alla rigenerazione *in vitro* necessaria per sviluppare efficienti protocolli di trasformazione genetica e di *gene editing*.

Recentemente, un gruppo di ricercatori dell'Università di Valencia ha messo a punto un protocollo di coltura *in vitro* (basato sull'utilizzo di un terreno di coltura arricchito con specifiche componenti ormonali) in grado di indurre organogenesi diretta a partire da espianti cotiledonari nel genotipo di peperone California Wonder (**Figura 7A**, sinistra) (Martínez-López et al 2021). Un'iniziale prova di organogenesi da noi svolta ha evidenziato che lo stesso protocollo se applicato ai genotipi 'Cuneo' giallo (**Figura 7A**, destra) e 'Quadrato di Carmagnola' giallo/rosso non induce organogenesi e rigenerazione, sottolineando come tali processi in peperone sia non solo complessi, ma anche fortemente dipendenti dal genotipo preso in esame.

In questo quadro, le attività di ricerca svolte nell'ambito del progetto PROSPECT hanno previsto prove sperimentali volte all'identificazione di un protocollo di trasformazione in grado di incrementare l'efficienza di rigenerazione *in vitro* a partire dai tessuti della pianta trasformati e, simultaneamente, indurre l'editing in una sequenza genomica bersaglio. In primo luogo, è stata sfruttata l'attività di specifici geni regolatori dello sviluppo, quali *Wuschel* (*WUS*), *Baby Boom* (*BBM*), *Shoot Meristemless* (*STM*) e *Isopentenil transferasi* (*IPT*), la cui efficienza nell'aumentare la rigenerazione è stata recentemente dimostrata in piante modello nonché in specie di interesse agroalimentare (Maher et al 2020). In secondo luogo, il gene *fitoene desaturasi* (*PDS*) è stato selezionato come target per il sistema di *editing genico* mediante approccio CRISPR/Cas9 poiché, essendo coinvolto nella sintesi dei carotenoidi, la sua inattivazione determina la formazione di un fenotipo albino chiaramente visibile, a dimostrazione dell'avvenuta disabilitazione del gene (Koschmieder et al 2017).

Un sgRNA disegnato su *PDS* di peperone è stato utilizzato per l'assemblaggio dei quattro vettori di trasformazione in pianta contenenti Cas9 e i regolatori di crescita per favorire la rigenerazione *in vitro* (uno contenente solo *WUS* come regolatore di crescita e gli altri tre contenenti *WUS* in combinazione con uno degli altri 3 regolatori: *BBM*, *STM* e *IPTI*, **Figura 7B**). I vettori assemblati sono stati quindi utilizzati in prove di trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens* e rigenerazione *in vitro*.

A seguito della trasformazione con il vettore contenente il gene *WUS* come unico regolatore di sviluppo, il genotipo 'California Wonder' ha mostrato una discreta efficienza di organogenesi (**Figura 7C**), sia a partire da gemme (25%) che da espianti cotiledonari (40%), molto probabilmente a causa dell'utilizzo di un terreno di organogenesi già testato e messo a punto per questo specifico genotipo. Diversamente, in 'Cuneo' giallo una bassa efficienza di organogenesi è stata osservata in entrambi i tessuti presi in esame (0.5%, **Figura 7C**). Risultati analoghi sono stati ottenuti a seguito di utilizzo dei vettori di trasformazione contenenti il gene *WUS* in combinazione ai geni *STM* o *IPT*, probabilmente perché tali geni non sono regolatori chiave del processo di rigenerazione in questa specie. Tuttavia, con l'impiego dei geni *WUS* e *BBM* un significativo incremento dell'efficienza di organogenesi è stato osservato in entrambi i genotipi presi in esame (**Figura 7C**). A partire da espianti cotiledonari, un'efficienza di organogenesi dell'80% e del 95% è stata ottenuta rispettivamente nei genotipi 'California Wonder' e 'Cuneo' giallo, mentre in entrambi i genotipi il 98% di organogenesi è stato osservato a partire da gemme. Sebbene con minor efficienza, risultati simili sono stati ottenuti in un successivo esperimento di organogenesi condotto *in vivo* tramite induzione *de novo* dei meristemi (**Figura 7D**) al fine di evitare le fasi di mantenimento e coltura *in vitro*. Tale esperimento ha previsto la valutazione dell'organogenesi di nodi laterali, privati di gemme, a seguito di trasformazione con i vettori precedentemente assemblati. Anche in questo caso la combinazione dei geni *WUS* e *BBM* ha indotto la

rigenerazione del 50% dei meristemi trasformati, valore che equivale almeno al doppio di quello ottenuto con le altre combinazioni di geni regolatori dello sviluppo. Le piante rigenerate in entrambi gli esperimenti di trasformazione e organogenesi *in vitro* e *in vivo* (**Figura 7C** e **Figura 7D**) sono attualmente oggetto di analisi di sequenziamento volte all'identificazione di un potenziale editing mediato dal sistema CRISPR/Cas9 nella sequenza bersaglio del gene *PDS*.

