





POSITION PAPER

NUOVE TECNICHE GENOMICHE “GENOME EDITING e CISGENESI” (ovvero TEA Tecniche di Evoluzione Assistita)

Aggiornamento Marzo 2025

Composizione del Gruppo di Lavoro (GdL) che ha collaborato nella redazione del Position Paper:

- *Luigi Cattivelli (Coordinatore) – CREA Centro di ricerca Genomica e bioinformatica*
- *Simona Baima – CREA Centro di ricerca Genomica e bioinformatica*
- *Alessia Fiore – ENEA*
- *Gabriele Fontana – Esperto esterno*
- *Nicola Lucifero – Università degli Studi di Firenze*
- *Michele Morgante – Università degli Studi di Udine*
- *Silvio Salvi – Università degli studi di Bologna*
- *Elena Sgaravatti – Assobiotec*

Il presente documento rappresenta l'opinione del Comitato Tecnico Scientifico (CTS). I contenuti sono stati condivisi e approvati dal CTS, che ne ha verificato l'accuratezza e la coerenza con le proprie linee guida e principi.

INDICE

EXECUTIVE SUMMARY.....	2
1. PERIMETRO DI RIFERIMENTO	3
Produttività e sostenibilità dell'agricoltura come sfide future	3
Aspetti legati alla comunicazione.....	5
2. REGOLAMENTAZIONE DELLE NUOVE TECNOLOGIE GENOMICHE	6
L'approccio normativo nel mondo	6
Il quadro normativo europeo e nazionale	8
Protezione della proprietà industriale.....	11
Quadro normativo generale della proprietà industriale in ambito biotecnologico e delle varietà vegetali.....	11
La definizione normativa di TEA	13
La Proposta di Regolamento relativo alle piante ottenute mediante TEA e la proprietà industriale	14
3. ELEMENTI STRATEGICI PER AFFRONTARE IL FUTURO DELLE TEA IN ITALIA	17
APPENDICE	21
Le tecnologie di <i>editing</i>	21
Per saperne di più	24

EXECUTIVE SUMMARY

Il documento evidenzia l'importanza delle Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA), come il *genome editing* e la *cisgenesis*, per migliorare la produttività e la sostenibilità dell'agricoltura. Queste tecniche permettono di modificare il DNA delle piante in modo preciso, aumentando la resistenza alle malattie, migliorando le caratteristiche nutrizionali e adattando le colture ai cambiamenti climatici. La ricerca genetica e le nuove tecniche genomiche rivestono un ruolo fondamentale nella selezione di piante che garantiscano una produzione alimentare adeguata e sostenibile. Inoltre, questa tecnologia, tutto sommato semplice, è perfettamente applicabile al sistema produttivo italiano ricco di varietà tipiche che possono essere migliorate senza stravolgere le caratteristiche che i consumatori apprezzano. L'iter legislativo europeo per regolamentare l'uso delle piante ottenute mediante TEA è giunto alla fase finale, riconoscendo le TEA come diverse dagli OGM. In vista della possibile prossima apertura del mercato europeo alle sementi TEA il Position Paper intende fornire un contributo alla discussione su quali strumenti di tutela della proprietà intellettuale possano essere applicate alle piante selezionate con le TEA e delineare alcuni elementi strategici per affrontare il futuro delle TEA nel contesto agricolo italiano.



1. PERIMETRO DI RIFERIMENTO

Produttività e sostenibilità dell'agricoltura come sfide future

Le sfide per la sicurezza alimentare e per una nutrizione adeguata dal punto di vista qualitativo sono di rilevanza prioritaria a livello globale, in quanto premessa per migliorare lo stato generale di salute delle popolazioni. Tutto questo deve inoltre essere inserito in un contesto di sostenibilità per limitare l'impatto dell'attività agricola sull'ambiente e sviluppare resilienza verso i mutamenti climatici. La scienza e la tecnologia possono svolgere un ruolo importante per contribuire a migliorare la produttività e la qualità nutrizionale diminuendo al contempo l'impronta ambientale dell'agricoltura. In particolare, la ricerca genetica, incluso l'uso delle nuove tecniche genomiche (NGT, *genome editing* e *cisgenesi*) in Italia note anche come *Tecniche di Evoluzione Assistita* (TEA), si configura come **strategia fondamentale per selezionare piante** (ma anche di animali o microrganismi) capaci di fornire prodotti capaci di garantire una produzione adeguata di alimenti aumentandone il valore nutrizionale e la salubrità, in un contesto quanto più sostenibile possibile.

La disponibilità di metodi avanzati per lo studio della funzione dei geni e la capacità di sequenziare l'intero genoma delle specie e varietà di interesse, insieme alla possibilità di intervenire con le tecniche precise di *genome editing* e di verificarne puntualmente, alla fine del processo di miglioramento, la sicurezza, hanno aperto scenari estremamente promettenti per migliorare la produzione ed i prodotti (cibi e principi nutritivi) e rappresentano un'importante e strategica opportunità per lo sviluppo economico del Paese.

Sull'utilizzo delle nuove tecniche genomiche scommette anche l'Unione Europea, al fine di raggiungere gli ambiziosi obiettivi di un'agricoltura "a prova di futuro" che "abbracci innovazione e sostenibilità per una resilienza a lungo termine", previsti nella nuova "Visione per l'agricoltura e l'alimentazione - Definire il futuro dell'agricoltura e del settore agroalimentare per le generazioni future in Europa." (https://agriculture.ec.europa.eu/vision-agriculture-food_en). Alla luce delle situazioni di instabilità internazionale, che si traducono anche in crisi alimentari globali, come quella conseguente alla guerra fra Ucraina e Russia, la futura politica agricola comune sosterrà la ricerca e innovazione, comprese le nuove tecniche genomiche per produrre colture più resistenti al clima e garantire un approvvigionamento sufficiente di alimenti all'Unione Europea senza compromettere gli obiettivi di sostenibilità ambientale.



Nell'ambito delle nuove tecniche genomiche, il **genome editing** offre la possibilità di modificare in modo voluto e preciso una specifica sequenza di DNA senza spostarla dalla sua posizione naturale nel genoma. Il modo più efficace è noto come CRISPR/Cas9. L'enzima Cas9 è una "nucleasi", cioè un enzima 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 progettato in laboratorio e trasferito all'interno di una cellula insieme al gene che codifica Cas9 o all'enzima stesso. La nucleasi Cas9 opera il taglio nella molecola di DNA solo in corrispondenza del sito bersaglio indicato dall'RNA guida e il meccanismo cellulare di riparazione del DNA provvede a risaldare le estremità. Per sua natura, questo processo di riparazione comporta frequentemente sostituzioni nucleotidiche oppure l'aggiunta o perdita di uno o pochi nucleotidi che introducono mutazioni nel sito scelto per il taglio. Quando usato in questo modo, il *genome editing* può essere considerato a tutti gli effetti **un metodo di mutagenesi biologica mirata**. Inoltre, poiché al termine del processo di *genome editing* l'RNA guida e la nucleasi non sono più necessari e possono essere degradati dalla cellula o eliminati mediante segregazione nella generazione successiva, negli organismi ottenuti in questo modo non sono presenti sequenze estranee a quelle del genoma originale. La stessa tecnica può anche essere utilizzata per inserire in una posizione precisa del genoma un intero tratto genetico proveniente da un'altra accessione della stessa specie (**cisgenesi**) oppure da qualsiasi altro essere vivente (vero e proprio OGM). Con *cisgenesi* si intende il trasferimento di un intero gene, inclusa la sua sequenza regolatrice posta a monte del tratto codificante, tra due **individui tra loro interfertili**, cioè, appartenenti alla stessa specie o a due specie filogeneticamente molto vicine tale da consentire incroci interspecifici.

