

UNIVERSITÀ DEGLI
STUDI DI PADOVA



Editing genomico nelle specie orticole: impatto sulla costituzione di nuove varietà e tracciabilità genetica dei loro derivati alimentari



Dipartimento di Eccellenza MUR

Progetto CASA 2018 – 2022
Progetto VITAE 2023 – 2027

Portici, 20 Novembre 2025

Gianni Barcaccia

Laboratorio di Genetica Agraria

Direttore DAFNAE www.dafnae.unipd.it

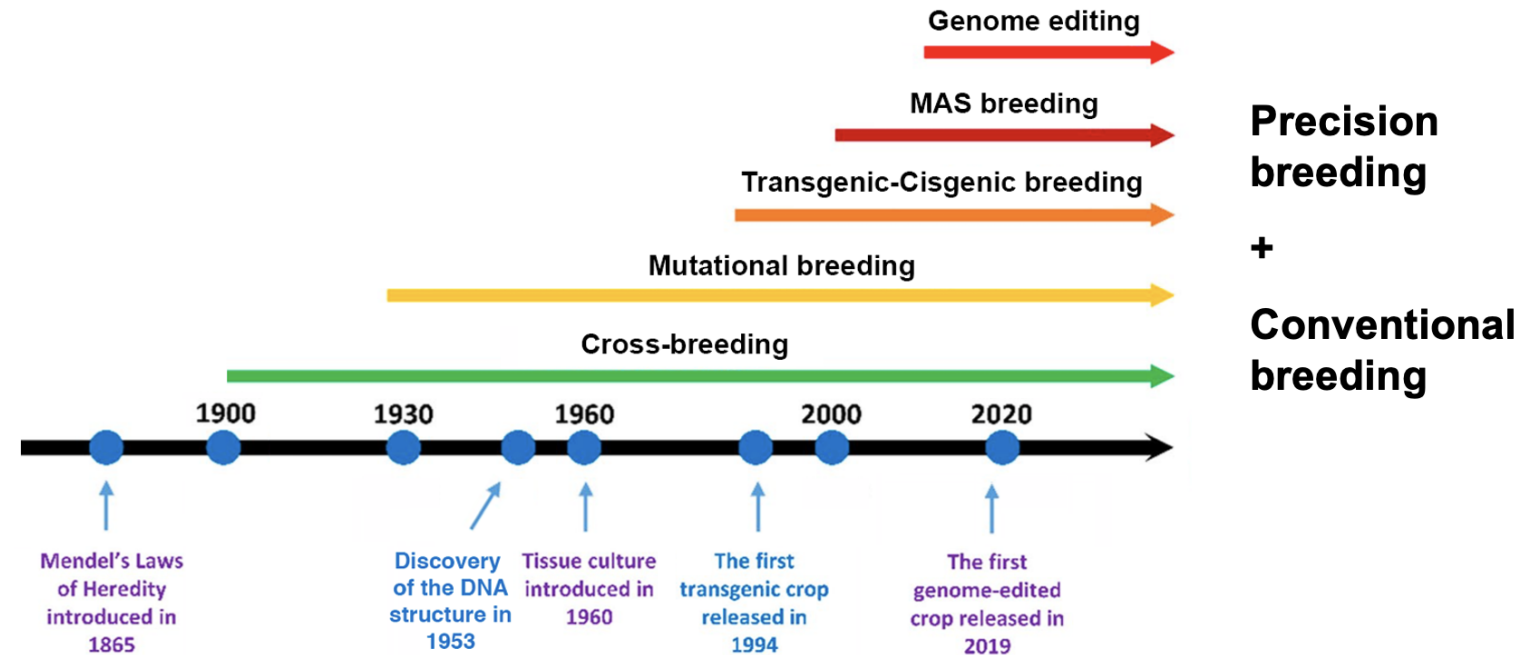
E-mail: gianni.barcaccia@unipd.it

Web-site: www.giannibarcaccia.com

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

• Innovazione genetica a livello metodologico

- In pochi decenni siamo passati da metodi basati su eventi casuali e non riproducibili (mutagenesi e transgenesi) a metodi di miglioramento genetico basati su processi predeterminati e riproducibili a carico di geni specifici (GE)
- Alla selezione fenotipica, per lungo tempo realizzata unicamente su base morfologica, è stata affiancata la selezione genotipica, assistita da marcatori molecolari di valenza predittiva (MAS/MAB)



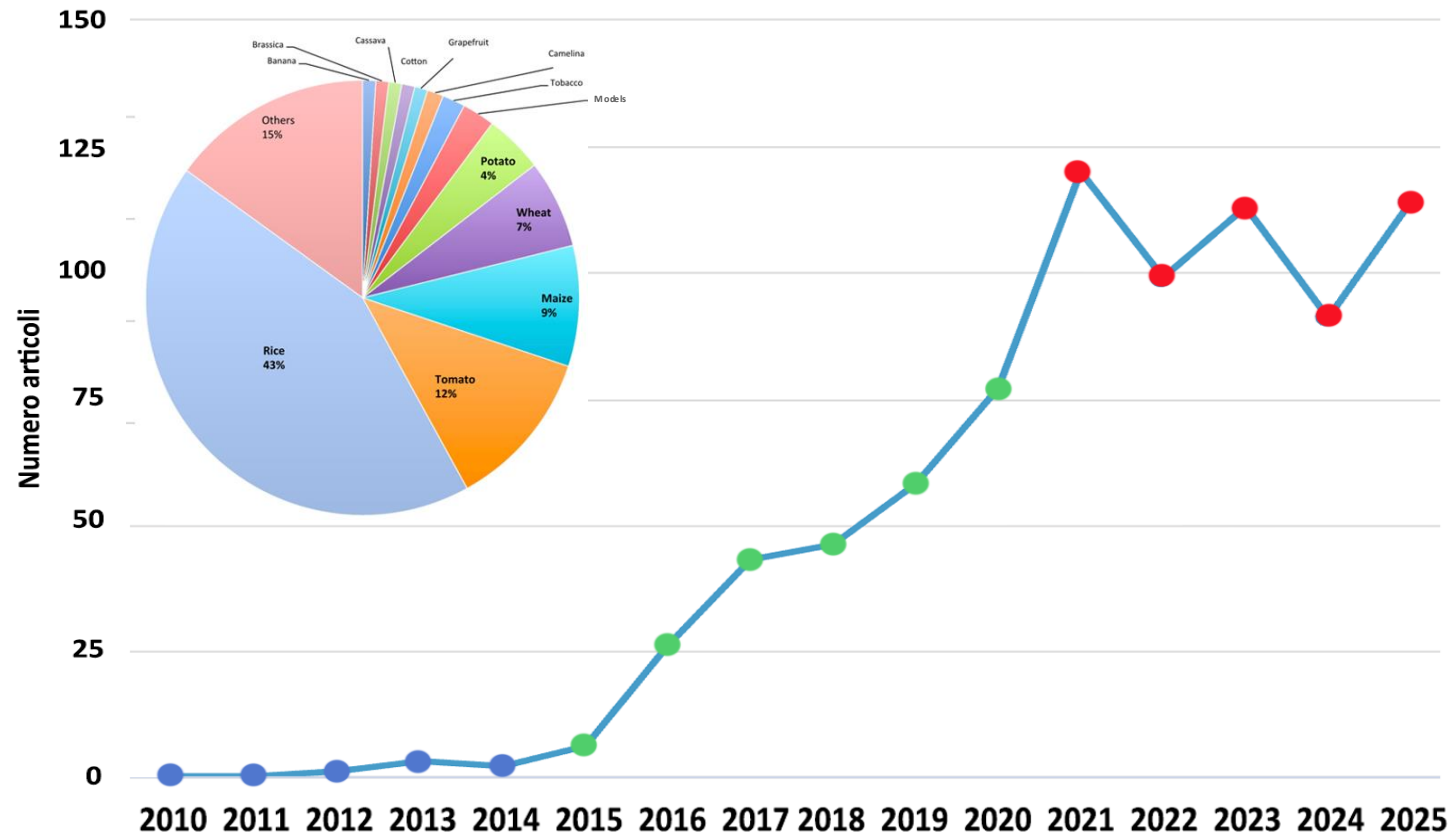
Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- **Editing genomico: analisi della letteratura**

- Applicazioni nelle piante agrarie: articoli 2010 – 2025 (>800)

Le specie maggiormente editate sono riso, pomodoro, mais, frumento e patata

i caratteri agronomici maggiormente editati riguardano la **qualità nutrizionale degli alimenti** e la produttività delle colture per effetto di **resistenza a patogeni e erbicidi**, la **tolleranza alla siccità** e stress abiotici



