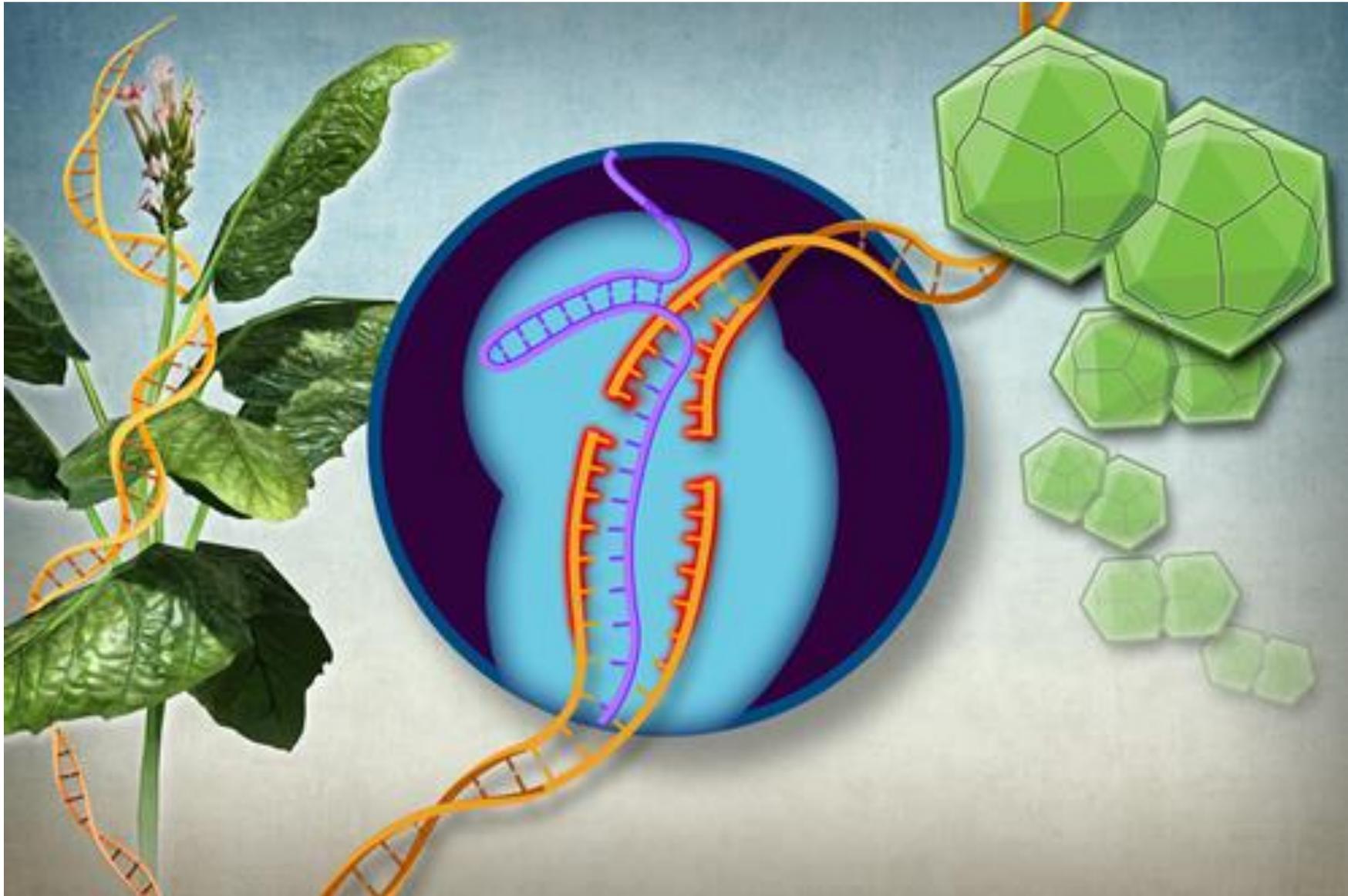


Plant Genome Editing



Plant Genome Editing

Cos'è il Genome Editing?

L'Editing genomico è un processo di ingegneria genetica che permette la modificazione del DNA di una cellula con un approccio molto più preciso rispetto ai processi di trasformazione genetica passati. Nello specifico le prime tecniche di trasformazione genetica inserivano frammenti di DNA /geni nel genoma ospite in modo casuale. L'editing genomico agisce, invece, in siti specifici.

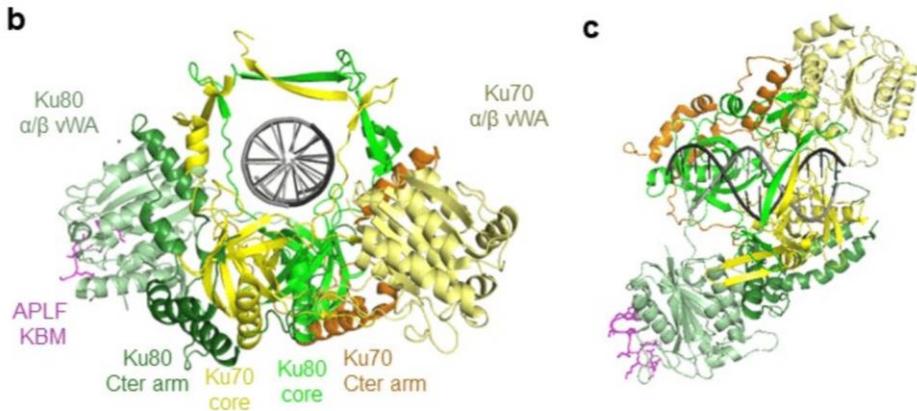
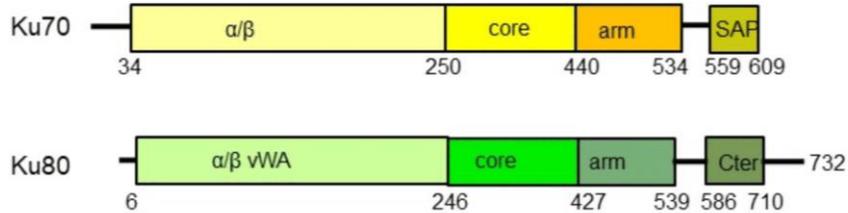
L'evoluzione dell'ingegneria genetica verso il «genome editing» è stata ottenuta con la scoperta di **endonucleasi** specifiche capaci di rompere il doppio filamento del DNA (Double Strand Break – DSB) in punti precisi e grazie allo sfruttamento dei **meccanismi di riparazione** del doppio filamento già presenti nelle cellule.



Endonucleasi= forbici molecolari specifiche

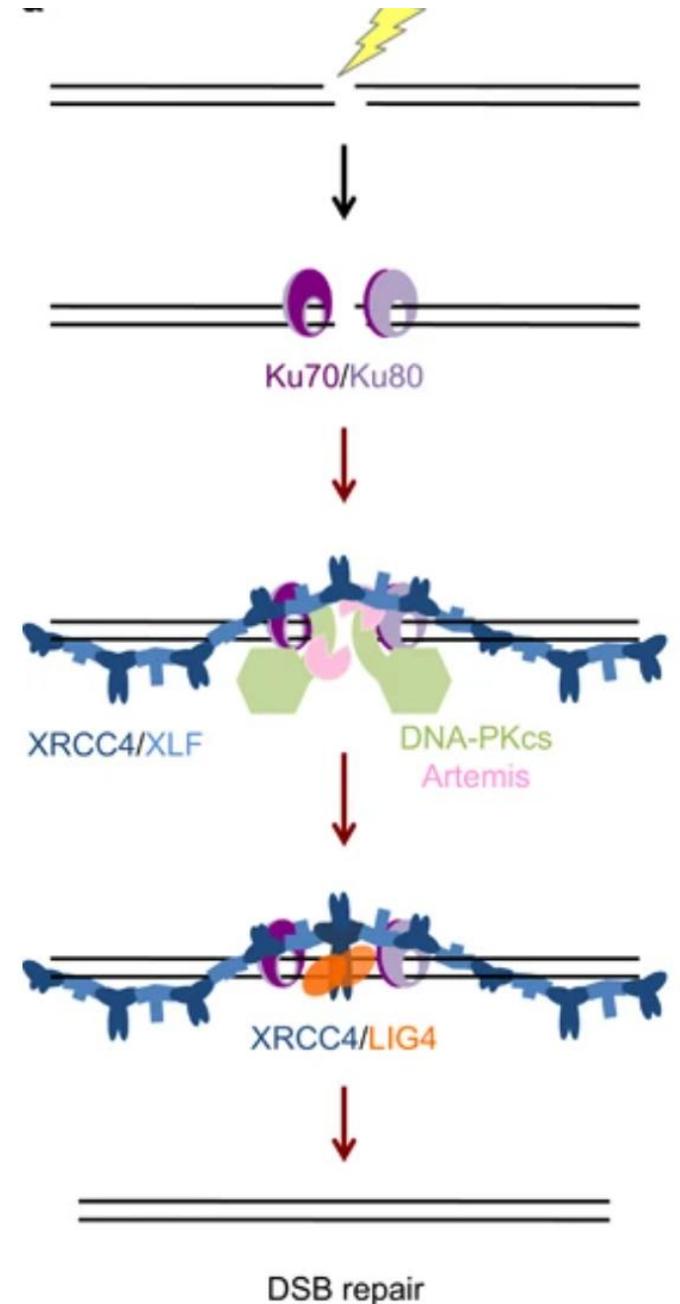
La riparazione 'non omologa' del filamento

Quando un doppio filamento viene tagliato si possono attivare enzimi capaci di congiungere i frammenti rotti (giunzione diretta o Non-Homologous End Joining o NHEJ).



La NHEJ spesso avviene grazie ad un complesso proteico eterodimerico composto da proteine Ku70 e Ku80 (abbastanza conservate) che avvicinano le estremità che vengono unite grazie a delle ligasi.

Può accadere che vi siano errori minimi che portano a brevi inserzioni e delezioni (mutazioni puntiformi) ma in generale è un processo abbastanza efficiente.

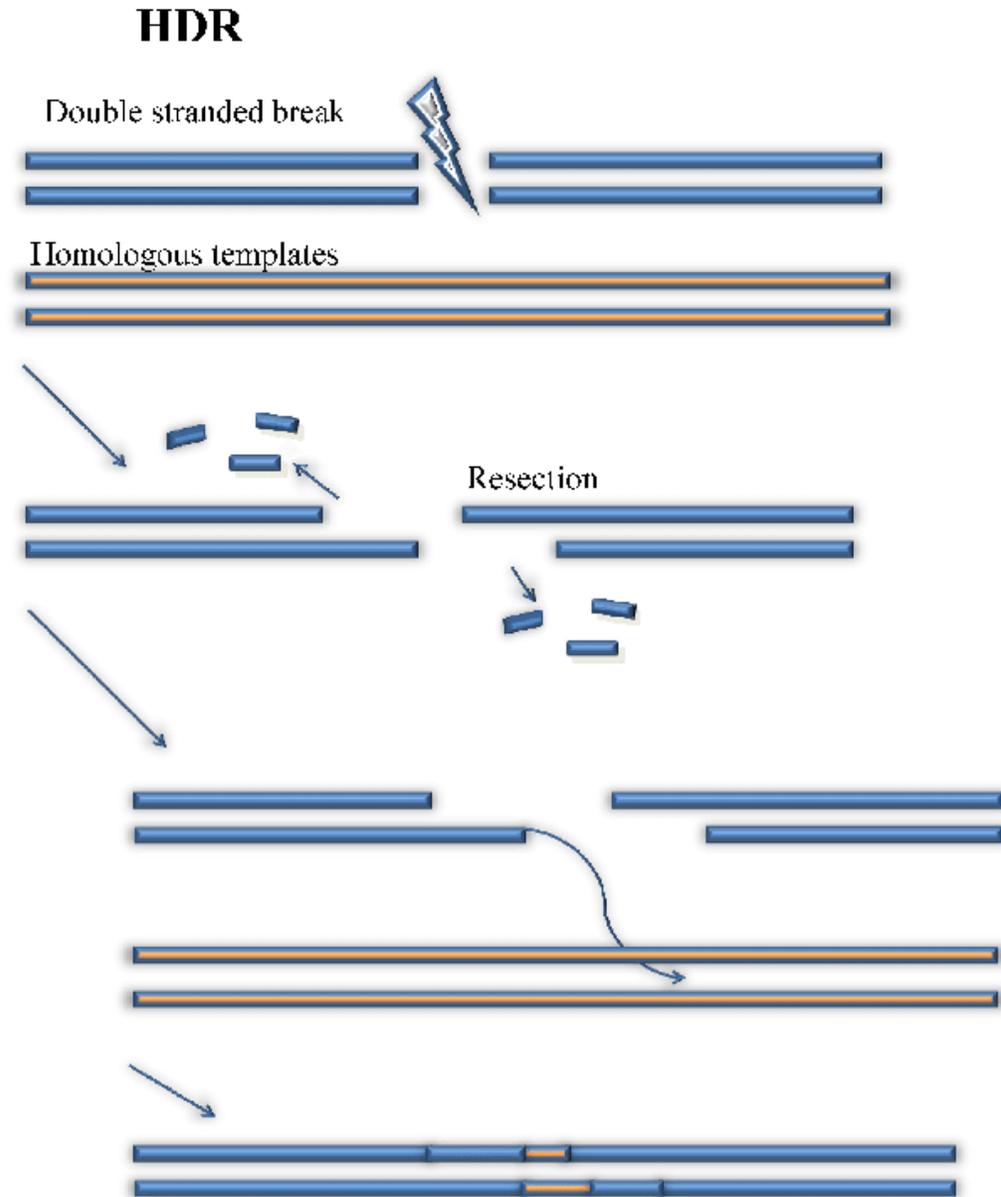
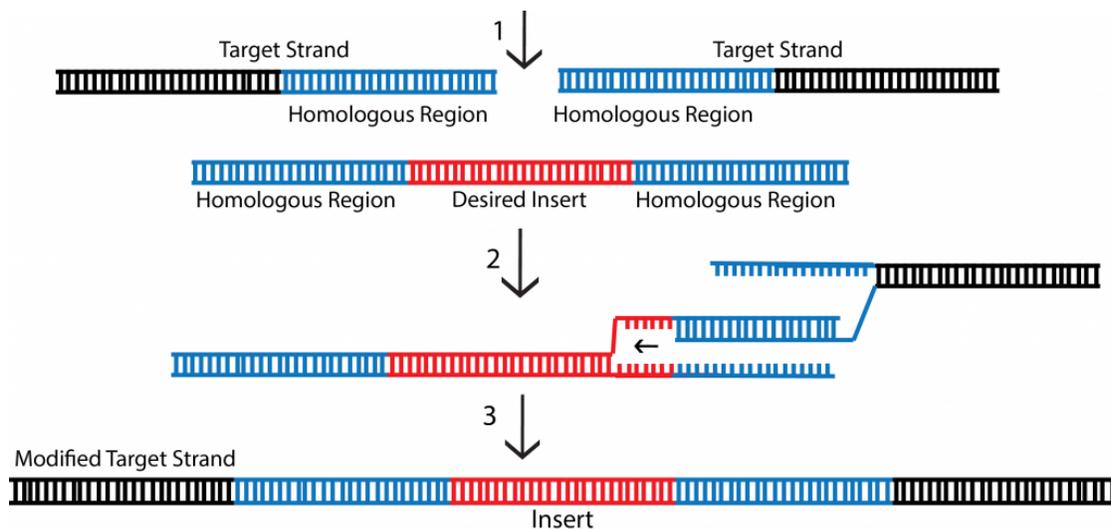


La riparazione omologa

La riparazione omologa (Homologous Direct Repair - HDR) richiede che vi sia presente una coppia di DNA da copiare e spesso questa azione viene svolta dal 'cromosoma omologo'.

Qualora al posto del cromosoma omologo si inserisse del DNA esogeno con sequenze fiancheggianti conservate è possibile che il meccanismo di HDR sfrutti questo come stampo.

Il risultato è l'inserimento di una sequenza nuova nel mio DNA.

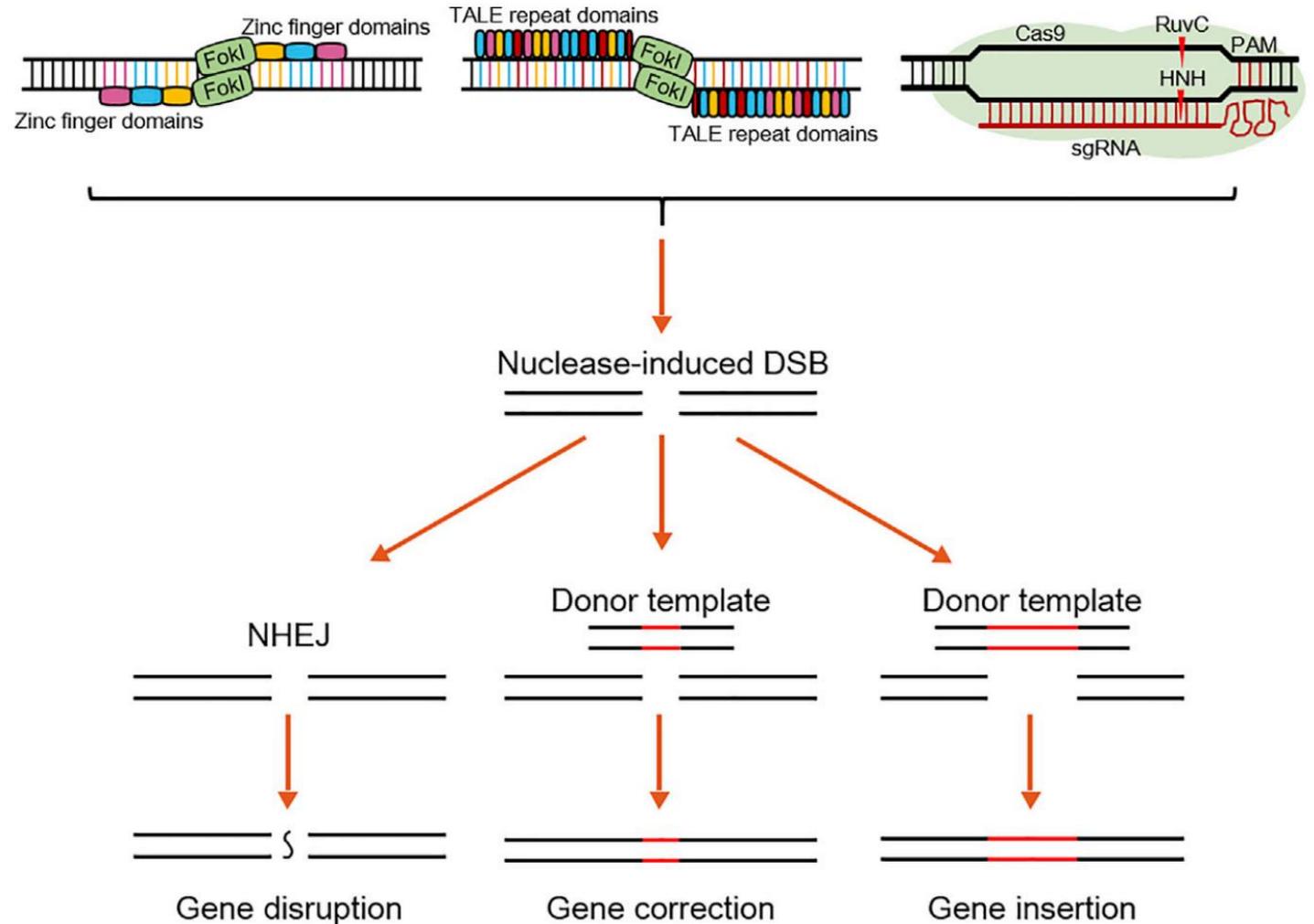


Perché questa tecnica è rivoluzionaria?

Sfruttando enzimi capaci di tagliare come monomeri o dimeri il DNA e le proteine ad essi associate, che sono in grado di riconoscere siti specifici, è possibile modificare 'precisamente' il DNA.

Nello specifico il processo di Genome Editing può eliminare un gene (utile per esempio in terapia genica per silenziare in modo definitivo un gene) oppure correggere un gene (terapia genica per chi ha geni non 'funzionanti')

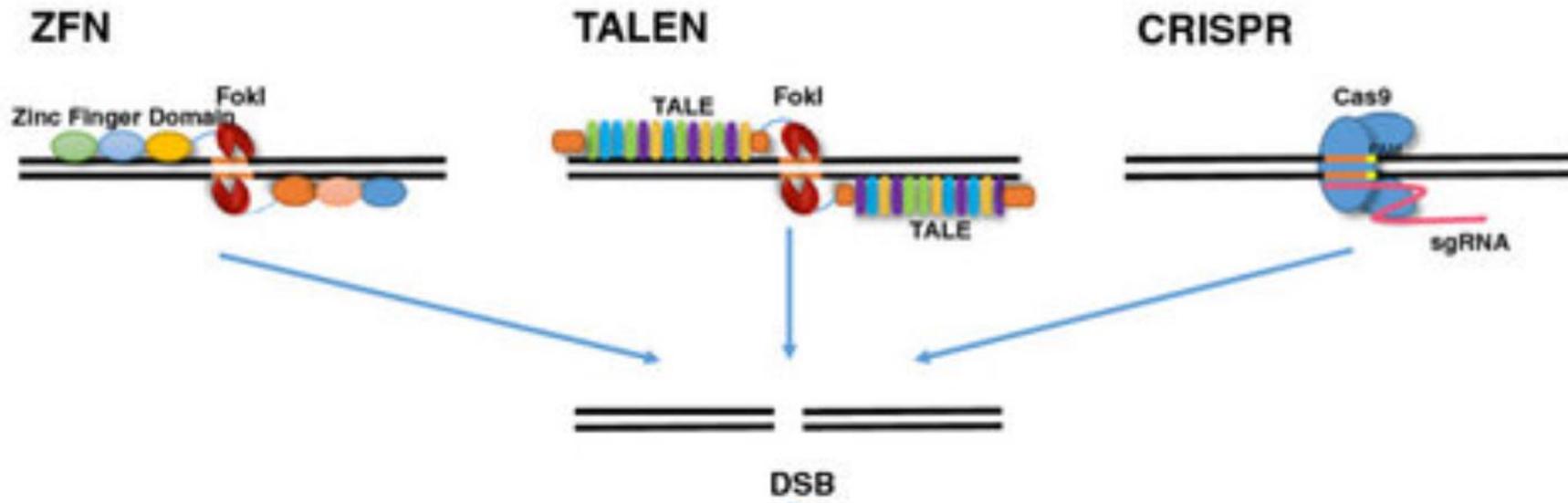
Infine, è possibile inserire un gene ma rispetto all' approccio tradizionale è possibile farlo in un sito ben definito del genoma, magari a valle di un promotore di interesse o vicino ad un gene che deve essere co-espresso.