In parallelo alle suddette analisi, sono in corso prove di rigenerazione *in vitro* di protoplasti isolati da tessuto fogliare dei genotipi 'California Wonder' (dati non mostrati) e Cuneo Giallo (**Figura 7E**), al fine di porre le basi per un protocollo di editing genico che non preveda l'integrazione della Cas9 nel genoma vegetale. La più comune applicazione del sistema di editing genico CRISPR/Cas9 si basa sulla trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* che lascia sequenze di DNA esogeno nel genoma di interesse, che solo successivamente può essere eliminato a seguito di segregazione. Tuttavia, recentemente, è stato dimostrato che il sistema CRISPR/Cas9 può essere trasferito sotto forma di complesso ribonucleoproteico preformato Cas9-gRNA direttamente alle cellule ospiti (protoplasti) che, se editati, possono essere indotti a rigenerare una nuova pianta priva di DNA esogeno (Woo et al 2015).

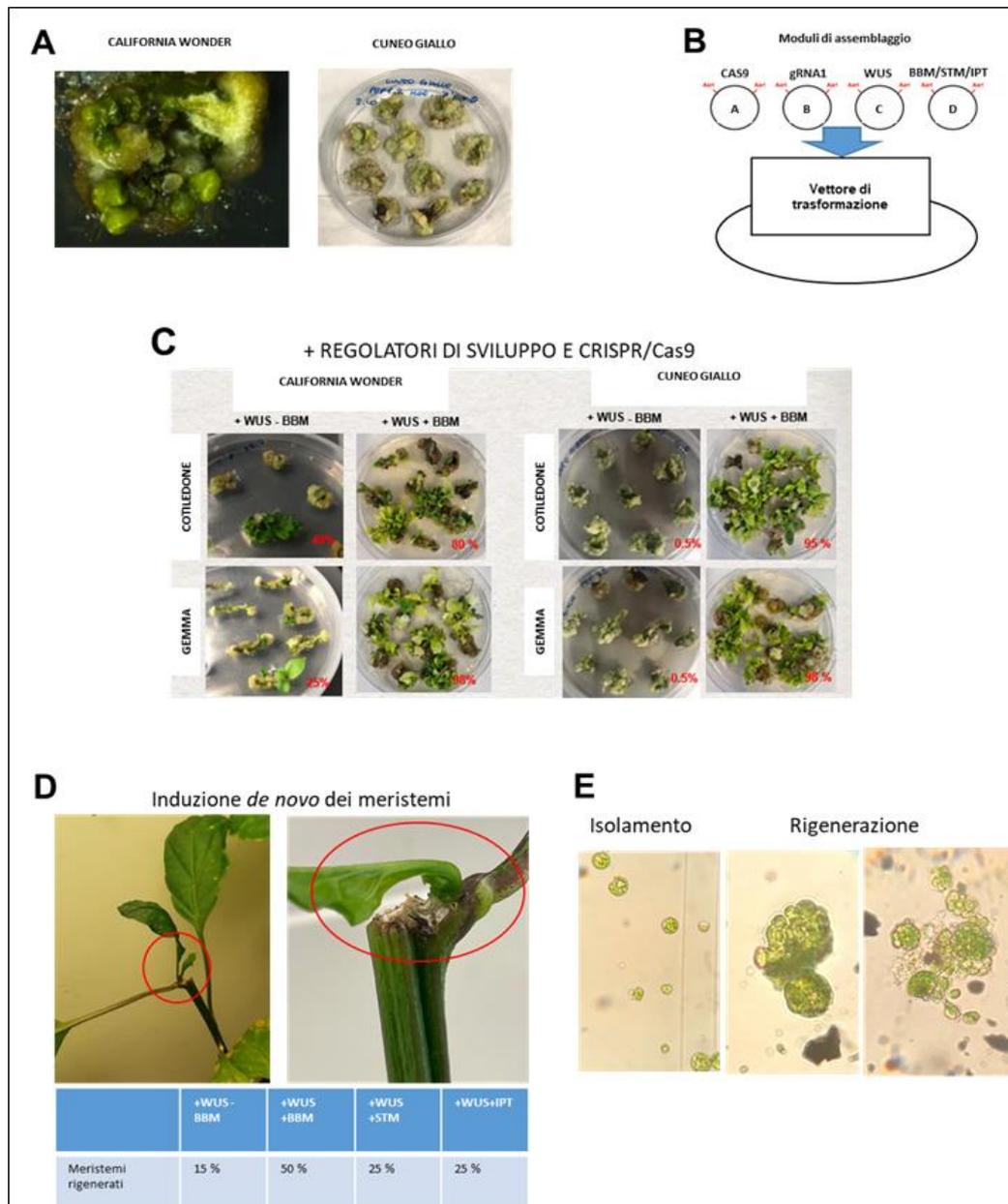


Figura 7. Stato dell'arte sulle attività sperimentali previste dal progetto di ricerca PROSPEC in peperone. **A)** Prova di organogenesi *in vitro* a partire da espianti di cotiledoni dei genotipi di peperone California Wonder (foto di Martínez-López et al., 2021) e Cuneo Giallo mantenuti su un terreno di organogenesi messo a punto da Martínez-López et al. (2021). **B)** Il sgRNA disegnato sul *PDS* è stato inserito in un vettore di trasformazione insieme al gene *Cas9* e a differenti combinazioni dei geni regolatori dello sviluppo *WUS*, *BBM*, *STM* e *IPT*. **C)** Prova di organogenesi *in vitro* a partire da espianti di cotiledoni e gemme dei genotipi di peperone California Wonder e Cuneo Giallo trasformati via *A. tumefaciens* con il vettore di trasformazione contenente il sistema CRISPR/Cas9 ed il gene *WUS* *da solo* o in combinazione con il gene *BBM*. **D)** Induzione *de novo* dei meristemi a partire da nodi ascellari privati di gemme del genotipo di peperone Cuneo Giallo agro-infiltrati con *A. tumefaciens* trasformato con vettori di trasformazione contenenti il sistema CRISPR/Cas9 e differenti combinazioni dei geni regolatori dello sviluppo. **E)** Prove di isolamento e rigenerazione *in vitro* di protoplasti ottenuti da tessuto fogliare dei genotipi di peperone Cuneo Giallo.

IL PROGETTO PROSPECT: PROVE di CAMPO (trattati/non trattati)

Resoconto delle attività in campo presso aziende del territorio associate a Confagricoltura Cuneo

Nell'ambito del triennio di svolgimento del Progetto PROSPECT (2019-2020-2021), sono state allestite prove in campo presso quattro Aziende dislocate in areali completamente diversi della Provincia Granda. Questa attività è stata resa possibile grazie alla disponibilità delle aziende e degli Enti di ricerca che da sempre coltivano specie appartenenti alla famiglia delle Solanacee e che si sono resi disponibili ad ospitare le prove in campo. Si elencano di seguito le Aziende partner del progetto:

