



Presidenza del Consiglio dei Ministri

*Comitato Nazionale per la Biosicurezza,
le Biotecnologie e le Scienze della Vita*



**LE NEW BREEDING TECHNIQUES (NBT):
1 - LA POSIZIONE DEI PRINCIPALI PORTATORI
D'INTERESSE ITALIANI**

17 luglio 2017

INDICE

Presentazione	3
1. Premessa	4
2. L'attuale quadro normativo	5
3. La consultazione	6
3.1. Domande e sintesi delle risposte pervenute.....	6
3.1.1 La regolamentazione delle varietà vegetali prodotte mediante NBT	7
3.1.2. La tracciabilità delle varietà vegetali prodotte mediante NBT	8
3.1.3. Le importazioni e la coltivazione delle varietà vegetali prodotte mediante NBT.....	10
3.1.4. L'interesse dell'agricoltura italiana per le NBT	11
3.1.5. Benefici e rischi delle NBT	13
4. Sintesi e conclusioni.....	14
Allegato 1	16
Allegato 2	17

Presentazione

Il Comitato ha ritenuto di approfondire l'ambito delle tecniche innovative di miglioramento genetico (*New Breeding Techniques* - NBT), che comprendono un'ampia varietà di approcci e permettono, tra l'altro, la correzione o revisione del genoma (*Genome Editing*) per l'ottenimento di precise modificazioni della sequenza di DNA di piante ed animali.

L'argomento è stato proposto dal gruppo di lavoro coordinato dal Presidente, il Prof. Andrea Lenzi, e dai Proff. Marco Gobbetti e Piero Morandini nella plenaria del 3 ottobre 2016 con il documento su "Le biotecnologie genetiche avanzate nei vegetali".

Nella riunione Plenaria del 5 dicembre 2016, il Prof. Piero Morandini ha, poi, proposto, con l'ausilio di alcune diapositive, un piano di lavoro dal titolo "Opportunità, problemi e aspetti normativi delle nuove tecniche di miglioramento genetico", ravvisando la necessità di raccogliere in merito la posizione della comunità scientifica italiana e di altri portatori di interesse nel settore (richiedendo pareri scritti su una serie di domande riferite all'ambito agrario/agroalimentare - e non a quello medico - ad enti di ricerca, accademie e associazioni). L'obiettivo finale è ricavare dalla letteratura scientifica e dalle risposte fornite dagli enti interpellati indicazioni per il legislatore.

Nella Plenaria del 10 aprile 2017 i Proff. Marco Gobbetti e il Prof. Piero Angelo Morandini hanno riferito circa lo stato dell'arte in materia. La Plenaria ha, altresì, approvato la proposta di coinvolgere le principali associazioni di settore interessate al tema le quali sono state formalmente interpellate ed hanno tutte fornito la risposta la propria posizione.

In data 28 Aprile 2017 il Gruppo di Alto Livello del Meccanismo di Consulenza Scientifica (*Scientific Advice Mechanism High Level Group* - SAM HLG) della Commissione Europea ha pubblicato una nota esplicativa sulla natura e le caratteristiche delle nuove tecniche di miglioramento genetico (con un'analisi comparativa tra CBT, ETGM e NBT), in merito alla quale il Ministero dell'Ambiente, della Tutela del Territorio e del Mare ha richiesto un parere (Allegato 1) al Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita (CNBBSV).

Nella Plenaria del 17 luglio 2017 i Proff. Marco Gobbetti e il Prof. Piero Angelo Morandini hanno portato in discussione e approvazione il documento "Le *New Breeding Techniques* (NBT): 1 - la posizione dei principali portatori d'interesse italiani", al quale ha dato il proprio contributo anche il Prof. Paolo Visca, corredato del parere del CNBBSV rilasciato al Ministero (Allegato 2).

Il Comitato approva tale documento all'unanimità dei presenti, i Proff.: Carlo Caltagirone, Paolo Gasparini, Maurizio Genuardi, Marco Gobbetti, Paola Grammatico, Piero Angelo Morandini, Luigi Naldini, Ferdinando Nicoletti, Giuseppe Novelli, Pier Franco Pignatti, Roberta Siliquini, Paolo Visca.

Assenti alla votazione, hanno espresso successivamente la loro adesione i Proff.: Antonio Amoroso, Antonio Bergamaschi, Roberto Cingolani, Mauro Magnani.

Il Presidente Prof. Andrea Lenzi

1. Premessa

Tutti gli organismi viventi sono soggetti a modificazioni dell'informazione genetica come conseguenza di processi biologici (es. mutazioni legate alla replicazione) e come effetto di fattori ambientali (es. raggi cosmici) o di trattamenti mutageni operati dall'uomo. Tali modificazioni sono alla base dell'evoluzione e conducono, inevitabilmente, alla diversificazione genetica delle popolazioni. La semplice selezione e le tecniche di miglioramento genetico applicate in agricoltura hanno sfruttato e sfruttano questa diversità genetica per la produzione di piante, animali e microrganismi con nuovi caratteri. Le piante coltivate sono il risultato della selezione plurisecolare di specie selvatiche che ha causato poche ma profonde modificazioni genetiche funzionali alla coltivazione e al sostentamento dell'uomo e degli animali. Le modificazioni genetiche sono, quindi, intrinseche all'agricoltura e senza di esse non vi sarebbe sufficiente produzione per sostenere l'attuale popolazione¹. Successivamente alla semplice selezione, nell'ultimo secolo sono state sviluppate diverse tecniche con l'obiettivo di creare, introdurre, tracciare e combinare nuovi e desiderabili caratteri.

In questo documento è adottata la classificazione² che distingue tecniche convenzionali di miglioramento genetico (*Conventional Breeding Techniques* - CBT), tecniche consolidate di modificazione genetica (*Established Techniques of Genetic Modification* - ETGM) e tecniche innovative di miglioramento genetico (*New Breeding Techniques* - NBT). Quest'ultime, a loro volta, ricomprendono un'ampia varietà di tecniche³ che rappresentano un perfezionamento delle CBT o sono usate in combinazione con le ETGM o più spesso con le CBT. Le NBT più innovative e promettenti sono quelle che permettono la correzione o revisione del genoma (il cosiddetto *Genome Editing*) per l'ottenimento di precise modificazioni della sequenza di DNA che possono variare da mutazioni puntiformi (modificazione di uno o pochi nucleotidi) all'inserzione di geni *ex novo*. Il *Genome Editing*, già possibile da diversi anni in modalità poco efficiente, è stato notevolmente migliorato e facilitato dall'introduzione delle nucleasi sito dirette (*Site-Directed Nucleases SDNs*, TALEN e ZFN) ed è letteralmente esploso negli ultimi cinque anni con lo sfruttamento delle nucleasi RNA dipendenti, proprie del sistema batterico CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associato all'enzima Cas9 (CRISPR/Cas9) e sistemi analoghi. Le

¹ Con riferimento al documento "Considerazioni riguardo la tecnica del *genome editing* per il miglioramento genetico delle colture agrarie" prodotto congiuntamente nel 2016 dalla Società Italiana di Genetica Agraria e dalla Società Italiana di Biologia Vegetale, disponibile su entrambi i siti.

² "New Techniques in Agricultural Biotechnology" prodotto dall'*High Level Group of Scientific Advisors del Scientific Advice Mechanism* (SAM) della Commissione Europea, *Directorate-General for Research and Innovation Unit*, RTD.01; ISBN 978-92-79-66222-5 doi: 10.2777/574498 KI-02-17-242-EN-N. La versione PDF è scaricabile dal sito <http://goo.gl/DF2bj4>.

³ Per ulteriori informazioni su queste tecniche si rimanda a Lusser M., Parisi C., Plan D. e Rodríguez-Cerezo E., *New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects for commercial development*, in "JRC Scientific and Technical Reports", 2011, e nota 2.

modificazioni genetiche indotte in organismi mediante *Genome Editing*, pur essendo spesso ottenute usando tecniche di ingegneria genetica, risultano in molti casi indistinguibili da quelle ottenute mediante metodi convenzionali di mutagenesi o derivanti da mutazioni spontanee, e quindi c'è incertezza sul loro inquadramento normativo nella UE, cosa che pone seri problemi perché alcune varietà ottenute con le NBT sono già presenti sul mercato internazionale o lo saranno presto, ed è prevedibile che molte altre vengano commercializzate nei prossimi anni. Queste motivazioni hanno spinto il Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita (CNBBSV) a iniziare una riflessione sulle NBT, a prevedere i possibili scenari e a suggerire le scelte più adeguate in base alle attuali conoscenze scientifiche. In questo primo documento si riporta la posizione del mondo scientifico nazionale e degli altri portatori di interesse italiani a riguardo delle NBT.

Recentemente (28 Aprile 2017), il Gruppo di Alto Livello del Meccanismo di Consulenza Scientifica (*Scientific Advice Mechanism High Level Group - SAM HLG*) della Commissione Europea ha pubblicato una nota esplicativa² sulla natura e le caratteristiche delle nuove tecniche di miglioramento genetico, con un'analisi comparativa tra CBT, ETGM e NBT. A questa esauriente nota si rimanda per la descrizione delle tecniche e la più ampia trattazione di alcuni risultati applicativi. Nel merito della suddetta nota del *SAM HLG*, il CNBBSV ha espresso il parere riportato nell'Allegato 2.