Gli ingredienti per un processo che sfrutta ricombinazione omologa

Vi sono almeno 3 tipi di esonucleasi utilizzate per tagliare il doppio filamento del DNA in siti specifici:

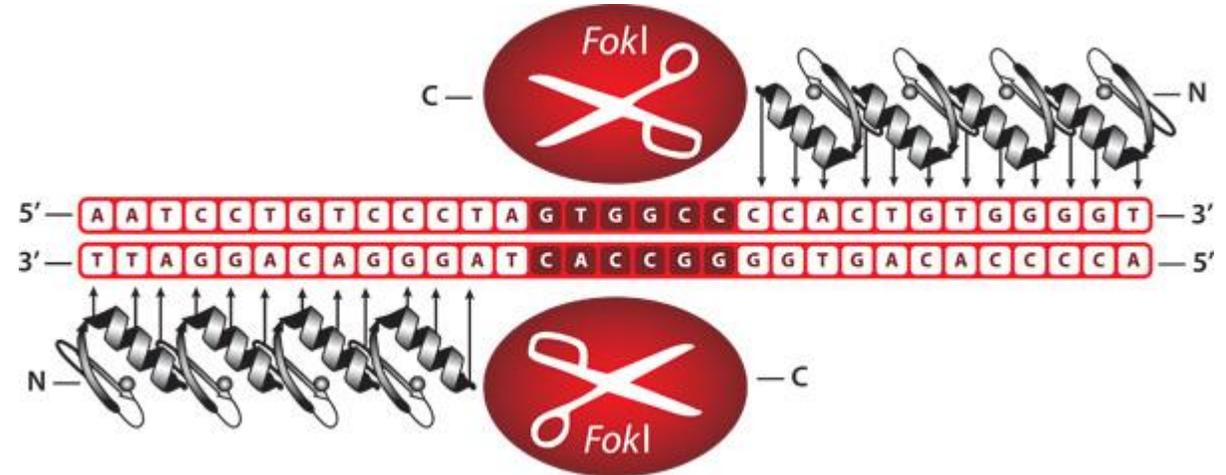
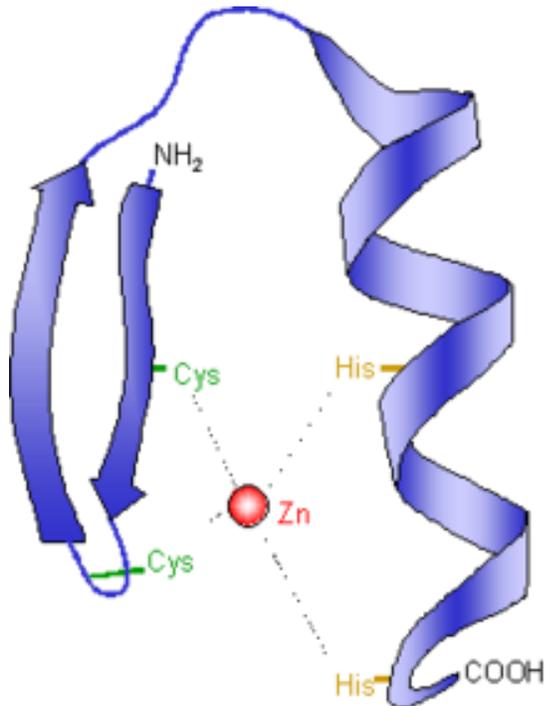
- Zinc Finger Nuclease (ZFN)
- Nuclease TALEN
- CRISPR/Cas9



Zinc Finger Nuclease (ZFN)

Zinc Finger Nuclease (ZFN): si tratta di una proteasi che nasce come proteina di fusione composta appunto da una regione che ha la struttura di 'dito di zinco' (ZFN) e dall'enzima di scissione del DNA chiamato FokI.

Il Dito di Zinco è composto da circa 30 aa con struttura a beta foglietto e alfa elica. L'aspetto caratteristico di 'dito' è tuttavia dato dall'atomo di Zn che si lega a residui di cisteina e istidina.



La parte del dito di zinco è quella che riconosce specifiche sequenze di DNA, mentre la porzione FokI procede al taglio. Grazie all'ingegneria genetica sono state modificate diverse zone ZFN per riconoscere siti specifici del genoma e tagliarli.

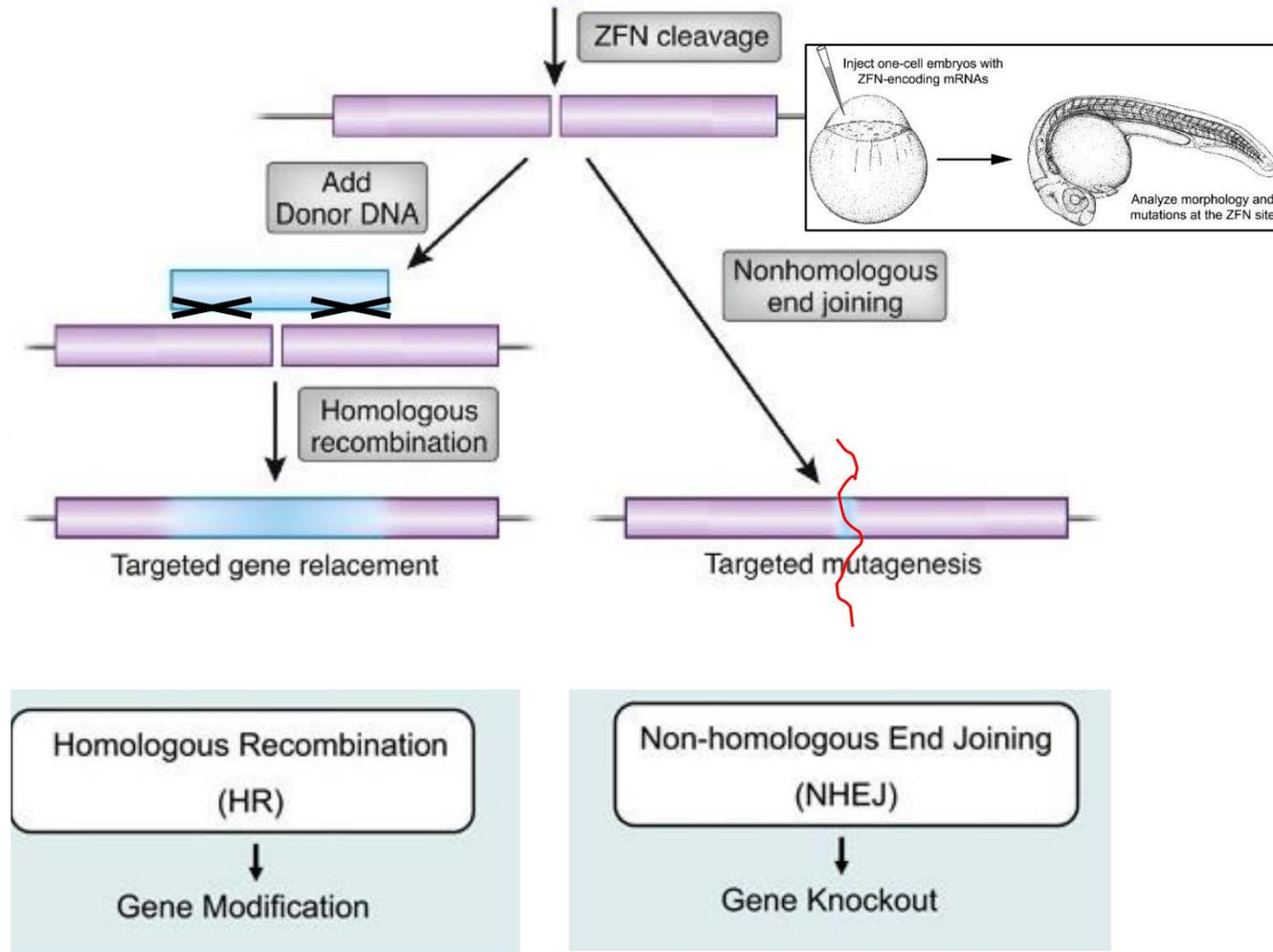
IMP: la proteina agisce come dimero quindi è fondamentale che si crei una struttura in cui le due regioni FokI siano adiacenti. Questa si ha solo quando le due regioni ZFN riconoscono siti specifici vicini.

Non basta tagliare!

Come abbiamo detto le nucleasi rompono il doppio filamento ma poi serve un sistema di *Homologous Direct Repair* – HDR.

Per questa ragione, oltre a inserire nella cellula ospite enzimi ZFN, si deve introdurre anche un frammento di DNA ricombinante da copiare, che abbia alle estremità brevi sequenze omologhe a quelle fiancheggianti il sito di taglio nel DNA bersaglio.

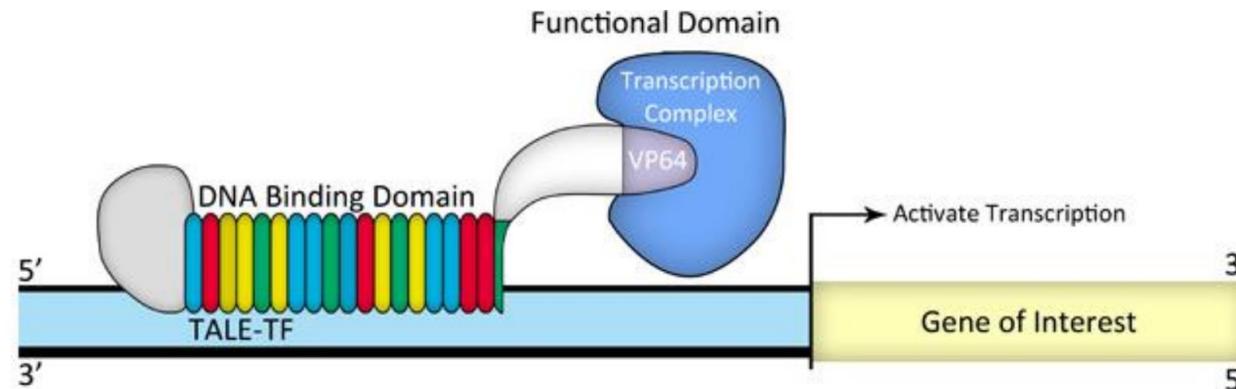
Tra queste regioni omologhe si può poi inserire il **DNA target** che si desidera introdurre nella cellula. Attraverso questa azione il DNA esogeno usato come stampo con la sequenza 'DNA target' sarà inserito nel punto in cui hanno agito le endonucleasi grazie al fenomeno della ricombinazione omologa.



Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)

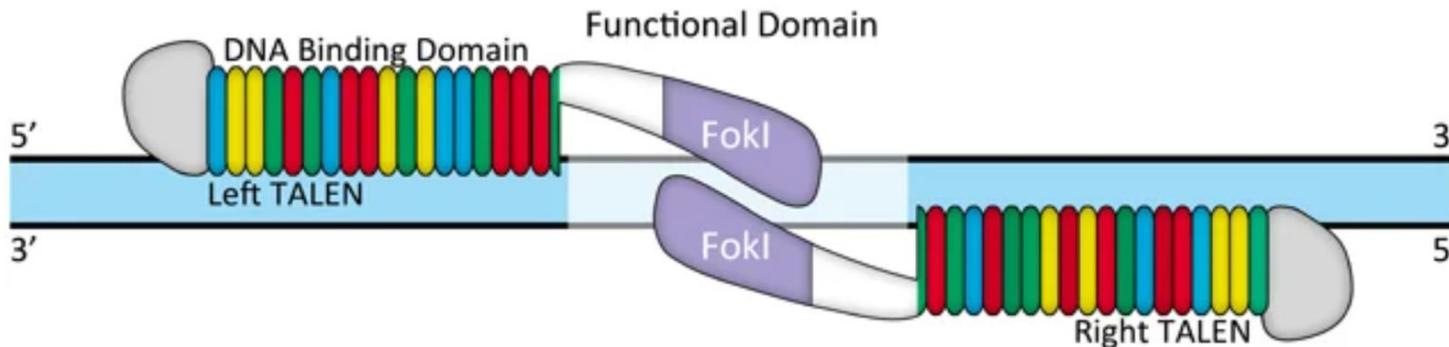
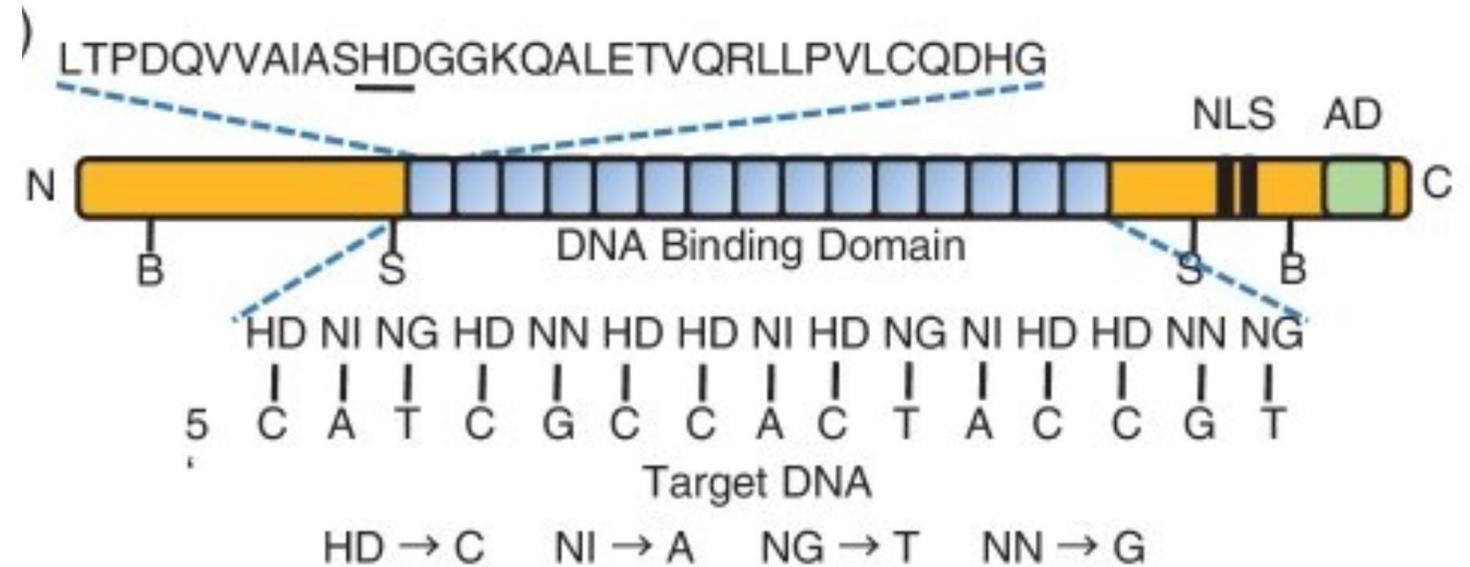
Le nucleasi TALEN sono enzimi sintetici che sfruttano sempre la porzione FokI. Rispetto a ZFN riconoscono porzioni diverse di DNA della cellula vegetale grazie a domini noti come TALE o Transcription Activator-Like Effector.

Questi sono fattori trascrizionali che vengono secreti dai batteri *Xanthomonas*. Questo batterio è in grado di iniettarli nelle cellule delle piante, dove arrivano nel nucleo e riconoscono sequenze di DNA note come EBE (Effector Binding Elements). Il legame provoca la trascrizione di geni specifici, che rendono la pianta più suscettibile all'infezione.



Il dominio legante il DNA è formato da una sequenza altamente conservata di 33-34 aminoacidi ripetuti col 12° e 13° aminoacido divergenti. Queste due posizioni, indicate come Repeat Variable Diresidue (RVD), sono molto variabili e fortemente correlate al riconoscimento specifico dei nucleotidi sul DNA bersaglio.

Analizzando le nucleasi TALEN presenti in natura è stato possibile osservare che le coppie di aminoacidi Asn-Ile, His-Asp, Asn-Asn e Asn-Gli riconoscono rispettivamente A, C, G e T. Combinando questi aa è possibile creare delle TALEN di sintesi specifiche per determinati siti target che si vogliono colpire.

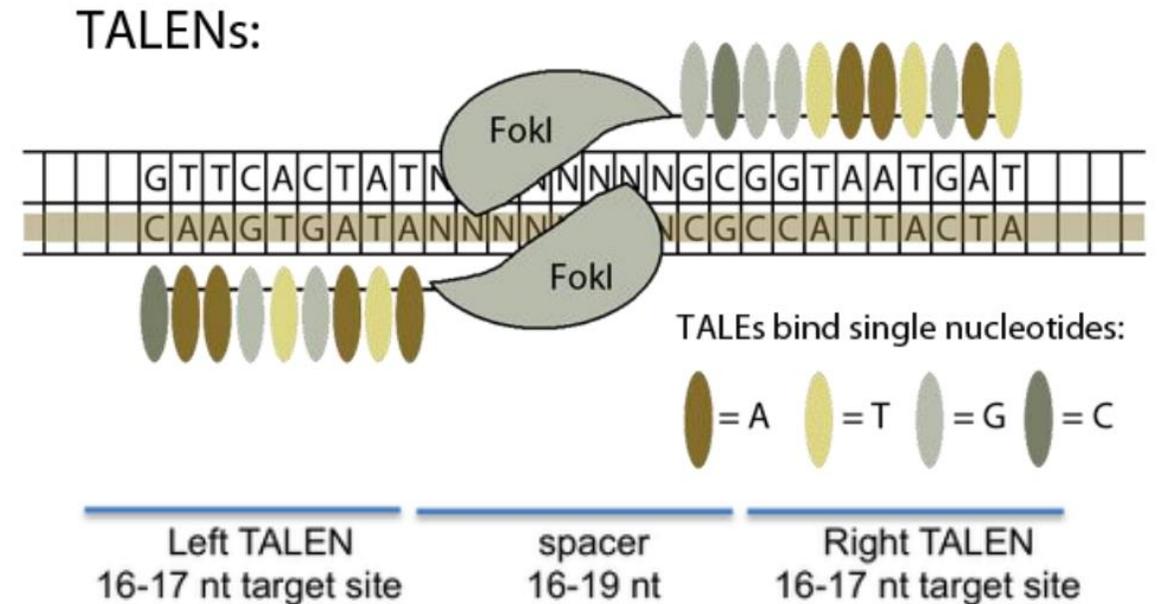
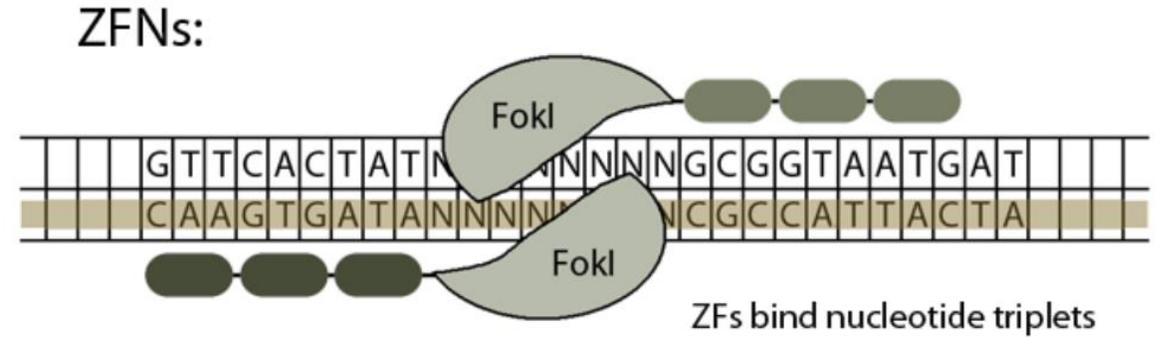


Come per ZFN anche TALEN agiscono come dimeri quindi è necessario che la proteina del filamento opposto riconosca un sito analogo affinché le due nucleasi FokI si trovino vicine.

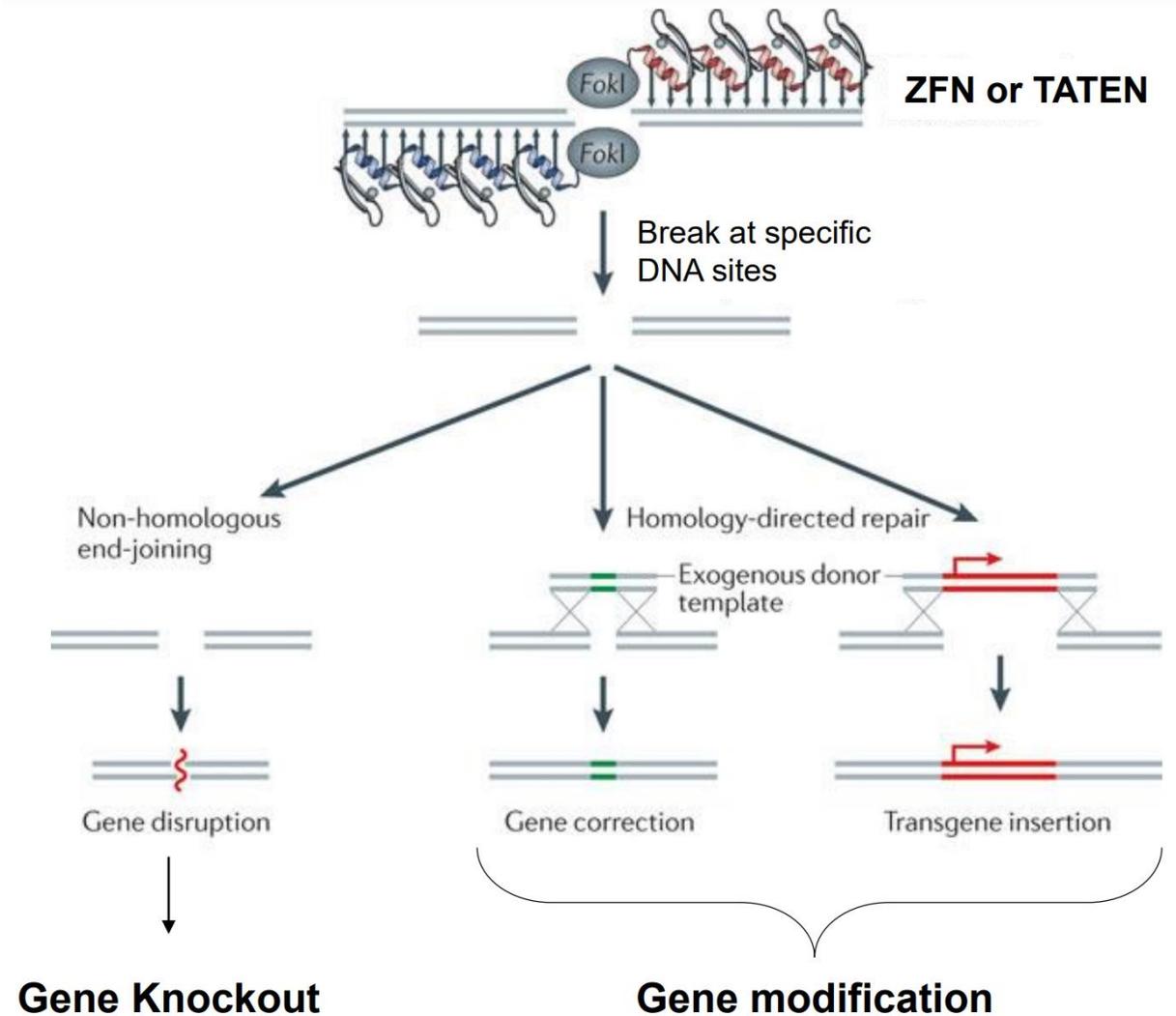
Dal punto di vista tecnico le nucleasi TALEN sono più facili da costruire rispetto alle ZFN in quanto ogni nucleotide è riconosciuto da un singolo modulo di legame al DNA composto dai 2 aa.