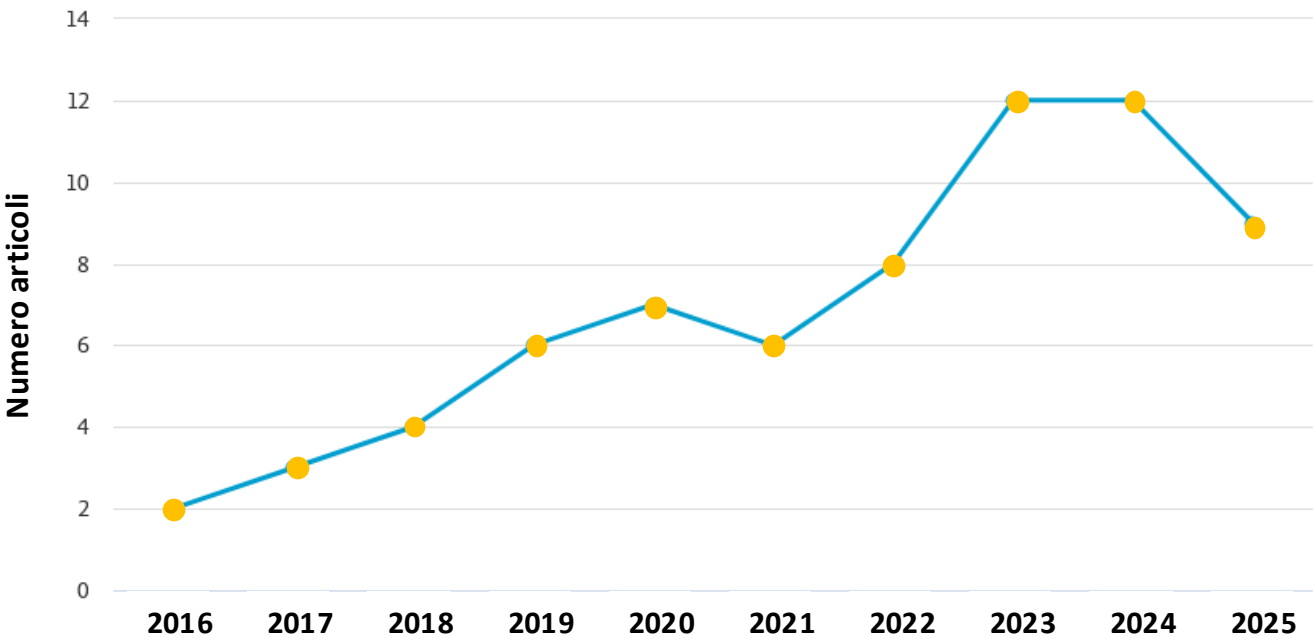
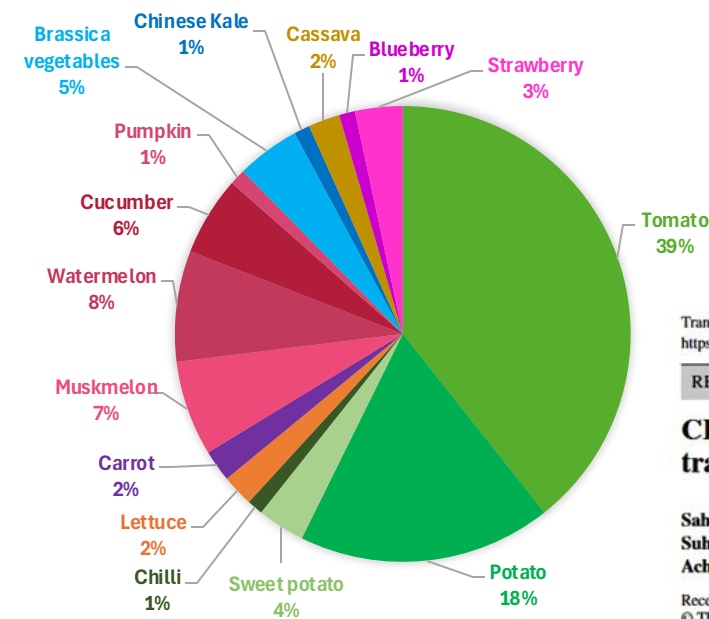
Fonte: Scopus

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- **Editing genomico: analisi della letteratura**
 - Applicazioni nelle piante orticole: articoli 2016 – 2025 (≈70)

Le **orticole** più editate appartengono a **Solanaceae** e **Cucurbitaceae**

I caratteri di interesse agroalimentare riguardano **resistenze a stress (abiotici e biotici)** e **caratteristiche qualitative e nutraceutiche** dei prodotti



Fonte: Scopus

Transgenic Res (2025) 34:26
<https://doi.org/10.1007/s11248-025-00444-x>

REVIEW

CRISPR mediated gene editing for economically important traits in horticultural crops: progress and prospects

Saheb Pal · Ram Krishna · Labdhi Dedhia · Hukum Singh Panwar ·
Suhas Gorakh Karkute · Nagendra Rai · Rajesh Kumar · Sudhakar Pandey ·
Achuit Kumar Singh

Received: 2 September 2024 / Accepted: 9 May 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2025

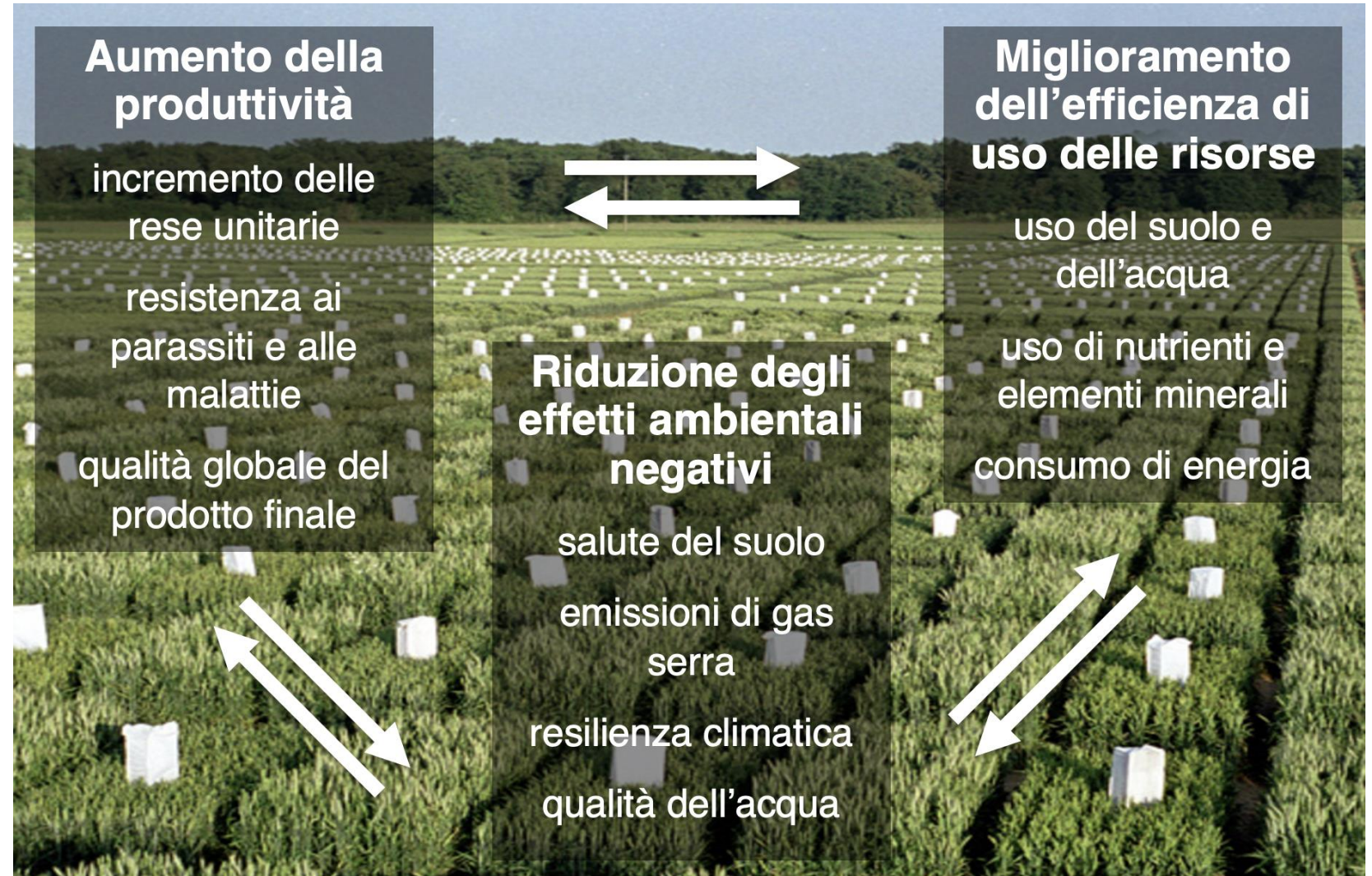
- 1. TEA come nuova frontiera del miglioramento genetico di precisione per la costituzione di nuove varietà di specie orticole**
2. CRISPR/Cas come strumento genomico di precisione per l'accertamento dell'identità genetica delle varietà e la tracciabilità molecolare dei loro derivati alimentari

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Principi guida: "more with less" + "do no significant harm"

Qual è il ruolo e il contributo del miglioramento genetico per lo sviluppo futuro dell'agricoltura sostenibile?

produzione maggiore per unità di risorsa e minore impatto ambientale =
intensificazione sostenibile



Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- **Caso di studio: frutti biofortificati (alimenti funzionali)**

👉 2022: sviluppo di linee di pomodoro con **frutti biofortificati** tramite editing genomico per incrementata capacità di accumulo di 7-deidrocolesterolo

