



Società Italiana di Genetica Agraria

Società Italiana di Biologia Vegetale



***Considerazioni riguardo la tecnica del genome editing
per il miglioramento genetico delle colture agrarie***

Riassunto e raccomandazioni

- Le modifiche genetiche che avvengono casualmente in natura sono state essenziali per l'evoluzione delle piante coltivate e sono quindi alla base della nostra stessa esistenza. Tutte le piante che coltiviamo oggi sono il risultato di un lungo processo di selezione di piante mutate che, partendo dalle specie selvatiche presenti in natura, ha portato ad ottenere piante adatte alla coltivazione, che consentono all'umanità di alimentarsi in maniera sempre più completa, sana ed economica.
- Per ottenere piante sempre migliori, a partire dalla metà del secolo scorso nuove mutazioni sono state introdotte con tecnologie dagli esiti casuali e dunque poco prevedibili. Queste piante non sono sottoposte a regolamentazioni particolari. Da alcune decine d'anni sono state sviluppate tecnologie più precise e dunque dagli effetti meglio prevedibili: la modificazione genetica tramite le tecnologie del DNA ricombinante (le piante ottenute sono comunemente definite OGM) e, molto recentemente, il *genome editing* (correzione o revisione del genoma), che può essere utilizzato per introdurre modificazioni indistinguibili da possibili mutazioni naturali. Queste piante sono sottoposte a rigida regolamentazione (OGM) o sono al momento in uno stato di vuoto normativo (*genome editing*).
- In più di vent'anni non sono stati evidenziati pericoli specifici per la salute o l'ambiente associati agli OGM coltivati. Al contrario, spesso sono stati riscontrati effetti positivi per l'ambiente e l'economia. E' doveroso proseguire l'azione di monitoraggio, come d'altronde è giusto esaminare accuratamente gli effetti di ogni pratica agricola e ogni coltivazione, tradizionale o innovativa. Tuttavia, la severità delle normative per coltivazioni OGM impone costi economici che di fatto favoriscono le grandi multinazionali a discapito delle piccole imprese e della ricerca pubblica. I tempi appaiono maturi per passare ad una normativa che moduli il livello di controllo in base alle specifiche tecnologie usate e alla novità genetica introdotta e che quindi **giudichi una varietà vegetale non solo in base alla tecnologia utilizzata per produrla ma soprattutto in base alle caratteristiche della varietà ottenuta.**
- In tale prospettiva **raccomandiamo di rivedere la Direttiva europea 2001/18/EC, che regola la coltivazione di OGM, predisponendo normative specifiche basate sull'eventuale pericolosità o meno dei prodotti, cioè la combinazione dei geni utilizzati con la specie che li riceve.**
- Un'eventuale decisione di regolamentare come OGM i prodotti del *genome editing* che risultano indistinguibili da eventuali mutazioni naturali sarebbe un grave errore sotto l'aspetto scientifico, normativo, logico ed economico. **Fintanto che la Direttiva 2001/18/EC rimarrà invariata, raccomandiamo che i prodotti di *genome editing*, ove non presentino combinazioni di geni diverse da quelle potenzialmente risultanti da mutagenesi casuale naturale o incrocio, siano esclusi dal suo campo d'applicazione.**

Viviamo un'epoca di grandi cambiamenti sociali, economici e dell'ambiente naturale. Alcuni di essi sono particolarmente rapidi e profondi. Una delle conseguenze forse poco evidenti per il grande pubblico, ma di probabile grande importanza per il nostro futuro, è la grande pressione che sta subendo l'agricoltura, per fornire alimenti in quantità sufficiente e di qualità sempre migliore a una popolazione globale tuttora in crescita, nel contempo salvaguardando l'ambiente. A questo scopo, tutte le pratiche agricole sono continuamente revisionate e migliorate basandosi sui risultati della ricerca scientifica. In particolare, il miglioramento genetico ha fornito storicamente e continua a fornire gli strumenti principali per ottenere raccolti sempre più nutrienti e adatti a un mondo che cambia velocemente e per ridurre l'impatto ambientale dell'agricoltura.

La ricerca produce nuove conoscenze e nuove tecnologie, alla luce delle quali la società aggiorna le proprie opinioni e le relative norme, per evitare che le regole in vigore risultino equivocabili, inattuali o inapplicabili. Con questo documento intendiamo fornire informazioni scientifiche e proporre raccomandazioni riguardo alle piante ottenute mediante alcune delle tecniche denominate *New Plant Breeding Techniques* (nuove tecniche di miglioramento genetico delle piante), in particolare quelle dette di "genome editing" (correzione o revisione del genoma), inquadrando nel più ampio dibattito sulle piante prodotte con le tecnologie del DNA ricombinante, comunemente e collettivamente definite piante geneticamente modificate (piante GM) o usando un termine più generico organismi geneticamente modificati (OGM). Poiché in realtà il miglioramento genetico delle piante coltivate avviene da quando è nata l'agricoltura, consideriamo importante sviluppare la discussione anche in rapporto alle diverse tecnologie già utilizzate da tempo.

Altri documenti e prese di posizione su questi argomenti sono stati recentemente preparati e resi pubblici da organizzazioni e società scientifiche europee e di Paesi membri¹. Vi è un sostanziale accordo sulle raccomandazioni che si ritiene necessario e urgente fornire.