Inizialmente i primi ibridi TALEN usavano il dominio nucleasico di FokI wild-type, ma successivamente sono state usate varianti del dominio nucleasico di FokI progettando mutazioni per migliorarne la specificità e l'attività.

Nella progettazione di Editing genomico con TALEN, il numero di amminoacidi tra il dominio di TALEN legante il DNA, il dominio nucleasico di FokI ed il numero di basi sul DNA dei rispettivi siti di legame e taglio, sono parametri importanti da considerare per ottenere elevati livelli di attività.



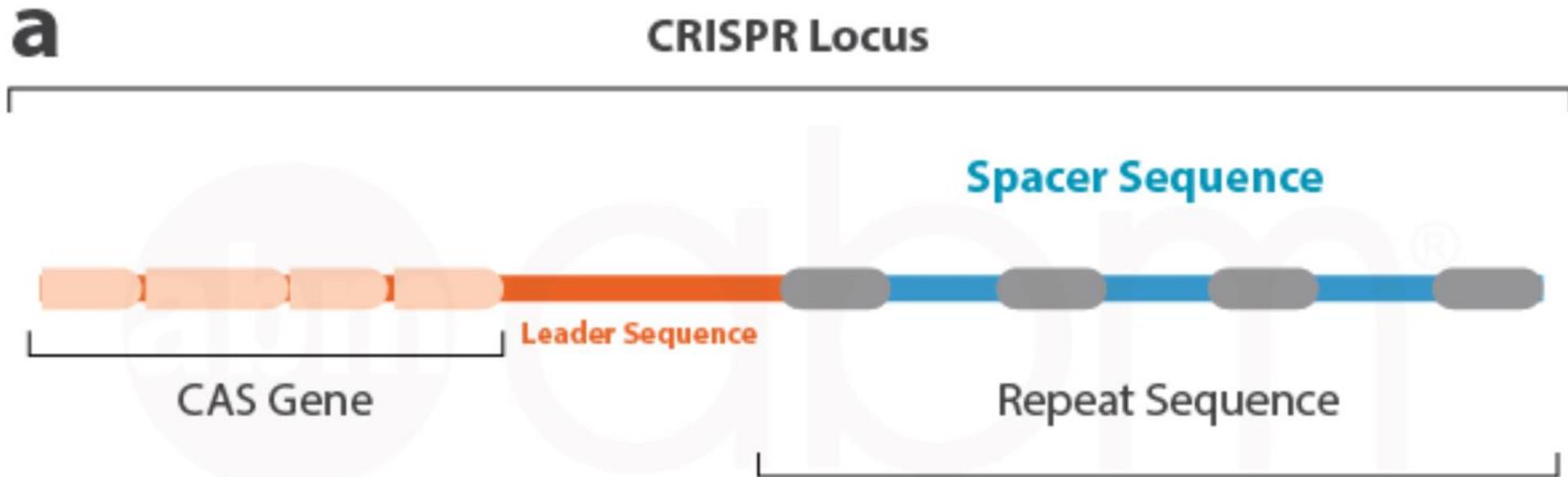
Ciò che accomuna ZFN e TALEN è sicuramente la struttura ibrida (e quindi modificabile) della nucleasi che usando FokI (o sue varianti di sintesi) taglia il DNA e sfruttando la porzione di riconoscimento può direzionare il taglio in aree specifiche del DNA.



CRISPR/Cas9

Nel 2012 è stato messo a punto il sistema noto come CRISPR/Cas9 che si ispira ad un sistema di difesa dei procari rivolto verso porzioni di DNA esogeno (virus, plasmidi esterni ecc).

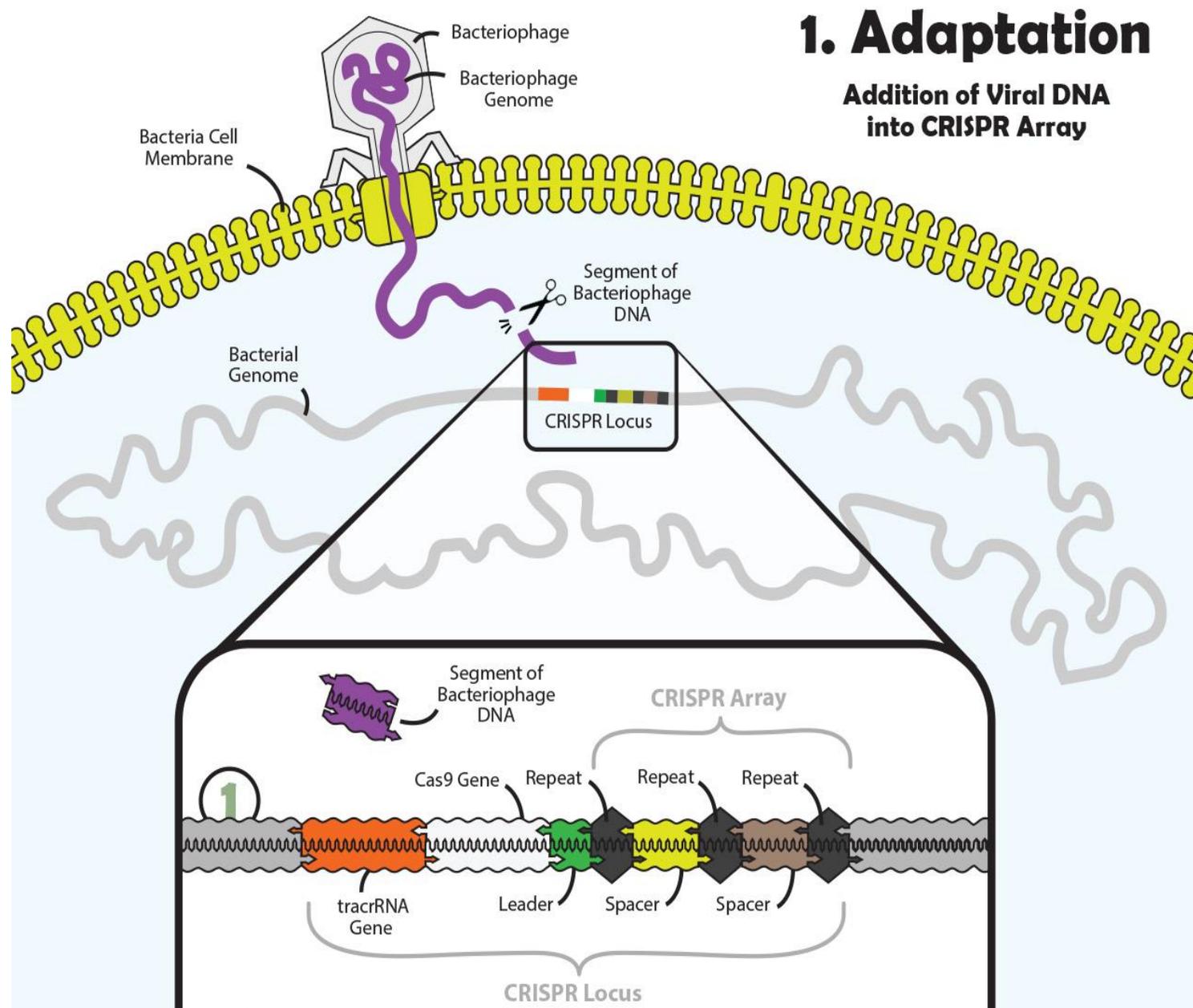
Punto centrale del sistema è stata la scoperta nel DNA batterico del locus CRISPR (Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats) e di nucleasi associate a questo locus note come Cas (CRISPR-Associated). Il sistema si chiama Cas9 perchè tra le diverse caspase batteriche, solitamente si usa la numero 9.



CRISPR sono segmenti di DNA contenenti brevi sequenze ripetute di 25-75 bp. Ogni ripetizione è seguita da brevi frammenti di DNA «distanziatore», generato da una passata esposizione del batterio a virus, batteriofagi o plasmidi.



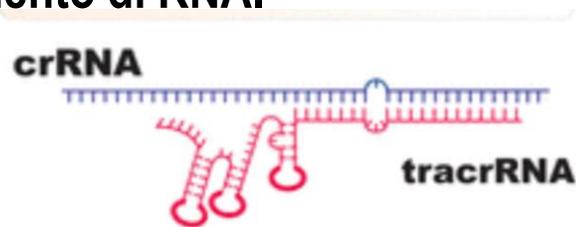
Questi frammenti di DNA esogeno rappresentano per il batterio un meccanismo analogo alla memoria del sistema immunitario! Nel caso in cui il batterio fosse esposto alla stessa infezione saprebbe come difendersi!



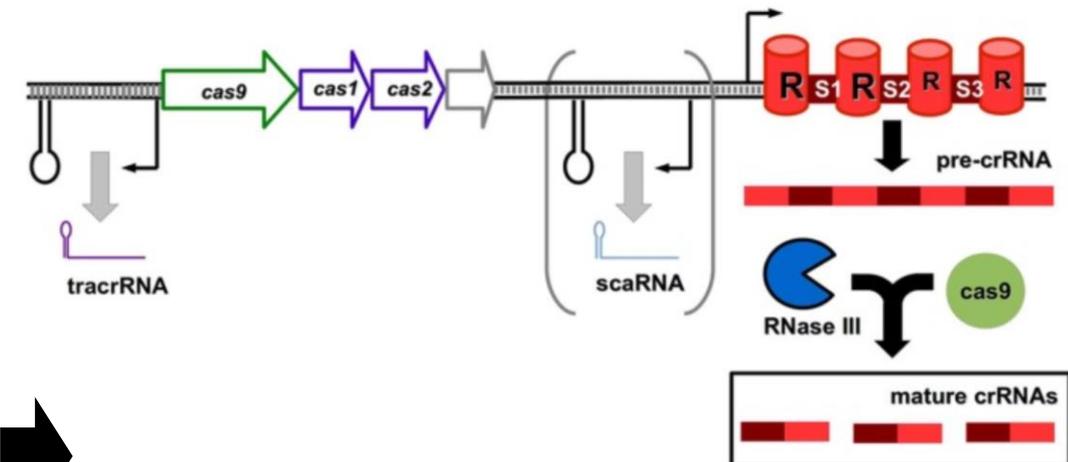
La scoperta che i batteri usassero queste sequenze come 'Memoria del Sistema Immunitario' la si deve a Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier che hanno scoperto che il batterio reagisce alle successive infezioni virali trascrivendo questi spacer e i repeat di DNA adiacenti in una unica lunga molecola di RNA nota come **preCRISPR RNA** o semplicemente **cr-RNA**.

Una seconda molecola di RNA, nota come Trans Activating CRISPR RNA (**TracrRNA**) viene generata sempre dallo stesso cluster genico.

IMP: il TracrRNA contiene le sequenze omologhe alle sequenze ripetute che separano i protospacer nel locus CRISPR ed è quindi in grado di appaiarsi con il pro-CRISPR RNA generando un doppio filamento di RNA.



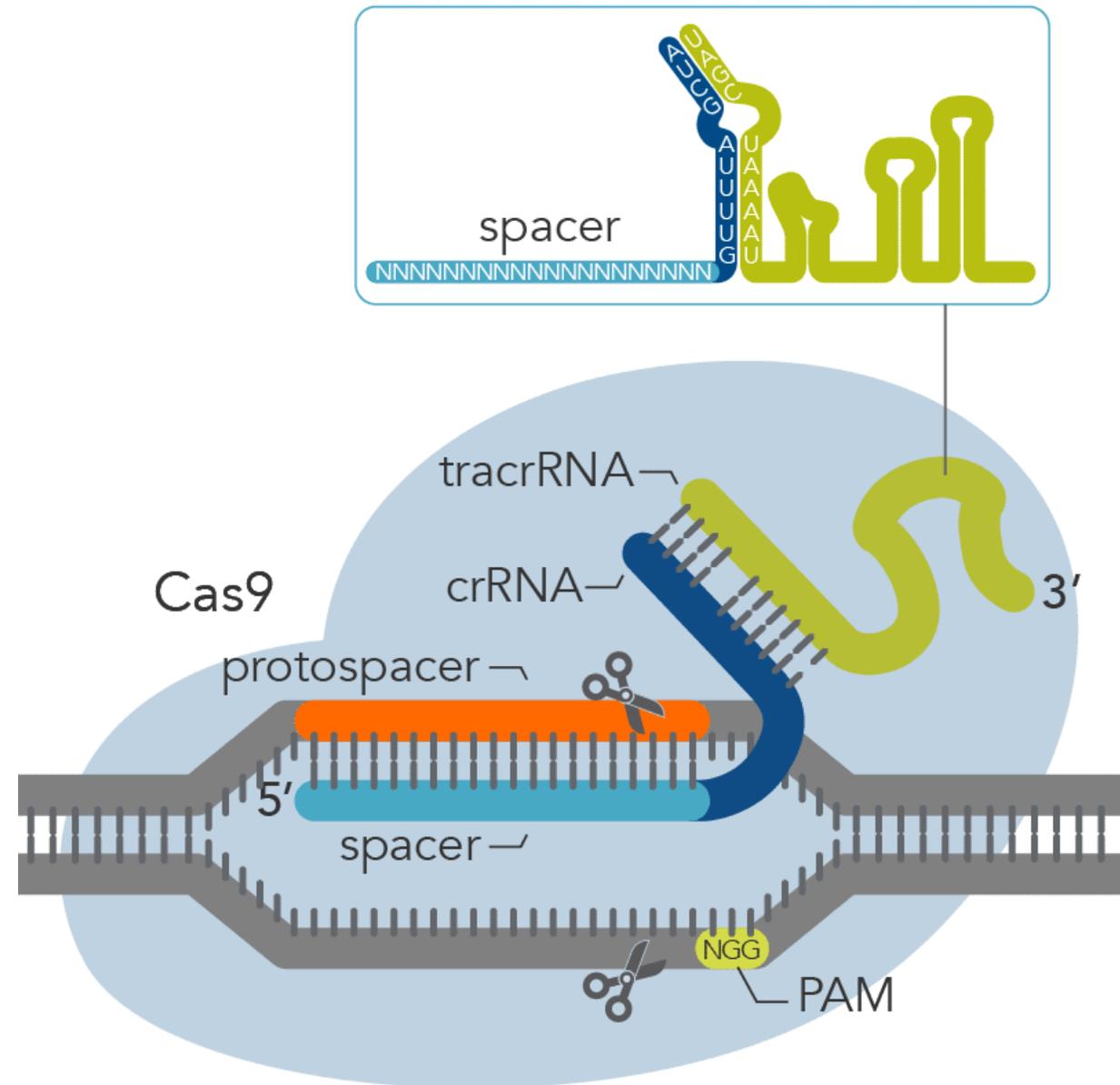
L'enzima RNasi III determina la formazione di complessi (crRNA-tracrRNA) ognuna delle quali contiene un singolo protospacer.



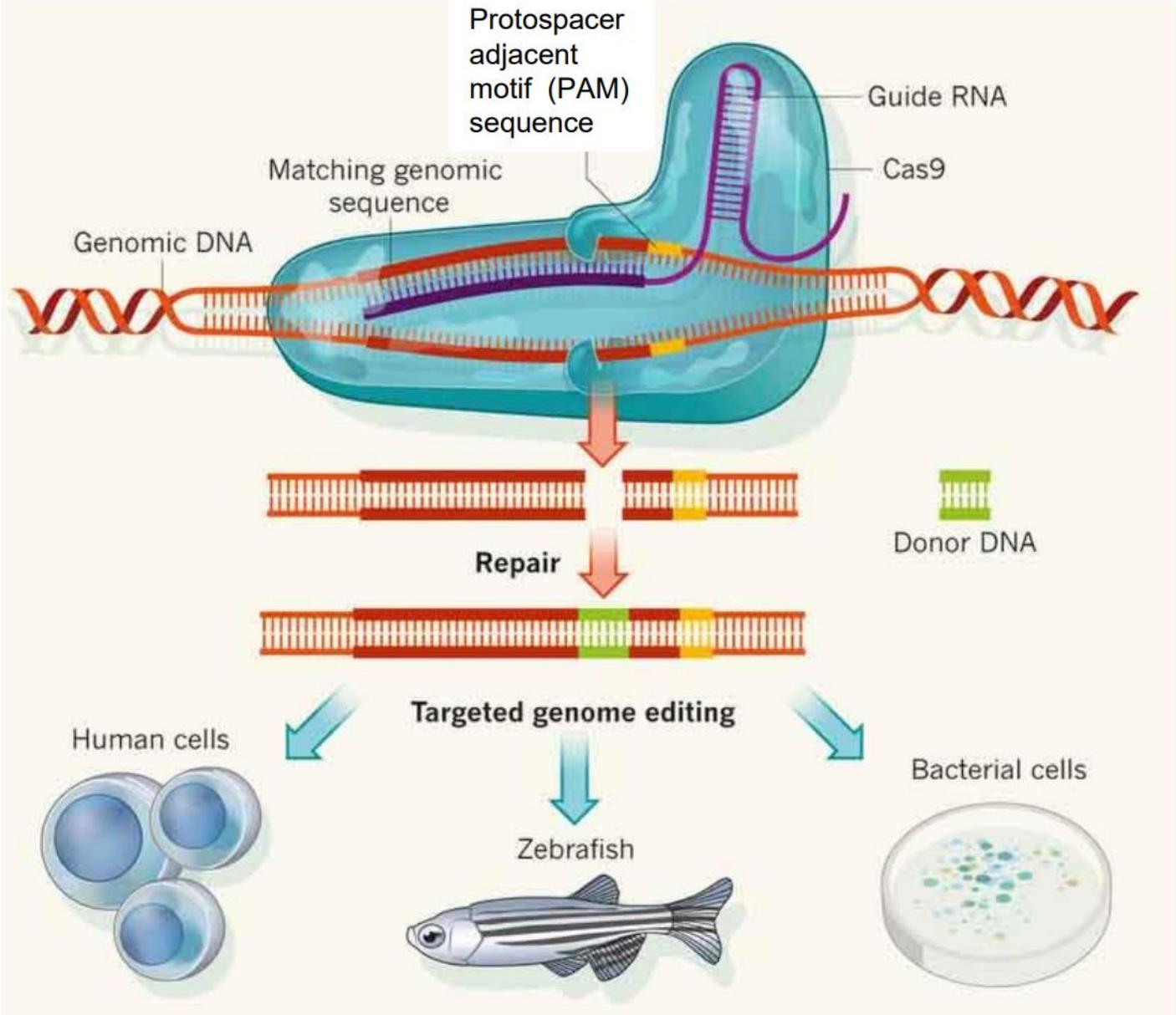
crRNA – tracrRNA guidano Cas9

La coppia di crRNA-TracrRNA direziona la endonucleasi cas9 sul DNA esogeno (virus, plasmidi, ambientale) per degradarlo. Per procedere a questa degradazione è fondamentale che vi sia un motivo conservato, adiacente al protospacer noto come PAM (Protospacer Adjacent Motif) e composta da 3 nucleotidi.

La nucleasi taglia entrambe i filamenti di DNA tre nucleotidi a monte del motivo PAM. Caspasi diverse riconoscono sequenze PAM diverse. La Cas9, estratta da *Streptococcus pyogenes*, riconosce la sequenza PAM 5'-NGG-3'.



