



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Webinar

**"NUOVE TECNICHE GENOMICHE PER MIGLIORARE LA
SOSTENIBILITÀ DELLE COLTURE AGRARIE: POTENZIALITÀ
APPLICATIVE E SVILUPPI NORMATIVI"**

Venerdì 21 Ottobre, Bologna

**Prime applicazioni dell'editing genomico e della
cisgenesi per il miglioramento genetico di
specie arboree**

Stefano Tartarini

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari

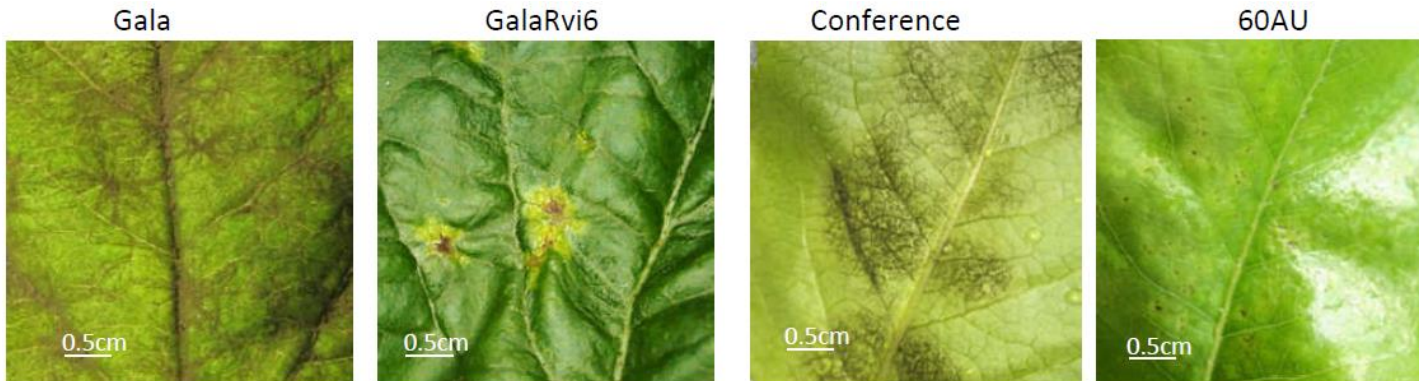
Esempi di cisgenesi in piante da frutto

- Resistenza a ticchiolatura

The development of a cisgenic apple plant

Thalia Vanblaere^a, Iris Szankowski^a, Jan Schaart^b, Henk Schouten^b, Henryk Flachowsky^c, Giovanni A.L. Broggini^a, Cesare Gessler^{a,*}

Journal of Biotechnology 154 (2011) 304–311



→ trasferimento geni fra melo e pero

bioRxiv preprint doi:

<https://doi.org/10.1101/2021.05.31.446424>

Perchepped et al., 2021

- Resistenza a colpo di fuoco batterico



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

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

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0143980 December 1, 2015



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Esempi di DNA editing in piante da frutto

Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system

Chikako Nishitani¹, Narumi Hirai¹, Sadao Komori², Masato Wada³, Kazuma Okada³, Keishi Osakabe⁴, Toshiya Yamamoto¹ & Yuriko Osakabe⁴

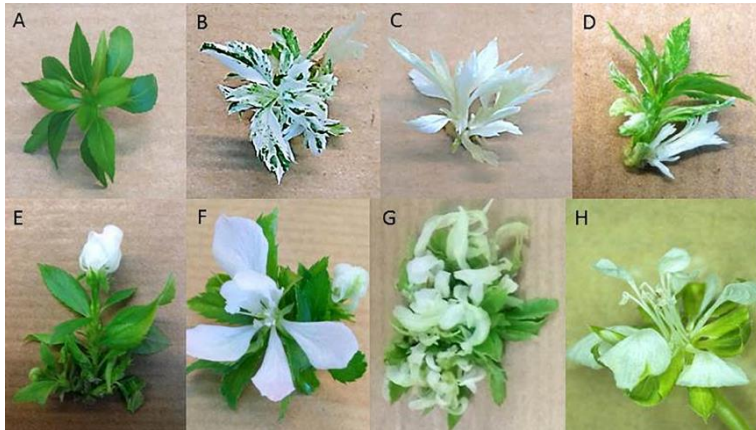
SCIENTIFIC REPORTS | 6:31481 | DOI: 10.1038/srep31481 - 2016