- 1) Fondazione Agrion_ Agricoltura, ricerca e innovazione
- 2) Az. Agr. Combale Giuseppe
- 3) Az. Agr. Solavaggione Antonio
- 4) Az. Agr. Il Frutteto di Lungo Marco
- 5) Az. Agr. Pairoto Filippo

In ciascuna azienda si è monitorato: lo stato fitosanitario delle colture (peperone, pomodoro e patata) valutando nel tempo le parcelle di piante trattate (T) con i tradizionali prodotti fitoiatrici fungicidi e parcelle non trattate (NT); questi rilievi sono condotti per verificare in termini economici il costo e l'impatto di una conduzione colturale con o senza trattamenti fitosanitari a supporto dell'esigenza di coltivazione di materiali genetici resistenti/tolleranti a patogeni, in particolare a peronospora e oidio.

In ciascuna azienda (**Figure 8-12**), sono state messe a confronto delle parcelle di un certo numero di piante trattate tradizionalmente con fitofarmaci fungicidi nel corso della stagione, con parcelle non trattate, allo scopo di valutare i danni determinati dalle patologie in studio (peronospora, oidio), ma anche quelli indotti da altri patogeni fungini, contro i quali i medesimi trattamenti chimici hanno un effetto contenitivo. Non sussiste alcuna differenza tra le parcelle di ogni azienda, per quanto riguarda le pratiche agronomiche (sfemminellatura, potatura, diradamento, ecc...), le concimazioni ed i trattamenti insetticidi, che sono stati eseguiti allo stesso modo tra le tesi a seconda della strategia di difesa adottata da ogni azienda. Lo schema delle tesi eseguite nei 3 anni di attività è riportato in **Tabella 1**.

Tabella 1: schema delle prove in azienda

Azienda	Localita'	Coltura (VARIETA') - Tecnica Colturale	Anni Di Conduzione Delle Prove
Agrion	Boves, Mellana	Patata (PENELOPE) - Pieno Campo	2019, 2020
Il Frutteto Di Lungo Marco	Saluzzo, Reg. Torrazza	Patata (SILVANA) - Pieno Campo	2019, 2020, 2021
Il Frutteto Di Lungo Marco	Saluzzo, Reg. Torrazza	Pomodoro (CUOR Di Bue) - Tunnel	2020, 2021
Combale Giuseppe	Caraglio, Palazzasso	Pomodoro (CUOR Di Bue) - Tunnel	2019, 2020, 2021
Combale Giuseppe	Caraglio, Palazzasso	Peperone (CUNEO) - Pieno Campo Con Copertura Antigrandine	2019, 2020, 2021
Solavagione Antonio	Cavallermaggiore, Motta Gastaldi	Peperone (CUNEO) - Pieno Campo	2019
Az. Agr. Pairoto Filippo	Peveragno, Fraz. San Lorenzo	Peperone (CUNEO) - Tunnel	2020

Le parcelle su cui si sono svolti i rilievi, sono state identificate in ogni azienda come nello schema seguente (i risultati ottenuti dalle tesi sono stati poi tramutati all'ettaro):

- *Patata*. 100 mq di superficie per la tesi NT e 100 mq per la tesi trattata
- *Pomodoro*. 30 piante per la tesi NT e 30 piante per la tesi trattata (circa 15 mq di superficie ciascuna)
- *Peperone*. 60 piante per la tesi NT e 60 piante per la tesi trattata (circa 20 mq di superficie ciascuna)