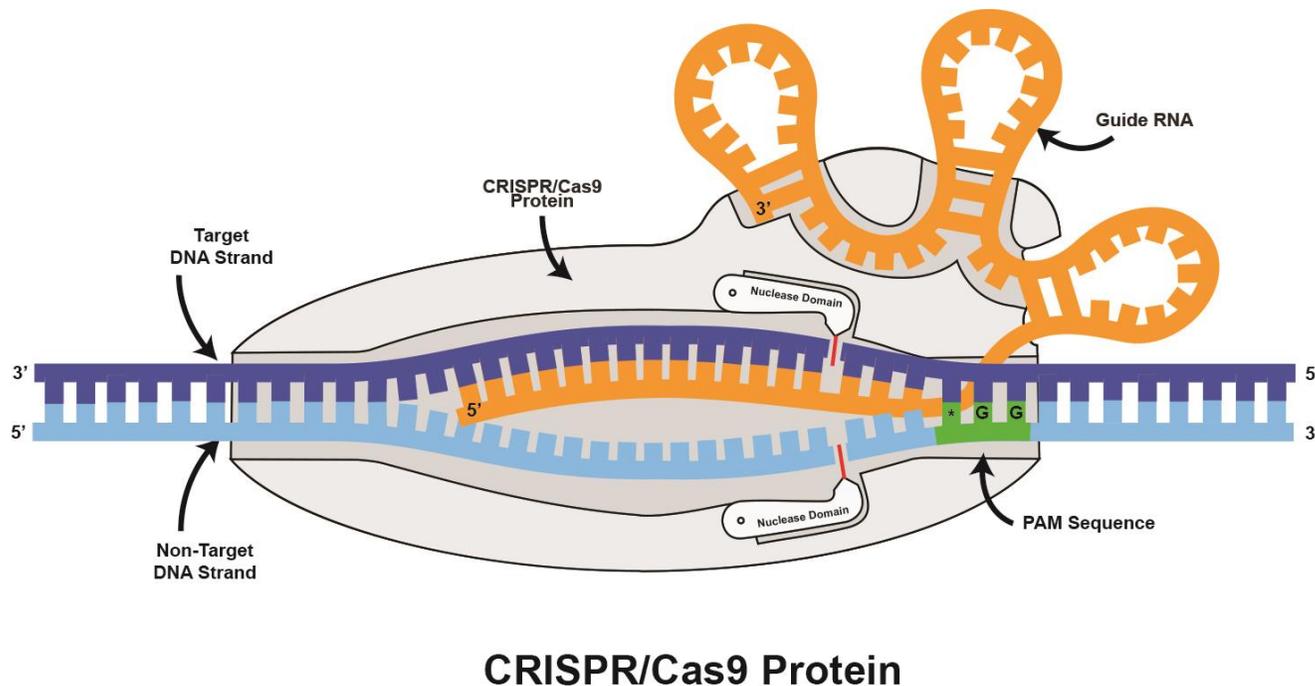
Come per gli altri sistemi di 'ricombinazione omologa' è possibile inserire un 'DNA donatore' per interrompere un gene o inserire un gene.



Miglioramento del sistema CRIPR/Cas9

Grazie alla biologia molecolare si è riusciti a semplificare il sistema a tre componenti - crRNA-tracrRNA-Cas9 –con uno a due componenti dove il sistema crRNA-tracrRNA viene sostituito da un RNA guida noto come **sgRNA**.

sgRNA combina le proprietà di «specificità» del crRNA per il DNA che si vuole modificare e le proprietà strutturali del tracrRNA



Cell

Leading Edge
Perspective

The Heroes of CRISPR

Eric S. Lander^{1,2,3,*}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, 415 Main Street, Cambridge, MA 02142, USA

²Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA

³Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

*Correspondence: lander@broadinstitute.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>

Three years ago, scientists reported that CRISPR technology can enable precise and efficient genome editing in living eukaryotic cells. Since then, the method has taken the scientific community by storm, with thousands of labs using it for applications from biomedicine to agriculture. Yet, the preceding 20-year journey—the discovery of a strange microbial repeat sequence; its recognition as an adaptive immune system; its biological characterization; and its repurposing for genome engineering—remains little known. This Perspective aims to fill in this backstory—the history of ideas and the stories of pioneers—and draw lessons about the remarkable ecosystem underlying scientific discovery.

Le potenzialità delle nucleasi

Review

Trends in Biotechnology July 2013, Vol. 31, No. 7

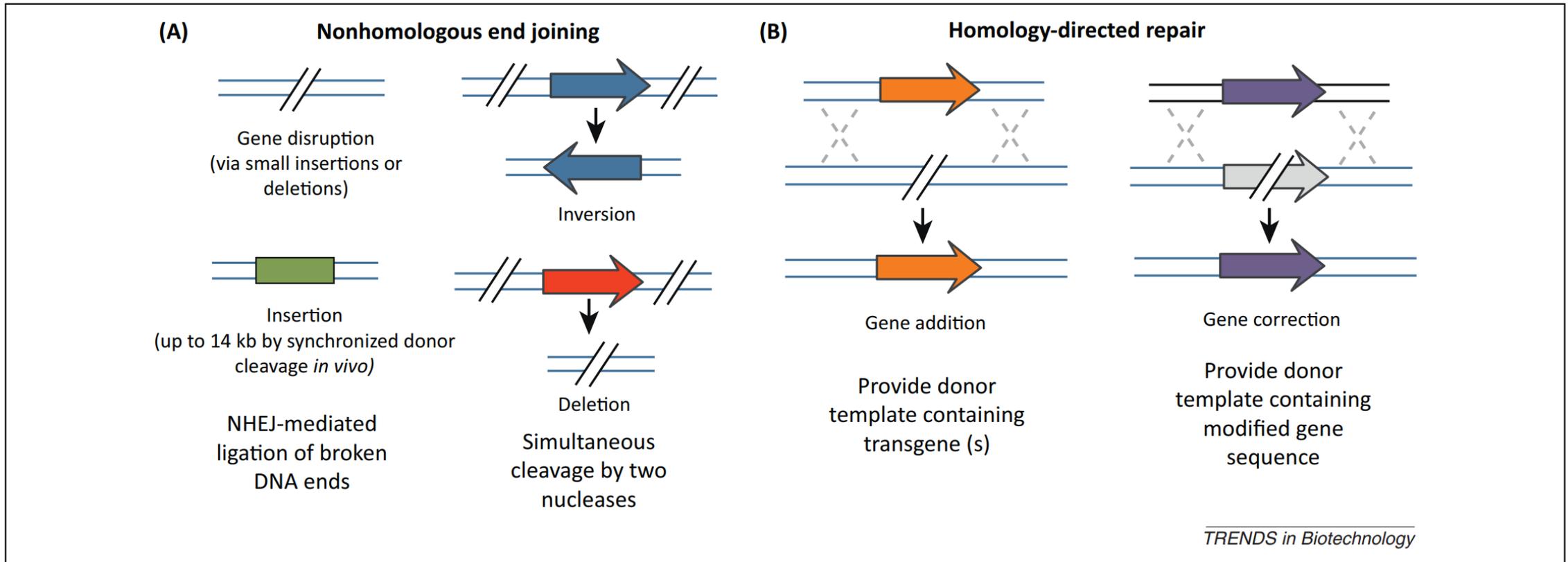
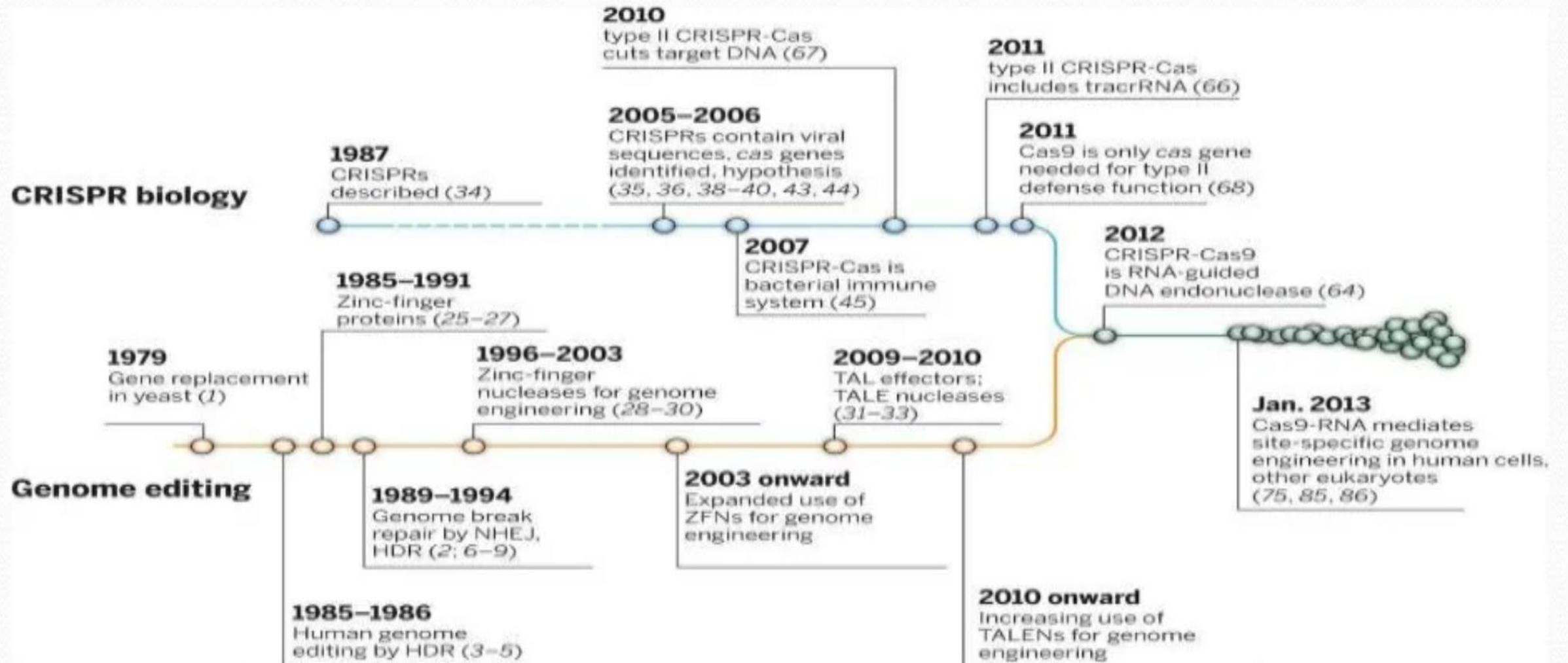


Figure 2. Overview of possible genome editing outcomes using site-specific nucleases. Nuclease-induced DNA double-strand breaks (DSBs) can be repaired by homology-directed repair (HDR) or error-prone nonhomologous end joining (NHEJ). **(A)** In the presence of donor plasmid with extended homology arms, HDR can lead to the introduction of single or multiple transgenes to correct or replace existing genes. **(B)** In the absence of donor plasmid, NHEJ-mediated repair yields small insertion or deletion mutations at the target that cause gene disruption. In the presence of double-stranded oligonucleotides or *in vivo* linearized donor plasmid, DNA fragments up to 14 kb have been inserted via NHEJ-mediated ligation. Simultaneous induction of two DSBs can lead to deletions, inversions and translocations of the intervening segment.

Evoluzione del Genome Editing



Innovazione CRISPR/Cas9...senza Cas9

La deaminazione spontanea della citosina determina la transizione dalle coppie di basi C•G a T•A. Al tempo stesso la deaminazione dell'adenina produce inosina, che viene trattata come guanina dalle polimerasi.

Usando enzimi specifici per produrre queste modifiche è possibile 'correggere' alcune basi del DNA o introdurre mutazioni puntiformi.

I ricercatori hanno generato un costrutto con adenosina deaminasi (ABE) capace di operare sul DNA quando fusa con un mutante CRISPR-Cas9. I primi dati evidenziano che gli ABE introducono mutazioni puntiformi in modo più efficiente e pulito rispetto al metodo CRISPR/Cas9 senza che vi sia la necessità di un taglio da parte di Cas9 in quanto modificano direttamente i filamenti di DNA a cui si legano.

nature

[Explore content](#) ▾ [About the journal](#) ▾ [Publish with us](#) ▾

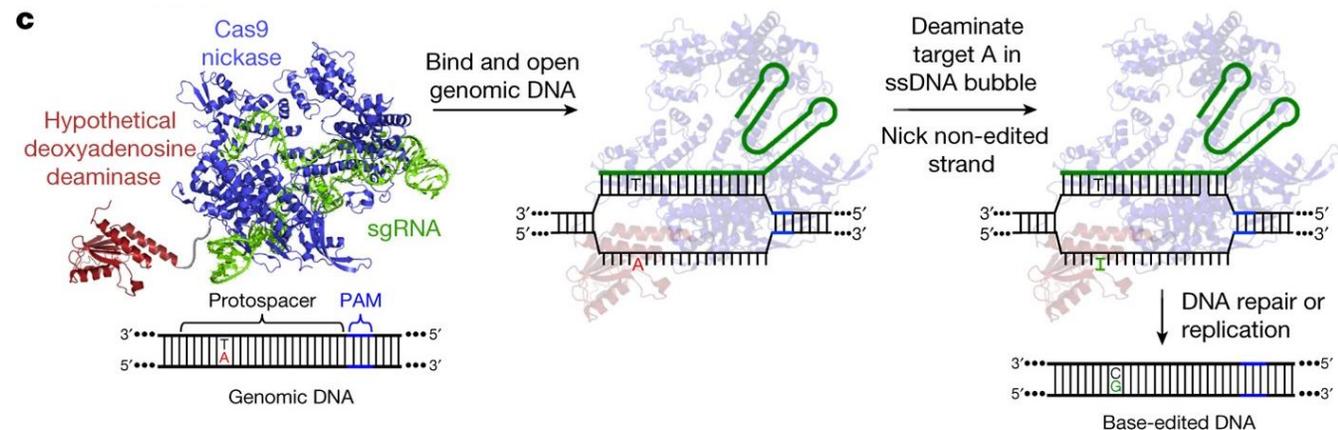
[nature](#) > [articles](#) > article

Published: 01 November 2017

Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage

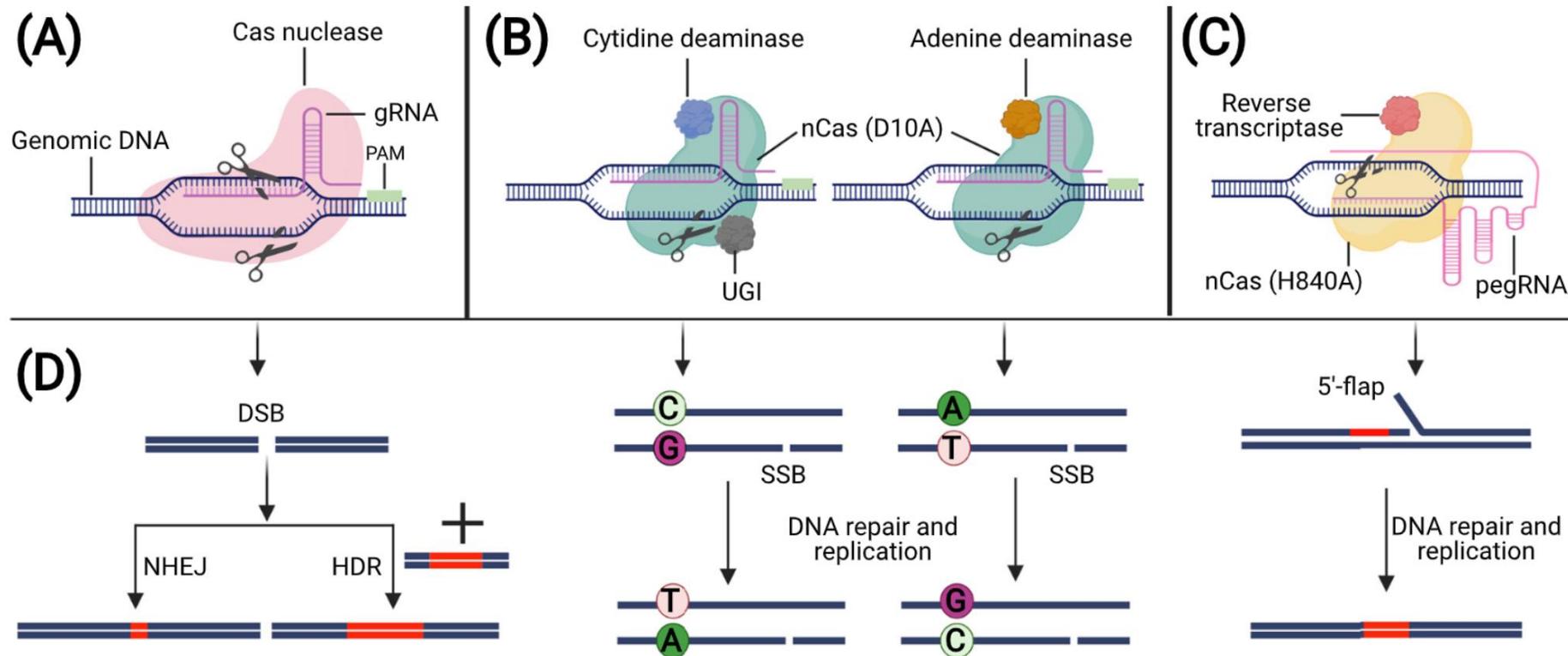
[Nicole M. Gaudelli](#), [Alexis C. Komor](#), [Holly A. Rees](#), [Michael S. Packer](#), [Ahmed H. Badran](#), [David I. Bryson](#) & [David R. Liu](#) 

[Nature](#) 551, 464–471 (2017) | [Cite this article](#)



Caspasi e costrutti diversi per ottimizzare l'efficacia dell'editing

E' possibile sfruttare il semplice sistema di taglio per introdurre una mutazione e silenziare un gene (A- Classic CRISPR/Cas nuclease) oppure modificare una regione sia con DNA donor sia con sistemi di deaminazione mirati che 'riscrivono il genoma (B - Base Editor). Infine vi sono tecniche raffinate note come **PRIMA Editor** che, oltre a tagliare, corregge il DNA.

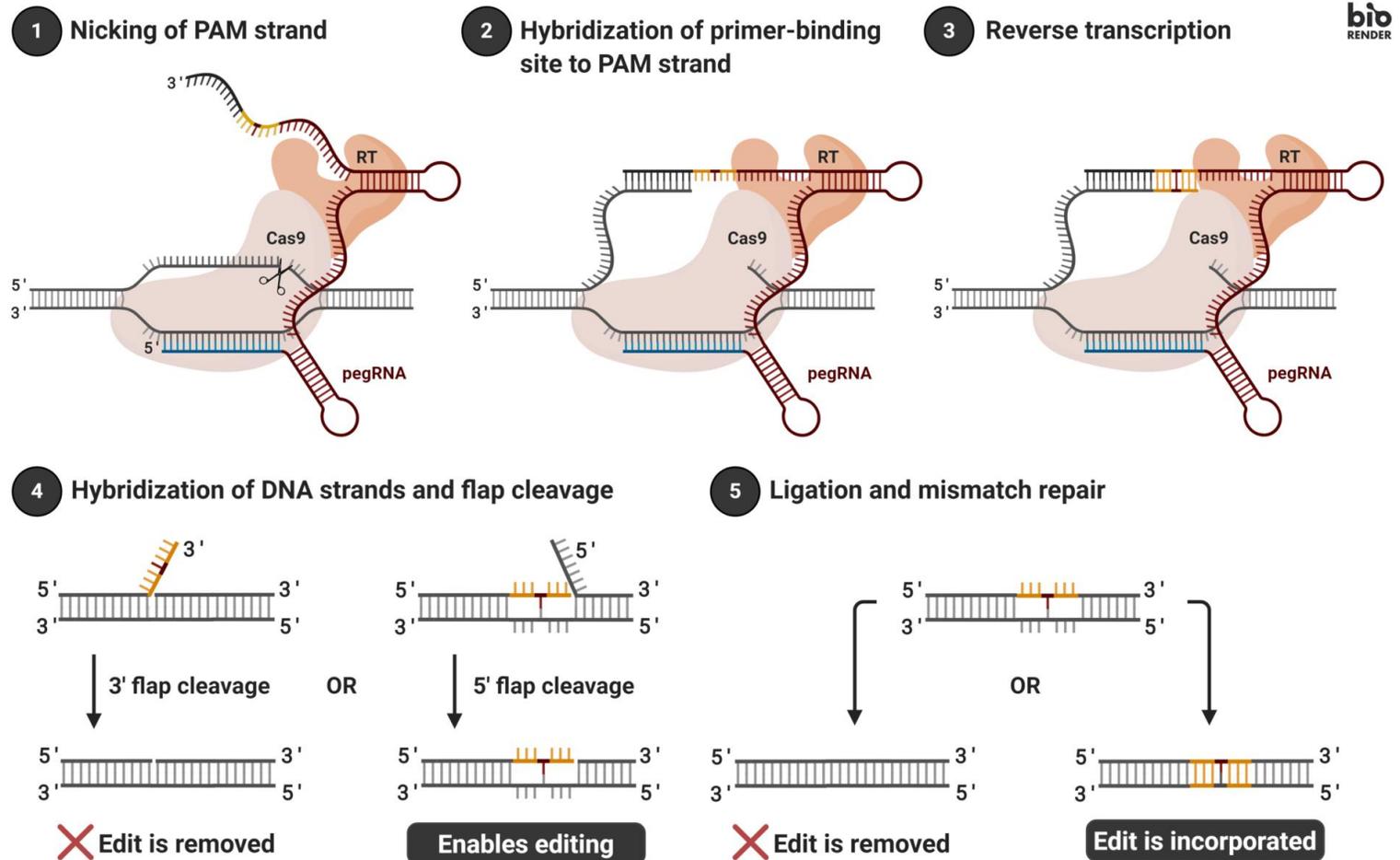


A CRISPR-Cas nucleases. (B) Base editors. (C) Prime editor.(D) Editing mechanisms.

PRIME EDITING RNA

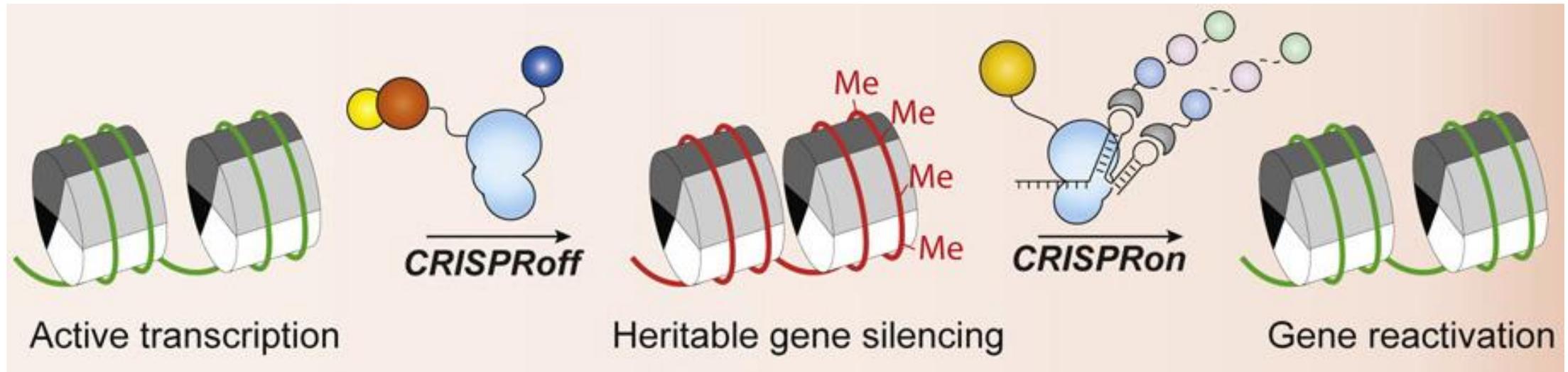
Questa tecnica si basa sullo sviluppo di un costrutto che contiene una caspasi modificata, in particolare vi è una un enzima di trascrittasi inversa ingegnerizzato insieme alla Cas9 e un RNA guida dell'editing noto come pegRNA.