Varietà migliorate

non solo produttività
ma anche qualità

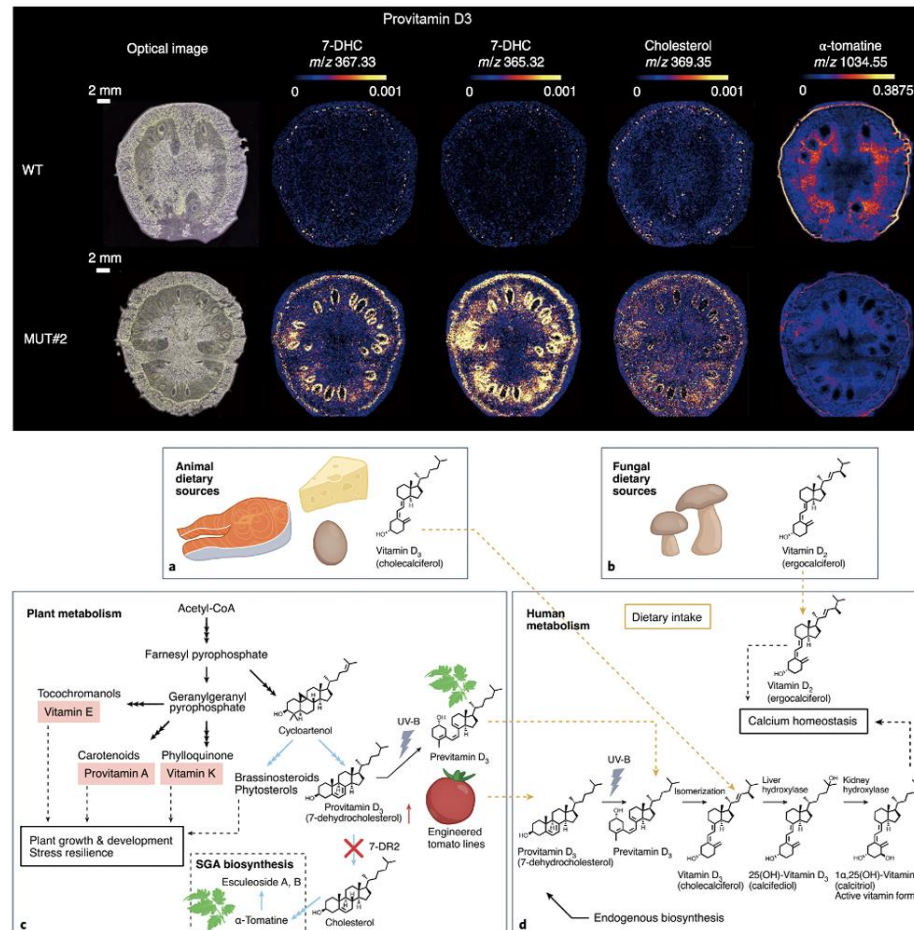


Open Access | Published: 23 May 2022

nature plants
BRIEF COMMUNICATION
<https://doi.org/10.1038/s41477-022-01154-6>

Biofortified tomatoes provide a new route to vitamin D sufficiency

Jie Li¹, Aurelia Scarano², Nestor Mora Gonzalez³, Fabio D'Orso^{1,4}, Yajuan Yue¹, Krisztian Nemeth⁵, Gerhard Saalbach¹, Lionel Hill¹, Carlo de Oliveira Martins¹, Rolando Moran⁶, Angelo Santino² and Cathie Martin¹✉



7-DHC → Colecalciferolo (Provitamina D3):

contribuisce a regolare i livelli di calcio e fosforo nell'organismo, favorendone l'assorbimento a livello intestinale

- Mineralizzazione ossea
- Funzione immunitaria
- Funzione muscolare
- Regolazione umore

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- **Caso di studio: frutti biofortificati (alimenti funzionali)**

👉 2023: miglioramento del **valore nutrizionale** in pomodoro tramite cisgenesi per l'aumentata sintesi di flavonoidi e di aminoacidi a catena ramificata

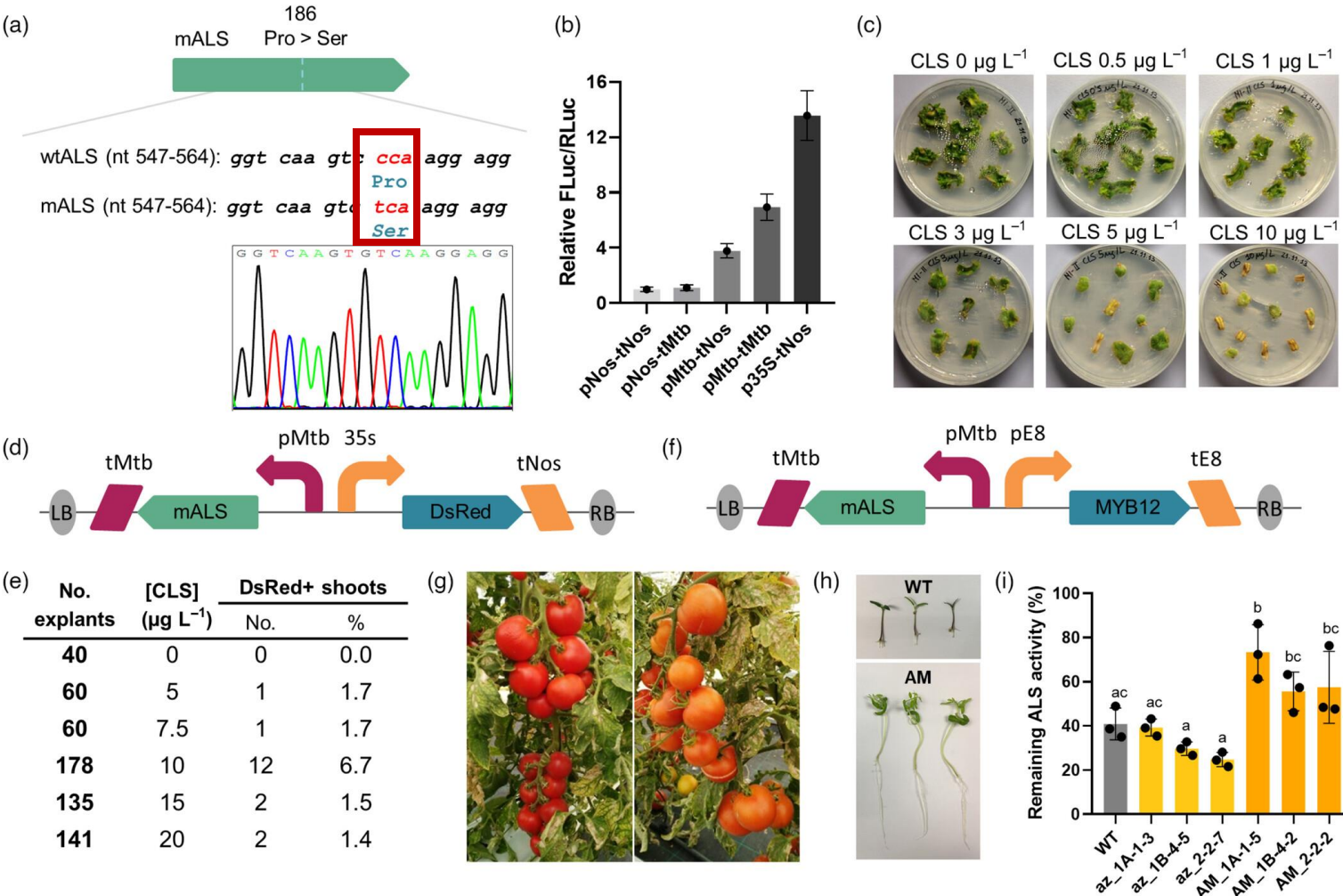


Research Article | Open Access | CC BY-NC-ND

Dually biofortified cisgenic tomatoes with increased flavonoids and branched-chain amino acids content

Marta Vazquez-Vilar, Asun Fernandez-del-Carmen, Victor Garcia-Carpintero, Margit Drapal, Silvia Presa, Dorotea Ricci, Gianfranco Diretto, José Luis Rambla, Rafael Fernandez-Muñoz ... See all authors

- **pomodori biofortificati con flavonoidi (polifenoli) antiossidanti e aminoacidi a catena ramificata (BCAA) → alimenti funzionali e valore nutrizionale migliorato**
- **geni nativi di pomodoro + profilo metabolico controllato → maggiore accettazione e sicurezza percepita da parte dei consumatori**



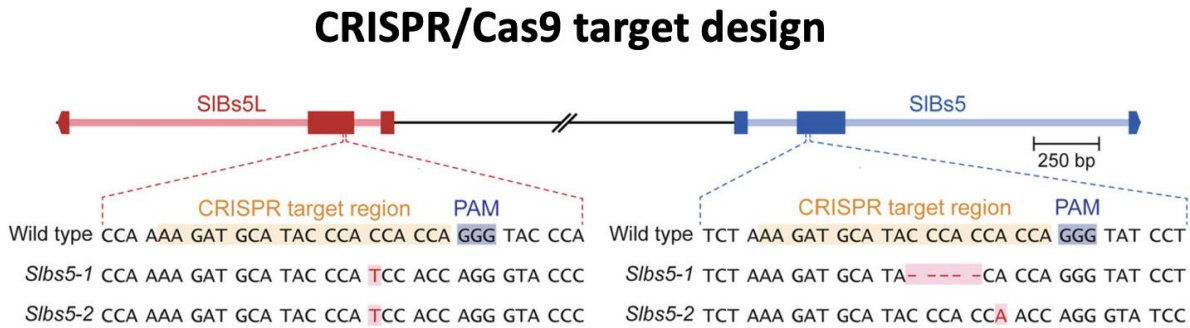
Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Caso di studio: resistenza ad agenti batterici



Brief Communication
CRISPR/Cas9-mediated editing of *Bs5* and *Bs5L* in tomato leads to resistance against *Xanthomonas*