1) L'importanza delle mutazioni nelle piante coltivate

Le piante coltivate sono frutto della selezione operata dagli esseri umani nel corso dei millenni e hanno caratteristiche dovute a mutazioni casuali che le differenziano notevolmente dalle specie selvatiche. Queste caratteristiche sono positive per noi - maggiore produttività o qualità - ma spesso negative per la "autonomia" della pianta: l'insieme dei caratteri associati alla domesticazione, la cosiddetta "sindrome da domesticazione", rende le piante coltivate inadatte a sopravvivere nell'ambiente naturale. Un effetto simile si ha nell'allevamento animale, a scopo economico o ludico: basti pensare che gran parte delle razze canine da noi selezionate non potrebbero sopravvivere senza l'accudimento umano.

Per le piante, l'esempio più eclatante è la perdita della capacità di disperdere i semi nei cereali e legumi coltivati (Figura 1): una caratteristica che ovviamente facilita la raccolta da parte dei coltivatori, ma rende la pianta quasi incapace di riprodursi spontaneamente. Se queste mutazioni, avvenute per caso, non fossero state selezionate dai primi agricoltori, esse sarebbero state eliminate dalla selezione naturale. Esempi di questo tipo sono molto numerosi fra le piante coltivate.

¹ Comitato consultivo delle accademie nazionali delle scienze dei paesi membri della EU (EASAC):

<http://www.easac.eu/home/reports-and-statements/detail-view/article/easac-statem-2.html>

European Plant Science Organization (EPSO): <http://www.epsoweb.org/file/2147>

Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), Regno Unito:

<http://www.bbsrc.ac.uk/news/policy/2014/141028-pr-position-statement-on-crop-breeding-techniques/>



Fig. 1. Riso coltivato e selvatico

La cosiddetta “sindrome da domesticazione” è quindi il risultato dell’accumulo di una o più mutazioni nel DNA, che si traducono nell’alterazione dell’espressione di specifici geni o della loro funzionalità. **Tutte le piante coltivate sono quindi organismi geneticamente modificati** rispetto alle piante selvatiche da cui derivano, e tale modifica è intrinseca all’agricoltura. Non ha dunque senso giudicare a priori come pericolosa o negativa una modifica genetica, bensì è il suo effetto (la pianta risultante) che va analizzato e valutato.

2) Il miglioramento genetico tramite incrocio e selezione

Il presupposto fondamentale per il miglioramento genetico è la variabilità genetica, cioè la disponibilità di piante con caratteristiche diverse ma appartenenti alla stessa specie o specie molto simili e comunque sessualmente compatibili, tra cui individuare quelle con le caratteristiche desiderate.

Le cellule contengono almeno due copie di ogni gene, denominate “alleli”. Come noto, ogni individuo riceve una copia da ciascun genitore. I due alleli possono essere identici, ma spesso presentano piccole differenze dovute a mutazioni casuali. L’incrocio fra individui genera nuove combinazioni di alleli e quindi nuova variabilità genetica (Figura 2). Il numero dei geni varia da circa 25.000 a 80.000 a seconda della specie, e dunque il numero delle possibili nuove combinazioni da sottoporre a selezione è così grande da poter essere praticamente considerato illimitato. Per ottenere piante migliori, il selezionatore sceglie le piante da incrociare (parentali) e cercherà poi nella progenie quelle con nuove combinazioni di caratteristiche desiderate.

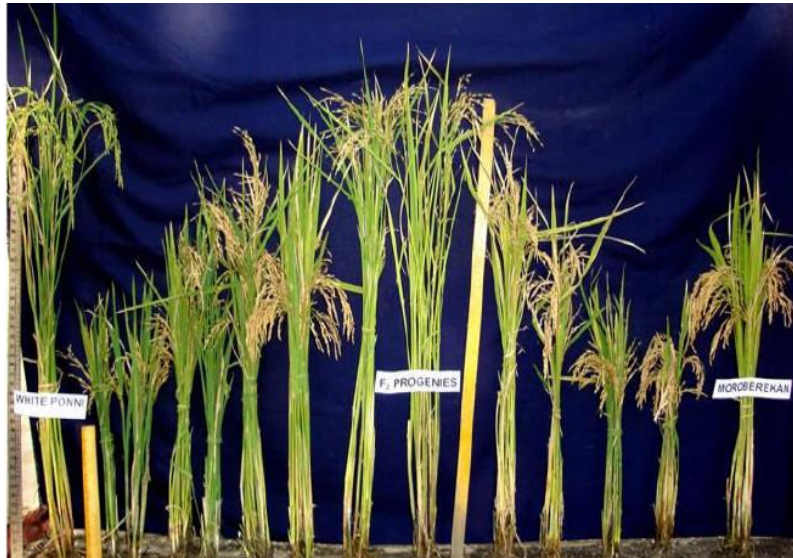


Fig. 2. Variabilità nella progenie di un incrocio tra due varietà di riso. Alle due estremità i genitori usati per l'incrocio. *Immagine di I. Selvaraj, Vellore University (India).*

L'ibridazione tra specie diverse ma sessualmente compatibili è prevalentemente utilizzata per trasferire dalla specie donatrice, per lo più una specie selvatica, alcuni geni e le corrispondenti caratteristiche assenti nella specie coltivata (es. resistenza a insetti o migliore qualità). L'incrocio però rimescola tutti i geni dei due genitori. Quando si desidera ottenere nuove varietà stabili bisogna perciò "ripulire" la pianta dai geni indesiderati che sono stati ereditati insieme a quelli desiderati, specialmente quando uno dei genitori è una pianta selvatica che è inadatta alla coltivazione. A questo scopo, per diverse generazioni si realizzano successivi re-incroci con il genitore coltivato, in modo da eliminare quanto più possibile i geni "selvatici". Il risultato finale sarà quindi una pianta quasi identica alla pianta iniziale, che conterrà poche decine o centinaia di geni della pianta donatrice, tra cui ovviamente quello o quelli che conferiscono la caratteristica desiderata, e manterrà nel contempo tutte o la maggior parte delle proprie caratteristiche positive. Questa procedura è definita "introgressione tramite reincrocio" ed è ad esempio largamente utilizzata per introdurre nuovi geni di resistenza ad agenti patogeni individuati in piante selvatiche o meno addomesticate.