Il pegRNA si dirige sulla zona da correggere e taglia uno dei due filamenti. L'enzima trascrittasi inversa agisce sul taglio e scrive la nuova sequenza corretta di DNA al posto del tratto rimosso. L'ultima fase prevede l'intervento della proteina Cas9 che taglia l'altro filamento in maniera che questo si autoripari sfruttando la sequenza complementare inserita dalla trascrittasi inversa.



CRISPR/Cas9 Epigenetico: per un'espressione modulabile

E' stato creato un sistema CRISPR/Cas9 che si basa su modificazioni epigenetiche. Nello specifico sono stati costruiti due vettori chiamati CRISPRoff e CRISPRon che contengono una proteina Cas9 mutata (dCas9) cataliticamente inattiva, ossia che lega l'RNA guida, posizionandosi sul DNA ma senza tagliarlo. La proteina dCas9 viene fusa con un enzima "repressore" nel caso di CRISPRoff o "attivatore" dell'espressione genica, nel caso di CRISPRon, che agiscono sulla sequenza bersaglio.

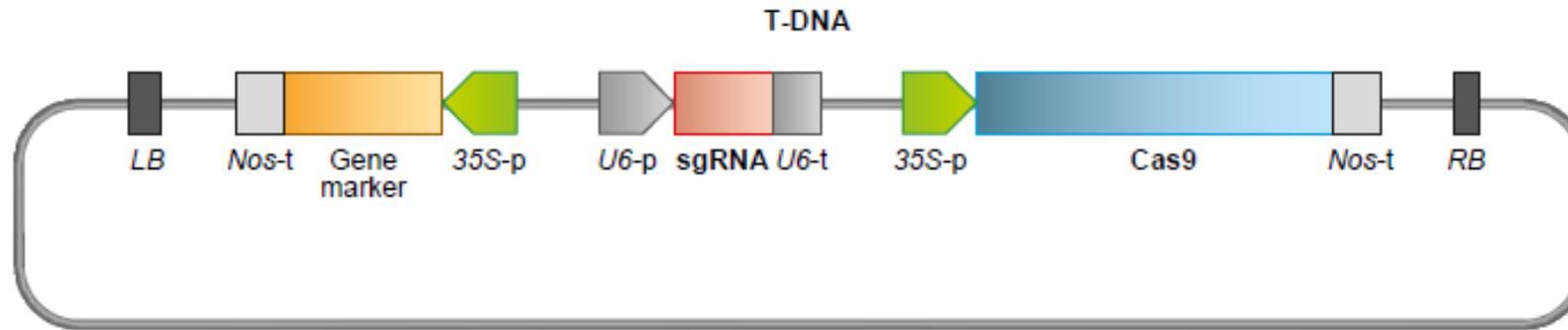


Nel sistema 'off' si sfruttano delle metiltransferasi che metilano il DNA rendendolo inattivo dal punto di vista trascrizionale. In questo modo si silenzia in modo reversibile un gene. Al contrario per attivarlo si usa il sistema 'on' che presenta delle demetilasi.

Procedimento di Genome Editing in pianta

Per effettuare una modificazione genetica mediante sistemi di Editing genomico è necessario predisporre un costrutto. Questo contiene: la cassetta di espressione per la nucleasi.

Nel caso di TALEN e ZFN vi è la necessità di un corretto assemblaggio della regione codificante per i motivi di legame al DNA seguita dalla regione FokI.

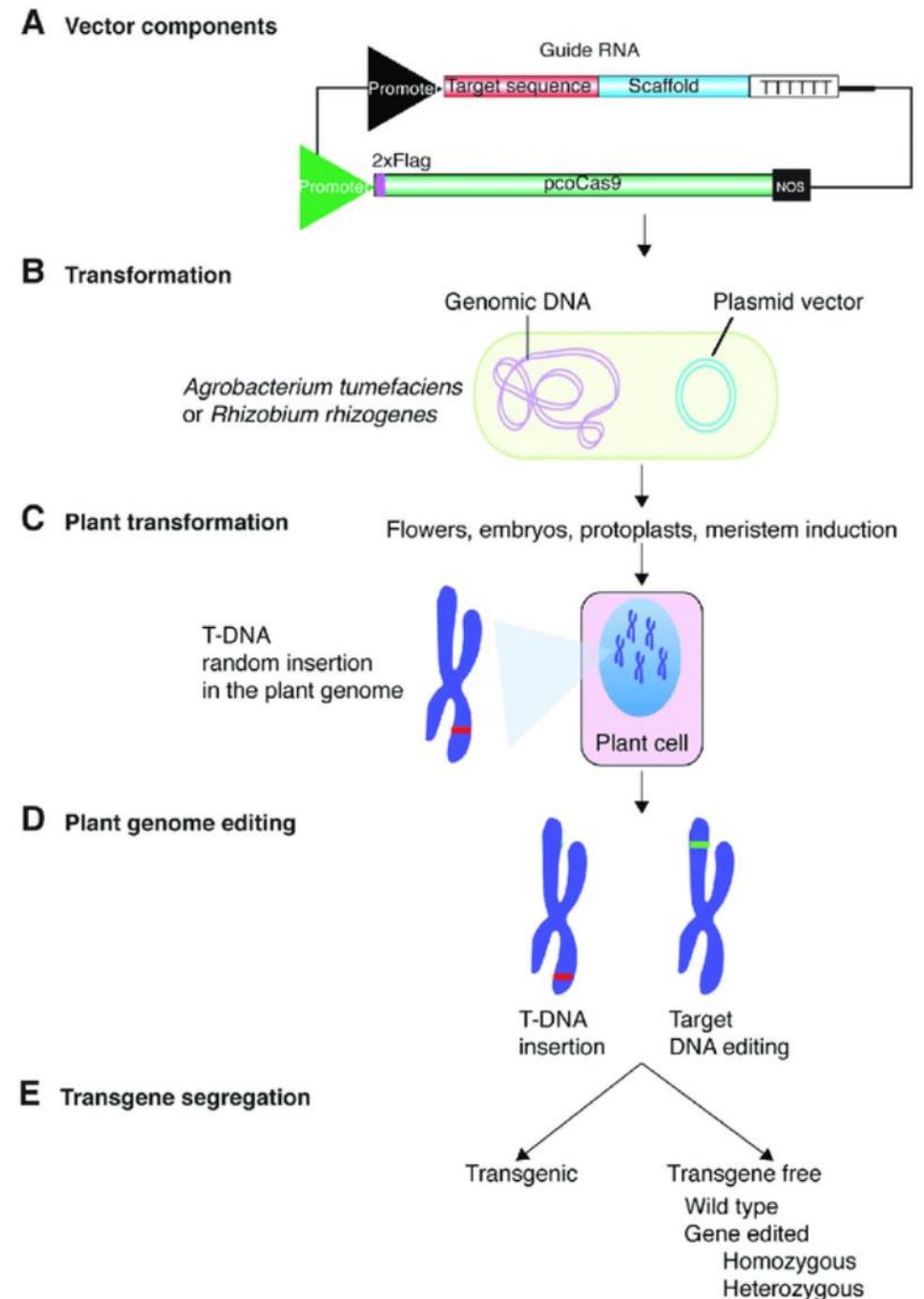


Il sistema CRISPR/Cas9 è più semplice! Il T-DNA che serve per trasferire il DNA esogeno nella cellula vegetale ha solitamente tre aree:

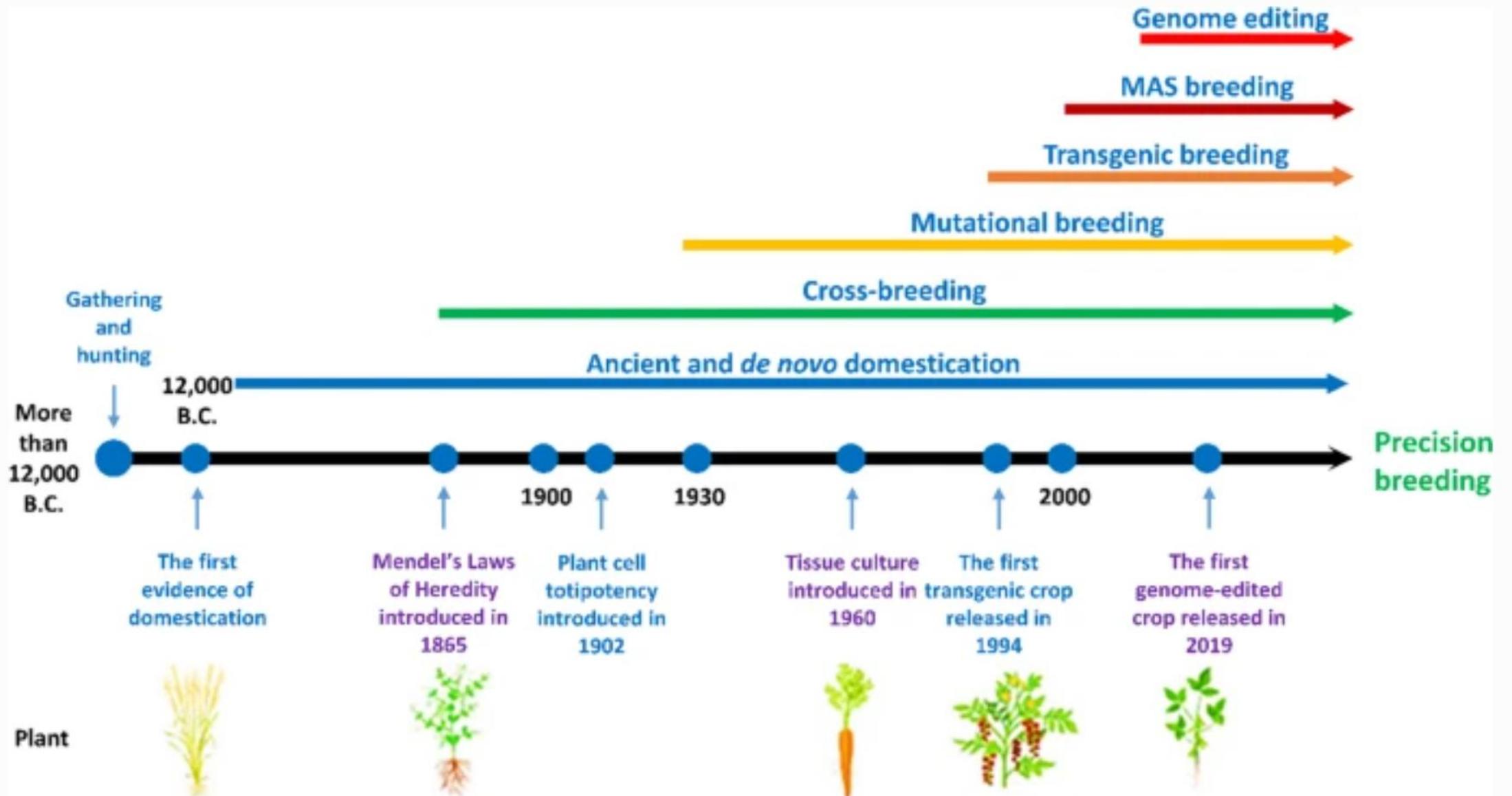
- Una cassetta per un gene marker (es. resistenza ad un antibiotico) che serve per verificare che il trasferimento sia avvenuto.
- La parte centrale è la regione che contiene sgRNA di circa 20 nucleotidi. Questa regione può presentare diversi promotori specifici per piccoli RNA come U6-p.
- L'ultima regione presenta il gene che codifica per la Cas9 (in cui sono stati usati i codoni eucariotici dato che deve esprimersi in pianta). In generale questa proteina è controllata da un promotore forte come il 35S che deriva dal virus del mosaico del tabacco (molto usato in pianta).

Agrobacterium tumefaciens (o anche sistemi biolistici) armato con questo plasmide può portare il sistema di editing dentro la cellula. Qui è possibile tagliare, inserire mutazioni o pezzi di DNA.

Qualora si volesse eliminare tutto il sistema CRISPR/Cas9 e lasciare la sola 'inserzione' è necessario attendere le generazioni F2 e la segregazione dei cromosomi, ricercando non più il gene reporter ma la porzione di DNA modificata mediante PCR sito specifica.



La modificazione genetica delle piante: genome editing è una rivoluzione?



RISULTATI NELLE PIANTE

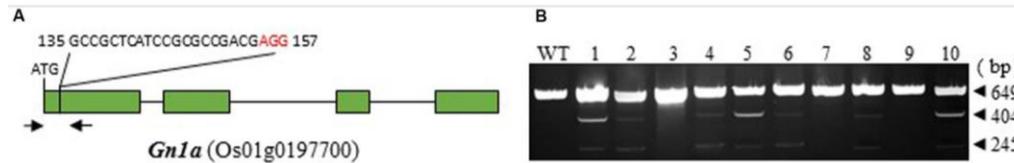
Ad oggi circa l'80% degli studi di editing delle piante hanno avuto come scopo il knock out per migliorare alcune caratteristiche delle piante. Molte degli organismi target sono specie coltivate.

Li et al. (2016) hanno mutato *OsGN1a*, *OsDEP1* e *OsGS3* provocando un aumento del numero di semi, di densità delle pannocchie dense ed un aumento della dimensione dei frutti-semi, rispettivamente.

Reassessment of the Four Yield-related Genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in Rice Using a CRISPR/Cas9 System

Meiru Li^{1,2†}, Xiaoxia Li^{3†}, Zejiao Zhou³, Pingzhi Wu^{1,2}, Maichun Fang^{1,2}, Xiaoping Pan^{1,2}, Qiupeng Lin³, Wanbin Luo³, Guojiang Wu^{1,2*} and Hongqing Li^{3*}

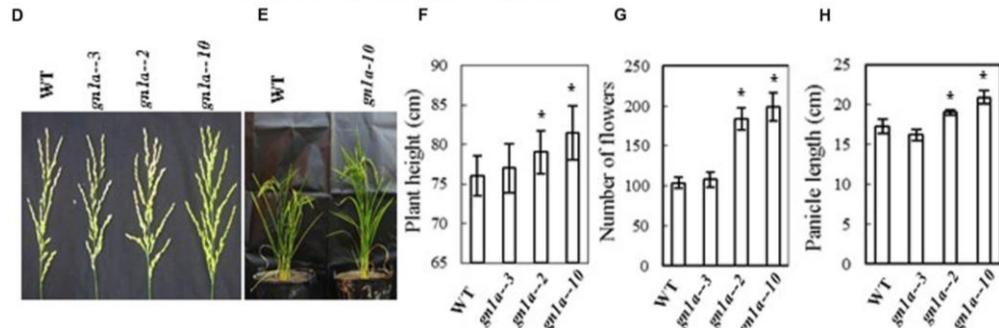
¹ Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, China, ² Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, China, ³ Guangdong Provincial Key Lab of Biotechnology for Plant Development, South China Normal University, Guangzhou, China



C

```

CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCCGACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC WT
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCC- ACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC gnla-1
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCC- ACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC gnla-2
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCC- ACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC gnla-3
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCA----- ACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC gnla-10
-----AC gnla-112
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCCG-----AC gnla-115
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCCG- ACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC WT
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCCGACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC gnla+1
CGACCTCGGCATCGCGCCGCTCATCCGCGCCGACGAGGCGGGCACCGCGCGCGCCTCCGCCGAC gnla+1
    
```



Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated (Cas) systems have been successfully used as efficient tools for genome editing in a variety of species. We used the CRISPR/Cas9 system to mutate the *Gn1a* (Os01g0197700), *DEP1* (Os09g0441900), *GS3* (Os03g0407400), and *IPA1* (Os08g0509600) genes of rice cultivar Zhonghua 11, genes which have been reported to function as regulators of grain number, panicle architecture, grain size and plant architecture, respectively. Analysis of the phenotypes and frequencies of edited genes in the first generation of transformed plants (T0) showed that the CRISPR/Cas9 system was highly efficient in inducing targeted gene editing, with the desired genes being edited in 42.5% (*Gn1a*), 67.5% (*DEP1*), 57.5% (*GS3*), and 27.5% (*IPA1*) of the transformed plants. The T2 generation of the *gn1a*, *dep1*, and *gs3* mutants featured enhanced grain number, dense erect panicles, and larger grain size, respectively. Furthermore, semi-dwarf, and grain with long awn, phenotypes were observed in *dep1* and *gs3* mutants, respectively. The *ipa1* mutants showed two contrasting phenotypes, having either fewer tillers or more tillers, depending on the changes induced in the OsmiR156 target region. In addition, we found that mutants with deletions occurred more frequently than previous reports had indicated and that off-targeting had taken place in highly similar target sequences. These results proved that multiple regulators of important traits can be modified in a single cultivar by CRISPR/Cas9, and thus facilitate the dissection of complex gene regulatory networks in the same genomic background and the stacking of important traits in cultivated varieties.

Rese e dimensioni

Il lavoro di Lv et al. (2021) ha evidenziato che silenziando OsPAO5, che codifica per le poliamminossidasi si riesce ad aumentare notevolmente la lunghezza del semi, del peso e anche del numero di semi per pannocchia con un netto incremento delle rese della



Targeted mutagenesis of *POLYAMINE OXIDASE 5* that negatively regulates mesocotyl elongation enables the generation of direct-seeding rice with improved grain yield

Yusong Lv^{1,2}, Gaoneng Shao¹, Guiai Jiao¹, Zhonghua Sheng¹, Lihong Xie¹, Shikai Hu¹, Shaoqing Tang¹, Xiangjin Wei^{1,*} and Peisong Hu^{1,*}

¹State Key Laboratory of Rice Biology, China National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

²National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

*Correspondence: Xiangjin Wei (weixiangjin@caas.cn), Peisong Hu (hupelsong@caas.cn)

<https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.007>

ABSTRACT

Under conditions of labor or resource scarcity, direct seeding, rather than transplantation, is the preferred mode of rice (*Oryza sativa*) cultivation. This approach requires varieties that exhibit uniform seedling emergence. Mesocotyl elongation (ME), the main driver of rapid emergence of rice seedlings from soil, is enhanced by darkness and inhibited by light. Plant polyamine oxidases (PAOs) oxidize polyamines (PAs) and release H₂O₂. Here, we established that *OsPAO5* expression in rice seedlings is increased in the presence of light and inhibited by darkness. To determine its role in ME, we created *OsPAO5* mutants using CRISPR/Cas9. Compared with the wild type, *pao5* mutants had longer mesocotyls, released less H₂O₂, and synthesized more ethylene. The mutant seedlings emerged at a higher and more uniform rate, indicating their potential for use in direct seeding. Nucleotide polymorphism analysis revealed that an SNP (*PAO5*^{-578G/A}) located 578 bp upstream of the *OsPAO5* start codon alters its expression, and was selected during rice mesocotyl domestication. The *PAO5*^{-578G} genotype conferring a long mesocotyl mainly exists in wild rice, most *Aus* accessions, and some *Geng* (*Japonica*) accessions. Intriguingly, knocking out *OsPAO5* can remarkably increase the grain weight, grain number, and yield potential. In summary, we developed a novel strategy to obtain elite rice with higher emergence vigor and yield potential, which can be conveniently and widely used to breed varieties of direct-seeding rice.

Key words: *Oryza sativa*, direct seeding, mesocotyl elongation, grain yield, polyamine oxidase 5

Lv Y., Shao G., Jiao G., Sheng Z., Xie L., Hu S., Tang S., Wei X., and Hu P. (2021). Targeted mutagenesis of *POLYAMINE OXIDASE 5* that negatively regulates mesocotyl elongation enables the generation of direct-seeding rice with improved grain yield. *Mol. Plant*. **14**. 344–351.

Figure 4. Knocking out *OsPAO5* increases the grain weight and yield potential.

(A) Comparison of the grain morphology of the wild type and the two *pao5* mutants.

(B–D) Grain length, grain width, and 1000-grain weight of *pao5* mutants and NIP.

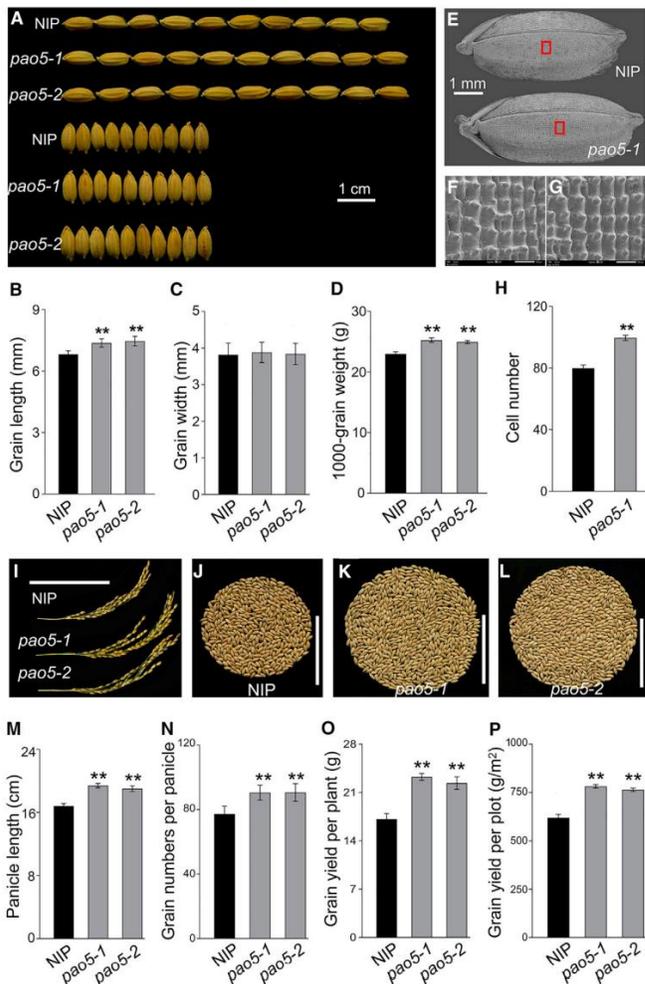
(E–G) Scanning electron microscopy images of the lemma of mature seeds of NIP (F) and the *pao5-1* mutant (G). (F) and (G) are magnified views of the boxed areas in (E).