Quando utilizzato per indurre mutazioni il *genome editing* consente di indirizzare modifiche genetiche in modo controllato e in punti precisi del genoma anche attraverso la correzione di una sola "lettera" (nucleotide) nella sequenza di un gene. Proprio perché in grado di modificare uno o pochissimi nucleotidi, ad esempio quello che può rendere un organismo resistente a un parassita o più resiliente ad un cambiamento ambientale, o capace di fornire un prodotto più nutriente, il *genome editing* consente di conservare inalterato il patrimonio genetico di una varietà tipica esattamente com'è e come piace oggi. Si tratta inoltre di una tecnologia relativamente semplice ed economica, facilmente applicabile al sistema produttivo italiano ricco di varietà e razze tipiche ed antiche, colture di nicchia e piccole imprese. Per una descrizione dettagliata delle tecnologie di editing e delle loro potenzialità si rimanda all'APPENDICE inserita al termine di questo documento.



Sulla base di quanto già emerso nella letteratura scientifica e dalle prime applicazioni commerciali già disponibili in diversi paesi, è prevedibile che il *genome editing* avrà uno straordinario impatto in agricoltura così come in campo medico. L'uso delle TEA nel miglioramento genetico vegetale ha già consentito di introdurre resistenze alle principali malattie, migliorare aspetti qualitativi di interesse per il consumatore o per l'industria di trasformazione, introdurre fattori capaci di migliorare la produttività e/o la resilienza verso i cambiamenti climatici, sia attraverso la modifica delle varietà tradizionali (es. le varietà di vite da vino), sia mediante la selezione di nuovi genotipi. Un quadro complessivo del contesto mondiale che ruota intorno alle TEA in agricoltura è desumibile dalla banca dati EU-SAGE¹.

Per favorire un dibattito basato sulle conoscenze e rendere consapevole l'opinione pubblica del ruolo positivo delle nuove tecniche genomiche è opportuno che la ricerca operi attraverso programmi condivisi con la società civile e orientati a soddisfare le esigenze di specifiche filiere, mettendo a disposizione delle imprese agricole, di quelle della trasformazione e del consumatore prodotti il cui valore sia riconoscibile e condiviso da tutti. Le nuove biotecnologie devono operare per lo sviluppo di prodotti che dimostrino un potenziale di impatto positivo sui consumatori (miglioramento qualitativo e nutrizionale), garantendo una maggiore redditività della produzione primaria e una razionale promozione dei prodotti sulla base della loro impronta ambientale.

Infine, **per lo sviluppo competitivo del sistema agroalimentare italiano una corretta politica di sicurezza alimentare non può prescindere dalla conoscenza dei fattori che condizionano la moltiplicazione e/o la sopravvivenza dei microrganismi patogeni e tossigeni responsabili di infezioni ed intossicazioni.** Anche in questo ambito, l'uso del genome editing con la possibilità di indirizzare in modo controllato le modifiche genetiche verso precise regioni del genoma potrà consentire l'ottenimento di ceppi non patogeni e/o atossigeni in grado di prevenire, attraverso la competizione biologica, l'insorgenza di attacchi da parte di microrganismi patogeni e tossigeni.

Aspetti legati alla comunicazione

L'aspetto normativo, frutto di un indirizzo di politica legislativa, è in larga misura connesso al sentimento dell'opinione pubblica in fatto di biotecnologie e questo porta a discutere il ruolo della

¹ <https://www.eu-sage.eu/>.



comunicazione e della formazione scientifica in una società sempre più polarizzata, che spesso esprime paure non giustificate da evidenze oggettive. In questa situazione risulta essenziale evitare l'acuirsi di questa polarizzazione e riconoscere la presenza di posizioni e sensibilità diverse, favorendone la coesistenza ed evitando che questo ostacoli lo sviluppo tecnologico o impedisca lo sviluppo integrato di diversi tipi di agricoltura. È auspicabile evitare la contrapposizione tra posizioni volte a preservare le produzioni tradizionali da qualunque azione di miglioramento genetico a prescindere dall'impatto sul loro genoma e dalle finalità e le opportunità offerte dalle TEA quando orientate a offrire reali benefici al consumatore ed all'ambiente (es. maggiore salubrità degli alimenti, riduzione significativa dell'uso di fitofarmaci).

La valorizzazione del concetto di *biotecnologie per la sostenibilità* deve rientrare come componente rilevante dei programmi di ricerca di filiera e trovare adeguato sostegno a livello istituzionale. Vista la sensibilità ambientale in vasti settori dell'opinione pubblica, è di fondamentale importanza sottolineare nella comunicazione i benefici che possono derivare dall'utilizzo delle TEA in termini di sostenibilità ambientale delle pratiche agricole. È possibile fare ricorso anche a specifici esempi concreti in cui il *genome editing* consente di migliorare il profilo di sostenibilità ambientale di varietà tradizionali dell'agricoltura italiana per dimostrare che innovazione e tradizione possono andare a braccetto e non sono concetti antitetici. Uno degli esempi più eclatanti riguarda l'uso delle TEA per rendere più resistenti alle malattie i tradizionali vitigni italiani, riducendo i trattamenti contro le avversità fungine e i relativi costi, senza modificare nulla delle caratteristiche dei vitigni tradizionali italiani e delle caratteristiche qualitative del vino.

2. REGOLAMENTAZIONE DELLE NUOVE TECNOLOGIE GENOMICHE

L'approccio normativo nel mondo

Come già avvenuto in passato per altre tecniche basate su una modifica esterna del patrimonio genetico degli organismi vegetali ed animali, il *genome editing* si presta a considerazioni etiche e deve essere oggetto di specifiche normative. Tuttavia, la maggiore precisione della tecnologia e la possibilità di distinguere a priori tra l'uso dell'*editing* per creare semplici mutazioni e l'uso dell'*editing* per l'inserimento mirato di transgeni dovrebbe consentire una regolamentazione differenziata; **gli organismi vegetali in cui è stato utilizzato il *genome editing* per effettuare mutazioni precise dovrebbero essere di fatto equiparati agli altri organismi ottenuti mediante**

mutagenesi di altra natura, anche perché indistinguibili a livello genetico da questi ultimi. Così come gli **organismi ottenuti a seguito del trasferimento di un singolo gene derivante da un altro organismo della stessa specie o di una specie interfertile (*cisgenesis*) dovrebbero essere regolati alla stregua delle normali varietà ottenute a seguito di incrocio**. Alla luce di quanto detto sopra, a definizione delle *best practice* costituisce un aspetto fondamentale per assicurare la qualità, il valore e la sicurezza degli organismi ottenuti con l'uso delle TEA.

Negli ultimi anni molti paesi si sono attrezzati per regolamentare le tecnologie di *genome editing*, cercando di definire regole chiare e semplici che valutano le nuove varietà indipendentemente dai metodi utilizzati per la loro selezione². In molti paesi **il discriminante principale è rappresentato dalla presenza o meno di DNA esogeno nella varietà oggetto di iscrizione** (dove per esogeno si intende proveniente da un organismo non interfertile con l'organismo ricevente). In assenza di DNA esogeno le nuove varietà non sono oggetto del regolamento OGM. Ad esempio, negli Stati Uniti sono esentati dalla normativa OGM (e quindi sono considerati alla stregua di una qualsiasi varietà) i prodotti ottenuti tramite *editing* se i loro genomi presentano delezioni di qualsiasi dimensione, sostituzioni mirate di singole lettere del DNA o introduzione di nuovo materiale genetico proveniente esclusivamente da specie sessualmente compatibili (*cisgenesis*). Allo stato attuale, l'approccio normativo rispetto alle TEA applicato in molti altri Paesi (es. Stati Uniti, Canada, Argentina, Brasile, Ce, Australia, Giappone, Israele, Regno Unito) è basato sulla valutazione delle singole varietà anziché sul metodo con cui sono state sviluppate al contrario dell'Europa dove le TEA rientrano ancora nell'ambito di applicazione della Direttiva 2001/18/EU come gli OGM classici (Figura 1). Questa mancanza di armonizzazione normativa pone problemi nel commercio globale, nel settore delle sementi e ostacola l'innovazione e il progresso scientifico in Europa.