2. L'attuale quadro normativo

Ogni pianta transgenica, in quanto Organismo Geneticamente Modificato (OGM) secondo la vigente normativa, è soggetta ad autorizzazione per la coltivazione e la commercializzazione ai sensi della Direttiva 2001/18/EC e del Regolamento 2003/1829. Nell'interpretazione dominante, la Direttiva 2001/18/EC regola, di fatto, il metodo impiegato per produrre una nuova pianta e non le caratteristiche della stessa. Non si può, tuttavia, parlare *tout court* di una normativa di processo, perché non è sufficiente utilizzare tecniche di DNA ricombinante per rientrare nell'ambito giurisdizionale della Direttiva 2001/18/EC. Almeno teoricamente, è necessario un requisito di novità, cioè la presenza di nuove combinazioni di materiale genetico. In definitiva, la Direttiva 2001/18/EC può essere configurata, sebbene in subordine, anche come una normativa di prodotto. Infatti, la mutagenesi indotta in maniera casuale con trattamenti chimici o fisici è riconosciuta dalla Direttiva 2001/18/EC come una tecnica che porta a modificazione genetica, ma è esentata dal suo ambito di applicazione in forza della tradizione d'uso sicuro e dell'assimilazione ai processi naturali.

Poiché la Direttiva 2001/18/EC è stata emanata e recepita antecedentemente alla definizione e applicazione delle tecniche di *Genome Editing*, le piante ottenute con tali tecniche, proprio per la loro peculiarità, sono attualmente in una condizione di vuoto legislativo. Il pronunciamento della Commissione Europea potrebbe delineare scenari contrapposti. Qualora le piante ottenute mediante

Genome Editing fossero legalmente considerate OGM, potrebbe risultare molto difficile, se non impossibile, distinguerle da mutanti naturali o indotti con metodi casuali, potendo di fatto eludere la normativa sugli OGM. Nell'ottica opposta e come temporaneamente deciso da alcune autorità nazionali, i prodotti del *Genome Editing* che non contengano DNA esogeno potrebbero essere esentati dalla Direttiva 2001/18/EC.

Auspicando un rapido pronunciamento della Commissione Europea che risulterà determinante per lo sviluppo, difesa e sostenibilità dell'agricoltura europea, è sicuramente raccomandabile che il futuro sistema normativo sia basato sui prevedibili rischi del prodotto (es. pianta, animale o microrganismo) in funzione dell'effetto della modificazione eseguita sul fenotipo, della combinazione di geni usati e della specie ricevente.

3. La consultazione

Con l'obiettivo di rappresentare le posizioni sulle nuove tecniche di miglioramento genetico (NBT) applicate al comparto agrario e di fornire elementi utili per un'interpretazione e revisione legislativa in materia (cfr. paragrafo 2.0), il CNBBSV ha condotto un'ampia consultazione avente per oggetto diversi portatori d'interesse, individuati nelle associazioni scientifiche, negli organi di ricerca, nelle associazioni di categoria e nelle associazioni di industriali. Hanno aderito alla consultazione e fornito il loro contributo: l'Accademia dei Lincei, l'Associazione Industriali delle Carni e dei Salumi (ASSICA), l'Associazione Italiana Sementi (ASSOSEMENTI), l'Associazione Italiana delle Società Scientifiche Agrarie (AISSA), l'Associazione Nazionale Cerealisti (ANACER), l'Associazione Nazionale per lo Sviluppo delle Biotecnologie (ASSOBIOTEC), l'Associazione Nazionale tra i Produttori di Alimenti Zootecnici (ASSALZOO), Coldiretti, il Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR - Dipartimento di Scienze Bio-Agroalimentari), il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria (CREA), la Federazione Italiana dell'Industria Alimentare (FEDERALIMENTARE), la Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV), la Società Italiana di Biologia Vegetale (SIBV), la Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA), l'Unione Nazionale fra gli Industriali dello Zucchero (UNIONZUCCHERO) e l'Unione Nazionale delle Accademie per le Scienze Applicate allo Sviluppo dell'Agricoltura (UNASA).

3.1. Domande e sintesi delle risposte pervenute

La consultazione ha richiesto pareri e posizioni su temi ben precisi, precedentemente discussi nell'ambito del CNBBSV e ritenuti prioritari in funzione dell'obiettivo del presente documento. I temi sono stati formulati sotto forma di domande e i contributi pervenuti, che rimangono agli atti del CNBBSV, sono qui di seguito sintetizzati in altrettanti paragrafi corrispondenti ai cinque temi della consultazione. Seppure con argomentazioni complementari, i contributi convergono in maggioranza

su una proposta unitaria, che il CNBBSV ha integrato, ove opportuno, con ulteriori informazioni o considerazioni. Le eventuali posizioni divergenti sono riportate in appendice ai singoli paragrafi.

3.1.1 La regolamentazione delle varietà vegetali prodotte mediante NBT

E' fortemente auspicato che ciascuna varietà vegetale prodotta mediante NBT debba essere regolamentata sulla base del carattere o dei caratteri modificati o introdotti e in relazione al possibile incremento del rischio per la salute e per l'ambiente rispetto al rischio comunemente associato alla pianta da cui essa origina. L'impatto sulla salute dell'uomo e sull'ambiente dipendono dal corredo genetico della pianta e non dal processo con cui tale corredo genetico è stato ottenuto. Un'analisi basata sul prodotto e non sul processo ha, inoltre, il vantaggio di non richiedere un aggiornamento della normativa ogni qual volta si verifichi un progresso tecnologico. Solo in limitati casi, e cioè quando il meccanismo di *Genome Editing* rimanga volutamente attivo nel prodotto per dare origine a un *gene drive* (meccanismo di ereditarietà che favorisce la diffusione di un carattere specifico in una popolazione)⁴, è auspicabile che la regolamentazione ponga attenzione al meccanismo genetico impiegato proprio per le sue caratteristiche di diffusibilità.

La Direttiva 2001/18/EC si basa su una definizione di OGM ormai superata sia dalle conoscenze scientifiche sul trasferimento naturale di geni⁵ e sia dallo sviluppo di nuove tecniche. È auspicabile una modifica della normativa che semplifichi la regolamentazione delle piante transgeniche, modulandola in proporzione ai caratteri trasferiti e alla loro funzionalità e origine, con lo scopo di accomunare, dal punto di vista normativo, le piante ottenute mediante incroci tradizionali a quelle prodotte mediante *Genome Editing*, ove quest'ultime non presentino combinazioni di geni diverse da quelle potenzialmente ottenibili mediante mutagenesi o incrocio⁶. Come sottolineato anche nella nota esplicativa del SAM HLG sulle nuove tecniche di miglioramento genetico (cfr. paragrafo 1), molti prodotti del *Genome Editing* potrebbero essere ottenuti mediante CBT o ETGM, sebbene con minor grado di precisione, oppure per mutazione spontanea, venendo così a mancare la condizione di novità richiesta dalla Direttiva. Nella fattispecie non è, quindi, scientificamente corretto normare differentemente prodotti indistinguibili. Nel caso, molto prevedibile, in cui la Direttiva 2001/18/EC non sia modificata in tempi rapidi, è auspicabile che i prodotti del *Genome Editing* che non presentino combinazioni di geni diverse da quelle ottenibili mediante mutagenesi casuale o incrocio siano esclusi dal campo d'applicazione. In caso contrario, è facile prevedere un impatto negativo sulla ricerca e l'innovazione a livello nazionale ed europeo.

⁴ Ledford, *Caution urged over editing DNA in wildlife (intentionally or not)*, in "Nature", 2015, 524:16.

⁵ Danchin EG., *Lateral gene transfer in eukaryotes: tip of the iceberg or of the ice cube?*, in "BMC Biol.", 2016, 14:101; Yang et al., *Horizontal gene transfer is more frequent with increased heterotrophy and contributes to parasite adaptation*, in "Proc Natl Acad Sci USA", 2016, 113:E7010–E7019.

⁶ Per i dettagli tecnici sulle diverse classi di prodotti ottenibili, si rimanda al documento SIGA-SIBV citato nella nota 1.

Contrariamente a quanto riportato come sintesi di tutte le consultazioni, Coldiretti ritiene che le varietà vegetali, frutto delle nuove tecniche, debbano essere considerate sotto il duplice profilo del prodotto in sé e del procedimento seguito per ottenerlo, comprendendole nella definizione di OGM (organismo il cui materiale genetico sia stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale). Tale opinione appare contraddittoria in quanto molti prodotti del *Genome Editing* sono modificati con un processo simile, se non identico, a quello che spontaneamente può avvenire in natura, rispecchiando la definizione di mutagenesi non casuale indotta tramite trattamenti biologici e accomunando tali prodotti a quelli ottenuti da mutagenesi indotta, già esentati dall'applicazione della Direttiva 2001/18/EC.