(H) The numbers of outer epidermal cells along the longitudinal axis of the lemma of mature seeds.

(I–L) The panicle phenotype (I) and grain numbers per plant (J–L) of NIP and the two *pao5* mutants.

(M–P) (M) Panicle length, (N) grain number per panicle, (O) grain yield per plant, and (P) grain yield per plot of NIP and the two *pao5* mutants.

All data are shown as means ± SD ($n = 3$), and statistically significant differences were determined by Student's *t*-test (** $P < 0.01$). Scale bars, 1 cm (A), 1 mm (E), 100 μm (F and G), and 10 cm (I–L).



Resistenza a erbicidi

Per introdurre tolleranza agli erbicidi è sufficiente creare mutazioni nelle proteine target di alcuni erbicidi commerciali. Per es., la modifica del gene dell'acetolattato sintasi (ALS) ha portato la resistenza agli erbicidi nel riso (Shimatani et al., 2017)

Published: 27 March 2017

Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion

[Zenpei Shimatani](#), [Sachiko Kashojiya](#), [Mariko Takayama](#), [Rie Terada](#), [Takayuki Arazoe](#), [Hisaki Ishii](#), [Hiroshi Teramura](#), [Tsuyoshi Yamamoto](#), [Hiroki Komatsu](#), [Kenji Miura](#), [Hiroshi Ezura](#) , [Keiji Nishida](#) , [Tohru Ariizumi](#)  & [Akihiko Kondo](#)

Nature Biotechnology **35**, 441–443 (2017) | [Cite this article](#)

20k Accesses | 440 Citations | 52 Altmetric | [Metrics](#)

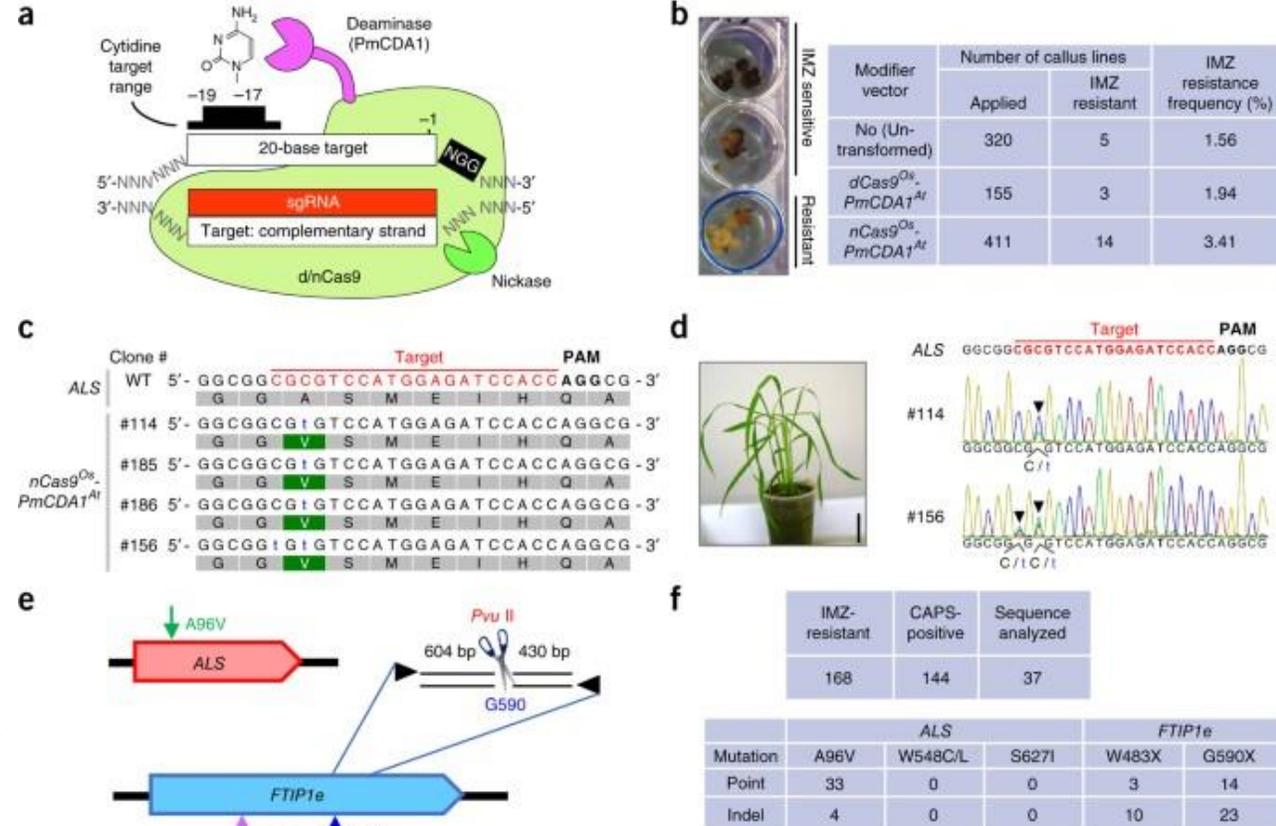
 This article has been [updated](#)

Abstract

We applied a fusion of CRISPR-Cas9 and activation-induced cytidine deaminase (Target-AID) for point mutagenesis at genomic regions specified by single guide RNAs (sgRNAs) in two crop plants. In rice, we induced multiple herbicide-resistance point mutations by multiplexed editing using herbicide selection, while in tomato we generated marker-free plants with homozygous heritable DNA substitutions, demonstrating the feasibility of base editing for crop improvement.

La mutazione interessa citidine situate nelle posizioni da -19 a -17 a monte della sequenza PAM sul filamento superiore.

(d) Piante mutanti rigenerate (a sinistra) e spettri di sequenziamento di Sanger della loro regione bersaglio ALS. Le punte delle frecce indicano mutazioni eterogenee sovrapposte. Barra della scala, 5 cm. (e) Mutagenesi multiplex assistita dalla SLA. Due target (W483 e G590) in FTIP1e sono stati combinati con il target ALS (A96V) e selezionati per la resistenza IMZ. La mutagenesi a G590 è stata valutata mediante analisi CAPS. (f) Frequenza di mutazione a target ALS e FTIP1e. Le calli trasformate e resistenti all'IMZ sono state analizzate mediante CAPS a G590. Le linee CAPS-positive sono state sequenziate per identificare i tipi di mutazione. Per la SLA sono state esaminate anche le comuni mutazioni di resistenza spontanea (W548C/L e S627I). X rappresenta il codice di arresto.



Resistenza a Stress biotici

Per aumentare la resistenza delle piante agli insetti o organismi patogeni è possibile agire a 2 livelli. Sull'insetto modificando i possibili bersagli della 'sostanza tossica' presente nella pianta. Per esempio si possono incrementare i recettori dell'insetto per la tossina Bt. Altre modificazioni sull'insetto possono colpire i geni responsabili dell'olfatto (metodo di riconoscimento della pianta bersaglio. E' poi possibile colpire geni dello sviluppo soprattutto quando gli insetti usano la pianta per deporre uovo e far sviluppare larve.

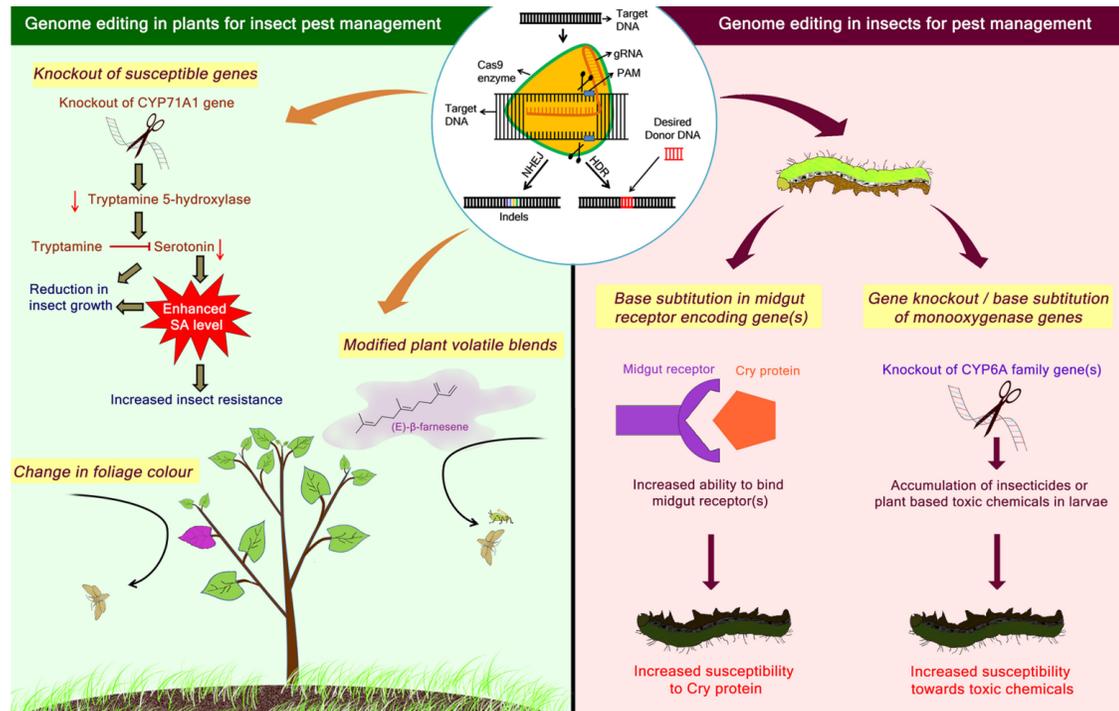


Figure 1. Strategies of CRISPR-based gene editing in plants and insects for pest management. Genome editing in plants for resistance against insect pests has been demonstrated by knocking down susceptible genes, modification of plant volatile blends, and changing foliage color. Editing in insects for susceptibility toward plants can be achieved by modification of Cry protein binding receptors and knockdown of detoxification enzymes.

Allo stesso modo si può agire sulla pianta per esempio attivando composti volatili che attirano parassitoidi. Si possono poi modificare segnali di riconoscimento come i colori dell'organo target. Infine si possono sintetizzare composti tossici per il parassita.

Grano Senza Glutine

Sanchez-Leon et al. 2018 hanno modificato con CRISPR/Cas9 la famiglia dei geni per le α -gliadine, le glicoproteine che stimolano la reazione immunitaria dei pazienti celiaci. Sono state ottenute ventuno linee di piante mutanti, con riduzione del contenuto di α -gliadine. Dei 45 geni diversi per α -gliadine, fino a 35 sono stati simultaneamente alterati dall'editing nel genoma di una stessa pianta.

Plant Biotechnology
Journal



Plant Biotechnology Journal (2018) 16, pp. 902–910

doi: 10.1111/pbi.12837

Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9

Susana Sánchez-León^{1, #}, Javier Gil-Humanes^{2, *, #}, Carmen V. Ozuna¹, María J. Giménez¹, Carolina Sousa³, Daniel F. Voytas² and Francisco Barro^{1, *}

¹Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba, Spain

²Department of Genetics, Cell Biology, and Development, Center for Genome Engineering, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

³Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

Received 28 May 2017;

revised 1 August 2017;

accepted 26 August 2017.

*Correspondence (Tel +34957499240; fax +34957499252; email fbarro@ias.csic.es (F.B.)) or (Tel +1 (651) 334 9384; email javi-gil@hotmail.com (J.G.H.))

[#]These authors contributed equally to this work.

Summary

Coeliac disease is an autoimmune disorder triggered in genetically predisposed individuals by the ingestion of gluten proteins from wheat, barley and rye. The α -gliadin gene family of wheat contains four highly stimulatory peptides, of which the 33-mer is the main immunodominant peptide in patients with coeliac. We designed two sgRNAs to target a conserved region adjacent to the coding sequence for the 33-mer in the α -gliadin genes. Twenty-one mutant lines were generated, all showing strong reduction in α -gliadins. Up to 35 different genes were mutated in one of the lines of the 45 different genes identified in the wild type, while immunoreactivity was reduced by 85%. Transgene-free lines were identified, and no off-target mutations have been detected in any of the potential targets. The low-gluten, transgene-free wheat lines described here could be used to produce low-gluten foodstuff and serve as source material to introgress this trait into elite wheat varieties.

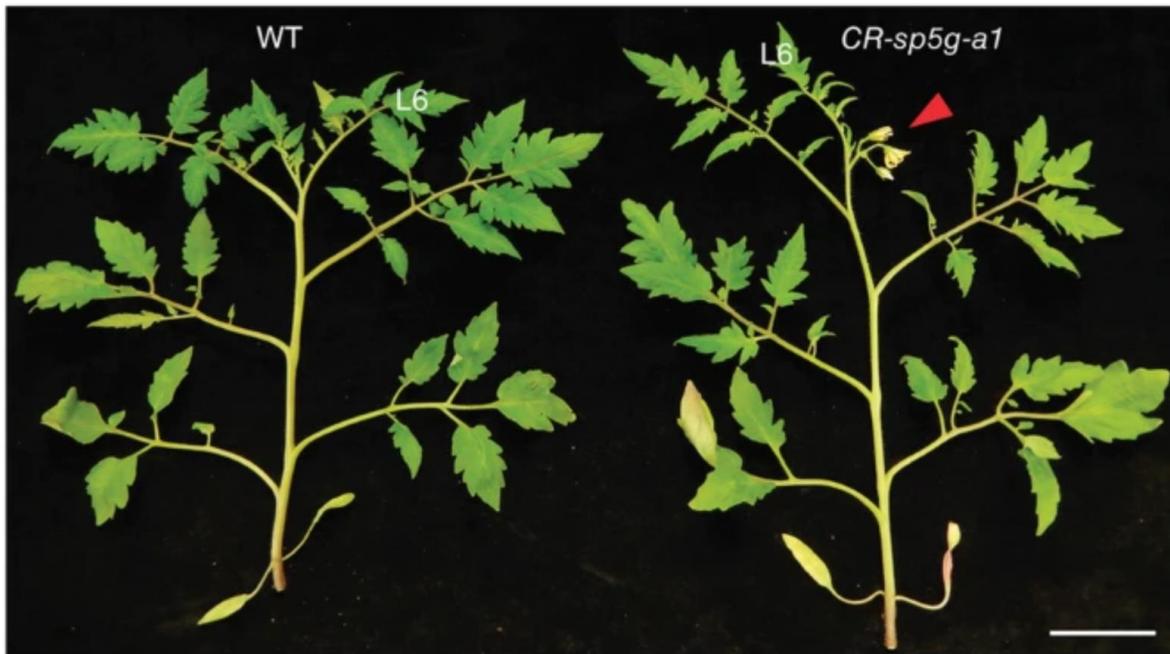
Keywords: coeliac disease, α -gliadins, CRISPR/Cas9.



Le linee modificate sgAlpha-2 BW208 e DP non sembrano avere differenze di rese e caratteristiche rispetto al WT (t545- V775).

Modifiche nello sviluppo

Generando mutazioni nel gene soppressore della fioritura (**SELF-PRUNING 5G**) è stato possibile incrementare le fioriture della pianta (indipendentemente dal fotoperiodo), quindi aumentare le rese e ridurre le dimensioni della pianta.



Published: 05 December 2016

Variation in the flowering gene *SELF PRUNING 5G* promotes day-neutrality and early yield in tomato

[Sebastian Soyk](#), [Niels A Müller](#), [Soon Ju Park](#), [Inga Schmalenbach](#), [Ke Jiang](#), [Ryosuke Hayama](#), [Lei Zhang](#), [Joyce Van Eck](#), [José M Jiménez-Gómez](#) ✉ & [Zachary B Lippman](#) ✉

[Nature Genetics](#) **49**, 162–168 (2017) | [Cite this article](#)

17k Accesses | 225 Citations | 108 Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

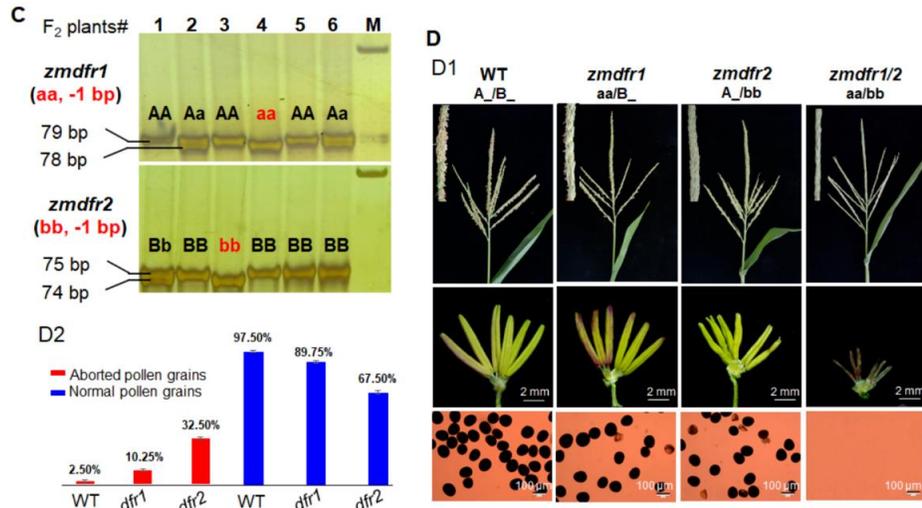
Plants evolved so that their flowering is triggered by seasonal changes in day length¹. However, day-length sensitivity in crops limits their geographical range of cultivation, and thus modification of the photoperiod response was critical for their domestication^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11}. Here we show that loss of day-length-sensitive flowering in tomato was driven by the florigen paralog and flowering repressor *SELF-PRUNING 5G* (*SP5G*). *SP5G* expression is induced to high levels during long days in wild species, but not in cultivated tomato because of *cis*-regulatory variation. CRISPR/Cas9-engineered mutations in *SP5G* cause rapid flowering and enhance the compact determinate growth habit of field tomatoes, resulting in a quick burst of flower production that translates to an early yield. Our findings suggest that pre-existing variation in *SP5G* facilitated the expansion of cultivated tomato beyond its origin near the equator in South America, and they provide a compelling demonstration of the power of gene editing to rapidly improve yield traits in crop breeding.

Modifica di caratteri complessi

Il genome editing offre l'opportunità di modificare anche caratteri complessi multigenici. Famoso il caso della maschio sterilità del mais.

La maschio sterilità è utile nel breeding perché previene l'autofecondazione.

La mutazione di un solo gene *Zmdfr* produce una parziale sterilità, ma la doppia mutazione invece produce una totale sterilità!



Use of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing to Simultaneously Mutate Multiple Homologous Genes Required for Pollen Development and Male Fertility in Maize

Xinze Liu ^{1,†}, Shaowei Zhang ^{1,†}, Yilin Jiang ^{1,†}, Tingwei Yan ¹, Chaowei Fang ¹, Quancan Hou ^{1,2}, Suowei Wu ^{1,2}, Ke Xie ^{1,2}, Xueli An ^{1,2,*} and Xiangyuan Wan ^{1,2,*}

- Zhongzhi International Institute of Agricultural Biosciences, Shunde Graduate School, Research Center of Biology and Agriculture, University of Science and Technology Beijing (USTB), Beijing 100024, China; b20180388@xs.ustb.edu.cn (X.L.); b20200413@xs.ustb.edu.cn (S.Z.); b20190393@xs.ustb.edu.cn (Y.J.); b20190395@xs.ustb.edu.cn (T.Y.); b20190392@xs.ustb.edu.cn (C.F.); houquancan@ustb.edu.cn (Q.H.); suoweiwu@ustb.edu.cn (S.W.); xieke@ustb.edu.cn (K.X.)
 - Beijing Engineering Laboratory of Main Crop Bio-Tech Breeding, Beijing International Science and Technology Cooperation Base of Bio-Tech Breeding, Beijing Solidwill Sci-Tech Co., Ltd., Beijing 100192, China
- * Correspondence: xuelian@ustb.edu.cn (X.A.); wanxiangyuan@ustb.edu.cn (X.W.); Tel.: +86-137-1768-5330 (X.A.); +86-186-0056-1850 (X.W.)
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Liu, X.; Zhang, S.; Jiang, Y.; Yan, T.; Fang, C.; Hou, Q.; Wu, S.; Xie, K.; An, X.; Wan, X. Use of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing to Simultaneously Mutate Multiple Homologous Genes Required for Pollen Development and Male Fertility in Maize. *Cells* **2022**, *11*, 439. <https://doi.org/10.3390/cells11030439>

Academic Editors: Francesco Carimi and Laurens Pauwels

Received: 7 December 2021
Accepted: 25 January 2022
Published: 27 January 2022

Abstract: Male sterility represents an important trait for hybrid breeding and seed production in crops. Although the genes required for male fertility have been widely studied and characterized in many plant species, most of them are single genic male-sterility (GMS) genes. To investigate the role of multiple homologous genes in anther and pollen developments of maize, we established the CRISPR/Cas9-based gene editing method to simultaneously mutate the homologs in several putative GMS gene families. By using the integrated strategies of multi-gene editing vectors, maize genetic transformation, mutation-site analysis of T₀ and F₁ plants, and genotyping and phenotyping of F₂ progenies, we further confirmed gene functions of every member in *ZmTGA9-1/-2/-3* family, and identified the functions of *ZmDFR1*, *ZmDFR2*, *ZmACOS5-1*, and *ZmACOS5-2* in controlling maize male fertility. Single and double homozygous gene mutants of *ZmTGA9-1/-2/-3* did not affect anther and pollen development, while triple homozygous gene mutant resulted in complete male sterility. Two single-gene mutants of *ZmDFR1/2* displayed partial male sterility, but the double-gene mutant showed complete male sterility. Additionally, only the *ZmACOS5-2* single gene was required for anther and pollen development, while *ZmACOS5-1* had no effect on male fertility. Our results show that the CRISPR/Cas9 gene editing system is a highly efficient and convenient tool for identifying multiple homologous GMS genes. These findings enrich GMS genes and mutant resources for breeding of maize GMS lines and promote deep understanding of the gene family underlying pollen development and male fertility in maize.

Pomodoro iperproduttore di acido gamma Amminobutirrico -GABA

Il GABA è un fitormone che interviene nei processi di sviluppo della pianta e nella regolazione dell'equilibrio carbonio-azoto. E' noto che il GABA si accumula nei tessuti vegetali in risposta a stress biotici e abiotici. Questa molecola nell'uomo svolge il ruolo di neurotrasmettitore cerebrale ad azione inibitoria. Sono stati identificati geni della biosintesi e modificati per aumentare la produzione.