3) Il miglioramento genetico tramite mutagenesi casuale

Disporre di una popolazione con una grande variabilità genetica significa avere maggiori possibilità di trovare individui migliori. Oltre ad utilizzare variabilità genetica esistente in natura, è possibile creare nuova variabilità inducendo l'insorgere di mutazioni con radiazioni ad alta energia (raggi X, raggi UV, raggi gamma), sostanze chimiche o strumenti biologici (es. sequenze naturali di DNA che spontaneamente cambiano posizione nel genoma). In ogni caso, il risultato è di creare nuovi alleli in una popolazione.

Questi trattamenti, utilizzati dalla metà del secolo scorso e ancora in uso, inducono modifiche casuali nella sequenza di centinaia o migliaia di geni, la maggior parte delle quali sono ignote come entità ed effetti. Le modifiche vanno dalle semplici sostituzioni di singoli nucleotidi (le "lettere" del codice genetico), alla delezione di decine di migliaia di lettere, allo spostamento d'interi "capitoli" (milioni di lettere) da una parte all'altra del genoma, alla duplicazione di alcuni geni e la perdita di altri. Come abbiamo visto, le mutazioni sono eventi naturali che accadono in tutte le specie; tramite la mutagenesi casuale indotta dall'uomo se ne

aumenta la frequenza e quindi si aumenta la probabilità di trovare mutazioni favorevoli. Esempi classici di mutanti creati con le radiazioni sono i frumenti duri semi-nani prodotti in Italia dalla ricerca pubblica negli anni '60 e '70 del secolo scorso (Figura 3), di cui Creso è la varietà più nota e utilizzata a livello mondiale per produrre nuovi frumenti da pasta. Anche molti alberi da frutto e ortaggi sono stati modificati con questa tecnologia.

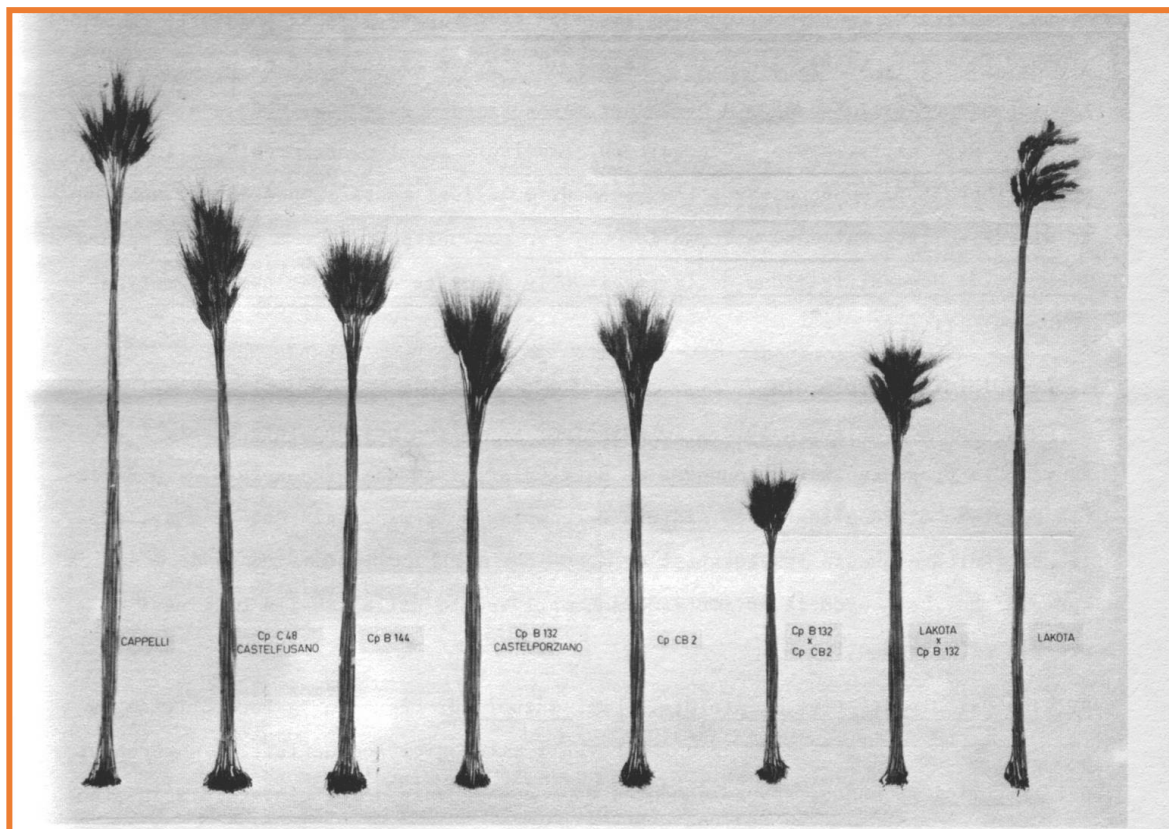


Fig. 3. Alcuni importanti mutanti di frumento duro prodotti in Italia mediante mutagenesi con radiazioni ionizzanti. CP B144 è stato utilizzato per ottenere il Creso.
Fonte: ENEA