IMMAGINI RAPPRESENTATIVE DELLE TESI AZIENDALI



Figura 8 - Tesi di pomodoro (Azienda Combale)



Figura 9 - Tesi di patata (Azienda Il Frutteto)



Figura 10 - Tesi di peperone (Azienda Solavaggione)



Figura 11 - Tesi di patata (Fondazione Agrion)



Figura 12 - Tesi di peperone (Azienda Pairoto)

Risultati ottenuti dalle prove in campo

Il trend dei risultati ottenuti negli anni tra le tesi NT e quelle aziendali trattate, mostrano un generalizzato calo produttivo per quanto riguarda patata e peperone (Colture di pieno campo o definito peperone semi-pieno campo per l'azienda Combale Giuseppe, **Tabella 1**) in concomitanza di annate particolarmente difficoltose sul fronte del meteo primaverile, mentre in generale non appaiono differenze significative in pomodoro sotto tunnel (**Table 2, 3, 4**). Di seguito sono commentati i risultati per coltura:

Patata

Sia presso Agrion che presso l'Azienda il Frutteto, le parcelle non trattate mostrano rispetto alle rispettive tesi trattate, un calo produttivo in certi casi abbastanza marcato. Il danno è ascrivibile principalmente a peronospora, i cui sintomi sono stati presenti a livelli medio alti nelle parcelle non trattate. Questa differenza produttiva si dimostra nel 2020 presso l'Azienda Il Frutteto elevatissima (addirittura 80% in meno sulla tesi NT rispetto a quella aziendale trattata); più contenuta è stata la riduzione presso Agrion sempre nel 2020: l'andamento stagionale ha senza dubbio giocato un ruolo fondamentale limitando le rese in concomitanza di periodi piovosi prolungati o vere e proprie bombe d'acqua nella fase primaverile. La semina tardiva avvenuta a fine mese di maggio presso Agrion, ha probabilmente fatto sì che i tuberi e successivamente le piante risentissero meno di queste condizioni climatiche avverse.

Peperone

Per quanto riguarda il peperone, si è osservato nel 2019 un deciso calo produttivo nelle tesi presso l'azienda Solavaggione in pieno campo (33%): ad un certo punto della stagione, nel momento in cui sono giunti umidità e temporali estivi, accompagnati anche dalla grandine, le parcelle non trattate hanno subito la quasi totale perdita del raccolto con morte di diverse piante (ascrivibile a batteriosi e *Phytophthora*). Nello stesso anno presso l'Azienda Combale, ove la coltura si trova sotto rete antigrandine, il calo produttivo delle parcelle non trattate rispetto a quelle trattate è risultato decisamente più contenuto. Su peperone in entrambe le aziende presso le quali si sono svolte le prove, non sono stati riscontrati danni da oidio.

Nelle prove realizzate gli anni successivi presso l'Azienda Combale Giuseppe, si apprezza sempre un calo produttivo intorno al 10% sulla tesi NT, a significare probabilmente una certa incidenza dei trattamenti fitoiatrici eseguiti sulla tesi aziendale trattata.

Nel 2020 sono state condotte presso l'Azienda Pairoto Filippo 2 tesi che mettevano a confronto linee pure di varietà Cuneo NT con varietà di ibridi NT. Le tesi aziendali sono state condotte in 2 tunnel separati e completamente chiusi sui 4 lati con rete

ant insetto a maglia molto fine; occorre specificare che l'azienda non fa uso di fungicidi per la difesa della coltura, per cui in questo unico caso la diversità tra le tesi a confronto era data unicamente dalla provenienza varietale diversa. Dai dati produttivi emersi si apprezza che le varietà di ibridi risultano più produttive delle linee pure definite dall'ecotipo "Cuneo".

Pomodoro

Per quanto riguarda le prove sul pomodoro, i dati raccolti hanno prodotto risultati poco significativi tra le tesi e negli anni di ripetizione in Azienda: presso l'azienda Combale Giuseppe nel 2019, i trattamenti contro peronospora ed altri patogeni fungini eseguiti sulla parcella aziendale trattata non si sono tradotti in aumento produttivo rispetto alla tesi NT. Si è osservata la presenza, seppur a livelli molto bassi in percentuale, di macchie di peronospora su foglia su entrambe le tesi. Nel 2020 e nell'anno 2021, anche presso l'Azienda il Frutteto, non si sono mai notate differenze significative in termini produttivi tra il NT ed il trattato. Probabilmente tutto ciò si traduce in una serie di annate non particolarmente predisponenti per le principali avversità fungine della coltura nell'ambiente del tunnel. Si segnala a metà settembre 2020 forte attacco di oidio presso l'Azienda Combale Giuseppe, che è stato contenuto sulla tesi aziendale trattata dall'effetto dei fungicidi, mentre su quella NT dall'asportazione manuale dei getti colpiti che ha portato ad una quasi totale defogliazione delle piante nei palchi centrali delle piante. Le raccolte sugli ultimi palchi della stagione, sono state in parte limitate e compromesse da questo attacco (diminuzione produttiva del 4% rispetto al trattato).