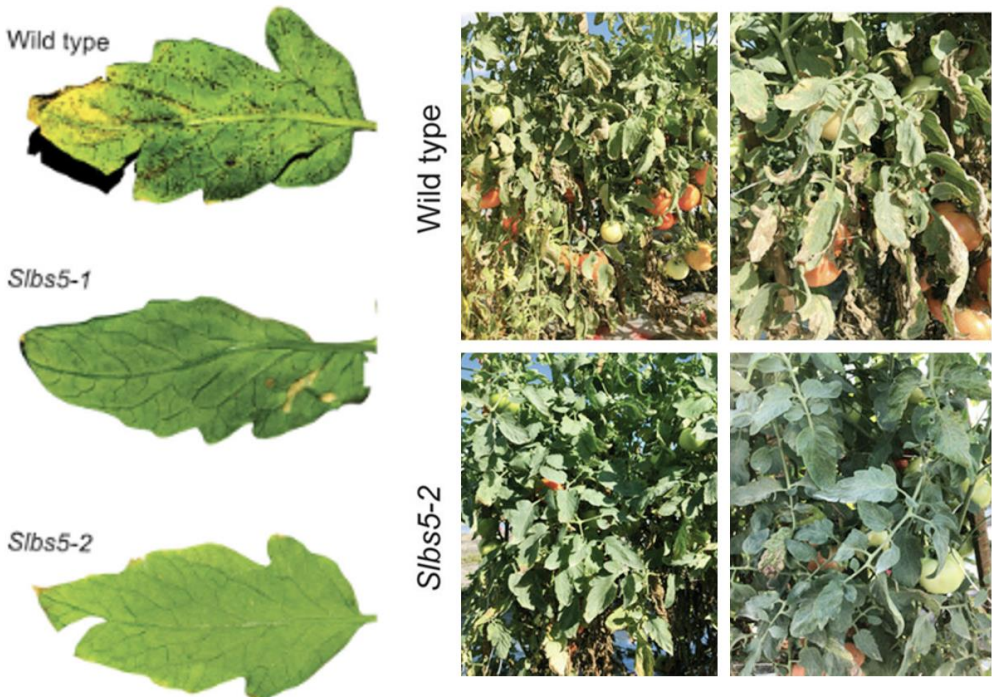
Arturo Ortega^{1,2,3}, Kyungyong Seong², Alex Schultink⁴, Daniela Paula de Toledo Thomazella^{2,3}, Eunyoung Seo^{2,3}, Elaine Zhang³, Julie Pham³, Myeong-Je Cho³, Douglas Dahlbeck^{2,3}, Jacqueline Warren³, Gerald V. Minsavage⁵, Jeffrey B. Jones⁵, Edgar Sierra-Orozco⁶, Samuel F. Hutton⁶ and Brian Staskawicz^{2,5,*}



Valutazione qualitativa dei sintomi della malattia causata da *Xanthomonas perforans*



2024: editing genico mediato da CRISPR/Cas9 conferisce resistenza alla maculatura batterica da *Xanthomonas* in pomodoro

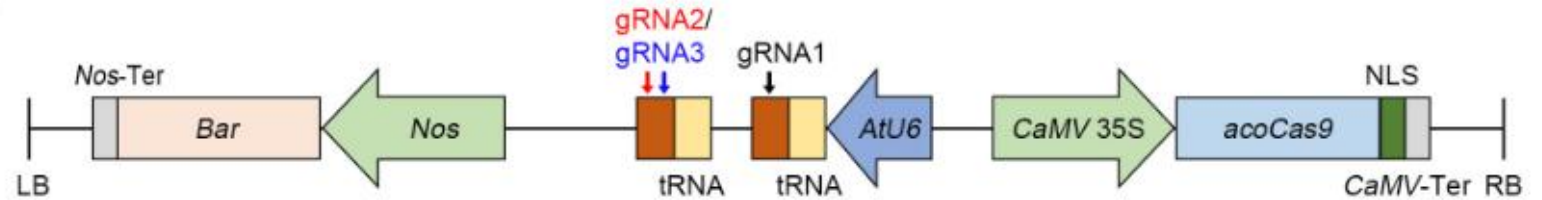


Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- **Caso di studio: ridotto potenziale allergenico**

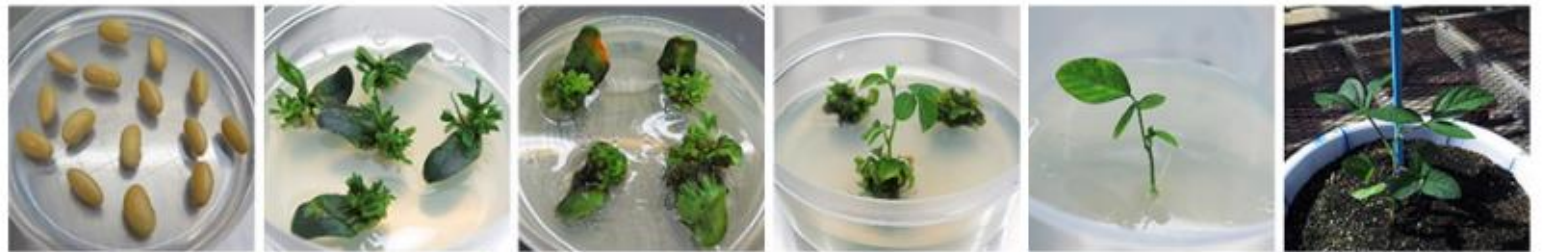


2025: Linee di soia con ridotto **potenziale allergenico** costituite mediante editing genomico (CRISPR/Cas9 multiplex)



 **frontiers** | Frontiers in Plant Science

CRISPR/Cas9-mediated simultaneous targeting of GmP34 and its homologs produces T-DNA-free soybean mutants with reduced allergenic potential



Dongwon Baek^{1†}, Byung Jun Jin^{2†}, Mi Suk Park¹, Ye Jin Cha², Tae Hee Han², Ye Na Jang², Su Bin Kim², Sang In Shim³, Jong-Il Chung³, Hyun Jin Chun^{3*} and Min Chul Kim^{1,2,3*}

¹Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea, ²Division of Applied Life Science (BK21 Four), Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea, ³Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Republic of Korea

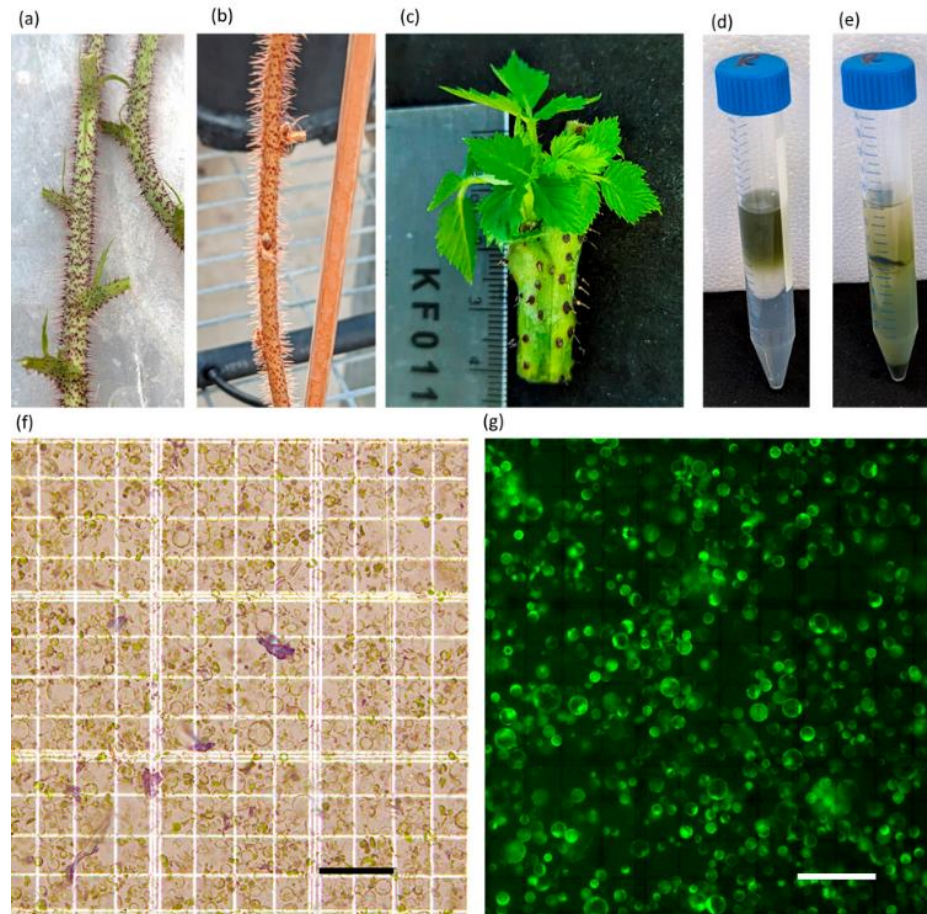
- Utilizzo di **CRISPR/Cas9 multiplex** per disattivare simultaneamente i geni *GmP34h1/h2* responsabili delle reazioni allergeniche
- Ottenimento di **linee mutanti prive di T-DNA** quindi mancanti di sequenze transgeniche
- Assenza della **proteina allergenica** confermata da analisi proteiche

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Caso di studio: "regulatory-friendly precision breeding"



Varietà migliorate via **editing genomico DNA-free** in lampone tramite transfezione con RNP di CRISPR/Cas9



- Possibilità di editing in varietà clonali preservando il patrimonio genetico
- Riduzione di tempi e costi rispetto ai metodi tradizionali di trasformazione genetica
- Migliore accettazione a livello normativo e commerciale grazie all'assenza di DNA esogeno



Frontiers in **Genome Editing**

TYPE Brief Research Report
PUBLISHED 30 June 2025
DOI 10.3389/fgeed.2025.1589431

DNA-free CRISPR genome editing in raspberry (*Rubus idaeus*) protoplast through RNP-mediated transfection

Ryan Creeth*, Andrew Thompson and Zoltan Kevei*

Centre for Soil, Agrifood and Biosciences, Cranfield University, Cranfield, United Kingdom