² Per un approfondimento: Groover et al. 2025. *A technical approach to global plant genome editing regulation*, Nature Biotechnology - <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02489-5>

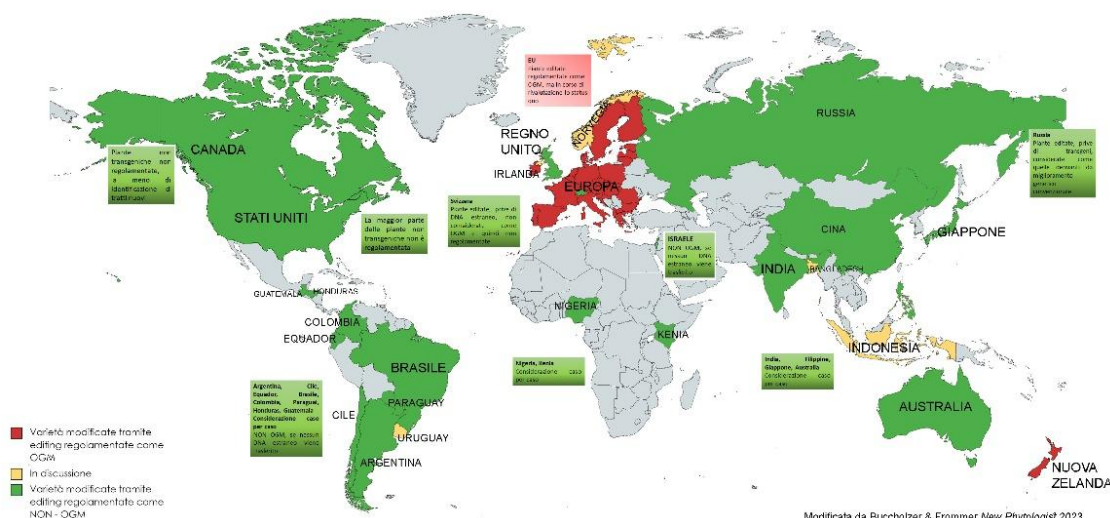


Fig.1 La regolamentazione del *genome editing* nel mondo (tratto da: Terra e Vita n. 11-2023).

Il quadro normativo europeo e nazionale

Le TEA costituiscono un passo avanti rispetto alle tecniche utilizzate comunemente per produrre OGM. Per questo la comunità scientifica internazionale ritiene che le piante generate con *genome editing* siano sostanzialmente diverse dagli OGM tradizionali e ritiene pertanto che debbano essere regolate diversamente da essi. Una posizione confermata anche dall'EFSA che in un parere richiesto dalla Commissione Europea, ha dichiarato che alcune modalità di *genome editing* non sono assimilabili alle tecniche che generano gli OGM ma alle tecniche convenzionali (EFSA Journal 2012,10:2561; EFSA Journal 2012, 10:2943). Tuttavia, in seguito al pronunciamento della Corte di Giustizia Europea (sentenza sul caso C-528/16 del 2018) che afferma che tutte le tecniche di mutagenesi danno luogo ad OGM, anche gli organismi ottenuti mediante *genome editing* sono rientrati nel campo di applicazione della Direttiva che regola la diffusione degli OGM (Direttiva 2001/18/EU), in quanto ne possono essere esclusi solo gli organismi espressamente indicati nell'Allegato I B, ovvero quelli ottenuti con tecniche di mutagenesi convenzionali e con una storia d'uso sicuro. Il possibile impatto negativo di questa sentenza sullo sviluppo commerciale e tecnologico in Europa nel campo dell'innovazione genetica, così come l'impossibilità tecnica di rilevare e identificare i prodotti ottenuti mediante le nuove tecnologie, distinguendoli da quelli ottenuti per mutazione casuale, ha spinto il Consiglio Europeo a chiedere alla Commissione uno studio per valutare l'inquadramento delle TEA all'interno della normativa europea. In base all'esito



dello studio è stato avviato l'iter per la revisione della normativa vigente con l'obiettivo di mantenere gli standard dell'attuale legislazione per quanto riguarda gli elevati livelli di protezione della salute (umana, animale e ambientale), ma anche consentire di cogliere i frutti dell'innovazione nel sistema agroalimentare. L'iter per definire un nuovo quadro giuridico per le piante ottenute mediante mutagenesi mirata e *cisgenesis*, e per gli alimenti e i mangimi da esse ottenuti, ha portato la Commissione a presentare al Parlamento Europeo in data 5 luglio 2023 una proposta di Regolamento *relativo alle piante ottenute mediante alcune nuove tecniche genomiche nonché agli alimenti e ai mangimi da essi derivati*. Dopo alcune modifiche, la proposta è stata approvata dal Parlamento il 24 aprile 2024. Il testo è stato poi emendato dalla Presidenza del Consiglio di turno nel primo semestre 2025 (Polonia), che ha integrato i commenti sollevati dagli Stati Membri nel corso del 2024. Questo testo è stato approvato dal Comitato dei Rappresentanti Permanenti degli Stati Membri in data 14 marzo 2025 per l'avvio del mandato negoziale con il Parlamento e la Commissione (i cosiddetti triloghi). Il testo finale dovrà essere formalmente adottato dal Consiglio e dal Parlamento prima di entrare in vigore.

Il punto cardine del nuovo Regolamento è la suddivisione delle piante ottenute mediante TEA in due categorie (NGT1 e NGT2) sulla base del tipo e del numero di mutazioni generate. Le piante che sono considerate equivalenti a quelle che si trovano in natura o ottenibili attraverso metodi di selezione convenzionali sono definite NGT1 e, proprio per la loro equivalenza, sono esentate dalle regole attualmente previste dalla legislazione sugli OGM. Le piante NGT1 possono essere rilasciate con il solo obbligo di iscrizione in un apposito registro e sebbene le sementi di piante NGT1 dovranno essere etichettate i loro prodotti non saranno tracciati lungo la filiera alimentare, le piante NGT1 non saranno autorizzate in agricoltura biologica. Il regolamento, nella versione approvata dal Consiglio, identifica come NGT1 le piante che contengono sostituzioni o inserzioni di max 20 nucleotidi, delezioni di qualsiasi dimensione oppure inserzioni di geni interi provenienti da individui interfertili con il ricevente; il numero massimo di modificazioni genetiche consentito è di 20 modifiche per genoma (questi criteri variano leggermente tra le versioni del Regolamento approvate dai diversi organismi comunitari). Le piante selezionate con l'uso delle TEA, ma che contengono mutazioni superiori per numero e/o estensione ai limiti imposti alle NGT1 e tutte le piante che contengono una resistenza agli erbicidi, sono definite NGT2. Le piante NGT2 sono soggette alle norme previste dalla legislazione sugli OGM (tra cui una valutazione del rischio e un'autorizzazione prima dell'immissione in commercio) e i loro prodotti dovranno essere etichettati e tracciati lungo tutta la filiera. Tuttavia, è previsto un sistema di incentivi per le piante NGT2 che presentano tratti potenzialmente in grado di contribuire agli obiettivi di sostenibilità dei sistemi agroalimentari. Il punto maggiormente



controverso nella proposta di Regolamento approvata dal Parlamento nel 2024 riguardava l'esclusione delle piante NGT1 dalla normativa sui brevetti limitando il riconoscimento della proprietà intellettuale solo a quanto previsto dalla Privativa varietale. Per accogliere le richieste in merito alla protezione delle invenzioni e di ritorno economico rispetto all'investimento in ricerca ed innovazione, la proposta approvata ora dal Consiglio invece non limita i meccanismi di protezione della proprietà intellettuale, ma prevede solo alcune misure di trasparenza. I costitutori al momento della registrazione di una pianta NGT1 devono rendere pubbliche tutte le informazioni sui brevetti (esistenti o in corso di registrazione) e, su base volontaria, possono rendere nota l'intenzione di concedere in licenza l'uso di una pianta NGT1 brevettata a condizioni eque. Infine, è prevista la costituzione di un gruppo di esperti che deve predisporre uno studio relativo all'impatto della brevettazione sull'innovazione, la disponibilità delle sementi per gli agricoltori e la competitività del settore sementiero nell'Unione Europea.