I fungicidi impiegati ed il numero dei trattamenti eseguiti nel corso della stagione vengono riassunti in **Tabella 2**.

Azienda	Coltura	Tesi Trattata Produzione (Kg/Ha)	Prezzo Medio Di Vendita All'ingrosso	Resa Economica (Euro Ettaro)	Tesi Non Trattata Produzione (Kg/Ha)	Calo Prodotto (%)	Perdita Economica Tesi Non Trattata (Euro Ettaro)	Anticrittogamici Eseguiti Tesi Trattata	Costo Trattamenti (Euro Ha)
Il Frutteto Di Lungo Marco	Patata (Silvana)	26000	0.4	10400	11000	58	6000	1 Metalaxil M+ Rame, 1 Rameico (20%), 1 Dimetomorf + Rame, 1 Fluazinam	Tot: 117,28
Agriion	Patata (Penelope)	24550	0.4	9820	17920	25	2652	3 Rameici (25%), 3 Ametocradina+ Dimetomorf, 1 Azoxistrobin	Tot: 339,90
Combale Giuseppe	Pomodoro (Cuor Di Bue)	192000	0.85	163200	200000	-	-	1 Rameico (20%), 1 Metalaxil M+ Rame	Tot: 57,00
Combale Giuseppe	Peperone (Cuneo)	26600	1	42560	25200	5	1400	2 Rameici (20%)	Tot: 39,60
Solavaggion e Antonio	Peperone (Cuneo)	16800	1.6	26880	11340	33	8736	3 Rameici (20%), 1 Mancozeb	Tot: 67,10

Tabella 2: prospetto dei valori produttivi nel 2019. Nella colonna “Costo trattamenti”, viene unicamente espresso il costo in euro all’ ettaro legato ai prodotti realmente impiegati (non viene tenuto conto del costo “umano” legato alla manodopera e alla tempistica che richiede il trattamento fitoiatrico in sé, né viene considerato il costo legato ai macchinari impiegati). Nella colonna “Resa economica” i valori esprimono il ricavo (produzione ottenuta moltiplicata per il prezzo di vendita). Nella colonna “Prezzo medio di vendita all’ingrosso” sono indicati i valori medi per annata.

AZIENDA	COLTURA	TESI TRATTATE A PRODUZIONE (KG/HA)	PREZZO MEDIO DI VENDITA ALL'INGROSSO	RESA ECONOMICA (EURO/ETTARO)	TESI NON TRATTATE A PRODUZIONE (KG/HA)	CALO PRODUTTIVO (%)	PERDITA ECONOMICA TESI NON TRATTATE (EURO/ETTARO)	ANTICRITTOGAMICI ESEGUITI TESI TRATTATE	COSTO TRATTAMENTI (euro HA)
IL FRUTTETO DI LUNGO MARCO	PATATA (SILVANA)	23000	0,4	9200	4600	80	7360	1 METALAXIL M+ RAME, 1 RAMEICO (20%), 2 DIMETOMORF + RAME, 2 FLUAZINAM	166,3
IL FRUTTETO DI LUNGO MARCO	POMODORO (CUOR DI BUE)	170800	0,9	153720	167384	2	3074	1 RAMEICO (20%), 1 PENCONAZOLO, 4 BICARBONATO DI POTASSIO, 2 ZOLFO, 2 TIOFANATE METIL	232,2
AGRION	PATATA (PENELOPE)	42300	0,4	16920	35700	16	2640	1 TEFLUTRIN, 4 RAMEICI, 1 ZOLFO, 1 CIMOXANIL, 2 AMETOCRADIN + DIMETOMORF	226,4
COMBALE GIUSEPPE	POMODORO (CUOR DI BUE)	206000	0,9	185400	198000	4	7200	3 METALAXIL R+ RAME, 1 DIMETOMORF + PYRACLOSTRIBIN, 1 ZOLFO	244
COMBALE GIUSEPPE	PEPERONE (CUNEO)	54600	0,95	51870	49000	10	5320	1 RAMEICO (20%)	17,6
AZ. AGR. PAIROTTO FILIPPO	PEPERONE	94281	0,95	89567	75600	20	17747	0	0

Tabella 3: prospetto dei valori produttivi nel 2020

AZIENDA	COLTURA	TESI TRATTATA PRODUZIONE (KG/HA)	PREZZO MEDIO DI VENDITA ALL'INGROSSO	RESA ECONOMICA (EURO/ETTARO)	TESI NON TRATTATE PRODUZIONE (KG/HA)	CALO PRODUTTIVO (%)	PERDITA ECONOMICA TESI NON TRATTATE (EURO/ETTARO)	ANTICRITTOGAMICI ESEGUITI TESI TRATTATE	COSTO TRATTAMENTI (euro HA)
IL FRUTTETO DI LUNGO MARCO	PATATA (SILVANA)	24300	0,4	9720	19440	20	1944	1 METALAXIL M + RAME, 1 FLUAZINAM, 1 RAMEICO (20%), 1 CIMOXANIL+ZOXAMIDE	131,7
IL FRUTTETO DI LUNGO MARCO	POMODORO (CUOR DI BUE)	207692	0,9	186923	206987	0,339	635	1 FOSETIL AL+ PROPAMOCARB, 1 BOSCALID + PYRACLOSTROBIN, 1 CIMOXANIL + ZOXAMIDE	254,75
COMBALE GIUSEPPE	POMODORO (CUOR DI BUE)	159905	0,9	143914	179893	-	-	2 METALAXIL M + RAME, 2 DIMETOMORF + PYRACLOSTROBIN	285
COMBALE GIUSEPPE	PEPERONE (CUNEO)	51800	0,95	49210	46200	11	5320	2 RAMEICI (20%)	35,2