Il Giappone è stato il primo Paese a commercializzare un prodotto a base di pomodoro che contiene un alto contenuto di acido γ -aminobutirrico (GABA) (Nonaka et al. 2017) nel settembre 2021.



Photo Source: Sanatech Seed
Sanatech Seed Co., Ltd., together with its partner for sales Pioneer EcoScience Co, Ltd., has announced that the commercial sales of Sicilian Rouge High GABA, their genome-edited tomatoes with increased gamma-aminobutyric acid (GABA) will begin on September 15, 2021.

Challenges and Prospects of New Plant Breeding Techniques for GABA Improvement in Crops: Tomato as an Example

Pietro Gramazio¹, Mariko Takayama^{1,2} and Hiroshi Ezura^{1,2*}

¹ Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, ² Tsukuba Plant Innovation Research Center (T-PIRC), University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

Over the last seven decades, γ -aminobutyric acid (GABA) has attracted great attention from scientists for its ubiquity in plants, animals and microorganisms and for its physiological implications as a signaling molecule involved in multiple pathways and processes. Recently, the food and pharmaceutical industries have also shown significantly increased interest in GABA, because of its great potential benefits for human health and the consumer demand for health-promoting functional compounds, resulting in the release of a plethora of GABA-enriched products. Nevertheless, many crop species accumulate appreciable GABA levels in their edible parts and could help to meet the daily recommended intake of GABA for promoting positive health effects. Therefore, plant breeders are devoting much effort into breeding elite varieties with improved GABA contents. In this regard, tomato (*Solanum lycopersicum*), the most produced and consumed vegetable worldwide and a fruit-bearing model crop, has received much consideration for its accumulation of remarkable GABA levels. Although many different strategies have been implemented, from classical crossbreeding to induced mutagenesis, new plant breeding techniques (NPBTs) have achieved the best GABA accumulation results in red ripe tomato fruits along with shedding light on GABA metabolism and gene functions. In this review, we summarize, analyze and compare all the studies that have substantially contributed to tomato GABA breeding with further discussion and proposals regarding the most recent NPBTs that could bring this process to the next level of precision and efficiency. This document also provides guidelines with which researchers of other crops might take advantage of the progress achieved in tomato for more efficient GABA breeding programs.

Keywords: γ -aminobutyric acid, GABA metabolism, tomato, health-promoting food, breeding strategies, new plant breeding techniques, CRISPR/Cas, cis-engineering

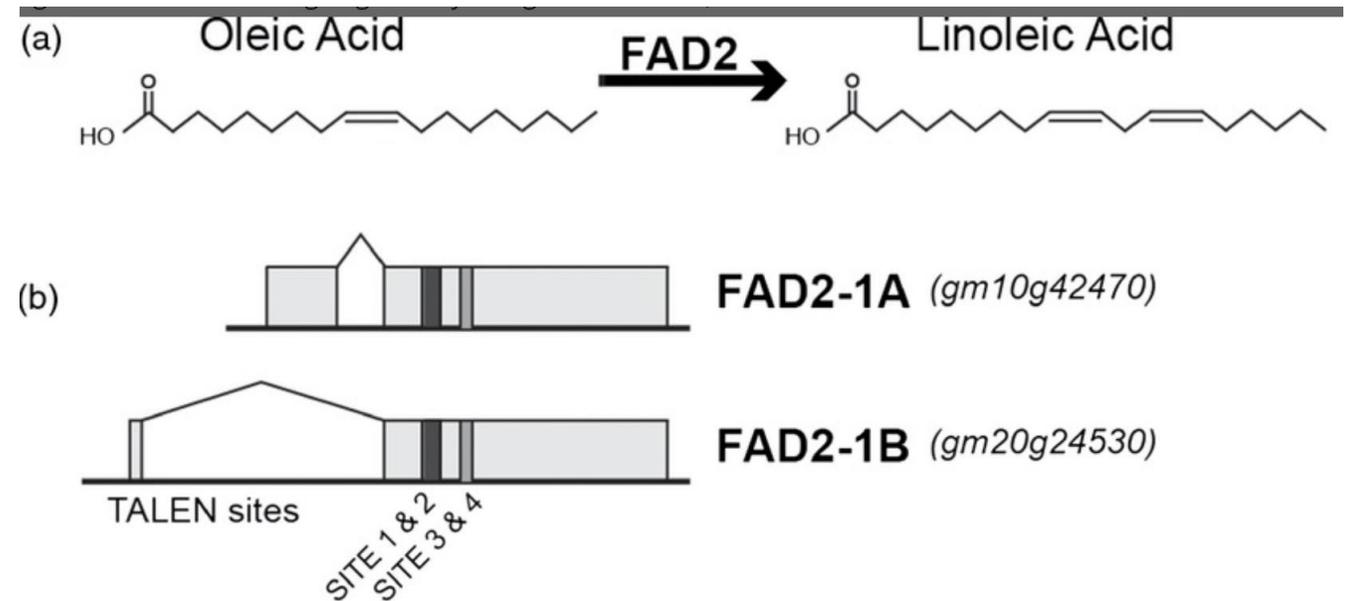
Miglioramenti nutrizionali

Uno dei primi prodotti «genome editing» è la soia migliorata nel contenuto di acidi grassi monoinsaturi.

L'olio di soia contiene circa il 24% di acidi grassi monoinsaturi, che è significativamente inferiore a oli concorrenti come colza (61%) e oliva (75%). Il consumo di oli ricchi di grassi monoinsaturi è considerato più salutare, inoltre aumenta la conservabilità dell'olio nel tempo.

I geni Fatty Acid Desaturase (FAD) determinano i livelli di grassi monoinsaturi nell'olio di soia in quanto catalizzano la conversione dell'acido grasso monoinsaturo, l'acido oleico, nell'acido grasso polinsaturo, l'acido linoleico.

Usando la tecnologia TALEN sono state inserite piccole mutazioni (inserzioni) in entrambi i geni FAD2-1A e FAD2-1B.

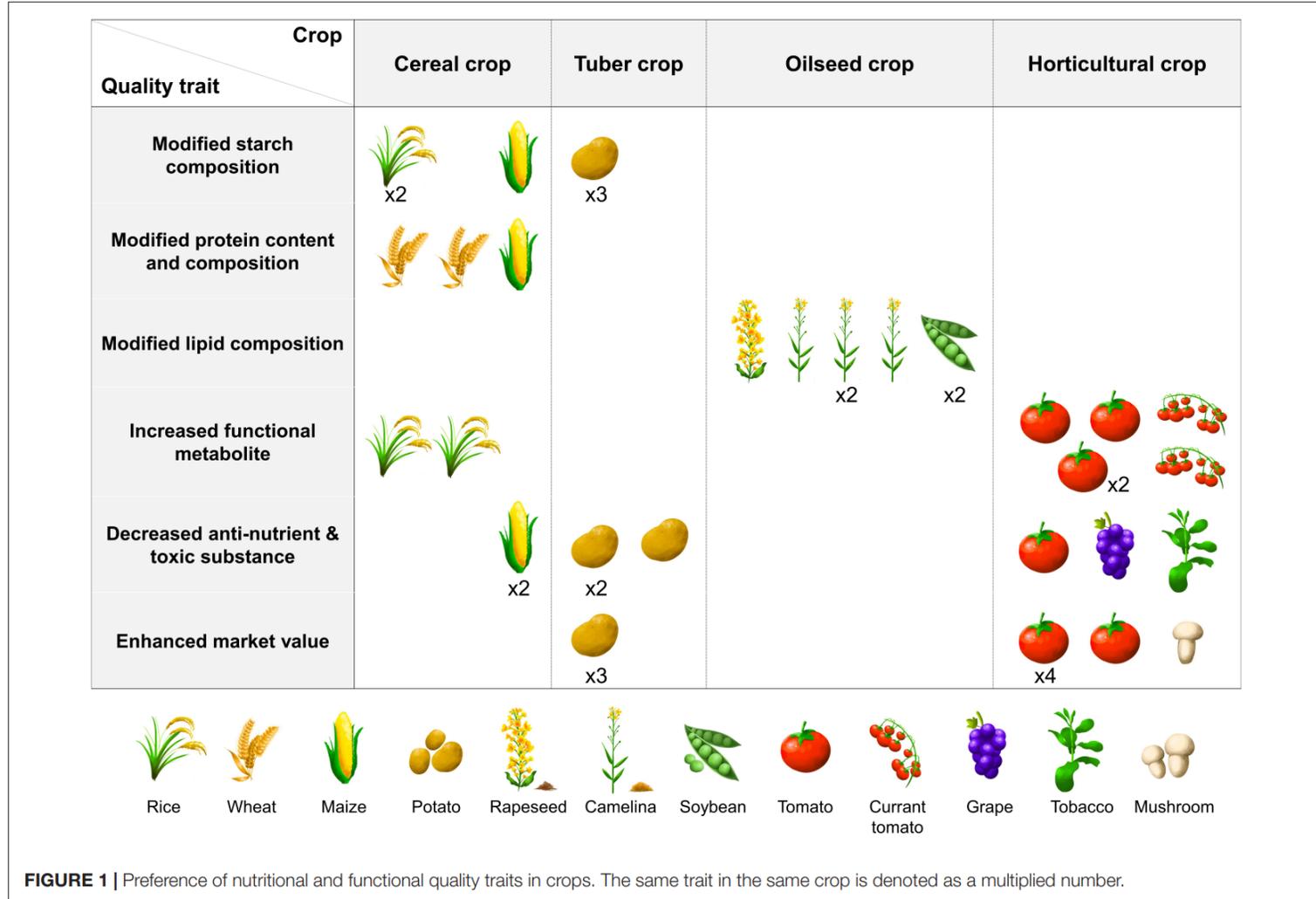


Le piante di soia modificate hanno prodotto quasi quattro volte più acido oleico rispetto ai WT.

Quali le sfide più emergenti

Le ricerca scientifica e quella applicata si stanno maggiormente concentrando su:

- Migliore resistenza delle specie di interesse agronomico alle malattie, per ridurre la necessità di utilizzare pesticidi;
- Miglioramento della resistenza allo stress abiotico al fine di mitigare gli effetti dei cambiamenti climatici sulla nostra produzione di cibo;
- Migliori caratteristiche agronomiche al fine di aumentare le rese delle colture, migliorare la produttività ed evitare perdite pre-raccolta;
- Migliorare la qualità di alcuni prodotti anche per ampliare il mercato e andare incontro ai gusti del consumatore;
- Miglioramento delle caratteristiche nutraceutiche e di quei composti che possono avere effetti positivi sulla salute.



Alcune esempi recenti

Il database EU-SAGE contiene i dettagli di circa 60 specie di piante di successo.

Banana, removal of banana streak virus	Early flowering rice
Camelina with altered oil composition	Carotenoid enriched rice
Fungal resistant grapevine	Soybean with increased oil and protein content
Waxy maize hybrid	Strawberries that flower multiple times
Maize with enhanced grain yield	Sugarcane adjusted saccharification behaviour
Maize with enhanced yield under drought stress	Tomato, self-pruning, early flowering
Non-browning mushroom	Tomato, improved shelf life

eusage

European Sustainable Agriculture
Through Genome Editing



Current Opinion in Plant Biology

Pictures of banana plants showing symptoms of major diseases and pests. **(a)**: Banana Xanthomonas wilt, **(b)**: Fusarium wilt, **(c)**: Black Sigatoka, **(d)**: Banana bunchy top, **(e)**: Banana streak and **(f)**: Toppling of plant due to nematode infestation.

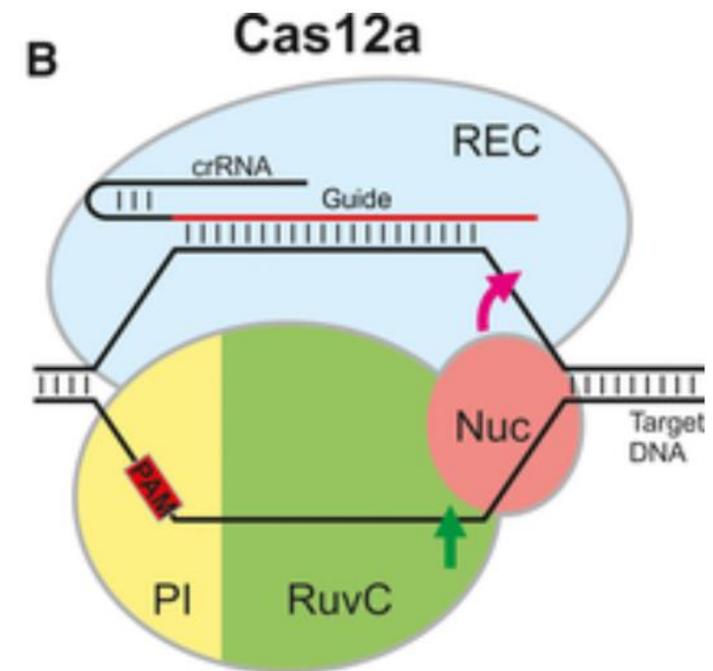
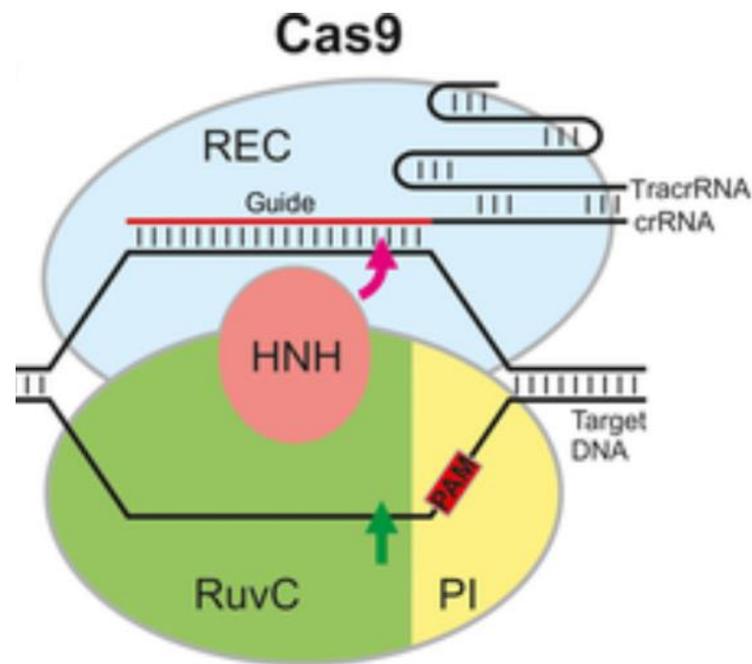
LIMITI del sistema CRISPR/Cas9 nelle piante

Spesso i costrutti sono grandi, la regione di SGRNA è lunga e soprattutto i siti PAM (NGG) non sempre sono adeguati per modificare le regioni di interesse.

Negli anni sono state sfruttate cspasi diverse. Ad esempio una molto usata nelle piante è Cas12.

Cas12a riconosce i PAM ricchi di AT pertanto può essere usata per colpire regioni genomiche ricche di AT. Produce DSB sfalsati, il che lo rende migliore per gli esperimenti basati sull'HDR. Cas12a richiede solo un breve CRISPR RNA (crRNA, ~42 nt), rendendo più economico da sintetizzare il costrutto.

Il DSB è mediato dai domini Nuc e RuvC, con il dominio Nuc che taglia il filamento target dopo la 18° bp a valle del PAM e il dominio RuvC che taglia il filamento non target dopo la 23° bp a valle del PAM



LA GUERRA DEL BREVETTO

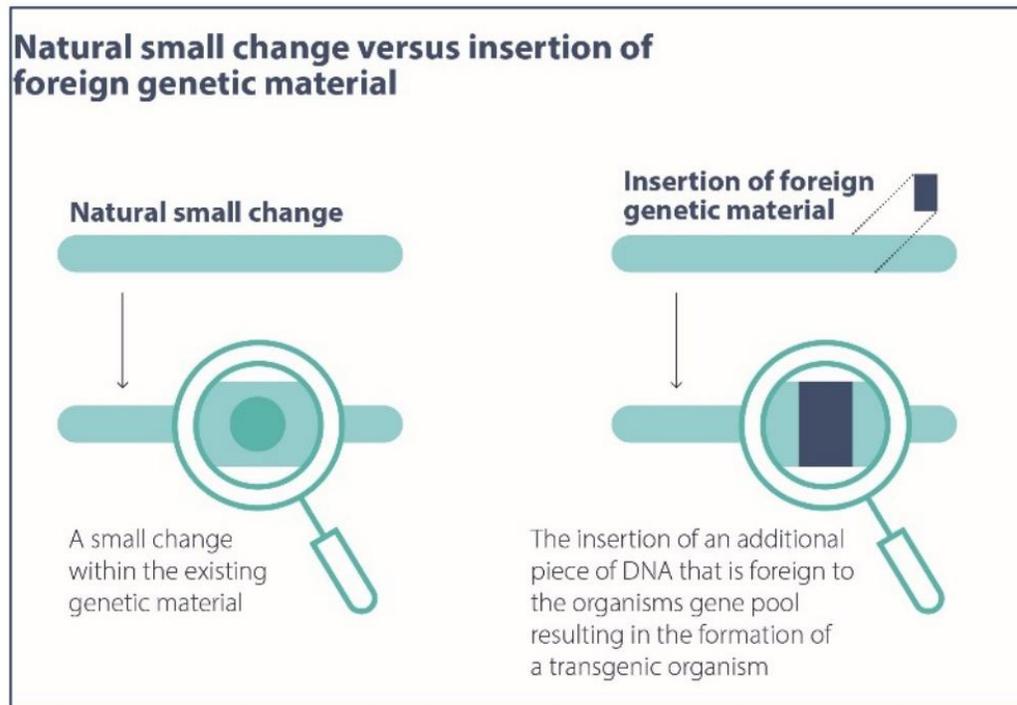
L'estrema versatilità e facilità di utilizzo di Crispr lo ha reso, naturalmente, estremamente appetibile dal punto di vista della proprietà intellettuale. Ad aprile 2014, Feng Zhang, del Broad Institute al Massachusetts Institute of Technology, uno dei pionieri dell'utilizzo della tecnica per la modifica del genoma nelle cellule dei mammiferi, ha registrato il brevetto statunitense per il Crispr-Cas9.

Anche se, come ricorda Scientific American, già diversi mesi prima che Zhang inviasse la domanda di brevetto (nel 2012), i biologi molecolari Jennifer Doudna, della University of California, Berkeley, e Emmanuelle Charpentier, del Max Planck Institute for Infection Biology di Berlino avevano a loro volta reclamato la paternità della tecnica. Al momento, la matassa è al vaglio dello United States Patent and Trademark Office, e in Europa è scoppiato un caso analogo. Tutti e tre gli scienziati hanno fondato un'azienda (a testa) che fa uso della tecnica Crispr-Cas9.



Genome Editing e OGM: cosa dice la legge

La legge europea definisce gli OGM come "organismi in cui il materiale genetico (DNA) è stato alterato in un modo che non si verifica naturalmente per accoppiamento o ricombinazione naturale". Tuttavia, gli OGM sviluppati negli anni '90 utilizzavano anche metodi diversi, meno precisi, rispetto ai nuovi strumenti di editing del genoma.



Vi sono due differenze chiave tra gli OGM tradizionali e il genome editing.

1) La prima è che nelle piante il genome editing viene usato prevalentemente per introdurre piccole mutazioni che possono anche sorgere spontaneamente in natura o attraverso il breeding tradizionali; al contrario la transgenesi generalmente comporta l'aggiunta di una nuova funzione alla pianta (uno o più geni) che non sarebbe potuto accadere altrimenti.

2) Quando invece l'editing del genoma viene utilizzato per generare una nuova funzione (inserzione di un gene con DNA donor) la differenza con la transgenesi è che l'inserimento viene eseguito in una posizione predeterminata del genoma con minori rischi di alterazione genomica (variazioni somaclonali).

Genome Editing è esente da errore?

Assolutamente no!

L'editing del genoma con CRISPR-Cas è accurato tuttavia sono state documentati:

- tagli e modifiche anche in siti Non target (v. Modrzejewski et al., 2020);
- nel sito bersaglio possono verificarsi ulteriori cambiamenti direttamente adiacenti al punto in cui il DNA è stato tagliato, causati da una riparazione imperfetta;
- la proteina Cas può tagliare il DNA in posizioni Non target per esempio in regioni con sequenza di DNA molto simile al sito bersaglio.

E' improntate sapere che anche il breeding classico produce modificazioni rilevanti nei genomi non solo nelle regioni di interesse. F1 risultate di fatto eredita genomi diversi e talvolta questi derivano da specie filogeneticamente lontane.

Si potrebbero incentivare metabolismi secondari particolari che producono prodotti tossici o alterare la fisiologia della pianta!