L'avvio della discussione per la definizione di un nuovo Regolamento europeo ha suscitato grande interesse politico anche in Italia ed ha portato il Parlamento italiano a sostenere l'applicazione del *genome editing* per il *breeding*. In particolare, nella Legge 13 Giugno 2023, n. 68 (recante disposizioni urgenti per il contrasto della scarsità idrica e per il potenziamento e l'adeguamento delle infrastrutture idriche, cosiddetto Decreto Siccità; articolo 9bis - disposizioni urgenti in materia di genetica agraria) viene delineata la procedura per la concessione dell'autorizzazione all'emissione deliberata nell'ambiente a fini sperimentali di piante prodotte con tecniche di mutazione sito diretta (*editing* genomico) o di cisgenesi. **Questa è la prima norma ad introdurre in Italia una differenziazione tra TEA e OGM** prevedendo un diverso percorso autorizzativo per la sperimentazione in campo. L'iniziale scadenza al 31 dicembre 2024 è stata poi prorogata al 31 dicembre 2025 (emendamento al DL Agricoltura del 2024). Questo intervento legislativo elimina per le prove sperimentali di piante TEA la valutazione dell'impatto sulla agrobiodiversità, un vincolo imposto dal Decreto Legislativo 224 del 2003, che recepisce in Italia la Direttiva 2001/18/EU, una modifica che semplifica di molto l'iter autorizzativo e di fatto rende possibile la sperimentazione in campo. Infatti, la mancata definizione dei protocolli tecnici operativi per la sperimentazione e la valutazione dell'impatto sull'agrobiodiversità, pur definita nei suoi caratteri generali dal Ministero delle politiche agricole e forestali di concerto con il Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio (Decreto 19 gennaio 2005), aveva di fatto introdotto in Italia una moratoria nella sperimentazione di OGM. La legge del 2023, nel pieno rispetto della Direttiva per quanto riguarda le emissioni a scopo sperimentale, ha aperto le porte alla prova in campo delle piante prodotte con le TEA e nel 2024 ha portato alla prima messa in campo di piantine di riso resistenti ad un patogeno



fungino sviluppate dall'Università di Milano. Le informazioni relative alle prove sperimentali autorizzate in Europa in accordo con la Direttiva 2001/18 sono raccolte nel database *Food and Feed Information Portal* della Commissione Europea (<https://ec.europa.eu/food/food-feed-portal/screen/gmob/search>) e ad oggi (marzo 2025) oltre alla prova sul riso, risultano autorizzate due sperimentazioni di viti resistenti alla peronospora (VITEA.1 sviluppata da EdiVite e Chardonnay+ sviluppata dalla Fondazione Edmund Mach) ed una di piante di pomodoro resistenti alle orobanche (Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo del CREA). Le prove sono state oggetto di campagne esecratorie a opera di associazioni antagoniste e di vandalismo distruttivo ad opera di ignoti, che hanno distrutto sia la prova riso nel 2024 che una delle prove vite nel febbraio 2025.

In attesa del completamento dell'iter normativo a livello Europeo, al momento non prevedibile e ancora potenzialmente fluido nei risultati, è comunque auspicabile che la ricerca non si fermi. Va infatti considerato che anche qualora non fossero ancora trasferibili direttamente in campo per un vincolo della normativa, il patrimonio di conoscenze e i risultati ottenuti con l'uso di *genome editing* potrebbero comunque essere utili nei programmi di miglioramento genetico tramite approcci più tradizionali.

Protezione della proprietà industriale

Uno degli argomenti più attuali nel dibattito europeo sulle TEA riguarda il tema della proprietà intellettuale, un tema che deve essere affrontato tenendo conto sia del quadro normativo europeo circa gli strumenti di proprietà intellettuale applicabili in agricoltura, sia le scelte inserite nel nuovo regolamento sulle TEA ancora in fase di discussione.

Quadro normativo generale della proprietà industriale in ambito biotecnologico e delle varietà vegetali

Secondo il diritto europeo la tutela della proprietà industriale delle invenzioni biotecnologiche in agricoltura, che attualmente includono anche le TEA, è regolata da un quadro normativo impostato su un doppio binario e composto da due fonti: la **Direttiva 98/44/CE** sulla protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche (**Direttiva Biotecnologie**) e il Regolamento concernente **la privativa comunitaria per ritrovati vegetali (Regolamento 2100/94/CE)**.



Nel sistema delineato dalla Direttiva Biotecnologie, il brevetto si può riferire ad un **materiale biologico** o a un **procedimento microbiologico**, i quali vengono definiti, rispettivamente, come un “materiale contenente informazioni genetiche, autoriproducibile o capace di riprodursi in un sistema biologico” (art. 2, par.1, let. a) e “qualsiasi procedimento nel quale si utilizzi un materiale microbiologico, che comporta un intervento su materiale microbiologico, o che produce un materiale microbiologico” (art. 2, par.1, let. b). Per essere suscettibile di brevetto il materiale biologico, o il procedimento, deve presentare, in seguito all’invenzione, determinate proprietà non preesistenti.

La tutela assicurata dalla Direttiva Biotecnologie al materiale biologico innovato e al procedimento attraverso il quale questo è stato ottenuto si estende a tutti i materiali biologici da esso derivati mediante riproduzione o moltiplicazione in forma identica o differenziata e dotati delle stesse proprietà

Sono previste alcune cause di esclusione. Dalla brevettabilità garantita dalla Direttiva Biotecnologie sono escluse le “Varietà vegetali e le razze animali” (art. 4, par. 1, lett. a) e i “Procedimenti essenzialmente biologici di vegetali o animali” (art. 4, par. 1, lett. b) dove un procedimento è essenzialmente biologico quando consiste integralmente in fenomeni naturali quali l’incrocio o la selezione.

Oltre alla disciplina ora citata, **le nuove varietà vegetali** possono essere protette solo attraverso una privativa *ad hoc*, costituita dal cosiddetto “diritto del costitutore” o “privativa varietale” (**Privativa**); mentre l’insieme vegetale ricomprendente tutte le varietà caratterizzate dalla presenza di un determinato gene che esplica certe funzioni può — se nuovo e originale — essere brevettato *ex* Direttiva Biotecnologie.

Il sistema di protezione *sui generis* delle varietà vegetali è disciplinato a livello europeo dal Regolamento 2100/94 che ha infatti istituito la privativa comunitaria per ritrovati vegetali, sulla base della Convenzione UPOV, raggiunta a livello internazionale il 2 dicembre 1961 a Parigi e dall’accordo Trips raggiunto in sede WTO nell’ambito del Trattato di Marrakesh del 15 aprile 1994, secondo il quale “i membri prevedono la protezione delle varietà vegetali mediante brevetti o mediante un efficace sistema *sui generis* o una combinazione dei due”.