Targets:

PDS gene

TFL-1 gene



Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System

Aur lie Charrier[†], Emilie Vergne[†], Nicolas Dousset, Andr a Richer, Aur lien Petiteau and Elisabeth Chevreau^{*}

published: 06 February 2019
doi: 10.3389/fpls.2019.00040

Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system

Valerio Pompili^{1,2,*} , Lorenza Dalla Costa¹, Stefano Piazza¹, Massimo Pindo¹ and Mickael Malnoy^{1,*}

Plant Biotechnology Journal (2020) 18, pp. 845–858



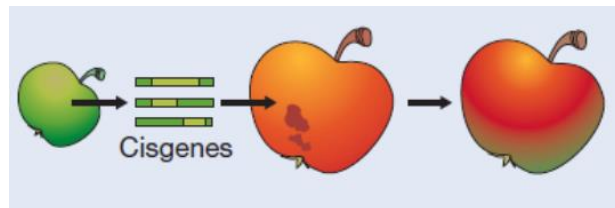
Primi risultati del progetto Biotech (aprile 2020 – gennaio 2023)



Sottoprogetto: Approcci biotecnologici di nuova generazione per migliorare la produttività e la sostenibilità delle specie da frutto

Due linee di ricerca presso l'Università di Bologna (DISTAL):

- Utilizzo della cisgenesi per ottenere piante di pero resistenti al colpo di fuoco batterico



- Utilizzo del DNA editing per migliorare la stabilità produttiva di piante di pero
→ silenziamento del gene responsabile dell'autoincompatibilità



«Cisgenesi» per resistenza al colpo di fuoco batterico in pero

Due geni di resistenza al colpo di fuoco batterico clonati in specie selvatiche di melo:

- da *Malus x robusta* #5 → CC-NBS-LRR type

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

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

- da *Malus fusca* → RLK type



Towards map-based cloning of *FB_Mfu10*: identification of a receptor-like kinase candidate gene underlying the *Malus fusca* fire blight resistance locus on linkage group 10

Ofere Francis Emeriewen • Klaus Richter • Stefano Piazza • Diego Micheletti •
Giovanni A. L. Broggini • Thomas Berner • Jens Keilwagen • Magda-Viola Hanke •
Mickael Malnoy • Andreas Peil