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Caso di studio: maschiosterilità (per sviluppo varietà F1)

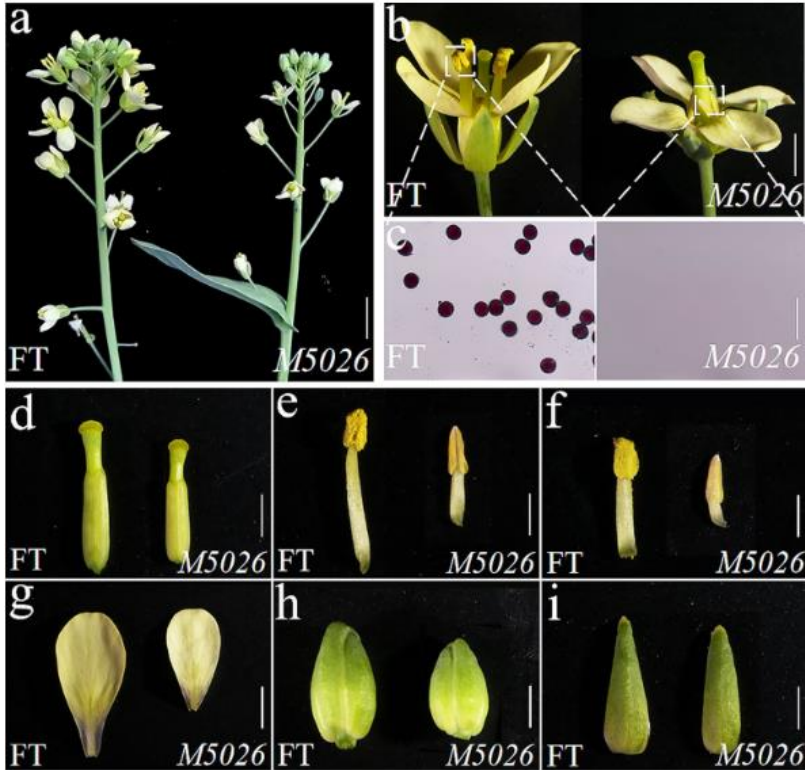
 Induzione di maschio-sterilità nucleare nelle *Brassicaceae*

Brems1 mutation induced tapetum deficiency leading to male sterility in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

Original Article | Published: 24 February 2025
Volume 138, article number 50, (2025) [Cite this article](#)

Access provided by CARE COMPACT-CRUI

[Download PDF](#)



- Semplificazione della produzione di ibridi grazie alla creazione di linee portaseme maschiosterili
- Riduzione dell'uso di metodi manuali o chimici nei processi di produzione sementiera
- Potenziale trasferimento ad altre Brassicacee di maggior valore agroalimentare

Chuanhong Liu, Lin Wang, Chong Tan, Di Zhao & Zhiyong Liu

Generations	Total	Male fertility	Male sterile	Segregation ratio	χ^2	$\chi^2_{0.05}$
P ₁ ('FT')	50	50	0			
P ₂ (M5026)	50	0	50			
F ₁ (P ₂ × P ₁)	20	20	0			
F ₁ ' (P ₁ × P ₂)	20	20	0			
F ₂	768	581	187	3.10:1	0.17	3.841

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Caso di studio: maschiosterilità (per sviluppo varietà F1)

 Induzione di maschio-sterilità nucleare nelle *Solanaceae* e *Asteraceae*

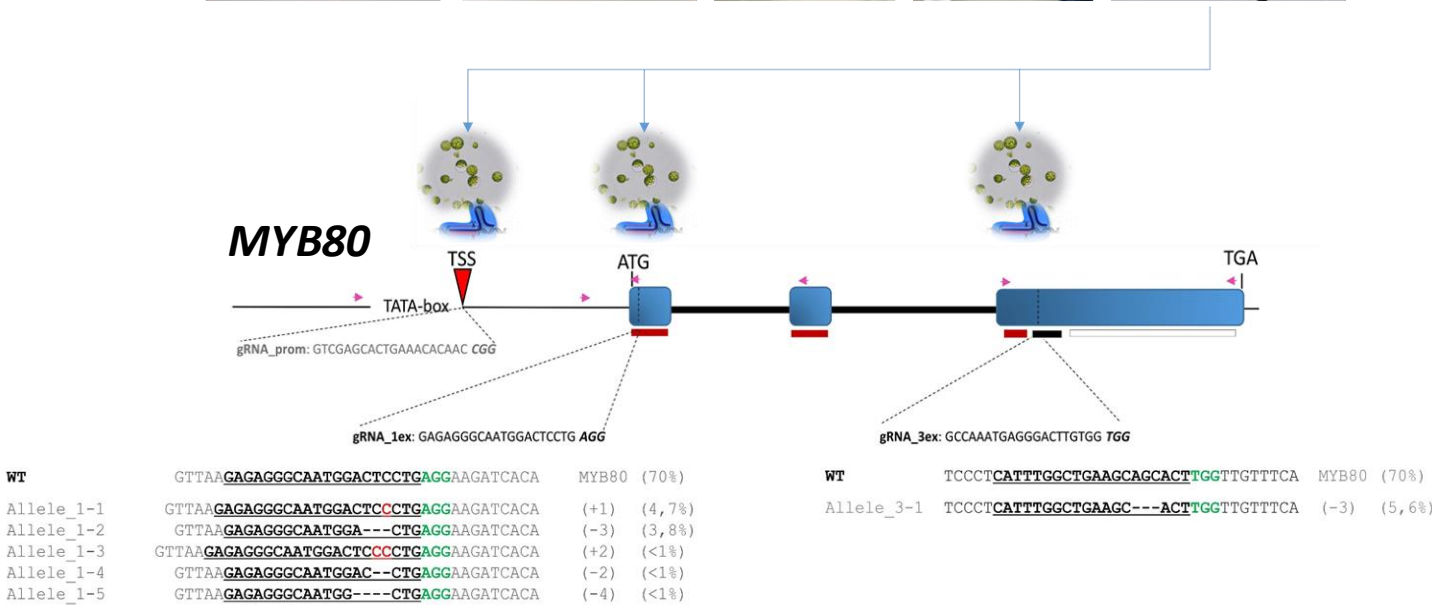
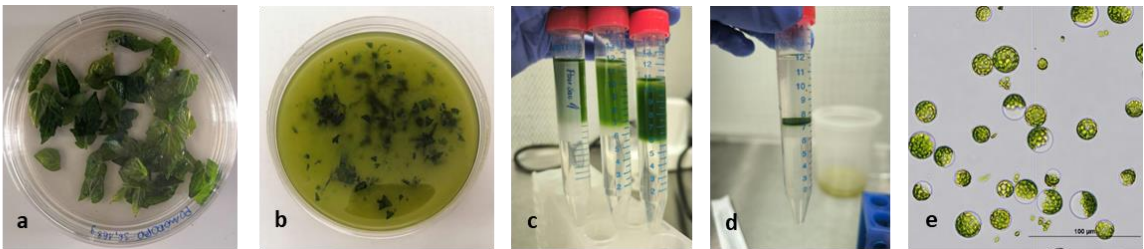
 frontiers | Frontiers in Plant Science

Unlocking male sterility in horticultural crops through gene editing technology for precision breeding applications: presentation of a case study in tomato

Silvia Farinati, Adriana Fernanda Soria Garcia, Samela Draga, Alessandro Vannozzi, Fabio Palumbo, Francesco Scariolo, Giovanni Gabelli and Gianni Barcaccia*

doi: [10.3389/fpls.2025.1549136](https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1549136)

- *MYB80* è un gene candidato valido per produrre mutanti *ms* via CRISPR/Cas in **pomodoro**, lattuga e radicchio



Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Caso di studio: maschiosterilità (per sviluppo varietà F1)



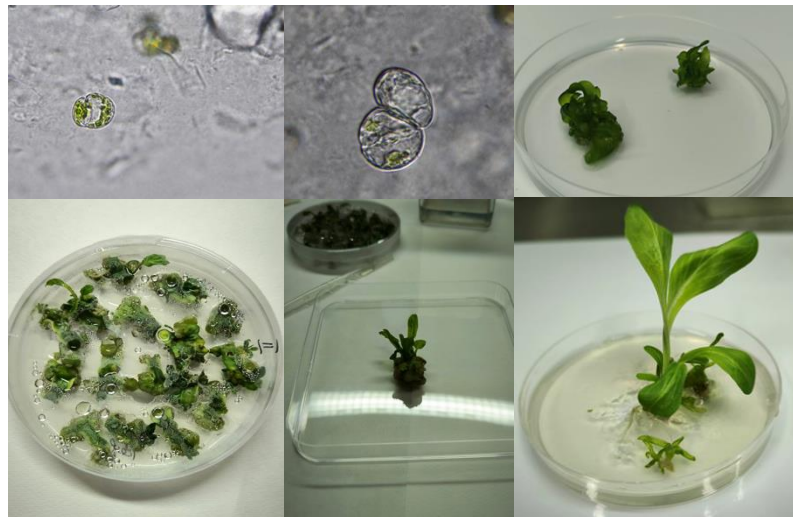
Induzione di maschio-sterilità nucleare nelle *Solanaceae* e *Asteraceae*