3.1.2. La tracciabilità delle varietà vegetali prodotte mediante NBT

Qualora la Direttiva 2001/18/EC fosse indistintamente applicata a tutte le varietà vegetali prodotte mediante NBT, è plausibile prevedere problemi di tracciabilità delle varietà approvate per la commercializzazione in Paesi non europei, ove non vi sia l'obbligo di definirne l'alterazione genetica contenuta. Un'alterazione genetica ignota non sarebbe identificabile a priori, con la conseguente impossibilità d'individuare la presenza di tali varietà nell'ambiente, come chiaramente richiesto dalla normativa europea sugli OGM (Regolamento UE1830/2003). Questa condizione sarebbe molto probabile, se non certa, nel caso in cui l'applicazione di tecniche NBT non implichi l'inserimento di sequenze estranee nel genoma, ma solamente mutazione di uno o pochi nucleotidi del gene o dei geni bersaglio. A supportare questa considerazione, vi è il riscontro di varietà vegetali ottenute mediante mutagenesi convenzionale (biologica, chimica o fisica), prodotte da oltre ottanta anni, e che ancora oggi sono rilasciate senza che vi sia l'obbligo di renderne nota l'alterazione genetica. Una mutazione ottenuta per mutagenesi casuale potrebbe essere replicata tramite *Genome Editing* senza che rimanga traccia del processo. Un esempio di ciò sono le varietà *ClearField* di riso e girasole coltivate in Italia. Solamente per il riso è stimato che tali varietà siano coltivate su una superficie di circa 70.000 ettari. Le varietà *ClearField* di riso e girasole, rese resistenti a una classe di erbicidi mediante mutagenesi casuale, potrebbero essere facilmente riprodotte mediante *Genome Editing* senza che vi sia la possibilità di determinare il processo utilizzato. Un altro esempio classico è quello della resistenza all'oidio mediata dal gene *mlo*⁷. Il gene *mlo* è stato scoperto in orzo a seguito di mutagenesi chimica. L'inattivazione del gene *mlo* conferisce resistenza a tutte le razze di oidio, con modesti effetti collaterali sul fenotipo. Dove l'oidio è una seria patologia, tutte le varietà di orzo utilizzano la resistenza conferita dall'inattivazione del gene *mlo*, sfruttando non una delle mutazioni indotte bensì una mutazione spontanea identificata in Etiopia e chiamata *mlo-11*. Tuttavia, *mlo* è un gene conservato in tutte le piante e l'oidio è una malattia comune a molte specie coltivate. Pertanto, mutanti *mlo* possono essere ottenuti mediante *Genome Editing* (es.

⁷ Büschges et al., *The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance*, in "Cell", 1997, 88:695-705.

frumento⁸) o mutagenesi anche in altre specie dove il gene *mlo* sia presente, ma nelle quali non sia mai stata selezionata la corrispondente mutazione. Il sistema *mlo*/oidio è, quindi, un ulteriore esempio di un carattere ottenibile mediante NBT, mutagenesi chimica oppure analisi della diversità naturale, senza che a posteriori sia possibile riconoscere l'origine della mutazione.

Alcune proposte di regolamentazione oggetto di valutazione negli USA prevedono che le varietà ottenute mediante *Genome Editing* senza inserimento di sequenze esogene di DNA (altresì tecnicamente definite come ottenute mediante SDN-1 e SDN-2⁹) siano autorizzate solo previa documentazione dei cambiamenti di sequenza contenuti¹⁰. Seguendo questa prassi sarebbe possibile sviluppare test molecolari specifici per identificare tali varietà, come di routine ha luogo per gli OGM in commercio. Nel caso, infine, di modificazioni con integrazione di sequenze esogene di DNA (*Genome Editing* usato in modalità SDN-3⁹, cisgenesi, intragenesi), l'applicazione della Direttiva 2001/18/EC sarebbe automatica, a meno di esenzioni specifiche previste dalla Direttiva stessa, e proporzionate in funzione delle caratteristiche del prodotto e della sua somiglianza ai prodotti del *breeding* convenzionale (es. cisgenesi).

Qualora le NBT non fossero autorizzate in ambito nazionale o europeo, dovrebbe essere conseguentemente impedita anche l'importazione di specie vegetali, mangimi o alimenti ottenuti mediante queste tecniche, con conseguenti problemi di approvvigionamento. Nel caso di piante prodotte mediante NBT, si manifesterebbero gravi ripercussioni in settori strategici (es. barbatelle di vite, alcune varietà di riso, melo e prodotti orticoli) con inevitabile perdita di mercato internazionale. Considerata la prevedibile pleora di varietà vegetali ottenute mediante NBT disponibili nel prossimo futuro, bloccarne l'autorizzazione alla coltivazione potrebbe avere un serio impatto sulla disponibilità di sementi e materie prime di origine europea.

Contrariamente a quanto riportato come sintesi di tutte le consultazioni, Coldiretti ritiene che l'applicazione delle disposizioni della Direttiva 2001/18/EC alle NBT sia necessaria in considerazione dei rischi collegati a tali tecniche sul piano della trasparenza, poiché esse rendono sostanzialmente impossibile la distinzione della pianta modificata da quella non modificata con gravi ripercussioni, anche sotto il profilo economico, sugli altri tipi di coltivazione, specialmente nel comparto delle colture biologiche. Con questa considerazione non è però specificato come sia possibile l'applicazione della Direttiva quando i prodotti risultino indistinguibili o come prodotti indistinguibili possano avere ripercussioni diverse su altri tipi di coltivazioni. Inoltre, non appare dimostrabile l'effetto negativo dei prodotti delle NBT sull'utilizzo di pratiche di agricoltura biologica.

3.1.3. Le importazioni e la coltivazione delle varietà vegetali prodotte mediante NBT

Come in parte già motivato nel precedente paragrafo, in caso di applicazione della Direttiva 2001/18/EC alle varietà vegetali ottenute mediante NBT, sarebbero inevitabili gravi ripercussioni

⁸ Wang et al., *Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew*, in "Nat Biotechnol.", 2014, 32:947-51.

⁹ Per i dettagli tecnici si veda il documento citato in nota 1.

¹⁰ Huang et al., *A proposed regulatory framework for genome-edited crops*, in "Nat Genet.", 2016, 48:109-11.

sulle importazioni. Il caso più frequente riguarderà l'importazione delle varietà vegetali prodotte con NBT da Paesi in cui queste non siano considerate legalmente come OGM e, quindi, non siano caratterizzate a livello molecolare, verso altri Paesi in cui, al contrario, sono regolamentate come OGM. In un simile scenario, è prevedibile una consistente diminuzione della quantità di materie prime disponibili, di cui l'Unione Europea e l'Italia, in particolare, si approvvigionano da Paesi Terzi.

In termini più generali, è opportuno ricordare che i divieti di coltivazione di varietà transgeniche sul suolo nazionale hanno acuito gravi lacune di produttività e competitività. Eclatante è l'esempio del mais, per il quale è documentabile da oltre venti anni un arresto delle rese e la diminuzione di circa il 50% della superficie nazionale coltivata. Il decremento delle maggiori produzioni primarie aggrava il deficit strutturale dell'industria di trasformazione che si approvvigiona all'estero per oltre il 50% delle materie prime. Agli agricoltori italiani è vietata la coltivazione delle varietà transgeniche, ma è consentita l'importazione delle materie prime per la produzione di alimenti e, soprattutto, di mangimi. La complessità e lunghezza dei tempi necessari per ammettere alla coltivazione ed al consumo alimentare una varietà transgenica ne hanno limitato la numerosità e reso esageratamente costosi gli investimenti. Al contrario, le NBT consentono di ottenere varietà in tempi rapidi e con costi contenuti, accelerando così il progresso produttivo di numerose colture vegetali. Su queste basi, l'agricoltura italiana potrebbe incrementare la competitività.

Purtroppo, diversi Paesi sembrano orientati verso approcci normativi non omogenei, aventi un diverso grado di permissività e lasciando presagire futuri contenziosi commerciali. Al contrario, è fortemente auspicabile che la regolamentazione delle varietà vegetali ottenute mediante NBT sia armonizzata a livello internazionale, così da evitare squilibri competitivi tra gli operatori del mercato unico in termini di accesso alle risorse, permettere la libera circolazione delle merci e ridurre i prezzi praticabili al consumatore. È da sottolineare che una posizione meno restrittiva a livello italiano o europeo non aggraverebbe il livello di rischio rispetto al miglioramento genetico convenzionale (livello peraltro estremamente basso ed ineliminabile), ma eviterebbe l'introduzione di controlli onerosi sulle importazioni e ridurrebbe, quindi, la burocrazia e i relativi contenziosi.

Contrariamente a quanto riportato come sintesi di tutte le consultazioni, Coldiretti ritiene che la Commissione Europea, attraverso le più recenti disposizioni, riconosca agli agricoltori e alle comunità agricole il ruolo di custodi delle varietà vegetali e assicuri la conservazione e valorizzazione della biodiversità attraverso l'impiego e la sperimentazione di metodi di riproduzione rigorosamente non brevettabili. Tale considerazione, anche se non perfettamente allineata al tema in oggetto, solleva l'importante questione della brevettabilità. A questo riguardo, vi è da sottolineare che il ruolo attribuito/invocato concerne una frazione molto esigua delle varietà coltivate e che tale ruolo non è influenzato dalle varietà prodotte commercialmente, il cui sviluppo è possibile in virtù della protezione della proprietà intellettuale, come definita dall'Unione Europea mediante il sistema di privativa per ritrovati vegetali (convenzione UPOV - *Union for the Protection of New Varieties of Plants*). Il sistema di privativa è ben distinto dal brevetto industriale, in quanto esso integra il principio di esenzione dei

costitutori con il libero accesso alle varietà protette, contribuendo in maniera decisiva al progresso dell'agricoltura attraverso lo sviluppo di nuove varietà.

3.1.4. L'interesse dell'agricoltura italiana per le NBT

In generale, le NBT sono più facilmente applicabili a caratteri con base genetica semplice e quando la relazione tra genotipo e fenotipo sia ben nota. È, inoltre, importante la disponibilità di risorse genetiche (cultivar facilmente manipolabili *in vitro*), genomiche (conoscenza dell'intera sequenza) e biologiche (conoscenza della funzione dei geni), e la conoscenza di protocolli di rigenerazione *in vitro* e *gene delivery*¹¹. Tali condizioni sussistono per molte delle più importanti colture italiane (es. ortaggi, frutta, cereali, vite), le quali potrebbero essere migliorate con le nuove tecniche.