Tabella 4: prospetto dei valori produttivi nel 2021

Conclusioni

Sintetizzando quanto rilevato per singola coltura, possiamo affermare che:

- le prove eseguite sulle colture in pieno campo (patata e peperone), mostrano che i trattamenti fungicidi sono fondamentali per salvare la produzione. Gli anticrittogamici comunemente eseguiti su certi target di patogeni, hanno un effetto anche su altri patogeni.
- dalle prove condotte sulle colture in tunnel (pomodoro e peperone) possiamo apprezzare che in generale l'effetto dei trattamenti è molto meno marcato e non ha determinato aumento significativo in ambito produttivo. E' possibile che annate climaticamente più complicate potrebbero determinare una comparsa decisamente più aggressiva dei vari patogeni, casistica che non si è materializzata nel triennio di prova.
- a livello di risultati, la prova del peperone sotto copertura antigrandine (definito di semipieno campo) si colloca a metà strada tra le colture di pieno campo e quelle in tunnel (differenza apprezzabile nelle produzioni tra le tesi trattate e non, in tutti gli anni di prova).

Dalle prove in campo è emerso che le principali avversità fungine delle Solanacee costituiscono un serio problema che è indispensabile gestire con i tradizionali metodi di lotta chimica. Dai raffronti rilevati tra le tesi di campo non trattate e quelle trattate, il costo di questi trattamenti è ampiamente giustificato dalla resa produttiva ottenibile. Sarebbe sicuramente interessante, in un'ottica di lotta integrata e di riduzione dell'inquinamento ambientale dato dall'impatto dei trattamenti fitosanitari sull'ambiente e sull'operatore, disporre di piante geneticamente resistenti o comunque tolleranti alle principali avversità.

Il progetto PROSPECT: prospettive e futuri campi di applicazione

Molte specie orticole e di piccoli frutti sono oggetto di problematiche fitosanitarie tali da rendere difficoltosa la coltivazione sia per numero e costo dei trattamenti necessari al contenimento delle patologie che per la costante riduzione delle sostanze attive. In alcuni casi i produttori vista l'elevata pressione dei patogeni, in particolare quelli tellurici e la diffusione di virosi e batteriosi, sono stati costretti a cambiare indirizzo produttivo o a sostituire gli ecotipi locali con le varietà ibride con la conseguente perdita delle tipicità piemontesi.

La possibilità di introdurre in coltivazione varietà ibride dotate di geni di resistenza è frutto dell'attività di miglioramento genetico operata dai diversi programmi di *breeding* che richiede però tempi lunghi e un notevole dispendio economico per individuare e inserire le resistenze nelle varietà. La mappatura del genoma delle diverse specie associata alla possibilità di poter intervenire solamente sui geni interessati permetterebbe di ridurre tempi e costi per ottenere delle varietà tolleranti.

Partendo da questo presupposto, obiettivo di PROSPECT è stata la messa a punto e l'applicazione delle nuove tecniche di *editing* genomico al fine di ottenere piante di peperone, pomodoro e patata non suscettibili a due delle principali problematiche fungine: peronospora e oidio. I risultati promettenti ottenuti nei test eseguiti in laboratorio (al momento la legislazione europea non permette la coltivazione in ambienti non confinati) potrebbero quindi aprire nuovi orizzonti sull'attività di miglioramento genetico con lo scopo di ridurre da un lato la suscettibilità a patogeni e stress abiotici e migliorare dall'altro le caratteristiche qualitative delle produzioni. Passando in rassegna le principali colture orticole piemontesi, le loro "storiche" criticità o le nuove emergenze si possono tracciare linee di intervento comuni come ad esempio la gestione di patogeni tellurici e malattie non controllabili con i trattamenti (virosi e batteriosi) o attività mirate a specifiche patologie come descritto nei successivi paragrafi.

Il virus dell'avvizzimento maculato del pomodoro (*TSWV*) è in grado di compromettere le coltivazioni di pomodoro e soprattutto peperone (Blancard 1998) (**Figura 13**) di cui ha limitato fortemente la coltivazione degli ecotipi "Cuneo" e "Carmagnola" quest'ultimo quasi scomparso dagli storici areali di coltivazione. Le varietà ibride dotate di resistenza hanno permesso, negli anni, di non dover abbandonare la coltivazione anche se sono in progressivo aumento le segnalazioni di superamento della resistenza da parte del virus anche nelle varietà dotate di resistenza.