Which Factors Affect the Occurrence of Off-Target Effects Caused by the Use of CRISPR/Cas: A Systematic Review in Plants

*Dominik Modrzejewski**, *Frank Hartung**, *Heike Lehnert*, *Thorben Sprink*, *Christian Kohl*, *Jens Keilwagen* and *Ralf Wilhelm*

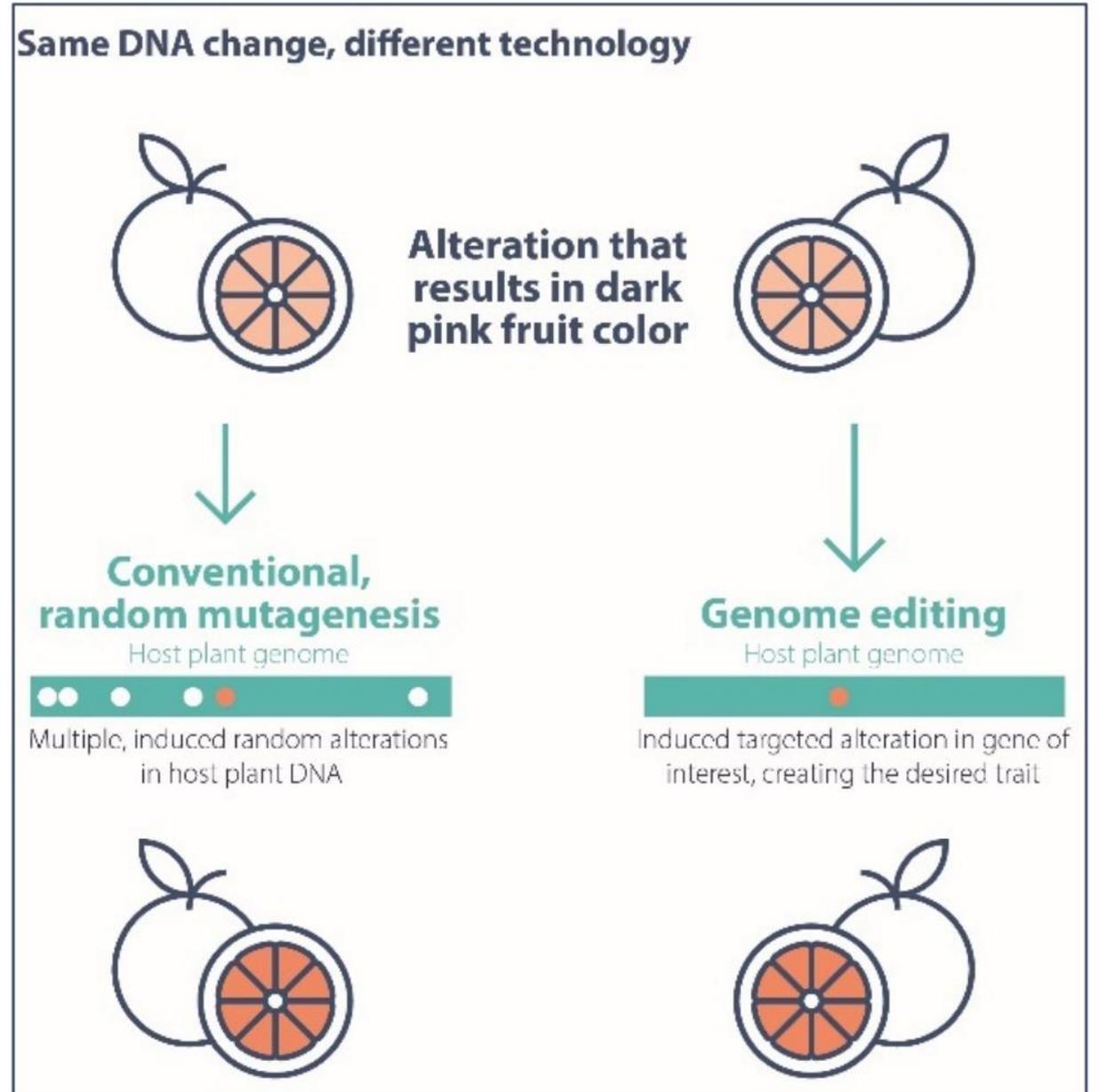
Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Biosafety in Plant Biotechnology, Julius Kühn-Institute, Quedlinburg, Germany

Genome editing: grado di rischio

In termini relativi, i rischi del genome editing sono inferiori a quelli prodotti attraverso mutagenesi casuale convenzionale che fa uso di radiazioni o sostanze chimiche per indurre cambiamenti genetici in quanto in questo processo vengono indotte diverse migliaia di mutazioni. Eppure questo viene accettato e oggi sono disponibili più di 3 000 varietà di colture prodotte utilizzando le radiazioni.

Ad esempio per ottenere la variante pompelmo rosa con mutagenesi chimica e fisica si indurranno centinaia o migliaia di mutazioni e si selezioneranno le più adatte guardando certamente la polpa e pochi altri tratti. Questo significa che il potenziale pericolo di altre mutazioni non verrà valutato.

Anche nel caso del genome editing, ma i rischi di mutazioni non target, ovvero in siti non desiderati, sono molto molto inferiori!



Genome Editing e OGM: diffusione

L'approccio CRISPR-Cas è stato rapidamente adottato nelle attività di ricerca per il miglioramento delle piante coltivate in tutto il mondo. La maggior parte delle attività si svolge in Cina, seguita da USA, UE e Giappone.

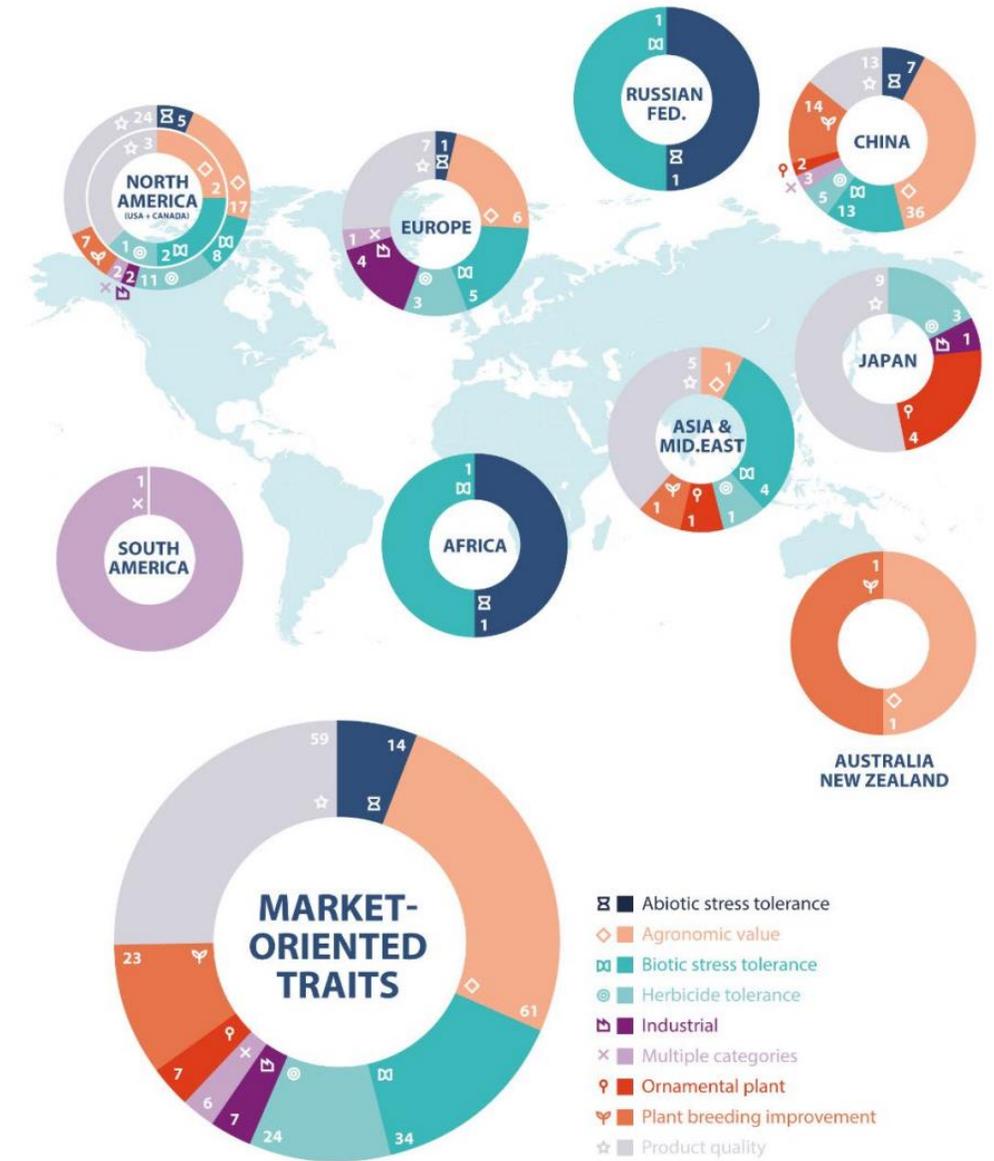
Altri paesi molto impegnati sono Brasile, Argentina, Israele, Russia, Arabia Saudita, India, Corea, Filippine e Turchia.

America Latina: Cile, Colombia e Costa-Rica

Africa: Sud Africa, Kenya, Etiopia e altri

Negli Stati Uniti, il numero di colture modificate nel genoma, orientate al mercato in fase di sviluppo, è il più alto, seguito da Cina ed Europa. Negli USA la più redditizia è la soia con olio arricchito di monoinsaturi. In Giappone è il pomodoro con GABA.

Global distribution of market-oriented genome editing applications



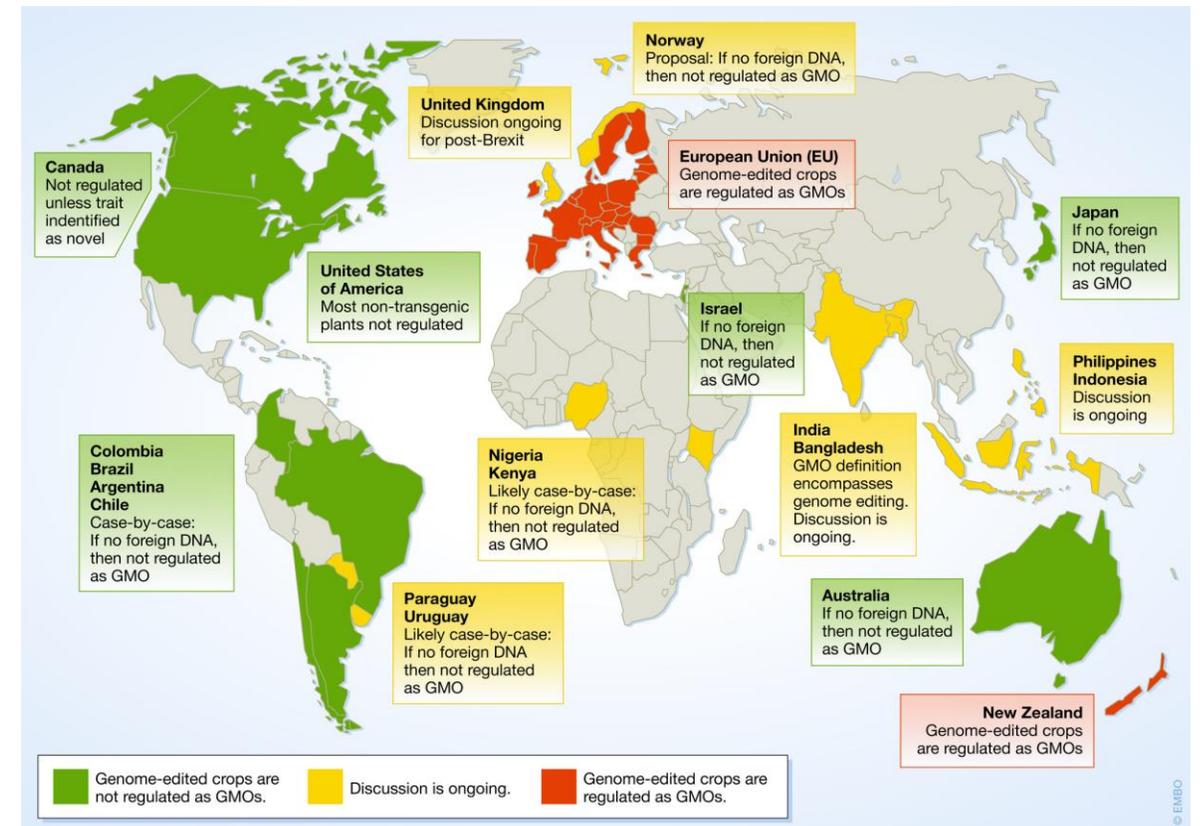
Genome Editing e OGM: cosa dice la legge.

NEL MONDO: USA e Canada non regolamentano il Genome Editing se l'alterazione genetica **sarebbe potuta avvenire con metodi tradizionali ovvero breeding**. Questo significa che le piante modificate con il genoma non sono soggette ai protocolli di sicurezza degli OGM e ai requisiti di etichettatura.

EUROPA: Nel 2018 la Corte di giustizia della UE ha confermato nella causa C-528/16 che gli organismi ottenuti mediante genome editing sono da considerarsi a tutti gli effetti uguali agli OGM.

La Corte ha inoltre stabilito che sono esclusi dal campo di applicazione di tale direttiva solo gli organismi ottenuti mediante tecniche di mutagenesi che sono state utilizzate convenzionalmente e hanno una lunga esperienza in materia di sicurezza.

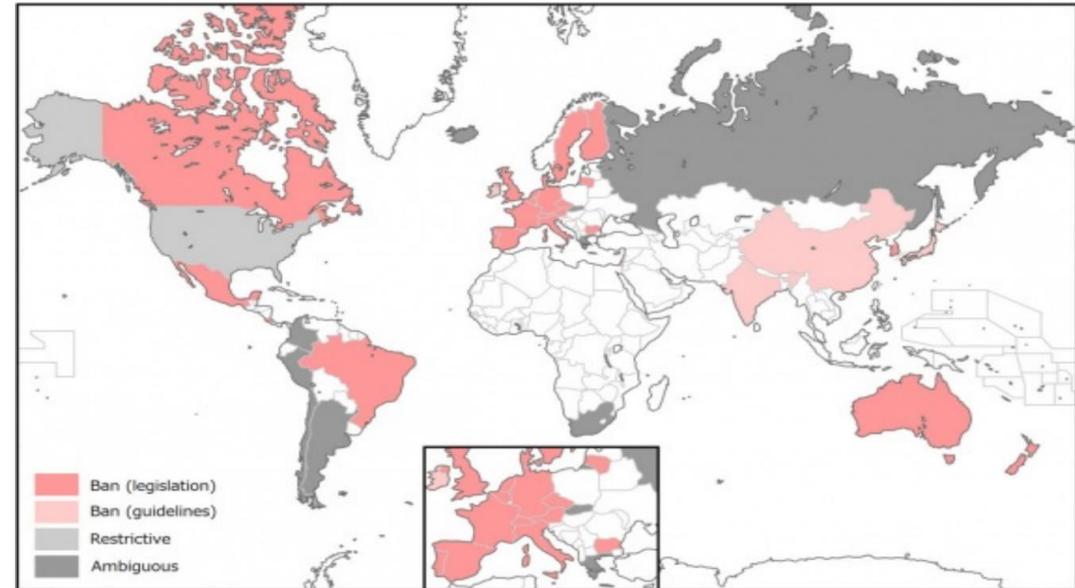
L'Inghilterra sta adottato una posizione simile. Alcuni Paesi, come il Brasile e l'Argentina, stanno trattando le piante modificate a livello genomico come quelle convenzionali, a meno che non contengano DNA estraneo.



Cosa sta cambiando

L'Argentina ha deciso di entrare nelle valutazioni caso per caso e questo è un esempio che stanno seguendo diversi Paesi; si va dagli USA in cui FDA mantiene un processo di consultazione volontaria sulla sicurezza alimentare combinato con una rigorosa legislazione sulla responsabilità in materia di sicurezza alimentare fino al Giappone e Australia, in cui gli organismi modificati dal genoma con piccole modifiche genetiche (cfr. SDN-1) non sono soggetti alla legislazione sugli OGM.

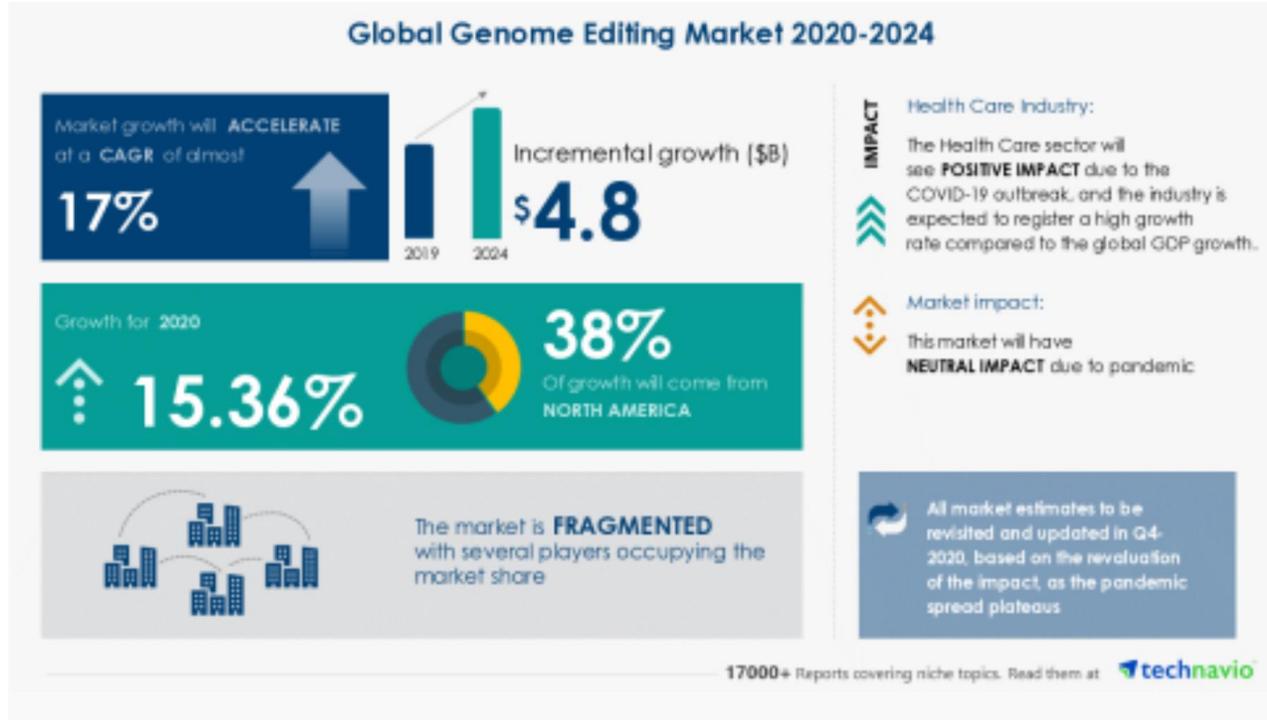
Nell'UE, la Commissione Europea ha avviato il processo per lo sviluppo di una proposta normativa capace di distinguere l'applicazione di mutagenesi e cisgenesi mirate. Si prevede che la Commissione presenterà una proposta di regolamentazione nel secondo trimestre del 2023.



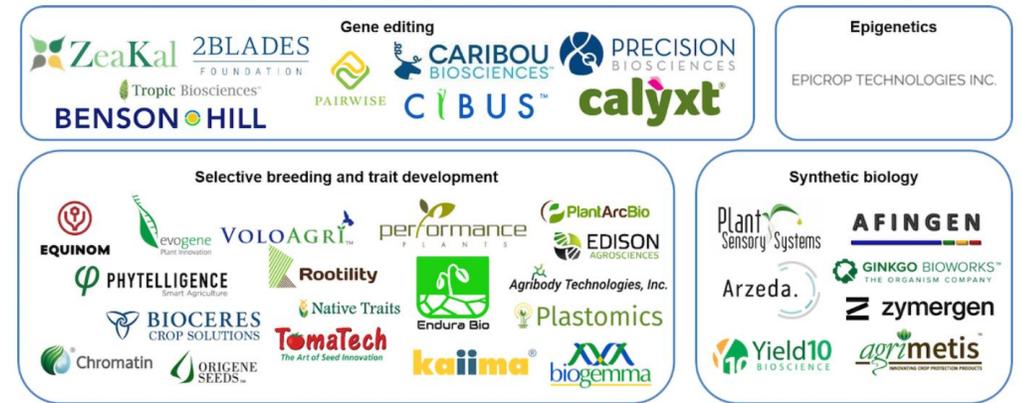
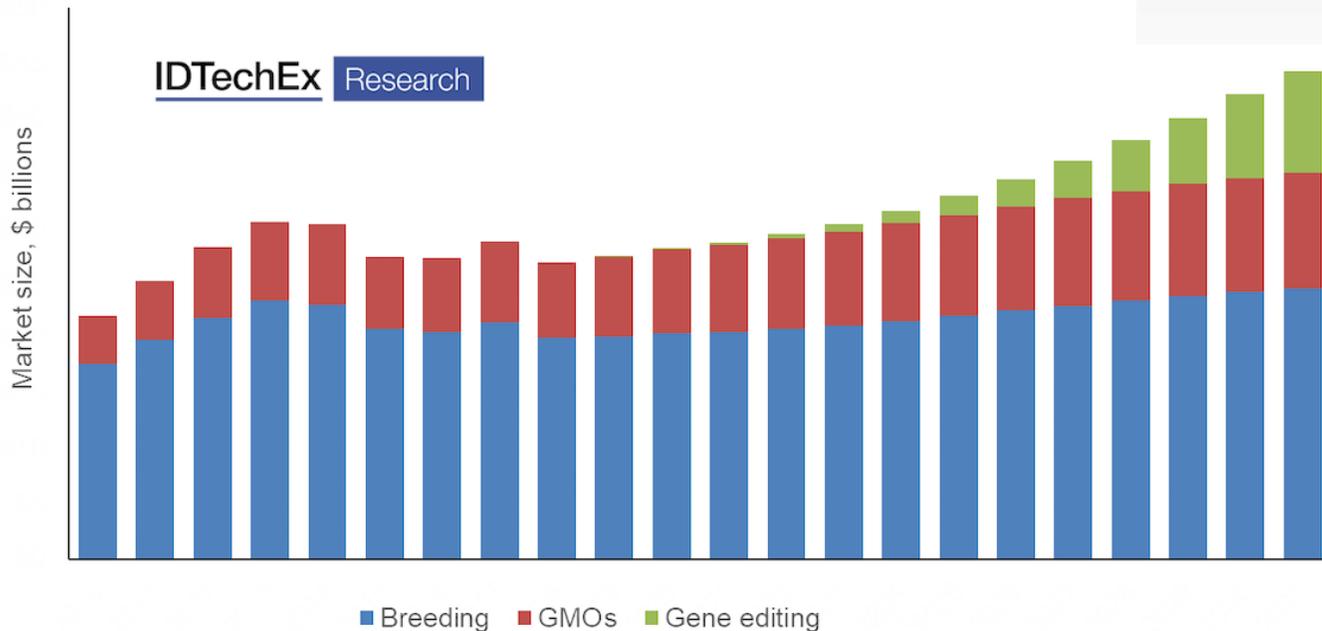
Legislatura

Ancora non esiste un *corpus* di leggi che legiferi l'ingegneria genetica in modo uniforme in tutto il mondo. Proprio per questo motivo, diversi scienziati e bioeticisti stanno cercando di mettere a punto delle linee guida condivise che regolamentino l'attività di ricerca nei laboratori di tutto il mondo, salvaguardando la sicurezza dei pazienti e scongiurando il rischio di pratiche eugenetiche *et similia*.

Crescita del mercato



Global crop biotechnology seeds market by method, 2010-2031



The crop biotechnology start-up landscape. Source: IDTechEx