Per tutte le colture vegetali, il miglioramento della resistenza a stress biotici e abiotici è un obiettivo di primaria importanza, in grado d'incidere sulla produttività e qualità delle produzioni. Le tecnologie di silenziamento genico mediante *RNA-dependent DNA Methylation* (RdDM) tramite transgenesi, ma senza geni estranei, e gli approcci di *gene knockout* mediante *Site Directed Nuclease* sono fruibili in tutti i casi in cui siano noti i geni necessari per l'interazione ospite/parassita (geni di suscettibilità). A questo riguardo, la letteratura evidenzia esempi concreti di resistenza a batteri nel riso¹² e negli agrumi¹³, a funghi nella patata¹⁴ e frumento¹⁵, e a virus nel cetriolo¹⁶. Inoltre, resistenze a patogeni diversi possono essere ottenute combinando il *Genome Editing* con la ricombinazione omologa, cioè introducendo in maniera mirata alleli che conferiscono resistenza a patogeni da specie sessualmente compatibili (cisgenesi allo stesso locus). Il trasferimento di cisgeni per la resistenza a patogeni è stato dimostrato nella patata¹⁷ e nel melo¹⁸, mentre nella vite sono noti, in specie sessualmente compatibili, geni di resistenza a oidio e peronospora, già trasferiti con approcci classici ma laboriosi, e che potrebbero essere impiegati in approcci cisgenici¹⁹. In questo contesto, le NBT costituiscono uno strumento eccellente per introdurre in tempi rapidi alleli di

¹¹ Altpeter et al., *Advancing crop transformation in the era of genome editing*, in "Plant Cell", 2016, 28:1510-20; Cardi et al., *Genetic transformation and genomic resources for next-generation precise genome engineering in vegetable crops*, in "Front Plant Sci.", 2017, 8:241.

¹² Li et al., *High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice*, in "Nat Biotechnol.", 2012, 30: 390-2.

¹³ Jia et al., *Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker*, in "Plant Biotechnol J.", 2017, 15:817-23.

¹⁴ Sun et al., *Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance*, in "Transgenic Res.", 2016, 25:731-42.

¹⁵ Ad esempio la referenza citata in nota 8.

¹⁶ Chandrasekaran et al., *Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology*, in "Mol Plant Pathol.", 2016, 17:1140-53.

¹⁷ Jo et al., *Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking*, in "BMC Biotechnol.", 2014, 14:50.

¹⁸ Vanblaere et al., *The development of a cisgenic apple plant*, in "J Biotechnol.", 2011, 154:304-11.

¹⁹ Di Gaspero, Morgante, *Nuove tecnologie genetiche al servizio della viticoltura*, in "Informatore agrario", 2016, 21:55-7.

resistenza, anche in specie poliploidi²⁰ dove le strategie classiche sarebbero inefficaci o in specie dove il ricorso all'incrocio andrebbe a modificare l'identità genetica delle varietà esistenti¹⁸. Approcci di *Genome Editing* permettono di creare geni di resistenza per il controllo di virus a DNA o RNA in diverse specie vegetali²¹. Tuttavia, diverse di queste strategie richiedono la continua presenza di nucleasi e, quindi, implicano l'uso di piante transgeniche, mentre altre strategie richiedono l'inattivazione di geni endogeni e sono, quindi, assimilabili ai prodotti delle tecniche convenzionali.

La tolleranza a stress abiotici è un altro obiettivo di rilievo, sebbene la complessità dei caratteri coinvolti abbia, per ora, limitato l'applicazione delle tecniche NBT. Approcci di *Genome Editing* sono stati dimostrati nel pomodoro e in altre specie vegetali per le quali si dispone di rilevanti conoscenze genomiche e fisiologiche.

Alleli superiori legati alla qualità, nella sua accezione più ampia, delle produzioni vegetali sono trasferibili da specie sessualmente compatibili. Come esempi possono essere menzionati il contenuto di zuccheri nella bacca di pomodoro²², la qualità panificatoria nel grano²³ e l'accumulo di molecole antiossidanti in diverse specie vegetali. Inoltre, il *Genome Editing* può consentire l'eliminazione di alleli responsabili di caratteristiche negative, quali, ad esempio, l'ossidazione durante lo stoccaggio dei semi nei cereali²⁴, il contenuto di glicocalcoidi o l'imbrunimento nei tuberi di patata²⁵ e il contenuto di allergeni e tossine in diverse specie vegetali. Approcci di *Genome Editing* possono essere impiegati per indurre l'apirenia (ossia prevenire la formazione di semi) nell'uva da tavola.

Pur risultando importante impiegare le NBT in situazioni che danno risultati in tempi relativamente rapidi e che consentono di ammortizzare rapidamente gli investimenti economici, è da segnalare che le stesse tecniche possono manifestare effetti positivi su intervalli temporali più lunghi, quali, ad esempio, quelli che caratterizzano le specie fruttifere o forestali. Caratteri interessanti in tal senso sono la già citata resistenza a patogeni, il portamento per facilitare la raccolta o la durata post-raccolta del prodotto.

Contrariamente a quanto riportato come sintesi di tutte le consultazioni, Coldiretti ritiene che l'esempio dei Paesi dove le NBT sono impiegate ne ha evidenziato la scarsa utilità pratica essendo, sinora, documentato il loro impiego per obiettivi di scarso interesse e con effetti non ancora definiti.

²⁰ Zhang et al., *Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat*, in "Plant J." (in stampa), 2017. Si vedano anche le referenze citate alle note 8 e 13.

²¹ Zaidi et al., *Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance*, in "Front Plant Sci.", 2016, 7:1673.

²² Fridman et al., *A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene*, in "Proc Natl Acad Sci U S A.", 2000, 97:4718-23.

²³ Gadaleta et al., *A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1Dy10*, in "J. Cereal Sci.", 2008, 48:439-45.

²⁴ Ma et al., *TALEN-based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds*, in "PLoS One", 2015, 10:e0143877.

²⁵ Clasen et al., *Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout*, in "Plant Biotechnol J.", 2016, 14:169-76.

Tali tecniche favorirebbero l'omologazione e ridurrebbero i caratteri di tipicità, biodiversità e la distinzione del *made in Italy*.

3.1.5. Benefici e rischi delle NBT

Ogni combinazione coltura/carattere deve essere valutata singolarmente nel contesto delle pratiche agronomiche utilizzate per la coltivazione, considerando la base genetica del carattere d'interesse e la strategia riproduttiva della pianta. I rischi connessi alle principali applicazioni delle NBT sono paragonabili a quelli delle tecniche convenzionali, che sono giudicati accettabili dalla normativa attuale. La maggior differenza tra questi due approcci consiste nella maggior precisione delle nuove tecniche e, quindi, nel minor rischio di effetti imprevisti. È, quindi, ragionevole giudicare l'introduzione delle nuove varietà sulla base dei benefici legati ai diversi caratteri introdotti (cfr. paragrafo 3.1.4).

La resistenza delle specie vegetali ai microrganismi patogeni è un carattere di estremo interesse che riguarda tutte le colture agrarie. Poiché i microrganismi patogeni impiegano tempi relativamente brevi per sviluppare meccanismi di superamento delle resistenze e le varietà tolleranti diventano rapidamente obsolete, il *Genome Editing* offre la possibilità di seguire l'evoluzione del rapporto patogeno-ospite mantenendo adeguati livelli di tolleranza, o di ampliare progressivamente il repertorio di meccanismi di resistenza per ritardarne il superamento. Un intervento del genere è stimabile che possa ridurre in maniera significativa (70-90%) l'uso di fungicidi, soprattutto nella vite, e allungare la durata delle strategie di resistenza.

È plausibile che nei prossimi anni gli studi di fisiologia e genomica funzionale possano evidenziare molti dei meccanismi coinvolti nella produttività delle piante coltivate. Tali studi, associati a quelli di genomica strutturale, porteranno all'identificazione di varianti geniche d'interesse dal punto di vista agronomico o nutrizionale. È probabile che l'introduzione di queste caratteristiche nelle principali varietà avverrà in tempi molto brevi grazie alle nuove tecniche. Nel caso dei cereali, la resa o alcune caratteristiche nutrizionali sono migliorabili mediante NBT con rilevanti benefici per l'economia o la salute.

Più in generale, l'utilizzo delle NBT e in particolare del *Genome Editing* e della cisgenesi appare pressoché indispensabile per fronteggiare la sfida sul miglioramento della sostenibilità ambientale ma anche economica e sociale delle pratiche agricole. Ciò è ancora più importante per quei settori (frutticoltura e agrumicoltura, viticoltura) nei quali l'utilizzo dei metodi tradizionali di miglioramento genetico per una serie di motivi scientifici e/o economici è difficile, se non impossibile. È questo il caso del miglioramento mediante incrocio di molte specie fruttifere, a oggi non proponibile perché causa di perdita d'identità e caratteristiche peculiari. Tempi brevi saranno indispensabili per creare varietà adatte ai rapidi cambiamenti climatici ed evitare la scomparsa di preziosa biodiversità, ma anche per agire su altri fattori che mettono a rischio le produzioni agricole come la fertilità dei suoli (in particolare la componente microbica), la redditività agricola in aree marginali afflitte da fenomeni

di spopolamento, la produzione con bassi input energetici e, più in generale, la riduzione dei carichi ambientali.