«Cisgenesi» per resistenza al colpo di fuoco batterico in pero

Schema costrutti disponibili per cisgenesi

Transgeni in **rosso**

Cisgene in **verde**

LB = Left border

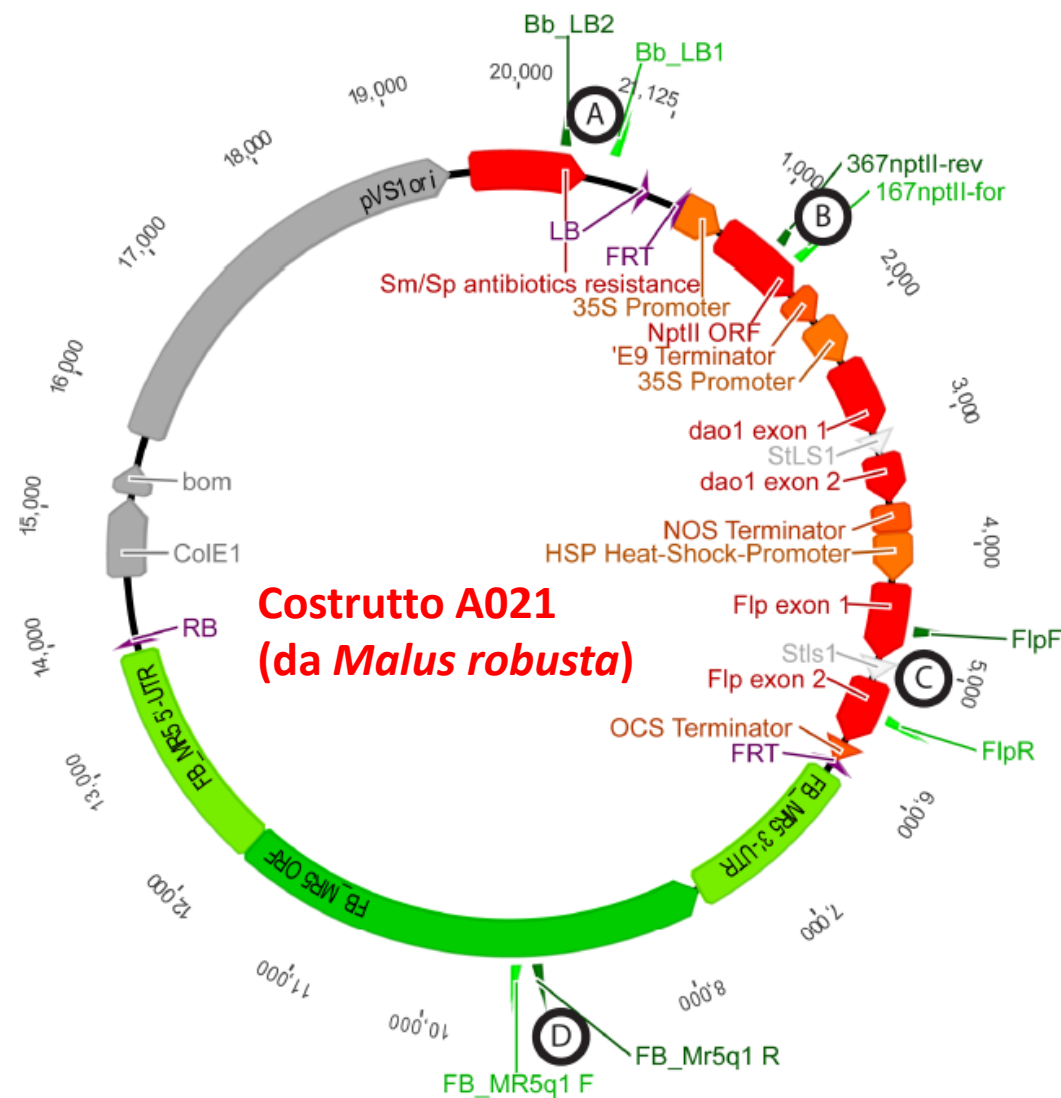
RB = Right border

FRT = Sito riconoscimento Flippase
Heat shock promoter

nptII = neomicina fosfotransferasi

Costrutto D034 (da *Malus fusca*)