Globalmente, le varietà coltivate create per mutagenesi sono più di 3000 e riguardano oltre 200 specie². Gli effetti delle mutazioni casuali sono altamente imprevedibili: non è possibile sapere a priori che tipo di mutanti emergeranno dal trattamento, ed è praticamente impossibile liberarsi completamente tramite incroci di tutte le mutazioni ignote prodotte e conservare unicamente quella desiderata. Nonostante questo, l'esperienza di oltre mezzo secolo su milioni di piante sottoposte a mutagenesi casuale ci permette di concludere che queste tecnologie non hanno causato i problemi o disastri ecologici paventati da alcuni, e giustifica il fatto che la mutagenesi casuale, benché correttamente definita "modificazione genetica" dalla direttiva europea 2001/18/EC che regola la coltivazione delle piante OGM, sia stata esplicitamente esclusa dal suo campo d'applicazione.

² Banca dati delle Varietà Mutanti (Mutant Varieties Database -MVD): <http://mvd.iaea.org>

4) Il miglioramento genetico tramite trasferimento orizzontale di geni

L'introduzione nel genoma di una sequenza di DNA proveniente da un individuo che può essere della stessa specie o di qualunque altra specie, ma non è un genitore, è chiamata trasferimento "orizzontale" di geni, per distinguerla dal trasferimento "verticale" fra genitori e figli. Si tratta di un caso particolare di modificazione genetica, che avviene con una certa frequenza in natura: il trasferimento orizzontale di geni fra una specie e l'altra è un fattore importante nell'evoluzione dei batteri e altri microbi. I sequenziamenti dei genomi evidenziano che il fenomeno, seppure raramente, avviene anche in piante e animali. Ad esempio, la patata dolce contiene naturalmente geni batterici nel proprio genoma³ ed è un alimento consumato giornalmente da centinaia di milioni di persone in tutto il mondo senza alcuna preoccupazione o regolamentazione particolare.

Se il trasferimento orizzontale di geni è eseguito in laboratorio artificialmente con le tecniche di ingegneria genetica, viene chiamato **transgenesi**. Gli organismi transgenici così prodotti sono comunemente definiti **Organismi Geneticamente Modificati (OGM)**. A questo scopo gli scienziati sfruttano spesso un meccanismo naturale attraverso cui un batterio, *Agrobacterium tumefaciens*, trasferisce alcuni geni alle piante che lo ospitano.

La produzione di piante GM permette di utilizzare geni di qualsiasi origine e quindi di aggiungere caratteri rari o del tutto assenti in una data specie o in quelle con essa sessualmente compatibili. Di conseguenza, si è rivelata una tecnologia estremamente potente per conferire caratteristiche di grande utilità: resistenza a insetti, virus o condizioni climatiche avverse, tolleranza a diserbanti, miglioramento della qualità dei raccolti, e perfino utilizzo delle piante per produrre farmaci e vaccini. A vent'anni dalla loro introduzione in agricoltura, gli OGM vegetali sono coltivati su una superficie di circa 180 milioni di ettari, che corrisponde a circa 15 volte la superficie coltivata italiana e rappresenta più del 12% della superficie coltivata globalmente. Non è sensato considerare la transgenesi in antitesi a tutte le altre tecniche di miglioramento genetico descritte sopra e utilizzate da migliaia o decine di anni: si affianca a esse, e come esse serve a conferire alle piante coltivate caratteristiche non ottenibili senza l'intervento umano.

La transgenesi effettuata in laboratorio è evidentemente tanto più distante dai processi di rimescolamento genico conseguenti all'incrocio quanto più i geni trasferiti derivano da specie diverse e non incrociabili sessualmente con la specie ricevente. Di conseguenza, in base all'origine del DNA trasferito, gli organismi formati con interventi di trasferimento orizzontale mediante ingegneria genetica sono classificati in tre gruppi:

- **transgenici**: la sequenza di DNA inserita proviene da un organismo che non si può incrociare sessualmente con l'organismo ricevente;
- **intragenici**: la sequenza di DNA proviene dalla stessa specie che viene trasformata o da specie sessualmente compatibili, ma in laboratorio è stata modificata oppure è stata alterata la porzione che ne regola l'espressione naturale (la cosiddetta sequenza regolatrice di un gene, che "decide" quando, quanto e in quali organi il gene è espresso);
- **cisgenici**: la sequenza proviene dalla stessa specie che viene trasformata o da specie sessualmente compatibili; la sequenza non è stata modificata e conserva la propria porzione regolatrice. Per quanto riguarda la caratteristica desiderata, il prodotto risultante è equivalente a quello che si potrebbe ottenere per introgressione tramite reincrocio (vedi la sezione 2), ma con il vantaggio di inserire il solo gene desiderato, senza portarsi dietro altri geni provenienti dal genitore donatore.

³ Kyndt et al. (2015) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112:5844-9.