Tra i rischi certi, in assenza di autorizzazione per la sperimentazione e coltivazione di specie vegetali ottenute mediante le nuove tecniche, vi sarebbe sicuramente quello della perdita di competitività per l'agricoltura nazionale. È anche prevedibile un grave rischio per le aziende sementiere e vivaistiche, che sarebbero tecnologicamente superate dalle controparti straniere. Occorre ricordare che non solo diverse imprese multinazionali del settore agrario utilizzano già il *Genome editing* o si apprestano a farlo, ma che anche diversi dei maggiori paesi emergenti hanno aumentato di molto gli investimenti nel settore agricolo negli ultimi anni²⁶. L'assenza di una normativa consistente e predicibile nelle tempistiche o, ancora peggio, l'incertezza normativa deprimono investimenti e quindi competitività nel settore delle biotecnologie agrarie²⁷. Se la ricerca italiana potesse intraprendere le sperimentazioni in pieno campo di piante ottenute per *Genome Editing* come avvenuto tra il 1992 e il 2004 per quelle transgeniche, senza sottostare alla Direttiva 2001/18/EC, sarebbe possibile migliorare la valorizzazione e difesa delle coltivazioni tipiche nazionali.

Contrariamente a quanto riportato come sintesi di tutte le consultazioni, Coldiretti ritiene che non vi siano particolari benefici per l'agricoltura nazionale in seguito all'applicazione delle NBT.

4. Sintesi e conclusioni

La consultazione ha consentito di esprimere esaurientemente le posizioni del mondo della ricerca e di una pluralità di portatori d'interesse della filiera agro-alimentare. Tali posizioni e le raccomandazioni sono di seguito sintetizzate.

(i) Molti prodotti del *Genome Editing* potrebbero essere ottenuti mediante CBT, ETGM o per mutazione spontanea. La principale differenza tra questi approcci concerne la maggior precisione delle nuove tecniche e, quindi, il minor rischio di effetti imprevisi.

(ii) Allo stato attuale delle conoscenze scientifiche si può affermare che i rischi connessi con le principali applicazioni delle NBT sono assimilabili a quelli derivanti dalle tecniche convenzionali e sono pertanto da considerare come accettabili dalla normativa vigente.

(iii) La raccomandazione unanime del mondo scientifico e pressoché unanime degli altri portatori di interesse è di esaminare le varietà vegetali, ivi incluse quelle ottenute mediante NBT e in particolare con *Genome Editing*, sulla base delle caratteristiche del prodotto e non in funzione del metodo impiegato per l'ottenimento. Esaminare il metodo di produzione è irrilevante ai fini della sicurezza alimentare o ambientale.

²⁶ Pardey et al., *Agricultural R&D is on the move*, in "Nature", 2016, 537:301-3.

²⁷ Stuart et al., *Investment, regulation, and uncertainty. Managing new plant breeding techniques*, in "GM Crops Food", 2014, 5:44-57.

(iv) Alla luce della rapida evoluzione ed utilizzo delle tecnologie NBT, la Direttiva 2001/18/EC risulta inadeguata e dovrebbe essere largamente rivista sulla base delle nuove conoscenze acquisite, rendendola puramente *product-oriented*. Si auspica una forte azione al fine di ridurre al minimo i tempi di revisione di tale normativa ma, nel frattempo, si chiede che la Direttiva 2001/18/EC non sia applicata ai prodotti del *Genome Editing*, quando le modifiche siano del tutto assimilabili a quelle ottenute mediante tecniche convenzionali o per mutazione spontanea.

Qualora ciò non si realizzasse, diversi problemi sono prevedibili per il sistema agro-alimentare:

- molti prodotti vegetali saranno indistinguibili da quelli ottenuti con altri metodi, soprattutto in assenza di informazioni da parte del costituente, con conseguenti difficoltà di rilevamento;

- sarà necessario istituire controlli sulle importazioni con un incremento dei costi, ispezioni meno affidabili e probabili contenziosi;

- incrementerà il rischio di peggiorare la capacità di approvvigionamento di materie prime della filiera agro-alimentare;

- la maggior parte delle aziende che producono sementi o propagano varietà vegetali non riuscirà a competere con le controparti straniere;

- aumenteranno gli ostacoli per la ricerca pubblica e privata.

(v) Benefici ambientali ed economici sono prevedibili in seguito alla coltivazione di varietà prodotte mediante NBT, con particolare riferimento alla resistenza a patologie microbiche. Considerato il basso costo, le NBT risultano accessibili a molti enti di ricerca e sviluppo, pubblici e privati, e sono trasferibili alla maggior parte delle colture tipiche del territorio nazionale.

Allegato 1

m_amte.DVA.REGISTRO.UFFICIALE.U.0012091.23-05-2017

CNBB-0000168-A-24/05/2017



Al Presidente del Comitato Nazionale
per la Biosicurezza, le Biotecnologie
e le Scienze della Vita
Prof. Andrea Lenzi
a.lenzi@governo.it
andrea.lenzi@uniroma1.it

e, p.c.,

All'Ufficio di Gabinetto
segreteria.capogab@pec.minambiente.it

Alla Direzione Generale per la
Protezione della Natura e del Mare
dgprotezione.natura@pec.minambiente.it

OGGETTO: Nuove tecnologie di breeding in agricoltura

Come è noto le nuove tecniche di breeding (NBT) e i loro impieghi in agricoltura sono oggetto di dibattito sia per quanto riguarda gli aspetti scientifici che per quanto riguarda il loro inquadramento giuridico.

Il 28 aprile u.s. il Meccanismo di Consulenza Scientifica (SAM) della Commissione europea ha pubblicato la nota scientifica esplicativa dal titolo "*New Techniques in Agricultural Biotechnology*" che si allega.

Nell'ambito della collaborazione avviata si chiede di conoscere il parere del Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita sul documento predisposto dal SAM anche in prospettiva di un futuro inquadramento giuridico-normativo di queste nuove tecniche.

Nel ringraziare per la cortese e fattiva collaborazione, si porgono distinti saluti.

Il Direttore Generale

Giuseppe Lo Presti

(documento informatico firmato digitalmente
ai sensi dell'art. 24 D.Lgs. 82/2005 e ss.mm.ii)

All: c.s.

ID Utente: 288

ID Documento: DVA-D4-06-288_2017-0011

Data stesura: 23/05/2017

✓ Resp. Div.: Eugenio C.

Ufficio: DVA-D4

Data: 23/05/2017

Tuteliamo l'ambiente! Non stampate se non necessario. 1 foglio di carta firmato A4 = 7,5g di CO₂.

Via Cristoforo Colombo, 48 - 00147 Roma Tel. 06-57223001 - Fax 06-57223040 e-mail: dva-adj@minambiente.it
e-mail PEC: DVA@segreteria.Ambiente@PEC.minambiente.it

Allegato 2

Parere del CNBBSV sul documento “*New Techniques in Agricultural Biotechnology*” prodotto per la Commissione Europea dal “*High Level Group of Scientific Advisors*”

Il documento “*New Techniques in Agricultural Biotechnology*”²⁸ è stato formalmente richiesto dal Commissario europeo per la Salute e la Sicurezza Alimentare, V. Andriukaitis, e dal Commissario europeo per la Scienza, la Ricerca e l’Innovazione, C. Moedas, al Gruppo²⁹ dei Consulenti Scientifici di Alto Livello (HLG) del Meccanismo di Consulenza Scientifica della UE. Il documento è stato presentato ufficialmente il 28 Aprile 2017. Lo scopo del documento è fornire una panoramica aggiornata sulle nuove tecniche nel settore delle biotecnologie agrarie, dettagliando le caratteristiche chiave e le potenziali applicazioni, e contestualizzando il tutto rispetto alle tecniche convenzionali e a quelle più moderne ma con una storia consolidata, come la transgenesi. I criteri di paragone richiesti riguardano la sicurezza per la salute e per l’ambiente, la possibilità di rivelare i rispettivi prodotti, la velocità ed i costi per ottenere i risultati attesi e il grado di maturità per le applicazioni in campo, cioè l’ottenimento di prodotti commerciali o commerciabili.

Viene presentata di seguito una sintesi dei principali messaggi del documento, focalizzandosi in particolare sulle tecniche che permettono il cosiddetto *Genome editing*; successivamente si fornisce un parere sui contenuti del documento e alcune considerazioni e indicazioni che emergono da un’attenta lettura, il tutto in vista dell’attesa decisione che la Commissione Europea prenderà riguardo all’inquadramento normativo delle nuove tecniche. L’Italia, in quanto paese membro, può ed è tenuta ad influenzare tale decisione tenendo conto dei propri interessi, oltre che, ovviamente, del bene comune.

Sintesi dei contenuti

Il miglioramento genetico sfrutta la variabilità genetica naturale o indotta per combinare tra loro i caratteri e creare organismi dalle caratteristiche desiderate (per es. più produttivi, nutrienti, o resistenti alle avversità). Il miglioramento genetico impiega per questo fine tutta una serie di strumenti in uso da molti anni, detti per questo tecniche convenzionali di miglioramento genetico

²⁸ “*New Techniques in Agricultural Biotechnology*”, ISBN 978-92-79-66222-5. La versione PDF è scaricabile al link <http://goo.gl/DF2bj4>.

²⁹ La composizione dell’HLG è descritta nel documento stesso. Il Gruppo si è valso del sostegno di un comitato direttivo di esperti, nominati dal consorzio SAPEA (Science Advice for Policy by European Academies) che raggruppa circa 100 Accademie e organizzazioni professionali da circa 40 nazioni di tutta Europa. Ulteriore supporto al comitato è stato fornito da Guy van den Eede in qualità di rappresentante della Direzione Generale del Joint Research Centre. Il documento rappresenta quindi l’espressione dei principali esponenti della scienza europea.