Il Regolamento 2100/94 permette di ottenere un unico titolo di protezione per le nuove varietà vegetali efficace su tutto il territorio dell’Unione. L’oggetto di tale privativa è costituito da “varietà di tutte le specie e di tutti i generi botanici, compresi, *inter alia*, gli ibridi tra generi e specie”. In accordo



con la convenzione UPOV, il Regolamento 2100/94 definisce la varietà come “*un insieme di vegetali nell'ambito di un unico taxon botanico del più basso grado conosciuto, il quale ... possa essere:*

- *definito mediante l'espressione delle caratteristiche risultante da un dato genotipo o da una data combinazione di genotipi,*
- *distinto da qualsiasi altro insieme vegetale mediante l'espressione di almeno una delle suddette caratteristiche e*
- *considerato come un'unità in relazione alla sua idoneità a moltiplicarsi invariato”.*

Il Regolamento 2100/94 riserva la possibilità di ottenere protezione con la privativa varietale comunitaria alle varietà che siano distinte, omogenee e stabili; tali condizioni sono necessarie al fine dell'ottenimento della protezione. La durata della privativa è prevista in 25 anni (art. 19), fatto salvo il diverso termine per le viti e le specie arboree (30 anni), decorso il quale la protezione viene revocata.

Attualmente, tale disciplina può essere impiegata per ottenere una protezione delle piante e delle varietà vegetali create attraverso la selezione tradizionale (ad esempio, tramite incroci selettivi e mutagenesi), e potrebbe essere utilizzata anche con riguardo alle TEA.

La definizione normativa di TEA

Il regime di protezione di proprietà intellettuale non può prescindere dalla qualifica giuridica del bene per cui si invoca la protezione brevettuale. In questa prospettiva, allo stato, non sussiste una norma vincolante che qualifica giuridicamente le TEA, posto che, come detto, *l'iter* di formazione normativo a livello europeo destinato a creare una normativa dedicata alle TEA non si è ancora concluso.

Ai fini della qualifica delle TEA occorre ricordare che i lavori preparatori che sono alla base della proposta sono coerenti con la posizione assunta dalla Corte di giustizia nella sentenza 25 luglio 2018 (C-528/16) ove si è ritenuto di ricondurre le TEA all'ambito di applicazione della direttiva 2001/18/EU in materia di organismi geneticamente modificati. Anche per questa ragione, a livello interpretativo, vi è un labile confine tra ciò che può essere considerato una nuova tecnica genomica, rispetto all'impiego di tecniche di *breeding* tradizionali.

Per valutare la brevettabilità delle piante ottenute con le TEA, ossia piante caratterizzate da modificazioni genetiche “semplici”, cioè simili a quelle che possono accadere in natura o che possono



essere ottenute con l'incrocio tradizionale, è necessario definire se le TEA siano o meno il risultato di un procedimento essenzialmente biologico, caratteristica dalla quale dipende la loro brevettabilità secondo la Direttiva Biotecnologie e la Convenzione sul Brevetto Europeo (il brevetto non è concesso per *"varietà vegetali o animali o processi essenzialmente biologici per la produzione di piante o animali"*). In merito la **Corte d'appello dell'Ufficio Brevetti Europeo** si è pronunciata (decisione G 2/07 – G 1/08 Broccoli & Tomato I, del 2010), chiarendo che, se un processo contiene *"un'ulteriore fase di natura tecnica, che di per sé introduce un tratto nel genoma o modifica un tratto nel genoma della pianta prodotta ... allora il processo non è escluso dalla brevettabilità"*. Questa pronuncia costituisce un utile riferimento interpretativo per quanto riguarda la **portata dell'esclusione della brevettabilità per i procedimenti essenzialmente biologici**. Le TEA, pur potendo essere presenti in natura o essere prodotte mediante tecniche di selezione convenzionale, prevedono comunque un' *"ulteriore fase di natura tecnica"* nel procedimento che porta alla loro creazione, concretizzandosi sempre in una modifica mirata del DNA. Le tecnologie TEA, quindi, non rientrano nell'esclusione della brevettabilità di cui all'art. 4 della Direttiva Biotecnologie perché non costituiscono mai procedimenti essenzialmente biologici, in quanto non consistono *"integralmente in fenomeni naturali quali l'incrocio o la selezione"*. La presenza di questa ulteriore fase di natura tecnica differenzia i procedimenti riguardanti le piante ottenute con le TEA dai procedimenti essenzialmente biologici facendo dunque ricadere tali procedimenti e i materiali biologici innovativi ai quali conducono nella tutela offerta dalla Direttiva Biotecnologie.

La Proposta di Regolamento relativo alle piante ottenute mediante TEA e la proprietà industriale

Da quanto sopra descritto emerge un quadro normativo composto da due forme concorrenti di tutela dei diritti di proprietà industriale legati alla costituzione delle TEA, che si applicano alternativamente a seconda della qualifica giuridica del bene oggetto di tutela: la prima e principale, che opera per tutti i tipi di TEA, è quella offerta dalla Direttiva Biotecnologie. La tutela offerta dalla Direttiva Biotecnologie copre diverse invenzioni biotecnologiche, come frammenti di DNA modificato, il procedimento biotecnologico, se innovativo, e le sue caratteristiche, ma non, come abbiamo visto, le varietà vegetali, la quali invece rientrano nella tutela *"residuale"* offerta dalla Privativa varietale.

Nella tabella che segue si è sinteticamente riportato l'oggetto della tutela e il relativo regime di protezione di proprietà intellettuale applicabile.



QUADRO NORMATIVO VIGENTE		
Beni oggetto di tutela	Direttiva Biotecnologie	Regolamento 2100/94 (Privativa varietale)
Materiale biologico (frammenti di DNA modificato) frutto di TEA	Tutelato (se innovativo e con applicazione industriale)	Non tutelato
Procedimento biotecnologico innovativo TEA	Tutelato	Non tutelato
Nuove varietà vegetali specifiche	Non tutelate (esclusione esplicita)	Tutelate indistintamente dal procedimento attraverso il quale sono ottenute (selezione tradizionale o TEA)

Tab.1 Beni oggetto della tutela e il relativo regime di protezione di proprietà intellettuale applicabile

In questo contesto normativo si inserisce la proposta di Regolamento circa la diffusione di piante ottenute con l'uso delle TEA presentata dalla Commissione europea il 5 luglio 2023 e le successive modifiche introdotte dal Parlamento (7 febbraio 2024) e dal Consiglio dei Ministri Agricoli (14 marzo 2025). La proposta della Commissione non interviene sulle regole di protezione dei diritti di proprietà intellettuale, il Parlamento propone di escludere le piante NGT1 dalla normativa sui brevetti lasciando solo l'istituto della Privativa varietale, mentre la proposta del Consiglio prevede solo una norma di trasparenza obbligando i costitutori rendere pubbliche le informazioni sui brevetti che gravano sulle piante TEA.

I dubbi sull'adeguatezza della tutela offerta dal Regolamento 2100/94 (Privative vegetali) sono diversi, in quanto questo sistema protegge esclusivamente le varietà vegetali specifiche, lasciando scoperti aspetti fondamentali come le innovazioni genomiche sottostanti. Sebbene la privativa garantisca il diritto esclusivo alla commercializzazione della varietà protetta, essa non offre alcuna protezione separata per le modifiche genetiche che danno origine ai caratteri presenti nella varietà stessa, ma soprattutto non garantisce protezione dei diritti di proprietà industriale dei selezionatori vegetali nei confronti degli specifici geni modificati con le TEA. Tale potenziale oggetto di brevetto rappresenta quello oggi più rilevante nel contesto attuale, poiché si colloca a monte rispetto sia alle modifiche apportate che alle varietà di ottenute. Se un gene è già brevettato per una sua specifica funzione, ad esempio la resistenza a malattia, dovrà ottenere una licenza dal titolare del brevetto originario non solo chi voglia utilizzare tale gene per ottenere piante resistenti, ma anche chiunque voglia modificare tale gene utilizzando le TEA, al fine di ottenere nuove funzionalità. Qualsiasi regolamentazione sulla brevettabilità delle TEA dovrebbe, dunque, considerare il peso significativo dei brevetti sui geni e il loro impatto sulla libertà di operare degli innovatori nel settore agricolo; altrimenti, può trovare facilmente luogo il potenziale distruttivo di una totale esclusione della loro brevettabilità sotto il profilo dello stimolo alla ricerca e all'innovazione nel settore agricolo.