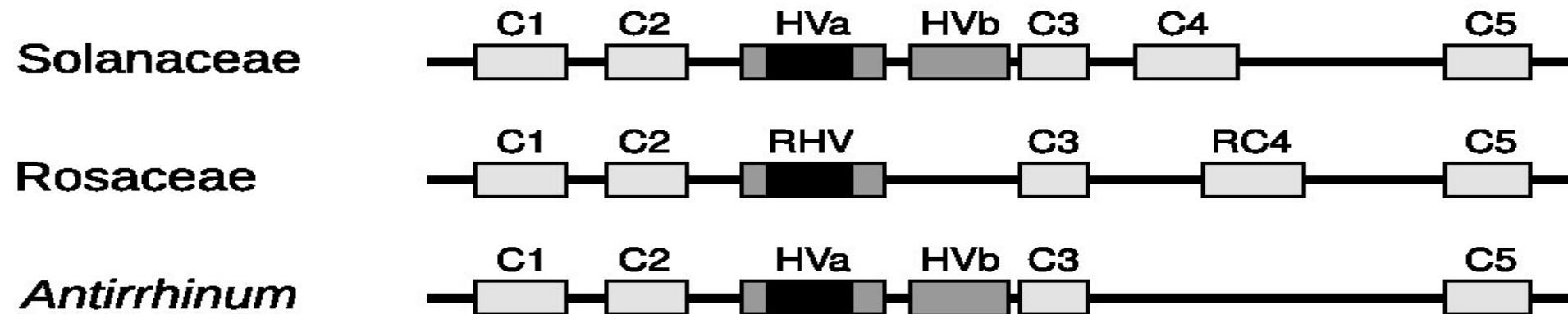
Trasformazione: Luglio 2021



DNA editing sul gene dell'autoincompatibilità gametofitica in pero

Nelle Rosaceae l'autoincompatibilità è controllata da una “**Ribonucleasi codificata dal locus S**”

S-RNasi



Erano note le sequenze delle *S-RNasi* di ‘Conference’ S108 – S121 → disegno RNA guida



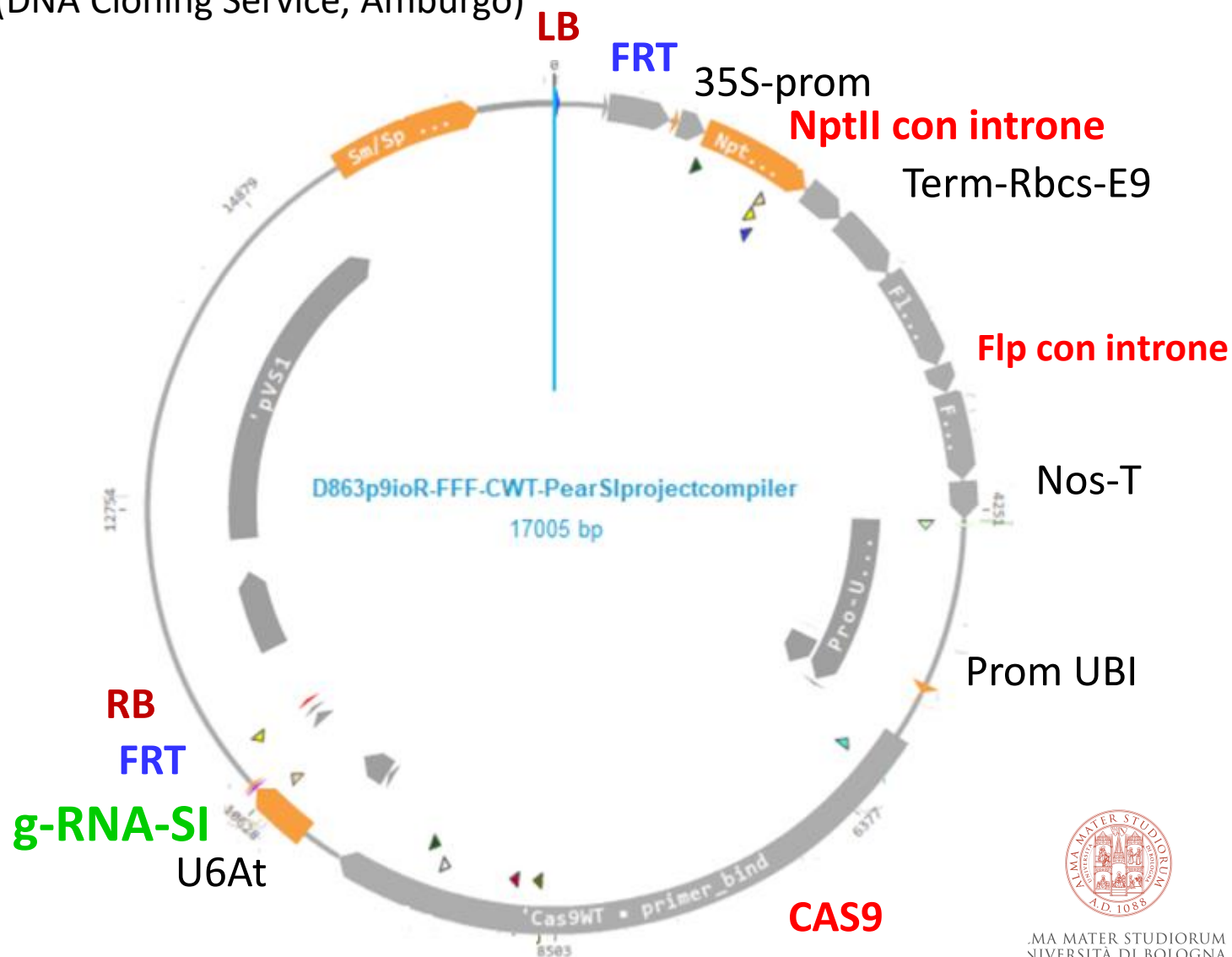
Metodo scelto: «Plasmid-mediated genome editing»