(CBT), tra cui menzioniamo la selezione semplice, quella assistita da marcatori, l'incrocio tra specie diverse o appartenenti a generi diversi, la mutagenesi casuale con mutageni biologici, chimici o fisici, le colture cellulari e il salvataggio degli embrioni. Tutte queste tecniche sono state usate per lungo tempo e sono cruciali per sviluppare le nuove cultivar usate in agricoltura. A partire da circa 35 anni fa, è diventata possibile la trasformazione genetica, cioè il trasferimento diretto di specifici geni (utilizzando ad es. *Agrobacterio* o il bombardamento con microproiettili) con diverse tecniche (raggruppate nel documento sotto l'acronimo ETGM, Established Techniques of Genetic Modification). Per ultimo in ordine di tempo, sono state sviluppate diverse tecniche, dette Nuove Tecniche di Breeding, cioè di miglioramento genetico (NBT), che rappresentano un insieme abbastanza eterogeneo di tecniche, alcune delle quali permettono il *genome editing* (revisione o correzione del genoma), cioè la modifica di punti precisi all'interno di genomi complessi, con l'inattivazione o la sostituzione del gene/i desiderato/i.

Le diverse tecniche (CBT, ETGM, NBT) possono portare a prodotti simili o diversi in base 1) al meccanismo molecolare impiegato, 2) alle dimensioni, localizzazione e frequenza dei cambiamenti genetici (cioè in pratica il grado di precisione e predicibilità dei cambiamenti), 3) all'utilizzo di tecniche diverse in combinazione (NBT e ETGM) e per ultimo, 4) alla presenza o meno di acidi nucleici esogeni negli intermedi o nei prodotti finali.

L'applicazione più semplice e popolare delle NBT è il cosiddetto *genome editing* (revisione o modificazione mirata del genoma) con cui si inducono di norma minimi cambiamenti nella sequenza. Tali modificazioni sono di fatto indistinguibili da quelle causate da mutazione spontanea o indotta (Tab. 1A, p. 101 del documento). Il *genome editing*, già possibile in teoria da molti anni ma con bassa efficienza attraverso l'uso di oligonucleotidi chimerici, è diventato routine, cioè tecnicamente facile e poco costoso, grazie allo sviluppo delle nucleasi sito dirette (SDN) che permettono di selezionare con grande precisione il sito dove introdurre rotture nel doppio filamento (double-strand breaks, DSBs). La rottura viene poi riparata dai sistemi endogeni a ciò preposti, evitando così la perdita di cromosomi o di loro frammenti, seguendo vie diverse a seconda del meccanismo e della presenza di altri frammenti di acido nucleico (Fig.1). La prima via consta della semplice riparazione per unione delle estremità non omologhe (Non Homologous End Joining, NHEJ) che tende a produrre mutazioni non specifiche (via SDN-1, Fig. 1a), mentre le vie SDN-2 e SDN-3 (Fig. 1c-d) producono mutazioni specifiche, cioè esattamente quelle previste e desiderate, per mezzo della riparazione guidata da omologia (Homology-Directed Repair, HDR, Fig.1). In questi due casi le estremità simili vengono appaiate e ricombinate, così da creare una saldatura perfetta tra le estremità create dalla nucleasi e le estremità del frammento introdotto, ovviamente quando esista somiglianza tra esse. Nel caso (b) di Fig.1, si verifica l'inserzione di frammenti per NHEJ che possono portare a inattivazione del gene o a inserzione di nuovi geni (con acquisto di funzione, GoF) e per questo è definito SDN-1/3.

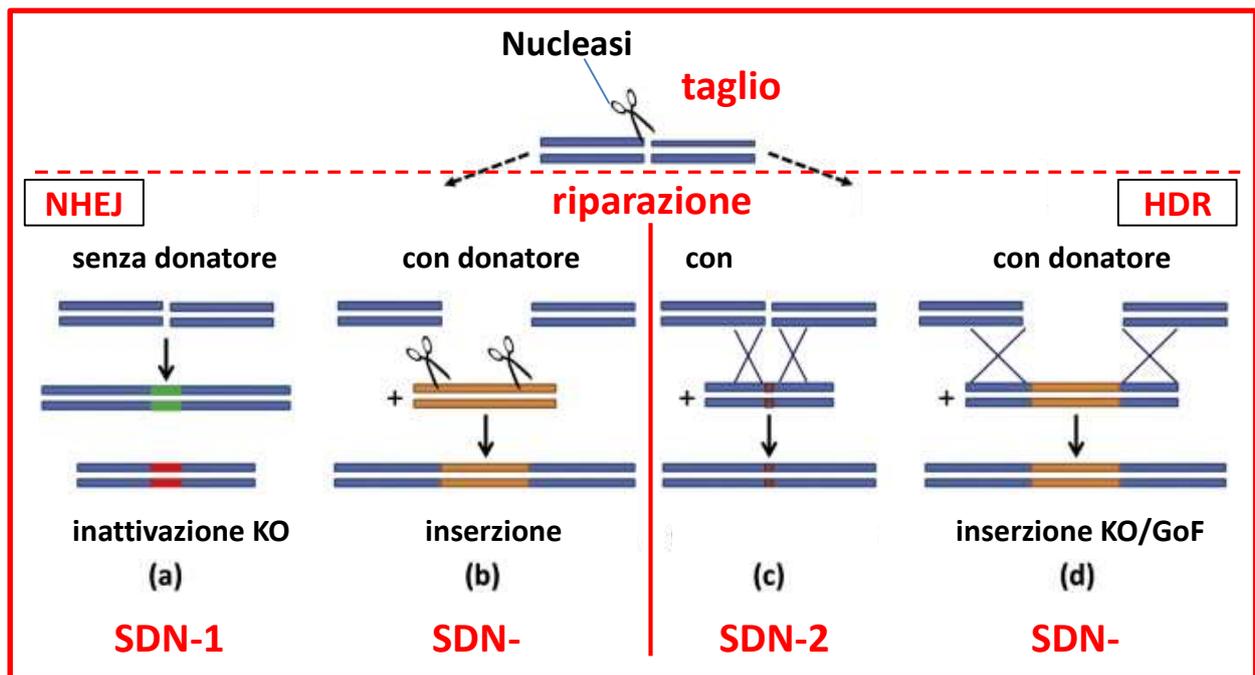


Figura 1. Revisione genomica con nucleasi di precisione. I tagli del doppio filamento di DNA indotti da nucleasi (sopra) possono venir riparati (sotto) per giunzione di estremità non omologhe (NHEJ) (a,b) o per ricombinazione omologa (HR) (c,d). La riparazione NHEJ causa di solito l'aggiunta o la rimozione di poche basi al punto di rottura, che spesso causano l'inattivazione del gene (a). Se sono presenti frammenti di DNA (b,c,d), questi possono essere inseriti nel punto di rottura attraverso NHEJ (b) o per ricombinazione omologa (c,d) di estremità simili o identiche, così da sostituire la copia endogena, con (c) piccoli o (d) grossi cambiamenti nella sequenza a seconda del donatore. La frequenza dei vari destini è diversa, in base anche della disponibilità di DNA donatori (ridisegnato da Bortesi, 2015).

Per quanto riguarda il risultato finale, la via SDN-1 porterà a prodotti in cui il gene viene spesso inattivato, cioè messo KO, con una mutazione assimilabile, se non identica a quelle ottenibili con mutazione spontanea o indotta in modo casuale. La via SDN-2 permette l'inserzione, nel sito del taglio, di un frammento simile al frammento originale, con la sostituzione di un allele con l'altro; anche in questo caso il prodotto è assimilabile, se non identico, a quelli ottenibili con mutazione (spontanea o indotta in modo casuale) o ancora per mezzo di incrocio e selezione con una varietà che porti quell'allele. La via SDN-3 permette l'inserzione, precisa o imprecisa, di tratti di DNA nuovi che possono derivare da organismi anche distanti, ma se il frammento inserito non permette la produzione di una proteina o RNA funzionale, il suo risultato sarà indistinguibile da un prodotto di tipo SDN-1, perché semplicemente viene persa la funzionalità del gene originale senza acquisto di una nuova funzione. Va sottolineato che l'apparato molecolare necessario per ottenere la correzione genomica può essere introdotto stabilmente nelle cellule e poi essere eliminato per segregazione mendeliana alla meiosi, oppure essere espresso solo transientemente. In entrambi i casi non ne rimane alcuna traccia nel prodotto finale se non in quei casi (SDN-3 e SDN-1/3) dove sia stato fornito

un DNA estraneo (da specie non sessualmente compatibili) e di una certa dimensione, negli altri casi è possibile che un simile prodotto sia ottenuto tramite metodi classici di miglioramento genetico o per mutazione spontanea.

Molte delle tecniche (CBT, ETGM e NBT) introducono cambiamenti più o meno grandi nella sequenza del DNA che vanno dal cambiamento di una singola base (su un totale di basi contenute in un genoma vegetale o animale che varia dalle centinaia di milioni fino ai miliardi), fino al raddoppio totale delle basi, oppure dalla delezione di interi cromosomi fino alla fusione di genomi di specie diverse (es. i diversi triticali, un gruppo di nuove specie create dall'uomo per fusione dei diversi frumenti con la segale). Il cambiamento della sequenza nel prodotto finale o anche nelle fasi intermedie, non è però un risultato necessario: ad esempio, la tecnica della metilazione RNA dipendente (RNA-dependent DNA methylation, RdDM) non introduce di fatto cambiamenti nel DNA, ma altera solo il livello di espressione dei geni interessati, mentre molti dei prodotti del *genome editing* richiedono uno stadio intermedio che contiene elementi transgenici, ma lo stesso risultato finale è spesso ottenuto anche senza l'integrazione temporanea di tali elementi.