Inoltre, l'esenzione per i costitutori prevista dal Regolamento 2100/94 (art. 15) permette l'utilizzo libero di varietà commerciali protette, anche se contenenti modifiche genomiche, per sviluppare nuove varietà senza alcun obbligo di compensazione per il titolare della privativa originale. Questo lascia gli innovatori esposti, soprattutto quando i caratteri basati su TEA diventano facilmente accessibili attraverso tecniche di introgressione. Questa lacuna normativa si aggrava ulteriormente con l'impossibilità di prevenire la copia indipendente di innovazioni sui caratteri, attraverso la ricreazione di mutazioni legate a tratti desiderabili. Di conseguenza, il Regolamento 2100/94 risulta insufficiente per proteggere in modo efficace i caratteri vegetali basati su TEA, che possono essere utilizzati trasversalmente in diverse varietà.

La mancanza di una protezione efficace potrebbe mettere a rischio gli investimenti in ricerca e sviluppo, necessari per creare nuove varietà innovative. Pertanto, da più parti si ritiene indispensabile affiancare al sistema delle privative la protezione tramite brevetti d'invenzione assicurata dalla Direttiva Biotecnologie (Dir. 1998/94), indipendente dalla tutela delle varietà, così che sia garantito un ritorno sugli investimenti e incentivi l'innovazione nel settore agricolo. D'altro canto, una protezione brevettuale troppo forte potrebbe favorire lo sviluppo di un mercato dominato da poche grandi società a scapito delle SMI, per limitare questo rischio, si potrebbero prendere in considerazione alcuni accorgimenti normativi capaci di garantire la protezione della proprietà intellettuale e al contempo l'accesso, a determinate condizioni, da parte di altri soggetti interessati. In particolare:

Licenze obbligatorie: Una possibile soluzione potrebbe essere quella di rafforzare e chiarire il regime di *cross-licensing* già esistente nell'art. 12 della Direttiva Biotecnologie, il cui par. 1 stabilisce che: *“Un costitutore, qualora non possa ottenere o sfruttare commercialmente una privativa sui ritrovati vegetali senza violare un brevetto precedente, può chiedere una licenza obbligatoria per lo sfruttamento non esclusivo dell'invenzione protetta dal brevetto, in quanto tale licenza sia necessaria allo sfruttamento della varietà vegetale da proteggere, dietro pagamento di un canone adeguato. Gli Stati membri stabiliscono che, in caso di concessione della licenza, il titolare del brevetto ha reciprocamente diritto ad una licenza reciproca a condizioni ragionevoli per utilizzare la varietà protetta”*. Attualmente questo regime è considerato difficilmente praticabile a causa dell'ambiguità di uno dei requisiti fondamentali di cui alla lettera b) del par. 3 dell'art. 12: *“la varietà vegetale o l'invenzione costituisce un progresso tecnico significativo, di notevole interesse economico rispetto all'invenzione rivendicata nel brevetto”*. Inoltre, l'utilizzo di licenze obbligatorie su base caso per caso genera incertezza, con il rischio di rallentare l'innovazione in modo significativo.



Introduzione di *patent pools*: I *patent pools* rappresentano un accordo tra titolari di brevetti per concedere in licenza o cross-licenziare i propri brevetti relativi a una particolare tecnologia, sia tra loro stessi che a terze parti. Tali pool spesso costituiscono la base per standard industriali che forniscono alle imprese le tecnologie necessarie per sviluppare prodotti e servizi compatibili. Si potrebbe prevedere l'introduzione obbligatoria di *patent pools* per le TEA e i relativi prodotti, o persino per l'intero settore delle piante alimentari. Questo approccio potrebbe favorire la condivisione di conoscenze, strumenti e semi tra i costitutori, contribuendo a una maggiore accessibilità e cooperazione.

Licenze "*as of rights*": Un'alternativa alle licenze obbligatorie potrebbe consistere nella promozione di licenze "*as of rights*", una formula che non obbliga il titolare del brevetto a cedere i diritti, ma lo impegna a concedere licenze a condizioni ragionevoli a tutte le parti interessate. Sebbene questa soluzione possa ridurre l'incertezza e incoraggiare l'innovazione, la sua implementazione richiederebbe un notevole sforzo normativo e di negoziazione per garantire la trasparenza e l'equità dei termini.

Infine, qualunque sia la scelta che verrà presa circa la protezione della proprietà intellettuale delle TEA, sarà necessario uniformarla con le norme che proteggono la proprietà intellettuale dei caratteri ottenuti mediante mutagenesi. In diversi casi TEA e mutagenesi possono conseguire lo stesso risultato, e le nuove tecnologie basate su sequenziamento e/o dPCR per lo screening di grandi popolazioni di piante mutagenizzate hanno reso la mutagenesi competitiva con le TEA per certe applicazioni soprattutto nelle specie moltiplicate mediante seme. Applicare norme diverse allo stesso evento genetico (stessa mutazione) a seconda del metodo utilizzato per generarla potrebbe portare a numerose contestazioni.

3. ELEMENTI STRATEGICI PER AFFRONTARE IL FUTURO DELLE TEA IN ITALIA

Nei prossimi anni il sistema agroalimentare italiano dovrà affrontare sfide importanti, tra le quali l'adattamento delle specie coltivate ed allevate ai cambiamenti climatici, l'adozione di pratiche agricole e di allevamento rispettose dell'ambiente, nonché il cambiamento di gusto dei consumatori e le nuove esigenze di un mercato sempre più attento agli aspetti qualitativi e nutrizionali degli alimenti.



I recenti avanzamenti tecnologici nel campo della genomica e della bioinformatica rendono il miglioramento genetico delle specie agrarie lo strumento potenzialmente più idoneo ad affrontare le sfide dei prossimi anni. In questo contesto è necessario che, attraverso un'azione coordinata di investimenti pubblici e privati, l'Italia si riappropri del *know-how* genetico e genomico delle specie agrarie, secondo una *vision* per cui questo *know-how* costituisce un *asset strategico* del sistema agroalimentare nazionale. Da un punto di vista operativo è opportuno **concentrare gli interventi su poche specie rilevanti per il *made in Italy*** (cereali, orticole, piante da frutto e vite) **e tematiche strategiche per sostenere l'agroalimentare italiano** come:

- resistenze alle malattie, per limitare l'uso di prodotti chimici e la contaminazione da micotossine;
- produttività ed adattamento alle nuove condizioni climatiche (alte temperature e ridotta disponibilità idrica);
- efficienza nell'utilizzo delle risorse nutrizionali (azoto, fosforo, acqua);
- nuove o migliorate caratteristiche nutrizionali (antiossidanti, fibre e vitamine);
- nuove tipologie di frutti che per forma, colore, profumi, sapori od altre caratteristiche risultino distinguibili sul mercato, anche richiamando le tipicità riconducibili ai territori.