Disegno e assemblaggio di 2 costrutti (DNA Cloning Service, Amburgo)

- D863 (1 gRNA su gene *RNasi*)
- E444 (2 gRNA: *RNasi* + *TFL-1*)

Trasferimento in Agrobatteri EHA105

Trasformazione: Agosto 2021



Risultati in pero

DNA editing



E444



D863



Cisgenesis



D034



Codice esperimento	Tecnica	Target	Genotipo
CIS-A021	Cisgenesi	<i>FB_Mr5</i>	Conference
CIS-D034	Cisgenesi	<i>FB_Mfu10</i>	Conference
CRISPR-D863	DNA-editing	<i>S-RNAsi</i>	Conference
CRISPR-E444	DNA-editing	<i>S-RNAsi</i> e <i>TFL1.1</i>	Conference

Efficienze di rigenerazione (2-20%)
e trasformazione (0,5-18%)
relativamente basse

Verifiche molecolari ancora in corso

Costrutto	Linee analizzate	<i>nptII</i>	<i>Flp</i>	<i>Mr5</i>	<i>Mfu10</i>
CIS-A021	29	26	24	26	-
CIS-D034	7	7	7	-	7
CRISPR-D863	6	3	3	-	-
CRISPR-E444	6	6	3	-	-



Conclusioni

- ✓ Dimostrata la fattibilità delle applicazione cisgenesi e DNA editing in piante da frutto
- ✓ Promettenti i primi risultati ottenuti al DISTAL
- ✓ Necessario completare le analisi molecolari, rendere le piante cisgeniche e soprattutto effettuare le verifiche fenotipiche
- ✓ Le sequenze di diversi genomi di piante da frutto sono già disponibili (i.e. melo, pero, pesco, fragola)
- ✓ Indispensabile arricchire le conoscenze sulle funzioni geniche per avere nuovi candidati da poter utilizzare in futuri esperimenti di cisgenesi e DNA editing

→ migliorare la sostenibilità e salubrità delle produzioni frutticole



Gruppo di ricerca del DISTAL:

- Dott.ssa Paola Negri (responsabile del laboratorio di colture in vitro)
- Dott.ssa Cecilia Domenichini e Dott. Marco Defrancesco (borse di studio)
- Prof. Luca Dondini

Collaborazioni esterne:

- Dr. Mickael Malnoy (FEM, San Michele all'Adige)
per preparazione costrutti e analisi molecolari
- Dr. Andreas Peil (JKI, Dresda)
per resistenza al colpo di fuoco batterico da *M. fusca*
- Dr. Giovanni Broggini (ETH, Zurigo) e Dr. Andrea Patocchi (Agroscope, Wädenswil)
per resistenza al colpo di fuoco batterico da *M. robusta*