Ne consegue che anche la capacità di rilevare i differenti prodotti risulta spesso problematica³⁰, soprattutto quando non si conosca l'esatta modifica, ma anche in funzione del tipo di modifica (a livello del DNA, degli RNA o delle proteine), della sua entità (una o poche basi o interi genomi), della sua presenza nel campione analizzato (molti RNA o proteine sono poco stabili e vengono degradati, mentre alcuni prodotti agroalimentari, come ad esempio l'olio, non contengono DNA della pianta di origine). La rilevazione di alcune modifiche, anche se conosciute a priori, rappresenta poi una sfida tecnica di una certa complessità, che richiede la messa a punto di metodi complicati oppure la disponibilità di macchine spesso costose (Microarray o Next-Generation Sequencing) rispetto alle tecniche di rivelazione dei prodotti transgenici oggi in commercio, che normalmente impiegano la PCR. Va anche tenuto conto che non è possibile rivelare in modo affidabile una specifica modifica/varietà senza la disponibilità di un protocollo validato e di un materiale standard da usare come riferimento (preferibilmente certificato).

Questa breve panoramica sui possibili prodotti ottenibili e sulla difficoltà della loro rilevazione, fa immediatamente capire la complessità della problematica e quindi l'impossibilità di inquadrare in una normativa tutte queste possibilità secondo categorie e definizioni puramente legali, come l'utilizzo di ingegneria genetica (è richiesta la presenza di DNA ingegnerizzato nel prodotto finale o basta il suo uso in qualche fase?), la presenza di DNA "estraneo" (quanto grande dovrà essere tale DNA e quanto estraneo?), la naturalità delle modificazioni (come misurarla?), la loro rilevabilità (a livello del DNA, RNA o proteine? in base al metodo usato?), la sensibilità della tecnica impiegata per la rivelazione (che dipende dalla sostanza utilizzata in origine e dal suo grado di processamento), etc.

³⁰ Si veda figura 8 della Nota Esplicativa per un sommario delle diverse tecniche e del tipo di analiti ricercati.

Un altro importante elemento è la velocità con cui i prodotti delle NBT sono generati dalla ricerca e con cui riescono a raggiungere il mercato come prodotti commerciali. Alcuni prodotti sono già in coltivazione commerciale e disponibili su alcuni mercati (colza resistente alle sulfonil-uree della Cibus), mentre altri è probabile che vengano resi disponibili nel giro di pochi anni (mais waxy della Dupont-Pioneer, lino tollerante al glifosate della Cibus, o patate resistenti alla peronospora, sia la versione cisgenica che quella *genome-edited*). Moltissimi altri sono in sviluppo e attendono un chiarimento sul loro inquadramento normativo prima di giungere alla fase commerciale. Molti di questi sono sviluppati dall'industria privata o in collaborazioni tra pubblico e privati, e non sono ancora stati descritti nella letteratura scientifica ufficiale, ma solo presentati a convegni o in modo del tutto informale. Molte delle NBT sono meno costose dal punto di vista tecnico, ma sono soprattutto più veloci nel generare il prodotto desiderato per motivi diversi a seconda dei casi (perché non sono richiesti diversi cicli di reincrocio per introgradire il gene nelle varietà di interesse, perché si raggiunge velocemente l'omozigosi anche in organismi poliploidi, perché viene mantenuta l'identità varietale per tutti i rimanenti caratteri...). Un ulteriore elemento di valutazione è l'estrema precisione con cui vengono raggiunti gli obiettivi: non solo viene deciso con precisione il punto il cui deve avvenire la modifica, ma spesso è possibile scegliere il tipo di modifica che si desidera ottenere (es. tramite SDN-2 o SDN-3 di Fig. 1). Spesso la combinazione delle NBT con altre tecniche permette di ridurre o eliminare alcune incertezze associate ai prodotti ottenuti con tecniche precedenti: ad esempio la combinazione delle nucleasi con la transgenesi (Fig.1, SDN-3), permette di selezionare il sito di inserzione, eliminando quindi l'incertezza associata alla casualità del sito in cui veniva inserito il transgene.

Una sezione è dedicata ai "gene drives", particolari meccanismi genetici che si riscontrano in diversi organismi, che favoriscono la trasmissione di specifici geni nella progenie, anche quando la loro trasmissione si riveli dannosa per la progenie. Proprio per queste loro caratteristiche sono stati proposti da circa 50 anni come metodi di controllo di insetti dannosi. E' stato solo però con l'introduzione dei sistemi basati sulle nucleasi guidate da RNA che è diventato fattibile ingegnerizzare tali meccanismi in modo semplice e preciso. In teoria è possibile che alcuni gene drive si diffondano nelle popolazioni in modo simile a quelli naturali fino a essere presenti nella totalità o quasi degli individui di una data specie, ma solo se la specie si riproduce per via sessuale. I gene drive potrebbero avere numerose applicazioni per limitare alcuni parassiti o vettori di parassiti riducendo i danni che questi causano a piante ed animali, uomo compreso. Potrebbero per esempio essere usati per controllare erbe infestanti o insetti vettori di malattie del bestiame, limitare o contrastare lo sviluppo di resistenze a erbicidi o insetticidi. Oggetto di attenzione sono in particolare i rischi di meccanismi genetici autopropaganti destinati al rilascio ambientale. Come per tutti gli altri prodotti delle diverse tecniche, non è possibile generalizzare un giudizio sulla tecnica (che sia intrinsecamente pericolosa, ad esempio), sono bensì le caratteristiche peculiari di ciascuna implementazioni che devono essere esaminate per emettere un giudizio sulla loro adottabilità per i

vari scopi proposti. Il potenziale significativo di questo tipo di applicazioni giustifica ulteriore ricerca e sperimentazione per valutarne benefici e rischi e decidere se procedere ulteriormente.

Parere sui contenuti

La Nota Esplicativa rappresenta una panoramica, notevole e aggiornata, sulle NBT, le loro potenzialità e su ciò che le distingue rispetto alle ETGM e soprattutto alle CBT in termini di rilevazione/identificazione, effetti imprevisti, presenza di DNA esogeno, caratteristiche dei prodotti finali, facilità d'uso, velocità/costi con cui si ottiene il prodotto finale e grado di maturità di alcuni dei prodotti. Un analogo documento³¹ prodotto dalle Accademie Nazionali delle Scienze, di Ingegneria e di Medicina degli Stati Uniti è appena uscito rappresenta una ulteriore fonte di informazione e giudizio che vale la pena di esaminare con attenzione.

La nota non prende posizione esplicita sulla sicurezza assoluta o comparativa delle differenti tecniche o su come inquadrare dal punto di vista normativo i prodotti delle nuove tecniche, vuoi per scelta di non interferire con enti preposti a tale valutazione (es. EFSA) a motivo delle grandi differenze tra le tecniche e ancora di più tra i prodotti, vuoi forse per richiesta della Commissione Europea di non influenzare un processo che pertiene più al mondo della politica. Se è pur vero che solo un approccio caso per caso è considerato appropriato per la valutazione dei prodotti delle NBT, allo stesso tempo è però possibile desumere alcuni principi generali in funzione dei vari criteri considerati (salubrità per l'uomo e sicurezza per l'uso nell'ambiente) proprio dal paragone tra le nuove tecniche e quelle precedenti.

Per esempio, la Nota Esplicativa correttamente afferma che molti prodotti delle NBT possono essere ottenuti anche usando CBT o ETGM, sebbene con minor precisione, minor efficienza e spesso con tempi molto più lunghi. Ad esempio in riso sono disponibili diversi mutanti (F. Fornara, comunicazione personale) nel gene RICE FLOWERING LOCUS T 1 (RFT1) che codifica per una proteina che regola la fioritura: 1) il mutante R174K ottenuto per mutagenesi casuale di una varietà tipica italiana che presenta un fenotipo "late flowering"; 2) il mutante transgenico nella varietà Norin 8 del tipo RNAi e pubblicato da un gruppo giapponese (Komiya et al, 2008; 2009); 3) la varietà Nona Bokra con una mutazione spontanea (E105K), descritta in Ogiso-Tanaka et al. (2013) e con una fioritura particolarmente tardiva; 4) mutanti ottenuti per *genome editing* nel lab del prof. F. Fornara, sia contenenti ancora il transgene codificante per la nucleasi e l'RNA, che i rispettivi segreganti nulli per il transgene. La domanda esplorativa per il rilascio ambientale è al momento sotto esame da diversi mesi presso il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Qualsiasi normativa o sua interpretazione che preveda di discriminare le mutazioni 1,3 e 4 in base al metodo

³¹ AA. VV., *Preparing for Future Products of Biotechnology*, 2017, ISBN 978-0-309-45205-2, <http://www.nap.edu/24605>.

usato per ottenerle e non in base al fenotipo, risulta insostenibile dal punto di vista scientifico e rappresenta una violazione del principio legale della non discriminazione.

Quando i risultati delle diverse tecniche sono paragonabili, ne consegue che anche i rischi sono simili. Visto che però il grado di precisione e predicibilità degli interventi ottenibile mediante le tecniche moderne non solo è di norma molto più elevato (nei casi di *genome editing* del tipo SDN-2 e SDN-3 viene specificato con precisione sia il punto da mutare che l'esatto prodotto da ottenere), ma sembra aver raggiunto il limite estremo, è d'obbligo concludere che gli effetti imprevisti (non-target) sono ridotti al minimo possibile, specialmente se paragonati a quelli delle tecniche convenzionali. Proprio a riguardo degli effetti imprevisti, la Nota giustamente distingue tra (1) cambiamenti imprevisti in loci diversi da quelli di interesse e (2) effetti imprevisti dei cambiamenti genetici ricercati. Nel primo caso, i cambiamenti non sono ricercati, ma sono semplicemente dovuti alla imprecisione più o meno grande della tecnica, e non è affatto detto che comportino effetti o che tali effetti sia necessariamente negativi. Esempi in tal senso sono le centinaia o migliaia di mutazioni disperse lungo il genoma dopo un trattamento mutageno casuale, l'inserzione di transgeni identici in posizioni diverse, che ne alterano l'espressione, o ancora la modifica di siti "off target" durante il *genome editing*. Gli effetti del secondo tipo sono intrinsecamente collegati alla modifica perseguita e non erano stati previsti per la limitata conoscenza del sistema biologico. Questo secondo livello di imprevedibilità è un fenomeno generale che può verificarsi con qualsiasi tecnica di miglioramento, ma quanto più la modifica ricercata risulta basata sulla conoscenza dei processi, della struttura e della funzione delle molecole biologiche implicate, tanto meno probabili saranno gli effetti imprevisti del secondo tipo. La Nota esplicativa quindi avrebbe potuto sbilanciarsi in tal senso, asserendo che è più probabile che le CBT causino effetti imprevisti delle ETGM, le quali a loro volta è più probabile le causino rispetto a molte delle NBT, quanto più la modifica indotta con queste ultime sia precisa e mirata.