Il dibattito in corso in Italia tra mondo scientifico, stakeholders e decisori politici e più in generale il dibattito nella società, evidenzia una grande attenzione ed una apertura verso le nuove tecnologie per il miglioramento genetico. Un'attenzione che si è concretizzata nella stesura di un manifesto per le biotecnologie sottoscritto il 30 gennaio 2025 dalle principali associazioni agricole italiane, unitamente alle associazioni industriali più attive nel settore delle biotecnologie applicate all'agroalimentare. Nel manifesto sono state proposte alcune azioni per sostenere lo sviluppo delle TEA in Italia tra le quali: i) l'istituzione di un **Tavolo permanente sulle TEA** che veda la partecipazione di tutte le figure coinvolte e l'attivazione di una **campagna istituzionale di comunicazione** al fine di sensibilizzare l'opinione pubblica sull'importanza delle TEA per la tutela delle nostre produzioni e la sicurezza alimentare nazionale; ii) la costituzione di **una rete di centri di ricerca pubblica e privata** per moltiplicare gli sforzi del progresso scientifico sulle TEA, anche tramite la sperimentazione in campo; iii) l'istituzione di un **Fondo destinato alla ricerca di base e applicata nel campo delle TEA**.

Affinché questa apertura alle biotecnologie determini poi un **reale impatto** sull'agricoltura italiana si devono tenere in considerazione **tre aspetti essenziali**.



1. **L'apertura normativa alle biotecnologie deve essere accompagnata da significativi investimenti pubblici e privati.** Non è pensabile un'apertura verso le TEA senza un forte investimento in ricerca, questo vanificherebbe tutto quello che è stato fatto sinora. Per altro, un buon piano di investimenti nella ricerca pubblica, che rimane essenziale per l'avanzamento tecnologico e a garanzia di tutti, non può prescindere da una visione più ampia che includa meccanismi di protezione della proprietà intellettuale. Appare particolarmente strategico **investire in programmi di ricerca che mirino con approcci innovativi a identificare i geni chiave per i caratteri che devono essere oggetto del miglioramento tramite TEA.** In questo contesto è cruciale comprendere approfonditamente i meccanismi molecolari di regolazione trascrizionale di tali geni in quanto, mentre fino ad ora, soprattutto nel caso delle resistenze alle malattie, si è potuto operare molto semplicemente attraverso l'inattivazione della funzione genica, in futuro in particolare per migliorare le caratteristiche relative a efficienza di uso delle risorse e adattamento al cambiamento climatico sarà necessario agire sulla regolazione fine della espressione genica. **L'investimento in ricerca sulle basi genetiche dei caratteri è particolarmente strategico alla luce di quanto detto in merito alla protezione della proprietà intellettuale in quanto chi controllerà la proprietà intellettuale relativa alle funzioni dei geni avrà una posizione dominante nel settore dell'editing.** Inoltre, vi è la necessità di operare nella direzione del trasferimento tecnologico, ovvero di "portare in campo" l'innovazione attraverso collaborazioni strategiche con chi nel settore sementiero ha l'esperienza e le competenze tecniche per raggiungere lo scopo, a partire dall'introggressione dei caratteri in affermate linee varietali commerciali.
2. In agricoltura **l'obiettivo deve essere la selezione di nuove varietà e ibridi**, non la sola identificazione di nuovi geni e caratteri. Questo significa che gli investimenti nelle biotecnologie per avere un impatto sul sistema agricolo devono riguardare, più in generale, l'area della genomica intesa come l'insieme delle tecnologie avanzate necessarie per aumentare l'efficienza del miglioramento genetico (***genomics assisted selection***). Le competenze della ricerca italiana nel campo della genomica sono valide e affermate a livello internazionale, ma oltre alla capacità di sequenziamento genico, occorre, a questo scopo, un impegno su tutte le **altre tecnologie necessarie**, come, ad esempio, la rigenerazione *in vitro*, la fenotipizzazione avanzata, la bioinformatica, in particolare con l'utilizzo di *large language models* addestrati su dati genomici delle specie di interesse. Infine, è imprescindibile la possibilità di **sperimentare in campo** in condizioni di sicurezza, di protezione adeguata e senza vincoli non giustificati su basi scientificamente oggettive.



3. **I cambiamenti climatici, gli obiettivi del “Vision for Agriculture and Food” europeo e le modalità di evoluzione dei mercati richiedono un radicale cambiamento del panorama varietale.** Se il clima dei prossimi anni sarà più caldo di quello del recente passato, questo imporrà un cambiamento delle varietà coltivate. Le vecchie varietà selezionate per il clima del passato non saranno la miglior scelta per gli anni futuri, se caratterizzati da alte temperature, ridotta piovosità e nuove malattie. Al di là degli aspetti orientati ai problemi e alle politiche ambientali, è necessario ricordare il **valore strategico della produzione primaria**, tanto per il suo valore intrinseco, quanto per la stretta relazione con il comparto dell'industria alimentare che ne elabora i prodotti. L'adozione e lo sviluppo di un programma di miglioramento genetico basato su tecnologie innovative consentiranno di consolidare questa condizione strategica, anche valorizzando il **patrimonio di agrobiodiversità** di cui l'Italia è ricca, attraverso un'utilizzazione mirata dei caratteri più importanti, quali la
4. resistenza alle malattie, la tipicità o le caratteristiche nutrizionali, di cui le varietà tradizionali sono dotate.

In questo contesto promuovere un sistema pubblico-privato di miglioramento genetico basato sulle tecnologie genomiche più avanzate, sulla logica della riappropriazione condivisa del know-how genetico e genomico e sulle specifiche competenze operative dei diversi soggetti è strategico per adeguare l'agricoltura nazionale al futuro e mantenere la competitività del comparto agro-alimentare



APPENDICE

Le tecnologie di editing

La tecnologia CRISPR/Cas9 ingegnerizzata comprende due componenti principali: un RNA guida singolo (sgRNA) e la proteina Cas9. Lo sgRNA è un breve RNA sintetico costituito da una sequenza di 20 nucleotidi complementari alla sequenza target. Il DNA target deve essere immediatamente adiacente ad una piccola sequenza chiamata PAM che è specifica a seconda della nucleasi che si utilizza. L'enzima Cas9 guidato dall'RNA taglia la sequenza di DNA target e genera rotture a doppio filamento (double strand breaks; DBSs) nella regione di interesse. Inoltre, introducendo una singola proteina Cas9 e due o più sgRNA, la tecnologia CRISPR/Cas9 consente anche l'editing genomico multiplo. Il multiplexing effettuato con CRISPR può essere utilizzato per modificare più geni contemporaneamente o per eliminare ampie regioni genomiche. È noto, infatti, che molti dei geni codificanti proteine si presentano sotto forma di famiglie di geni paraloghi. I membri di una famiglia genica normalmente hanno strutture simili e funzioni sovrapposte. Pertanto, il knockout di un solo paralogo potrebbe non essere sufficiente, e spesso è necessario mutare due o più paraloghi per ottenere un effetto fenotipico. **L'editing multiplex** può essere utilizzato a tale scopo. Ad esempio, la famiglia genica del glutine nel grano include più di 70 geni, in questo contesto CRISPR-Cas9 è stato utilizzato con successo per modificare simultaneamente più geni delle gliadine contemporaneamente e sono state ottenute linee di grano con una reattività immunologica ridotta dell'85%.

Sebbene Cas9 sia molto efficiente, il suo requisito specifico di PAM, la specificità del bersaglio e le grandi dimensioni della proteina ne limitano le applicazioni. Per superare queste limitazioni, sono state studiate Cas alternative caratterizzate da diverse preferenze per le sequenze PAM oppure da diversi meccanismi d'azione, una gamma di Cas che nell'insieme amplia la gamma di geni bersaglio. Cas12a (o Cpf1) e Cas12b (o C2c1) sono utilizzate per modificare regioni genomiche ricche di AT, considerato che queste Cas riconoscono motivi PAM ricchi in T (tipicamente Cas9 che riconosce PAM ricchi in G), mentre Cas13a ha la capacità di scindere in modo specifico ed efficiente un RNA target sempre guidato da uno sgRNA ed infine Cas10 è in grado di effettuare grandi delezioni fino a migliaia di basi. Infine, sono note anche alcune varianti di Cas9 ingegnerizzate per modificare la compatibilità PAM.