Alcune delle numerose tecnologie di miglioramento delle piante coltivate basate sul DNA ricombinante sviluppate a partire dalla fine degli anni '90 del secolo scorso sono state collettivamente denominate *New Plant Breeding Techniques*, NPBT. Caratteristica comune alle NPBT è quella di produrre modificazioni genetiche molto simili se non indistinguibili da quelle ottenibili attraverso metodiche più tradizionali quali l'incrocio e la mutagenesi casuale. Le NPBT si sono giovate soprattutto delle maggiori conoscenze acquisite grazie allo sviluppo tumultuoso della genomica, la scienza che studia la struttura e le interazioni funzionali d'interi genomi. Un ruolo importante in questo sviluppo è stato svolto dalla ricerca pubblica italiana, che ha dato un contributo determinante alla caratterizzazione di numerosi genomi di piante d'interesse agrario e di rilevanza per la nostra agricoltura. Fra le NPBT è stata inclusa la produzione di organismi cisgenici (cisgenesi). E' attualmente in discussione a livello europeo se separare dal punto di vista normativo questa tecnologia da quelle di d'intragenesi e di transgenesi in senso stretto (vedi la sezione 6 e le raccomandazioni finali). Questo anche a seguito di un parere scientifico fornito alla Commissione Europea nel 2012 dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), nel quale si conclude che i rischi presentati dalle piante ottenute tramite cisgenesi sono simili a quelli delle piante ottenute tramite miglioramento genetico tradizionale⁴.

5) Il miglioramento genetico tramite genome editing

Alcune NPBT permettono di modificare in modo voluto e preciso una specifica sequenza di DNA senza spostarla dalla sua posizione naturale nel genoma, un procedimento definito *genome editing* (correzione o revisione del genoma). Il metodo più promettente è al momento il sistema CRISPR associato all'enzima CAS9 (CRISPR/CAS9), che si prevede soppianderà presto gli altri metodi per semplicità di uso. Per ragioni di brevità, questo è l'unico che descriveremo. L'enzima CAS9 è presente nel batterio *Streptococcus pyogenes* e fa parte della grande famiglia delle nucleasi, cioè enzimi in grado di tagliare il DNA. CAS9 è diretto verso posizioni precise del genoma grazie ad una molecola guida, un piccolo RNA, che può essere facilmente modificato in laboratorio e inserito all'interno di una cellula insieme al gene che codifica CAS9 o all'enzima stesso. Una volta raggiunto il sito bersaglio, CAS9 taglia il DNA: tale rottura è riparata dalla cellula con conseguenze che possono essere diverse a seconda della modalità in cui la tecnologia viene usata. Convenzionalmente si distinguono tre modi di utilizzo, indicati rispettivamente con le sigle SDN-1, SDN-2 ed SDN-3, in cui SDN è l'acronimo per Site Directed Nuclease (nucleasi sito diretta).

- SDN-1: la nucleasi opera il taglio nella molecola di DNA e il meccanismo di riparazione cellulare del DNA provvede a risaldare le estremità. Frequentemente, questo processo di riparazione produce mutazioni nel sito scelto per il taglio, che possono consistere in sostituzioni nucleotidiche oppure l'aggiunta o perdita di uno o pochi nucleotidi. Quando usato in questa maniera, il *genome editing* può essere considerato a tutti gli effetti un metodo di mutagenesi biologica mirata. Il risultato più frequente di tale processo di mutagenesi è quello di rendere inattivo il gene bersaglio, in maniera molto simile a quanto avviene con la mutagenesi casuale indotta da agenti fisici o chimici. A differenza del *genome editing*, la mutagenesi casuale genera tuttavia mutazioni in tutto il patrimonio genetico dell'individuo sottoposto al trattamento, appunto in maniera casuale (vedi la sezione 3).
- SDN-2: oltre ad usare la nucleasi per introdurre il taglio nella molecola di DNA, si utilizza anche una molecola di DNA che funziona nella cellula come "stampo" per riparare la lesione. Pur non venendo integrata nel genoma, tale molecola guida la riparazione. In questo modo, invece di ottenere mutazioni casuali si ottengono mutazioni precise e volute, che possono consistere in specifiche sostituzioni di nucleotide oppure aggiunte o perdite di nucleotidi, in funzione della sequenza che

⁴ http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2561.pdf

viene usata come stampo. In questo caso, il genome editing può essere considerato un metodo di mutagenesi biologica mirata e predeterminata: può portare a generare per uno specifico gene una variante già esistente in natura oppure una nuova variante, ma comunque con caratteristiche predefinite dallo sperimentatore.

- SDN-3: al taglio in un sito predefinito operato dalla nucleasi si può far seguire l'integrazione di una nuova sequenza nel sito stesso, producendo così una pianta transgenica, intragenica o cisgenica a seconda dell'origine e della natura della sequenza inserita. In base ad un parere scientifico fornito dall'EFSA alla Commissione Europea⁵, i profili di rischio delle piante prodotte con questa tecnica sono simili a quelli delle piante prodotte mediante transgenesi, intragenesi o cisgenesi, con la sola differenza che in questo caso l'inserimento del nuovo gene avviene in una posizione predefinita del genoma: quindi si possono minimizzare gli eventuali rischi associati all'inserimento in una posizione casuale, che può avere effetti non voluti sulla funzione di altri geni.

Le tre metodologie di *genome editing* sono state applicate con successo alle principali specie d'interesse agrario, in numerosi laboratori. A seguito dello sviluppo recente della tecnica CRISPR/CAS9, è in particolare l'applicazione definita SDN-1 ad essere stata più frequentemente impiegata, con importanti risultati sia per la ricerca conoscitiva di base sia per il miglioramento genetico.