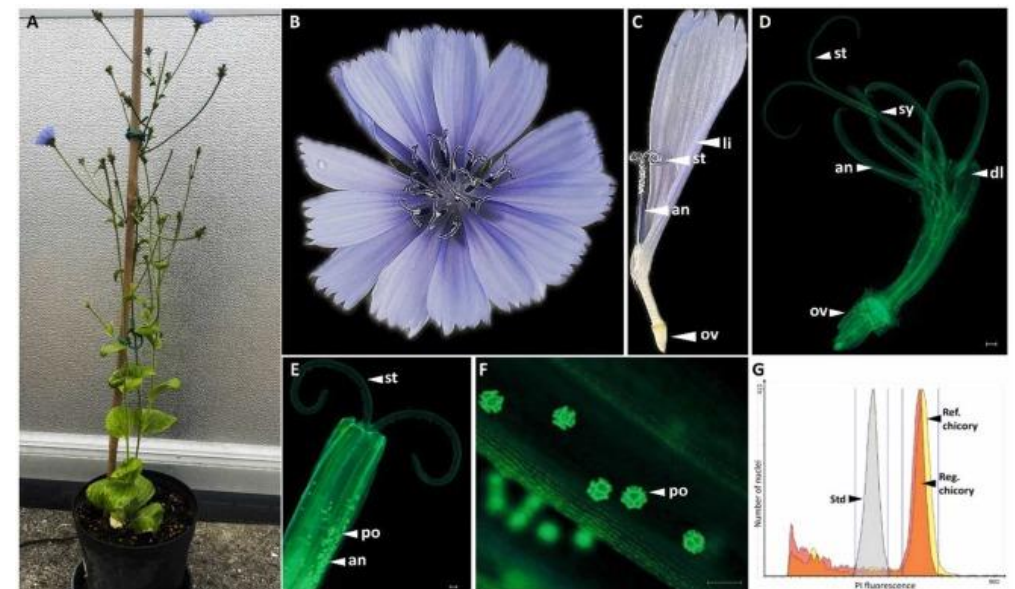
Establishing a cutting-edge protoplast technology platform for applying new genomic techniques in *Cichorium* spp

Adriana Fernanda Soria Garcia¹, Silvia Farinati¹, Samela Draga, Damiano Riommi, Giovanni Gabelli, Alessandro Vannozzi, Gianni Barcaccia^{*}, Fabio Palumbo[✉]

<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2025.10.008>



- Ottimizzazione di protocolli di estrazione dei protoplasti per 12 biotipi coltivati di **cicoria** e **indivia**
- Rigenerazione *in vitro* ottenuta da singoli protoplasti secondo protocolli ad elevata efficienza
- Implementazione di una tecnologia efficace di editing genomico DNA-free per protoplasti di *Cichorium* spp.



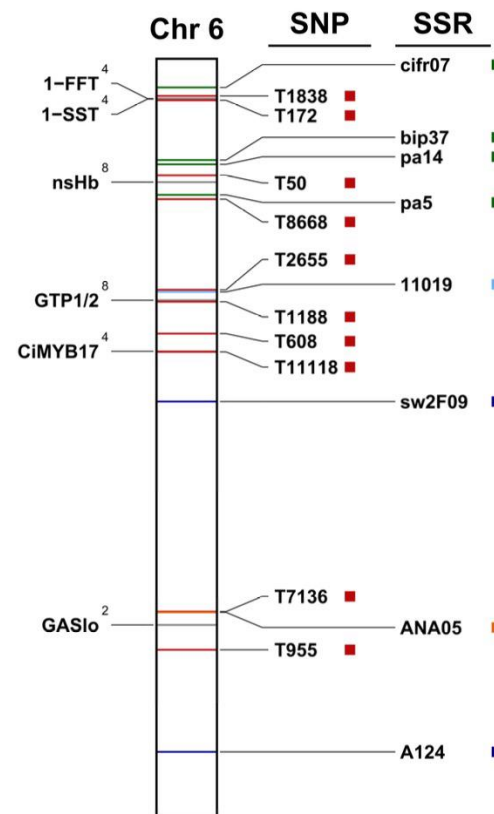
Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Caso di studio: resistenza a stress idrico e biotico

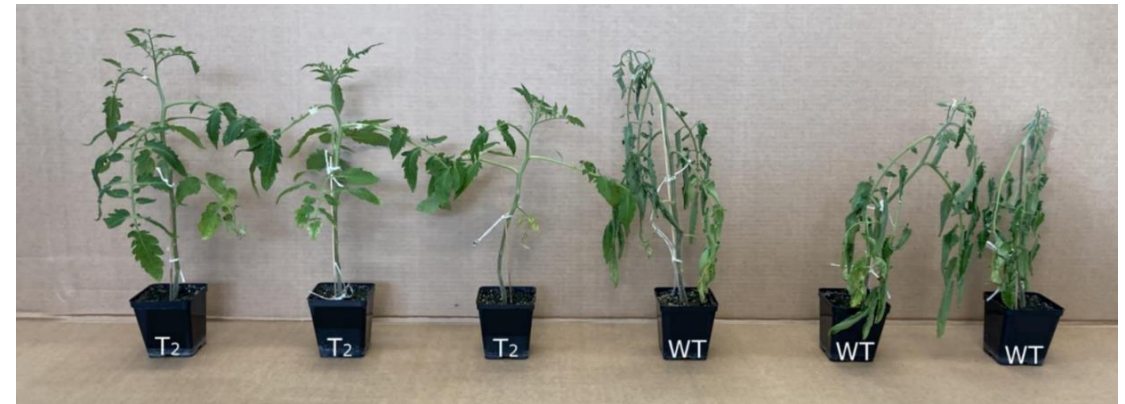


Spoke 4: Advanced genomic technologies for the selection of multiple resilient traits in crop plants (Task 4.1.1)

Sviluppo di banche dati di geni candidati e marcatori molecolari utili per applicazioni di **marker-assisted breeding (MAB)** e **genome editing (NGT)** finalizzate alla selezione di varietà superiori di **specie orticole**

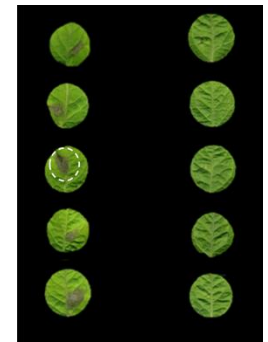


Stress idrico



Inattivazione tramite GE di un gene di suscettibilità - *DMR6* nella varietà "San Marzano" di pomodoro al fine di ottenere **tolleranza a stress idrico (sicidità) e resistenza a stress biotico (peronospora)**

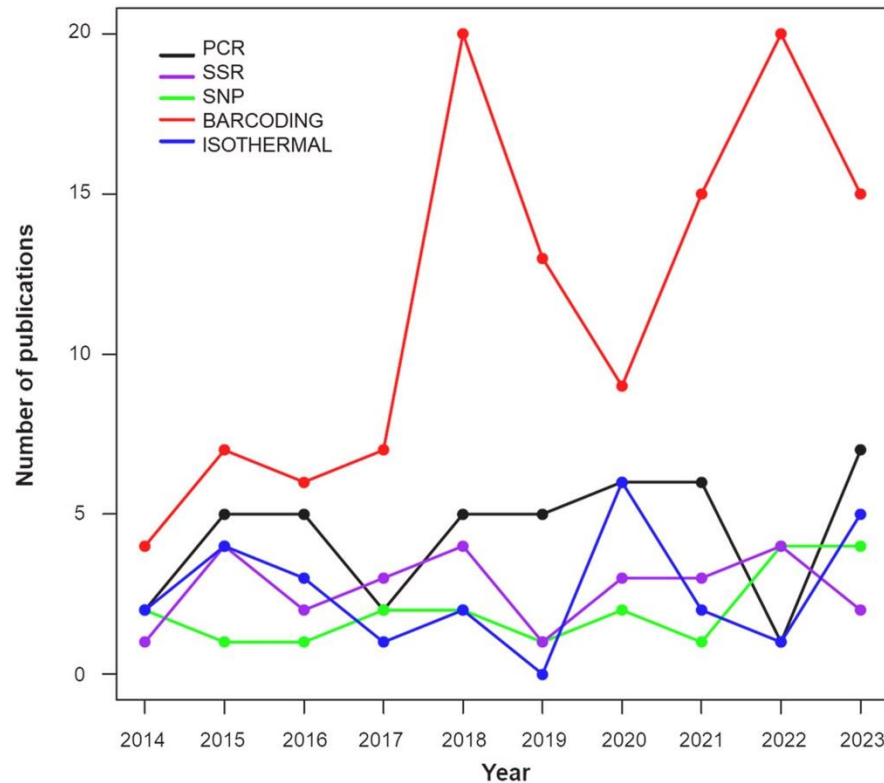
Stress biotico



1. TEA come nuova frontiera del miglioramento genetico di precisione per la costituzione di nuove varietà di specie orticole
2. **CRISPR/Cas come strumento genomico di precisione per l'accertamento dell'identità genetica delle varietà e la tracciabilità molecolare dei loro derivati alimentari**