Figura 13 - Apice e frutto di peperone colpiti da TSWV

Comuni a entrambe le specie e sempre più frequenti anche gli attacchi dei patogeni dell'apparato vascolare (*Fusarium* spp. e *Verticillium* spp., **Figura 14**) in piante a piede franco, ma anche innestate.



Figura 14 - Piante di pomodoro e peperone con collassi provocati da *Verticillium*

Un altro patogeno molto diffuso, particolarmente temuto e difficile da controllare è la *Phytophthora* che con le sue diverse specie può colpire e pregiudicare le produzioni di colture orticole (peperone e zucchini, **Figura 15**) e di piccoli frutti (lampone).



Figura 15 - Pianta di peperone con necrosi radicale (sx) e del colletto e pianta di zucchino collassata (dx)

Interessa invece solamente il pomodoro la problematica legata agli attacchi da parte del cancro batterico (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) e della necrosi del midollo (*Pseudomonas corrugata*).

La coltivazione della fragola è spesso oggetto di attacchi da parte di un complesso di patogeni della rizosfera (*Phytophthora fragariae*, *Verticillium* spp, *Rhizoctonia fragariae*) che portano al collasso le piante compromettendo anche totalmente gli impianti (**Figura 16**).



Figura 16 - Pianta con collasso provocato da *Verticillium*

Tra le leguminose i fagioli, sia nani che rampicanti, sono spesso oggetto di attacchi da parte di virosi in particolare *BCMV* (Virus del mosaico comune del fagiolo) e *CMV* (Virus del mosaico del cetriolo) e batteriosi (*Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*) con elevate perdite di produttività (**Figura 17**).



Figura 17 - Baccello con sintomo di *Pseudomonas* (sx), foglie colpite da *BCMV* (centro) e *CMV* (dx)

Per quanto riguarda la patata sarebbe interessante disporre di varietà non suscettibili alle scabbie in particolare a quella causata dal batterio *Streptomyces scabies* (**Figura 18**), ma un traguardo fondamentale sarebbe la possibilità di limitare la suscettibilità agli elateridi (**Figura 19**) che stanno diventando il fattore limitante per la pataticoltura fino a rendere antieconomica la coltivazione.



Figura 18 - Tuberi colpiti da Scabbia argentea *Helminthosporium*, Scabbia polverulenta *Spongospora* e Scabbia comune *Streptomyces*

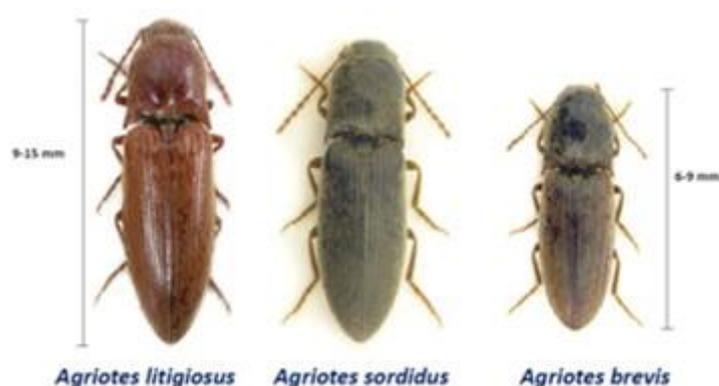


Figura 19 - Adulti delle principali specie di elateridi (M. Bariselli)

Alla luce dei cambiamenti climatici in atto che coinvolgono tutte le specie coltivate, alcuni obiettivi comuni potrebbero essere la riduzione alla sensibilità agli *stress* abiotici (e.g.: scottature, blotchy, colletto giallo, colatura fiorale, **Figura 20**) e l'ottenimento di varietà *low input*, dal punto di vista nutrizionale ed idrico, senza ripercussioni su potenzialità produttive e qualità delle produzioni.



Figura 20 - Bacche con difetti causati da spaccature iperidriche (sx), *blotchy* (centro) e colletto giallo (dx)