Mediante il *genome editing* si può generare in una varietà coltivata una qualsiasi mutazione favorevole che sia stata individuata in individui selvatici o specie affini, senza introdurre nuovi geni e soprattutto evitando le "tradizionali" lunghe pratiche di incrocio e reincrocio: l'unica mutazione introdotta è quella che si desidera ottenere. Come abbiamo spiegato (vedi la sezione 2), utilizzando gli incroci è invece inevitabile che alla fine la nuova pianta contenga altre porzioni del genoma della specie donatrice oltre al gene che si desidera trasferire; questo anche dopo ripetuti re-incroci, ovviamente dispendiosi in termini di tempo e lavoro o quasi impraticabili nelle specie arboree che hanno tempi di generazione di diversi anni. E' infine importante considerare che per coltivazioni tipiche dell'agricoltura italiana, come ad esempio vite, olivo, agrumi, il normale incrocio distruggerebbe l'identità legale della varietà, un problema che il *genome editing* può evitare: un carattere che interessa può essere modificato senza alterare alcuna altra caratteristica che rende tipica o unica una varietà coltivata. In tal modo si può, ad esempio, ridurre l'uso di pesticidi in viticoltura introducendo per via genetica nei vitigni coltivati la resistenza a funghi parassiti, una caratteristica presente solo in alcune viti selvatiche: un esempio di come l'innovazione possa proteggere la tradizione.

Nelle tecnologie di *genome editing* mediate da nucleasi, la nucleasi stessa e la molecola guida possono essere espresse nella pianta inserendone le sequenze codificanti. Queste ultime sono facilmente eliminabili per incrocio una volta che abbiano svolto il loro compito. **In questo caso dunque il prodotto intermedio è transgenico, ma il prodotto finale coltivato non lo sarà.** Molto recentemente sono state sviluppate tecnologie che evitano anche questo passaggio intermedio. E' dunque importante sottolineare che in ogni caso **alla fine del processo di modifica tali piante non sono transgeniche e sono identiche alla pianta di partenza tranne che per la mutazione desiderata.**

E' ovvio che, tranne che nella modalità SDN-3, il *genome editing* non può sostituire la transgenesi quando la nuova caratteristica desiderata richieda geni che sono solo presenti in specie diverse: un esempio è l'introduzione della capacità di produrre vitamina A nel riso, il noto "riso dorato" (*golden rice*). Per questo motivo, affermare che la transgenesi possa essere completamente sostituita dall'*editing* è fuorviante. Il

⁵ http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2943.pdf

genome editing nella modalità SDN-3 può essere utilizzato per trasferire geni da specie non sessualmente compatibili, ma con questa modalità il risultato sarà comunque la generazione di piante transgeniche.

6) Il miglioramento genetico e l'attuale normativa europea per gli OGM (Direttiva 2001/18/EC)

Ogni pianta OGM deve ottenere un'autorizzazione alla coltivazione e commercializzazione ai sensi della Direttiva 2001/18/EC del Parlamento Europeo e del Consiglio. Riportiamo i punti più rilevanti per la tematica che stiamo discutendo, rimandando al testo integrale⁶ per completezza.

L'articolo 2 recita:

Definizioni

«organismo geneticamente modificato (OGM)», un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale.

Ai fini della presente definizione:

a) una modificazione genetica è ottenuta almeno mediante l'impiego delle tecniche elencate nell'allegato I A, parte 1;

...

Il successivo Articolo 3 specifica:

Deroghe

1. La presente direttiva non si applica agli organismi ottenuti con le tecniche di modificazione genetica di cui all'allegato I B.

...

Allegato 1A

TECNICHE DI CUI ALL'ARTICOLO 2, PARAGRAFO 2

PARTE 1

Le tecniche di modificazione genetica di cui all'articolo 2, paragrafo 2, lettera a), comprendono tra l'altro:

1) tecniche di ricombinazione dell'acido nucleico che comportano la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento in un virus, un plasmide batterico o qualsiasi altro vettore, di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo all'esterno di un organismo, nonché la loro incorporazione in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;

2) tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;

3) fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali.

.....

⁶ Direttiva 2001/18 (italiano): http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2001_18/dir_2001_18_it.pdf

Allegato I B

ALLEGATO I B

TECNICHE DI CUI ALL'ARTICOLO 3

Le tecniche o i metodi di modificazione genetica che implicano l'esclusione degli organismi dal campo di applicazione della presente direttiva, a condizione che non comportino l'impiego di molecole di acido nucleico ricombinante o di organismi geneticamente modificati diversi da quelli prodotti mediante una o più tecniche oppure uno o più metodi elencati qui di seguito sono:

- 1. la mutagenesi;*
- 2. la fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali.*

La Direttiva 2001/18/EC regola dunque molto di più il metodo utilizzato per produrre una nuova pianta che non le caratteristiche della pianta. Non è tuttavia una normativa di puro processo: teoricamente, non è sufficiente utilizzare le tecniche di DNA ricombinante per rientrare sotto la giurisdizione della Direttiva. E' necessario anche un requisito di novità, cioè la presenza di "nuove combinazioni di materiale genetico" (Allegato 1A della Direttiva, paragrafo 1). Quindi la Direttiva è anche una normativa di prodotto, seppure in subordine. Se a questo aggiungiamo l'impreciso "tra l'altro" nella prima frase dell'Allegato 1A, si comprende come un'interpretazione inequivocabile della Direttiva stessa sia molto difficoltosa.

Secondo l'Allegato 1B è tuttavia chiaro che **un organismo che subisca una modificazione genetica diversa dall'incrocio non diventa automaticamente un OGM** dal punto di vista legale, anche se non v'è dubbio che sia un organismo modificato geneticamente. Dunque, le piante che abbiano subito modifiche che avvengono in natura o prodotte con mutagenesi casuale possono essere coltivate senza sottostare alla Direttiva, e, come riportato nella sezione 3, lo sono già di fatto e da molti anni anche in Italia.