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

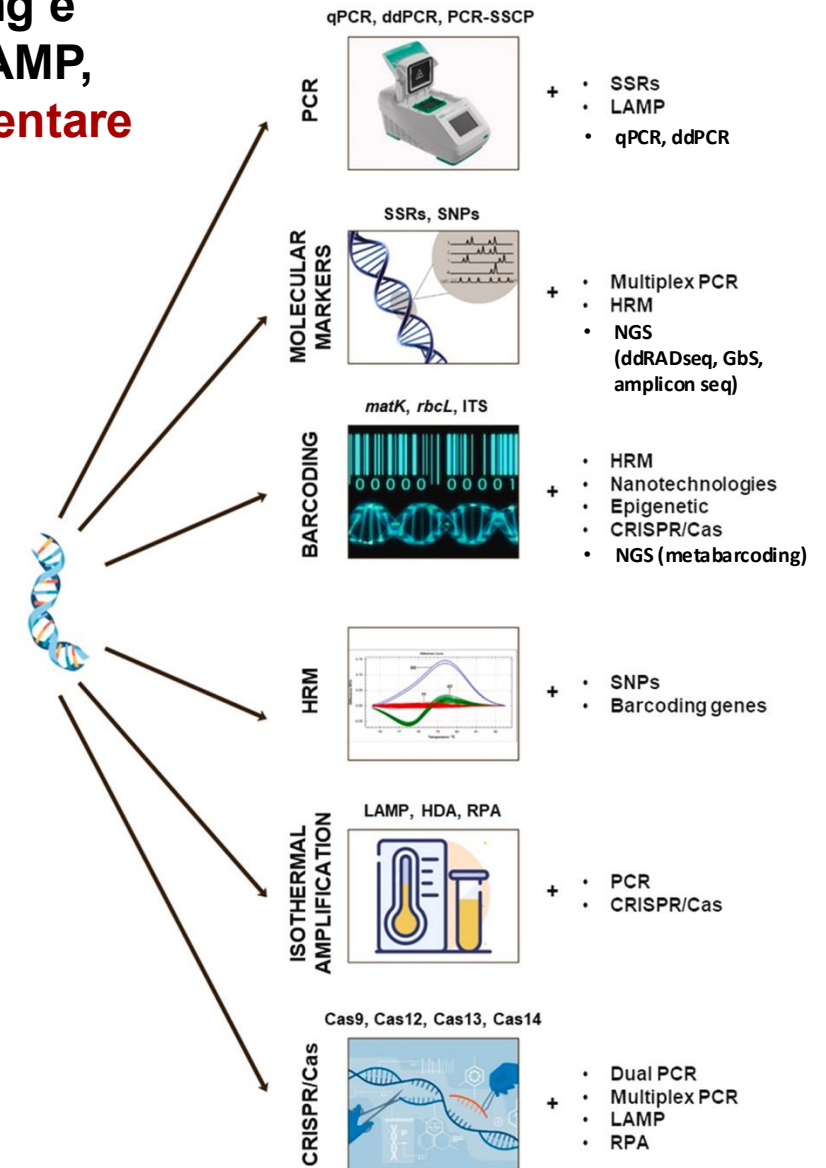
- Metodologie di tracciabilità genetica: dal DNA (meta)barcoding e DNA genotyping ai nuovi tools ad alte prestazioni: ddPCR, LAMP, ddRADseq e **CRISPR/Cas per garantire la sicurezza agroalimentare**



Lanubile A. et al. (2024) DNA-based techniques to check quality and authenticity of food, feed and medicinal products of plant origin: A review.

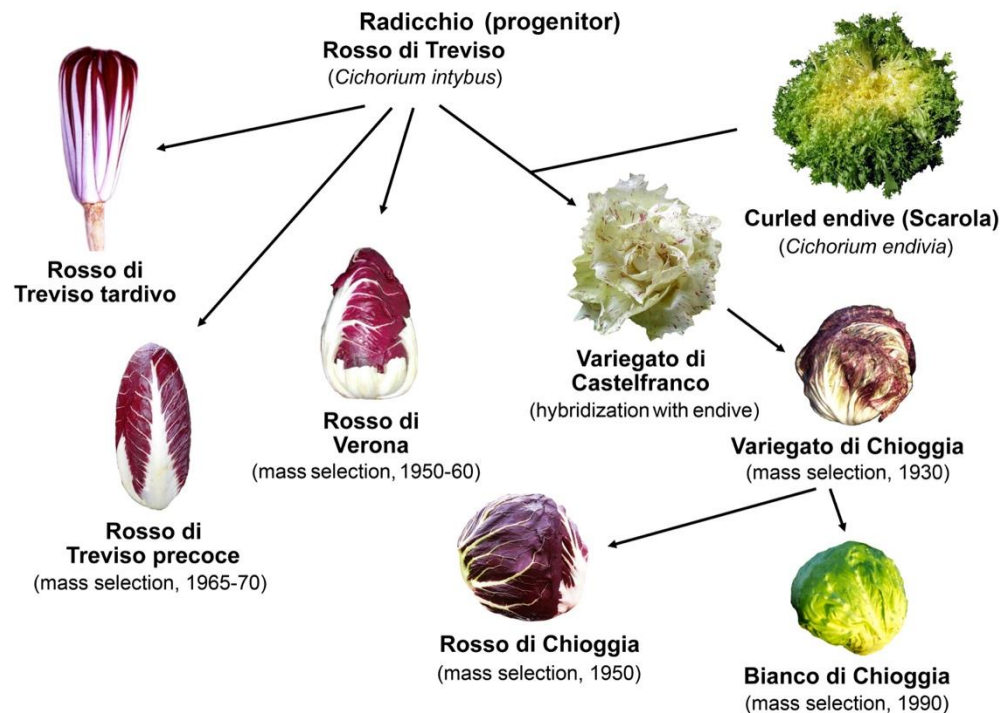
Trends in Food Science & Technology vol. 149: art. 104568.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104568>

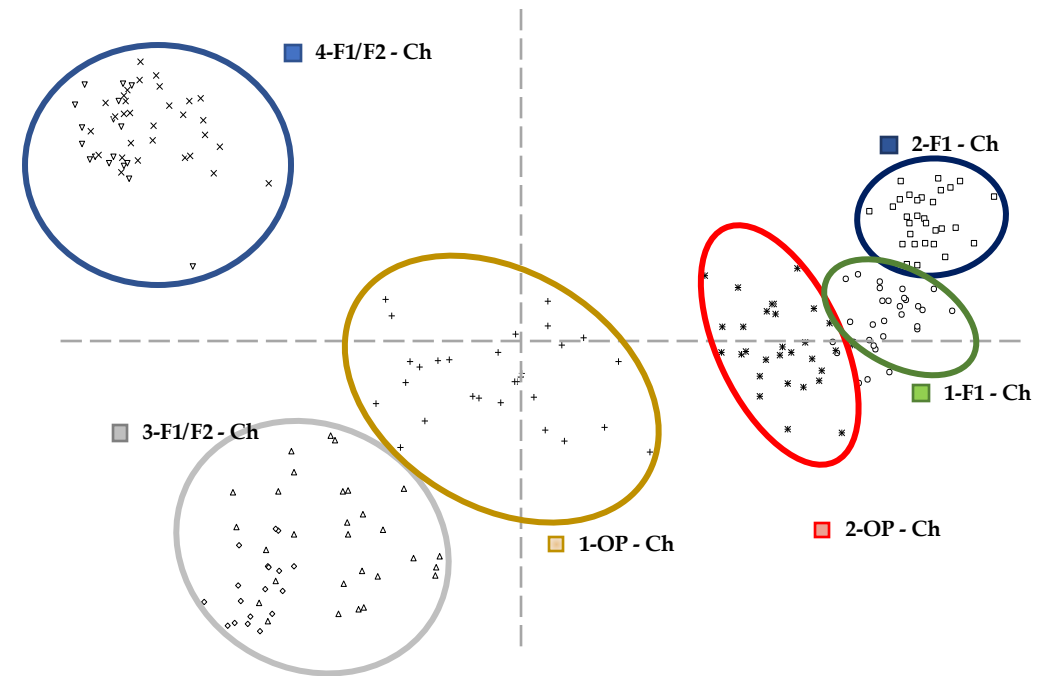


Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Metodologie di tracciabilità genetica: dal DNA (meta)barcoding e DNA genotyping ai nuovi tools ad alte prestazioni: ddPCR, LAMP, ddRADseq e CRISPR/Cas per garantire la sicurezza agroalimentare



Multilocus SSR genotyping



Genetic structure of cultivated varieties of radicchio (*Cichorium intybus* L.):
a comparison between F1 hybrids and synthetics