Bibliografia

- AA.VV. Il Pomodoro. Coltura & Cultura (2010): 565; <https://www.yumpu.com/it/document/read/9586283/il-pomodoro-coltura-cultura>
- AA.VV. La Patata. Coltura & Cultura (2011): 902; <https://www.yumpu.com/it/document/read/15136356/la-patata-coltura-cultura>
- AA.VV. Tecnologie di Evoluzione Assistita: la nuova via per la sostenibilità dell'agricoltura italiana (2021) *Informatore agrario*, 27, supplemento. http://www.informatoreagrario.it/wp-content/uploads/2021/09/21ia27_TEA.pdf
- AA.VV. Ortaggi, Fragola, Piccoli Frutti e Castagno: coltivazione sostenibile in Piemonte. *Agrion* (2022): 424; https://issuu.com/fondazioneagrion/docs/guida_orticola
- Bai Y, Pavan S, Zheng Z, Zappel NF, Reinstädler A, Lotti C et al. Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of MLO function. *Mol Plant Microbe Interact* 2008; 21: 30–39. [10.1094/MPMI-21-1-0030](https://doi.org/10.1094/MPMI-21-1-0030).
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712.
- Blancard D.. *Maladies de la Tomate: Observer, Identifier, Lutter*. Inra (1998): 212.
- Consonni C, Humphry ME, Hartmann HA, Livaja M, Durner J, Westphal L et al. Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat Genet* 2006; 38: 716–720. [10.1038/ng1806](https://doi.org/10.1038/ng1806). Fry W. *Phytophthora infestans: the plant (and R gene) destroyer* [published correction appears in *Mol Plant Pathol*. 2008 Sep;9(5):727]. *Mol Plant Pathol*. 2008;9(3):385-402. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x
- EFSA panel (2020) Applicability of the EFSA Opinion on site-directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site-directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide-directed mutagenesis. *EFSA Journal*, vol 18, issue 11; e06299, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6299>
- Li, H., Yang, Y., Hong, W. et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Sig Transduct Target Ther* 5, 1 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>
- Jørgensen JH. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 1992; 63: 141–152. [10.1007/BF00023919](https://doi.org/10.1007/BF00023919).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821
- Kim DS, Hwang BK. The pepper MLO gene, CaMLO2, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation. *Plant J*. 2012 Dec;72(5):843-55. doi: 10.1111/tpj.12003. Epub 2012 Oct 12. PMID: 22913752.
- Koschmieder J, Fehling-Kaschek M, Schaub P, Ghisla S, Brausemann A, Timmer J & Beyer P. (2017) Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications. *PLoS ONE* 12(11), Doi:10.1371/journal.pone.0187628
- Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, Starker CG, Clark MD, Voytas DF. Plant gene editing through de novo induction of meristems. *Nat Biotechnol*. 2020;38(1):84-89. doi:10.1038/s41587-019-0337-2
- Martínez-López M, García-Pérez A, Gimeno-Pérez E, Prohens J, Vilanova S, García-Forteza E. Screening of Suitable Plant Regeneration Protocols for Several Capsicum spp. through Direct Organogenesis. *Horticulturae*. 2021; 7(9):261. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7090261>
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseor, C.S., García-Martínez, J.S., and Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* 60, 174–182.

- Pollini A. La difesa delle piante da orto. *Edagricole* (2008): 486.
- Santillán Martínez MI, Bracuto V, Koseoglu E, Appiano M, Jacobsen E, Visser RGF, Wolters AA, Bai Y. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. *BMC Plant Biol.* 2020 Jun 19;20(1):284. doi: 10.1186/s12870-020-02497-y. PMID: 32560695; PMCID: PMC7304142.
- Sun, K., van Tuinen, A., van Kan, J., Wolters, A. A., Jacobsen, E., Visser, R., & Bai, Y. (2017). Silencing of DND1 in potato and tomato impedes conidial germination, attachment and hyphal growth of *Botrytis cinerea*. *BMC plant biology*, 17(1), 235. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1184-2>
- Sun, K., Wolters, A. M., Vossen, J. H., Rouwet, M. E., Loonen, A. E., Jacobsen, E., Visser, R. G., & Bai, Y. (2016). Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic research*, 25(5), 731–742. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9964-2>
- Thomazella DPT, Seong K, Mackelprang R, Dahlbeck D, Geng Y, Gill US, Qi T, Pham J, Giuseppe P, Lee CY, Ortega A, Cho MJ, Hutton SF, Staskawicz B. Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jul 6;118(27):e2026152118. doi: 10.1073/pnas.2026152118. PMID: 34215692; PMCID: PMC8271637.
- Van Damme M, Huibers RP, Elberse J, Van den Ackerveken G. Arabidopsis DMR6 encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew. *Plant J.* 2008 Jun;54(5):785-93. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03427.x. Epub 2008 Jan 31. PMID: 18248595.
- Van Schie CC, Takken FL. Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu Rev Phytopathol.* 2014;52:551-81. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045854. Epub 2014 Jun 23. PMID: 25001453.
- Vogel J, Somerville S. Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Feb 15;97(4):1897-902. doi: 10.1073/pnas.030531997. PMID: 10677553; PMCID: PMC26533.
- Wan, DY., Guo, Y., Cheng, Y. et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3 results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Hortic Res* 7, 116 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8>
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., & Qiu, J. L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32(9), 947–951. doi: 10.1038/nbt.2969. Zhu, H., Li, C. & Gao, C. Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 661–677 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9>
- Woo, J. W., Kim, J., Kwon, S. I., Corvalan, C., Cho, S. W., Kim, H., et al. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33, 1162–1164. doi: 10.1038/nbt.3389



Università degli Studi di Torino
DISAFA - Genetica agraria -
Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari
Largo Braccini 2 - 10095 Grugliasco (TO)
www.disafa.unito.it



Confagricoltura Cuneo
Via Bruno Caccia 4-6-8 - 12100 Cuneo (CN)
www.confagricolturacuneo.it



**Fondazione per la ricerca, l'innovazione
e lo sviluppo tecnologico dell'agricoltura piemontese**
Centro Sperimentale di Orticoltura, fragola e piccoli frutti
Via Albertasse n. 16 - 12012 Boves (CN)
www.fondazionecrc.it

Con il contributo di:



Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo
Via Roma 17 - 12100 Cuneo (CN)
www.fondazionecrc.it