L'editing del genoma avviene a seguito del taglio del doppio filamento di DNA provocato dalle nucleasi, per intervento dei meccanismi endogeni di riparazione della cellula non omologhi e omologhi, quest'ultimo solo nel caso venga fornito il frammento di DNA omologo. La riparazione



non omologa è il principale approccio utilizzato nell'ambito del genome editing per riparare le rotture a doppio filamento in quanto a seguito di questo processo possono essere introdotte inserzioni e delezioni nel sito target. Le mutazioni risultanti sono stocastiche, e normalmente causano knockout genici a causa di scorrimento nella sequenza di lettura. Utilizzando i meccanismi di riparo non omologhi è possibile ottenere anche una delezione mirata di DNA inducendo due DBS separati, in questo modo la regione compresa tra i due tagli viene rimossa.

Questo approccio è particolarmente importante per l'editing di regioni del DNA che hanno attività regolatrici e non codificanti per le quali piccole inserzioni o delezioni spesso non causano perdita di funzione. Con gli stessi sistemi possiamo ottenere **Riarrangiamenti cromosomici mirati**, che sono utili per rompere o fissare legami genetici. Quando coppie di DSB, infatti, vengono introdotte simultaneamente nello stesso cromosoma, possono generarsi delezioni di grandi dimensioni e inversioni tra le due rotture.

Base editing: Con l'avanzare della ricerca nell'ambito del genome editing, sono stati scoperti nuovi strumenti per un editing ancora più preciso, in grado, cioè di modificare alcune basi in altre senza rotture a doppio filamento. Un esempio è rappresentato dagli editori di basi (base editing) composti dalla nucleasi Cas9 fusa a deaminasi specifiche che sono in grado di catalizzare le transizioni CG in TA o AT in GC nei siti target ed in questo modo generare mutazioni puntiformi precise tramite conversioni di una singola base. Attualmente, esistono due editor di basi ampiamente utilizzati: **l'editor di basi della citosina (CBE)** e **l'editor di basi dell'adenina (ABE)**. Generando cambiamenti programmabili di una singola base del DNA, questi sistemi rappresentano degli strumenti potenti, per esempio, nel caso di malattie genetiche causate dalla mutazione di una o poche basi.

Prime editing: Gli editori di basi attuali non possono però produrre trasversioni di basi del DNA o inserzioni e delezioni di DNA predefinite; esiste una tecnica chiamata "prime editing" che consente la creazione di tutte le tipologie di sostituzioni di basi e piccole inserzioni e delezioni di DNA e viene largamente usata sia in cellule vegetali che umane. Anche se il prime editing è in grado di eseguire modifiche molto precise e ampie, ci sono ancora delle limitazioni. Ad esempio, non risulta particolarmente efficiente per inserire o rimuovere ampie sequenze di DNA, operazione ottenibile più facilmente con i classici sistemi CRISPR/Cas9. Il prime editing è comunque una tecnologia rivoluzionaria che amplia le possibilità di editing genomico, permettendo modifiche precise senza i problemi legati alle rotture a doppio filamento o all'uso di uno stampo di DNA esogeno. Grazie alla sua versatilità, il prime editing si sta rapidamente affermando come uno degli strumenti più



promettenti, accanto al base editing, per la correzione di mutazioni puntiformi, ad esempio in campo umano, con potenziali applicazioni terapeutiche avanzate.

Delivery o sistemi di somministrazione dei reagenti di editing genomico: Indipendentemente dal sistema che si decide di utilizzare, ci sono tre diversi approcci per introdurre il materiale necessario all'editing genomico nelle cellule:

1. Introdurre DNA che codifichi per le funzioni necessarie all'editing
2. Introdurre RNA generato dalla trascrizione *in vitro* della nucleasi e del sgRNA
3. Introdurre complessi di ribonucleoproteine (RNP) composte dalla nucleasi e dallo sgRNA trascritto *in vitro*

Sebbene questi tre diversi approcci siano utilizzati per tutti gli organismi, alcuni aspetti risultano essere variabili a seconda se si tratta di organismi vegetali, animali o microorganismi, specialmente per quanto riguarda il metodo di introduzione del materiale, sia esso DNA, RNA, o complessi RNA-proteina nelle cellule. I passaggi di trasformazione e rigenerazione rappresentano, ad esempio, ancora dei colli di bottiglia nell'editing del genoma delle piante, poiché questi processi devono essere ottimizzati per ogni specie e ogni varietà di pianta, il che risulta essere un compito arduo per la maggior parte delle varietà e delle specie selvatiche.

Inoltre, mentre il DNA può essere introdotto nelle cellule vegetali sia tramite bombardamento di particelle che trasformazione mediata da *Agrobacterium*, RNA e RNP sono introdotti nelle cellule vegetali preferenzialmente tramite bombardamento di particelle.

Il sistema ideale per la somministrazione dei reagenti di editing genomico nelle piante dovrebbe essere indipendente dal genotipo, senza necessità di coltura tissutale e applicato direttamente a tessuti specifici, come meristemi, foglie, semi o ipocotili. I metodi di somministrazione di elezione per le cellule vegetali includono bombardamento di particelle, trasformazione mediata da *Agrobacterium*, glicol polietilenico (PEG), vettori virali e nanoparticelle.

Nelle cellule/embrioni animali le metodiche di maggior utilizzo sono invece: la trasfezione chimica, la trasduzione virale, l'elettroporazione e la microiniezione. La trasfezione chimica è il metodo tradizionale per importare molecole esogene nelle cellule. Tuttavia, l'efficienza di questo metodo può essere limitata dalla rapida degradazione degli endosomi. Con l'elettroporazione che crea pori di dimensioni nanometriche sulla membrana cellulare tramite correnti ad alta tensione pulsate, si può



ottenere un'alta efficienza, tuttavia, poiché le cellule eucariotiche sono sensibili alla tensione elettrica e alla durata della corrente, è necessario adattare il protocollo ad ogni tipo cellulare. La microiniezione è al momento considerata il metodo più efficace, poiché, anche se richiede una manipolazione delicata ed è quindi più laboriosa rispetto ad altri metodi, non ha limitazioni di dimensioni relativamente al materiale da introdurre nella cellula; questo metodo è utilizzato principalmente per iniezioni in embrioni per studi sulla linea germinale.

Indipendentemente dalla nucleasi scelta, dal tipo di mutazione che si vuole ottenere o dal sistema di “delivery” utilizzato, il rapido progresso dell'editing genomico fa riflettere sul suo vasto potenziale in diverse discipline. La tecnologia continua ad evolversi, con sforzi continui per migliorare la sua efficienza, precisione e versatilità. Gli sviluppi futuri promettono di espandere ulteriormente le applicazioni dell'editing genomico, aprendo nuove frontiere dell'ingegneria genetica, nella biomedicina e nella biotecnologia.

Per saperne di più

Boshu Li, Chao Sun, Jiayang Li, Caixia Gao. 2024 Targeted genome-modification tools and their advanced applications in crop breeding. *Nature Reviews Genetics*, 25: 603–622
<https://doi.org/10.1038/s41576-024-00720-2>

Il presente documento elaborato ed edito dal CL.A.N. è stato rilasciato nel Maggio del 2025 sul sito web: clusteragrifood.it/documenti-position-papers/



CLUSTER AGRIFOOD NAZIONALE - CL.A.N.

Viale L. Pasteur, 10 - 00144 Roma

Tel 06.5903855 - Fax 06.5903342

clusteragrifood@gmail.com - www.clusteragrifood.it