E' perciò da notare che, per esempio, una pianta resistente a un certo diserbante a causa di una specifica mutazione può essere creata per transgenesi, per mutagenesi casuale o ancora sorgere per mutazione spontanea. Tuttavia solo nel primo caso essa è legalmente un OGM e deve sottostare alla Direttiva 2001/18 con tutta la relativa richiesta di prove estremamente costose, nonostante dal punto di vista agricolo o alimentare la caratteristica introdotta sia la stessa in tutti e tre i casi ed i profili di rischio per l'ambiente siano perfettamente equivalenti.

7) Quale normativa per il *genome editing*?

Come indicato sopra, il *genome editing* consente di produrre piante indistinguibili da quelle risultanti da una mutazione naturale casuale, quando è utilizzato secondo la metodica SDN-1 oppure è utilizzato secondo la metodica SDN-2 nel caso in cui si sia riprodotta una mutazione naturale identificata in un altro individuo della stessa specie. La Direttiva 2001/18/EC ha ora quindici anni, un tempo alquanto lungo se misurato rispetto alla velocità della ricerca scientifica e l'innovazione tecnologica in questo campo. Le piante ottenute con sistemi di *genome editing* si trovano dunque attualmente in un vuoto normativo, in attesa che la Commissione Europea si pronuncii.

Le normative sulle coltivazioni dovrebbero avere, tra gli altri, lo scopo di salvaguardare la salute dei cittadini e proteggere l'ambiente. L'opinione largamente prevalente tra gli scienziati è dunque che una nuova varietà vegetale coltivata debba essere giudicata per quello che è effettivamente e non in base alla procedura utilizzata per crearla, come invece è l'orientamento primario della Direttiva 2001/18/EC. La severità delle

normative sulle coltivazioni di OGM impone costi molto elevati per l'approvazione (dell'ordine di decine di milioni di euro per ogni nuovo evento), la successiva gestione delle coltivazioni e il continuo monitoraggio. Questi costi sono praticamente sostenibili solo dalle grandi imprese multinazionali. L'attuale regolamentazione dunque favorisce le grandi imprese a discapito delle piccole imprese e della ricerca pubblica. Un'eventuale estensione della Direttiva 2001/18/EC ai prodotti del *genome editing* avrebbe effetti perfino sulla sperimentazione in campo, che in Italia non è permessa per gli OGM. Il blocco si rifletterebbe specialmente sulla ricerca pubblica e quindi a danno delle colture d'interesse nazionale, lasciando un vuoto che altri potranno, se vorranno, colmare.

E' anche importante sottolineare che, se le piante ottenute con *genome editing* (SDN-1 e in certi casi anche SDN-2, vedi sopra) saranno classificate come OGM, sarà comunque difficile e spesso impossibile distinguerle da mutanti naturali o indotti con mutagenesi casuale, creando ovvii problemi riguardo al rispetto delle norme. In questo scenario, l'agricoltura europea rischia di essere invasa da varietà prodotte altrove mediante *genome editing*, senza avere la possibilità di identificarle come tali e di fatto senza poter competere. Come già avvenuto con le piante transgeniche attuali, la nostra ricerca pubblica e le nostre imprese sarebbero escluse anche da questa recente innovazione, nonostante l'Italia continui ad esempio a importare ogni anno 4 milioni di tonnellate di soia transgenica e derivati, che però non ci è permesso coltivare. Se ripetessimo quest'errore con i prodotti del *genome editing*, in un solo colpo otterremmo un pasticcio legale, un nonsenso logico, un'assurdità scientifica e un danno economico, peggiorando ulteriormente l'attuale situazione.

Giova anche in questo contesto ricordare che due diverse autorità nazionali, lo Swedish Board of Agriculture (è l'autorità governativa svedese esperta in materia di politica agroalimentare ed è responsabile per il settore agricolo ed orticolo) e il Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL, l'Agenzia Federale Tedesca per la Protezione dei Consumatori e la Sicurezza Alimentare), richieste recentemente di fornire un'opinione rispetto alle regole da utilizzare per la coltivazione di piante ottenute tramite la tecnica definita come SDN-1, hanno concluso che prodotti di *genome editing* che non contengano DNA esogeno dovrebbero essere trattati come prodotti non GM e quindi essere esentati dalla Direttiva 2001/18/EC⁷.

Considerazioni conclusive

In base alle considerazioni sopra esposte, le due Società Scientifiche, alle quali aderisce la grande maggioranza dei ricercatori italiani del settore, portano le seguenti osservazioni all'attenzione di tutti, e in particolar modo di chi è deputato a redigere le normative, con l'auspicio che possano servire ad avere un dibattito non ideologico, basato su evidenze scientifiche e trasparente:

- Le modifiche genetiche che avvengono casualmente in natura sono state essenziali per l'evoluzione delle piante coltivate e sono quindi alla base della nostra stessa esistenza; il miglioramento genetico seleziona le piante con le combinazioni geniche più utili. Le piante che coltiviamo oggi sono il risultato di un lungo processo che, partendo dalle piante selvatiche presenti in natura, attraverso una serie di modificazioni genetiche ha portato ad ottenere piante adatte alla coltivazione, che consentono all'umanità di alimentarsi in maniera completa, sana ed economica.