Se non c'è quindi obiezione valida contro colture, animali e microrganismi sviluppati tramite CBT, perché i rischi connessi con il loro sviluppo e rilascio sono senz'altro accettabili in vista dei benefici, a maggior ragione non è possibile obiettare contro quei prodotti delle NBT che siano assimilabili ai primi ma con maggior grado di predicibilità.

In certi casi, le NBT permettono di creare prodotti estremamente specifici (per esempio il contemporaneo spegnimento di ben 14 geni in una pianta, oppure l'inattivazione di tutte e 62 copie del retrovirus endogeno del maiale) che sarebbe impossibile ottenere con la stessa precisione, oltre che velocità, mediante tecniche convenzionali, anche se i singoli cambiamenti sono accessibili con le tecniche precedenti. In questi casi le NBT dimostrano una superiorità in termini di benefici e una precisione che ne suggeriscono l'approvazione quando forniscono risposte a problemi reali.

Conclusioni e raccomandazioni

La complessità delle prospettive e delle sfide che si aprono con l'uso delle NBT nel settore agroalimentare (sia sul versante delle colture vegetali e degli animali da allevamento che dei microrganismi utilizzati nelle trasformazioni) non potrà essere risolta con un approccio che pretende di classificare i prodotti ammissibili in base alla specifica tecnica e strategia impiegata. Molte delle tecniche possono essere combinate fra di loro e molti dei prodotti delle varie strategie rischiano di risultare indistinguibili e difficilmente tracciabili. E' ragionevole quindi giudicare le nuove varietà caso per caso in base ai caratteri, alla specie e all'ambiente, cioè in base ai rischi e ai benefici, paragonandoli a quelli delle varietà che andrebbero a sostituire.

Dal punto di vista scientifico va ribadito che non è assolutamente difendibile normare diversamente prodotti che abbiano mutazioni identiche o paragonabili (che si comportano nello stesso modo in quanto a reversione, stabilità, penetranza...) nello stesso gene o negli stessi geni. Se così fosse fatto, prodotti identici, se non addirittura tecnicamente indistinguibili, avrebbero destini normativi diversi, spingendo in tal modo il settore a non rivelare il metodo pur di sottrarsi a una normativa costosa, e perciò discriminante, che ha fortemente inibito l'innovazione nei paesi avanzati e, di riflesso, nei paesi in via di sviluppo, sottraendo i maggiori benefici soprattutto a coloro i quali ne avrebbero più bisogno.

Esistono già esempi specifici di mutazioni ottenute per uno stesso gene ma con diverse tecniche; questi casi reali devono essere tenuti in considerazione per evitare di emanare o applicare normative o regolamenti insensati.

L'opinione praticamente unanime della comunità scientifica è che l'unica normativa accettabile sia del tipo "product based", con un grado di scrutinio proporzionale rispetto ai rischi. Esistono sistemi regolatori come quello canadese che riflettono almeno parzialmente una tale impostazione e proposte di normativa in tal senso (Huang et al, 2016; Miller et al, 2010, Conko et al., 2015). Il sistema regolatorio statunitense è attualmente in fase di revisione perchè ritenuto eccessivamente complesso, frammentato e difficilmente interpretabile, quindi poco prevedibile per gli sviluppatori di nuovi prodotti, in particolare in previsione dell'arrivo imminente di molteplici prodotti difficilmente classificabili. Da una parte la raccomandazione è di sviluppare processi di analisi del rischio che siano rigorosi, predicibili, trasparenti e proporzionali rispetto alla complessità dei prodotti biotecnologici che pretendono di normare, con una sorta di "triage" che distingua le situazioni in base alla gravità o innocuità dei rischi coinvolti. D'altra parte però viene anche sottolineato che una regolamentazione superflua e complessa rischia di favorire l'imitazione piuttosto che l'innovazione, ed essere quindi inadeguata a sostenere il tasso di innovazione proprio del settore biotecnologico. Questa seconda strada, se perseguita solo a livello nazionale o più ampiamente a livello europeo, comporterebbe gravi rischi per il nostro sistema agricolo nazionale e andrebbe rigettata in modo fermo per evitare di deprimere le rese (aggravando la carenza di materie prime e la dipendenza dall'estero), per facilitare forme più sostenibili di agricoltura (riducendone la

dipendenza dalla chimica, migliorando quindi anche la sostenibilità economica), e per sostenere la ricerca pubblica e privata nazionale, favorendo con ciò processi innovativi che diano benefici più sistematici al paese, inclusa la promozione di settori produttivi come quello sementiero e affini, e riducano la nostra dipendenza dalla ricerca e dallo sviluppo esteri. Sarebbe auspicabile che anche a livello nazionale ed europeo valesse uno dei principi cardine degli Stati Uniti per poter proporre o adottare nuove regolamentazioni, vale a dire la richiesta ragionata che i benefici giustifichino i suoi costi.

In questo senso è opportuno che il governo Italiano attraverso le sue rappresentanze si faccia promotore e sostenitore di una revisione della Direttiva 2001/18/EC per sostituirla con una normativa “product-based”, tenendo conto delle conoscenze e delle esperienze accumulate nell’arco di oltre 30 anni di ricerca e circa 25 di coltivazione commerciale di prodotti biotecnologici a livello internazionale ed in previsione della pletora di nuovi prodotti attesi per il prossimo futuro. Una nuova direttiva definita in tal senso avrebbe l’enorme vantaggio di non essere costantemente superata dallo sviluppo tecnologico, anche se ovviamente richiederebbe un maggior sforzo da parte degli enti preposti alla supervisione e alla approvazione, perchè richiede che il giudizio su ogni singolo caso vada emesso non in base a semplici criteri generali sui metodi impiegati, come fatto fino ad ora, ma in base ad un esame caso per caso dei rischi e dei benefici, in paragone ai prodotti che andrebbero a sostituire. Con un simile sistema regolatorio in funzione, si eviterebbero incongruenze, come l’approvazione di un certo carattere (es. tolleranza a uno specifico erbicida) quando venga ottenuto per mutagenesi casuale (es. riso e girasoli tolleranti alle sulfonil uree) e non per transgenesi o mutagenesi mirata. Paradossalmente proprio le strategie transgeniche che permettono mitigare il flusso genico verso specie selvatiche compatibili molto più degli approcci classici, proteggendo così il valore di un sistema colturale, risultano essere frenate dal sistema normativo a tal punto che per nessuna delle colture tolleranti agli erbicidi oggi in coltivazione è stata chiesta l’approvazione, nonostante i benefici palesi (Al-Ahmad e Gressel, 2006; Rose et al., 2009). Normare più strettamente una tecnologia precisa e predicibile rispetto a tecnologie imprecise, e quindi poco predicibili nei loro effetti, è un errore logico e una scelta di cui paghiamo ancora oggi le conseguenze.

Visto che la revisione della direttiva 2001/18/EC non potrà avere tempi rapidi ed è prevedibile che l’iter sarà sofferto ed incerto, potendo addirittura risultare in una normativa ancora più restrittiva e basata non sui prodotti ma sulle tecnologie, è urgente escludere sin da ora le piante prodotte per *genome editing* dall’ambito di applicazione della stessa direttiva quando non contengano geni da specie sessualmente non compatibili, perché sono assimilabili a quelle ottenute per mutazione spontanea o mutagenesi indotta, ma casuale, e verrebbe a mancare quindi la condizione di novità richiesta dalla direttiva stessa.

Referenze

Rose et al. (2009) Genetic load and transgenic mitigating genes in transgenic *Brassica rapa* (field mustard) x *Brassica napus* (oilseed rape) hybrid populations. BMC Biotechnol. 9:93.

Al-Ahmad e Gressel (2006) Mitigation using a tandem construct containing a selectively unfit gene precludes establishment of *Brassica napus* transgenes in hybrids and backcrosses with weedy *Brassica rapa*. Plant Biotechnol J. 4:23-33.

Conko et al. (2016) A risk-based approach to the regulation of genetically engineered organisms. Nat Biotechnol. 34:493-503.

Gomez-Ariza et al. (2015) Loss of floral repressor function adapts rice to higher latitudes in Europe. J Exp Bot. 66:2027-39.

Huang et al. (2016) A proposed regulatory framework for genome-edited crops. Nat. Genet. 48:109-11.

Komiya et al. (2008) Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. Development. 135:767-74.

Komiya et al. (2009) A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice. Development. 136:3443-50.

Miller (2010) The regulation of agricultural biotechnology: science shows a better way. N Biotechnol 27:628-34.

Ogiso-Tanaka et al. (2013) Natural variation of the RICE FLOWERING LOCUS T 1 contributes to flowering time divergence in rice. PLoS One. 2013 8:e75959.