⁷ Swedish Board of Agriculture:

http://www.upsc.se/documents/Information_on_interpretation_on_CRISPR_Cas9_mutated_plants_Final.pdf

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit:

http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/Opinion_on_the_legal_classification_of_New_Plant_Breeding_Techniques.pdf?__blob=publicationFile&v=2

- Per sviluppare piante migliori, molte mutazioni sono introdotte con tecnologie dagli esiti casuali e dunque poco prevedibili. Queste piante non sono sottoposte a regolamentazioni particolari. Più recentemente sono stati sviluppate tecnologie come la produzione di OGM e, da poco, il *genome editing*, più precisi e quindi prevedibili nei loro effetti. Queste piante sono sottoposte a rigida regolamentazione (OGM) oppure sono al momento in uno stato di vuoto normativo (*genome editing*).
- In più di vent'anni non sono stati evidenziati pericoli specifici per la salute o l'ambiente associati alle piante GM coltivate finora. Al contrario, spesso sono stati riscontrati effetti positivi per l'ambiente e l'economia. E' doveroso proseguire l'azione di monitoraggio, come d'altronde è giusto esaminare accuratamente gli effetti di ogni pratica agricola e ogni coltivazione, tradizionale o innovativa. Tuttavia, la severità delle normative per coltivazioni OGM impone costi economici che di fatto favoriscono le grandi multinazionali a discapito delle piccole imprese e della ricerca pubblica. I tempi appaiono maturi per passare ad una normativa che moduli il livello di controllo in base alle specifiche tecnologie usate e alla novità genetica introdotta e che quindi **giudichi una varietà vegetale non solo in base alla tecnologia utilizzata per produrla ma soprattutto in base alle caratteristiche della varietà ottenuta**⁸.
- In tale prospettiva è giusto rivedere la Direttiva 2001/18/EC, predisponendo normative specifiche basate sull'eventuale pericolosità o meno dei prodotti, cioè la combinazione dei geni utilizzati con la specie che li riceve.
- Non è scientificamente e legalmente possibile definire "modificato in modo diverso da quanto avviene in natura" ciò che è indistinguibile dal prodotto di una mutazione naturale. Un'eventuale decisione di regolamentare come OGM i prodotti del *genome editing*, in particolare quelli ottenuti con la tecnica definita SDN-1, o SDN-2 nel caso sia riprodotta una mutazione naturale identificata in un altro individuo della stessa specie, sarebbe un grave errore sotto l'aspetto scientifico, normativo, logico ed economico.
- In estrema sintesi, riteniamo che, fintanto che la Direttiva 2001/18/EC rimarrà in vigore, **i prodotti di *genome editing*, ove non presentino combinazioni di geni diverse da quelle ottenibili tramite incrocio o mutagenesi casuale, debbano essere esclusi dal suo campo d'applicazione.**

GLOSSARIO

Allele: forma alternativa di un medesimo gene. Due alleli si distinguono perché la loro sequenza è diversa, anche per un solo nucleotide. A volte queste differenze non hanno alcun effetto sulla funzione del gene e dunque le caratteristiche dell'individuo; altre volte hanno effetti più o meno evidenti, che nelle piante coltivate possono essere di grande interesse pratico.

CRISPR-Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR-associated protein 9.* sistema genetico presente in batteri che è in grado di riconoscere e tagliare DNA estraneo. E' stato adattato a funzionare nelle cellule delle piante e degli animali per effettuare *genome editing*.

Domesticazione: con riferimento alle piante, è un processo di modificazioni subite dalle piante selvatiche, che ha comportato la selezione di mutazioni spontanee che le rende adatte alla coltivazione e ne favorisce l'uso da parte dell'uomo.

⁸ Al riguardo vedere anche l'articolo di commento di Kuzma (2016) Reboot the debate on genetic engineering, Nature 531:165-167, <http://www.nature.com/news/policy-reboot-the-debate-on-genetic-engineering-1.19506#/b8>

EFSA: *European Food Safety Authority*. Agenzia dell'Unione Europea che fornisce consulenza scientifica alla Commissione Europea sui rischi esistenti ed emergenti associati alla catena alimentare, per assicurare la protezione della salute dei consumatori europei e la sicurezza del cibo.

Espressione genica: processo che partendo dalla sequenza di DNA che costituisce il gene porta alla formazione di una proteina, o di un RNA, che svolgerà la sua funzione nella cellula. L'RNA si forma direttamente per trascrizione del DNA; la proteina si forma per traduzione del codice contenuto nell'RNA. Molti RNA sono tradotti, generando proteine, altri agiscono direttamente sulle funzioni cellulari.

Gene: una porzione di DNA che contiene l'informazione per produrre un RNA.

Genoma: l'insieme dell'informazione contenuta nel DNA in una cellula ed ereditata quando la cellula si divide. Il genoma consiste in milioni o miliardi di nucleotidi organizzati in un numero variabile di cromosomi, a seconda della specie. Ogni cromosoma è un lungo filamento di DNA. Negli animali e nelle piante ogni cromosoma è presente in almeno due copie, e dunque esistono due copie di ogni gene. Le cellule germinali sono particolari, in quanto contengono una sola copia: quando queste si fondono nella riproduzione sessuale viene ristabilito il numero doppio di cromosomi.

Mutazione: modificazione ereditabile di una sequenza nucleotidica del genoma.

Nucleasi: enzimi in grado di tagliare il DNA o l'RNA.

Nucleotide: l'unità strutturale degli acidi nucleici. E' costituita da acido fosforico, zucchero pentoso e base azotata. Esistono ribonucleotidi (nell'RNA) e deossiribonucleotidi (nel DNA). Le quattro basi azotate sono adenina, guanina, timina (sostituita da uracile nel RNA) e citosina, e specificano la sequenza dell'acido nucleico. Sono solitamente rappresentate dalle loro iniziali: A, G, T (U), C.

SDN: *Site directed nuclease*. Nucleasi sito-diretta, enzima in grado di tagliare il DNA in corrispondenza di una specifica sequenza bersaglio.