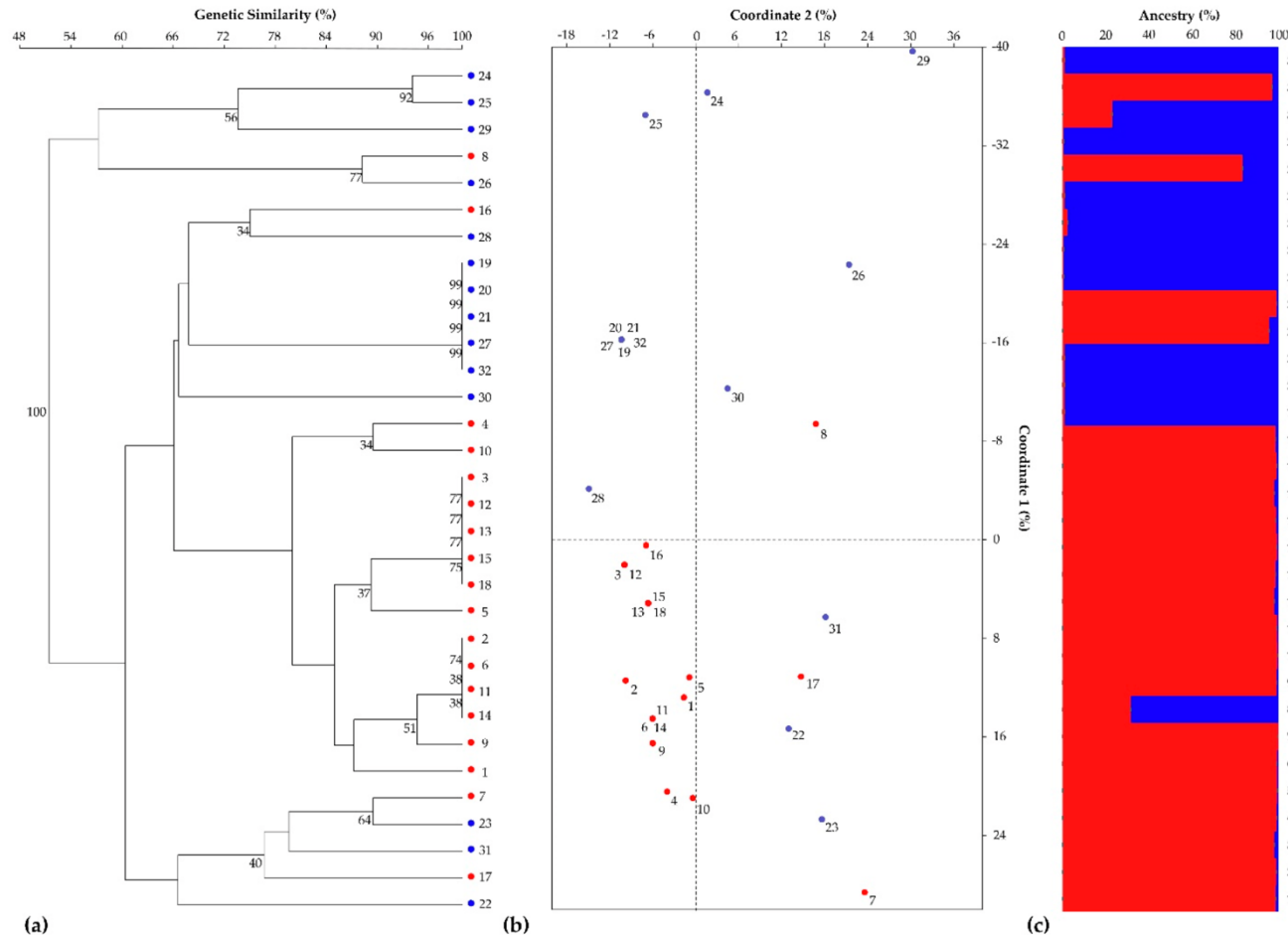
Alice Patella, Francesco Scariolo, Fabio Palumbo, Gianni Barcaccia

Plants (2019) vol. 8: art. 21 <https://doi.org/10.3390/plants8070213>

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Metodologie di tracciabilità genetica: dal DNA (meta)barcoding e DNA genotyping ai nuovi tools ad alte prestazioni: ddPCR, LAMP, ddRADseq e CRISPR/Cas per garantire la sicurezza agroalimentare

NGS genotyping (RAD sequencing)



Article



Genotyping by RAD Sequencing Analysis Assessed the Genetic Distinctiveness of Experimental Lines and Narrowed down the Genomic Region Responsible for Leaf Shape in Endive (*Cichorium endivia* L.)

Alice Patella [†], Fabio Palumbo [†] , Samathmika Ravi, Piergiorgio Stevanato and Gianni Barcaccia ^{*}

Genes (2019) vol. 8, art. 213

<https://doi:10.3390/plants8070213>



Article



Genotyping Analysis by RAD-Seq Reads Is Useful to Assess the Genetic Identity and Relationships of Breeding Lines in Lavender Species Aimed at Managing Plant Variety Protection

Francesco Scariolo ¹, Fabio Palumbo ¹, Alessandro Vannozzi ¹, Gio Batta Sacilotto ², Marco Gazzola ² and Gianni Barcaccia ^{1,*}

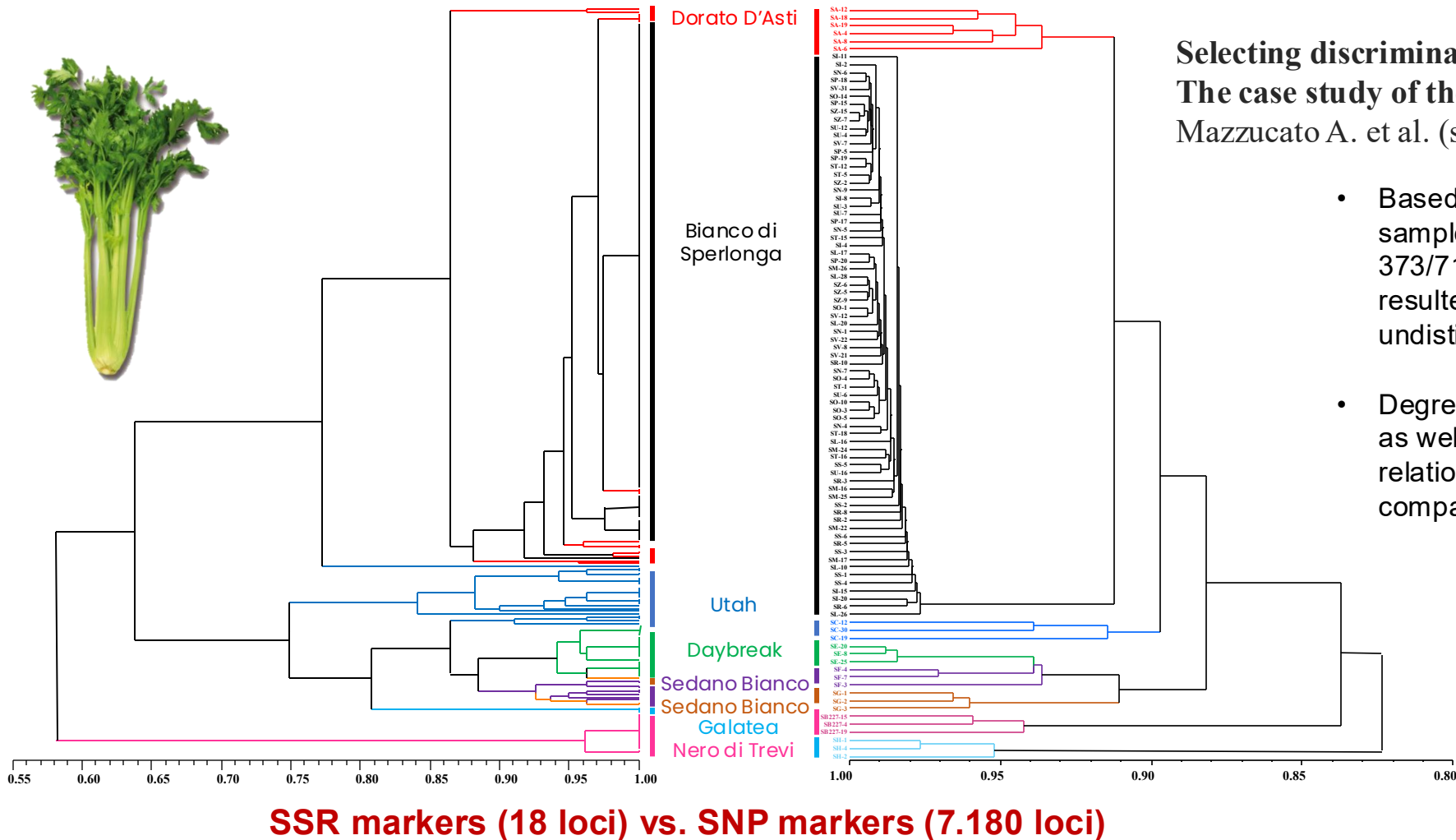
Genes (2021) vol. 12: art. 1656

<https://doi.org/10.3390/genes12111656>



Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

- Metodologie di tracciabilità genetica: dal DNA (meta)barcoding e DNA genotyping ai nuovi tools ad alte prestazioni: ddPCR, LAMP, ddRADseq e CRISPR/Cas per garantire la sicurezza agroalimentare



Selecting discriminant panels of markers: the more the better?
The case study of the local variety of celery "Sperlonga"
Mazzucato A. et al. (submitted)

- Based on **SNP data**, the most similar and dissimilar samples differed for 48/7189 loci (**0.3%**) and 373/7180 loci (**3.9%**), respectively, whereas they resulted genetically identical and molecularly undistinguishable based on **SSR data**
- Degrees of the overall homozygosity/heterozygosity as well as genetic diversity statistics and phylogenetic relationships among accessions were substantially comparable (**SNP vs. SSR data**)

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole



Genome-wide strategies aimed at the assessment of genetic distinctiveness, uniformity and stability (DUS), and identity (PVP) of pre-commercial varieties in the main horticultural crop species for the fresh-cut market (Task 1.3.5)

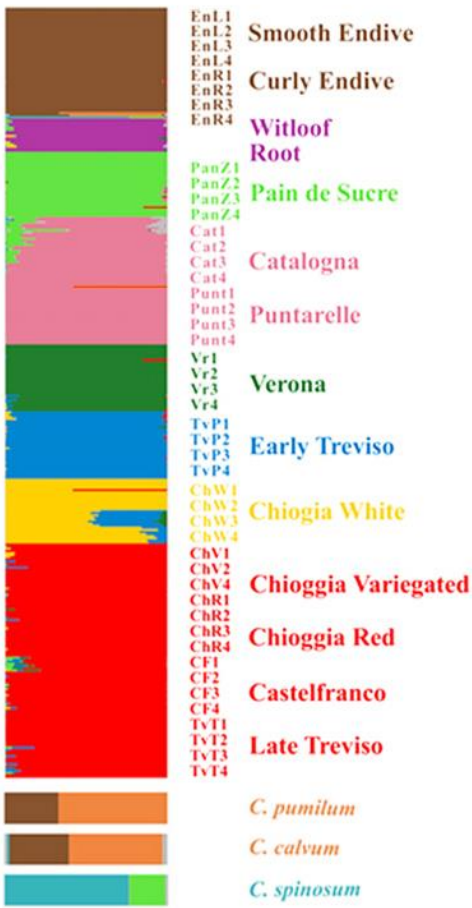
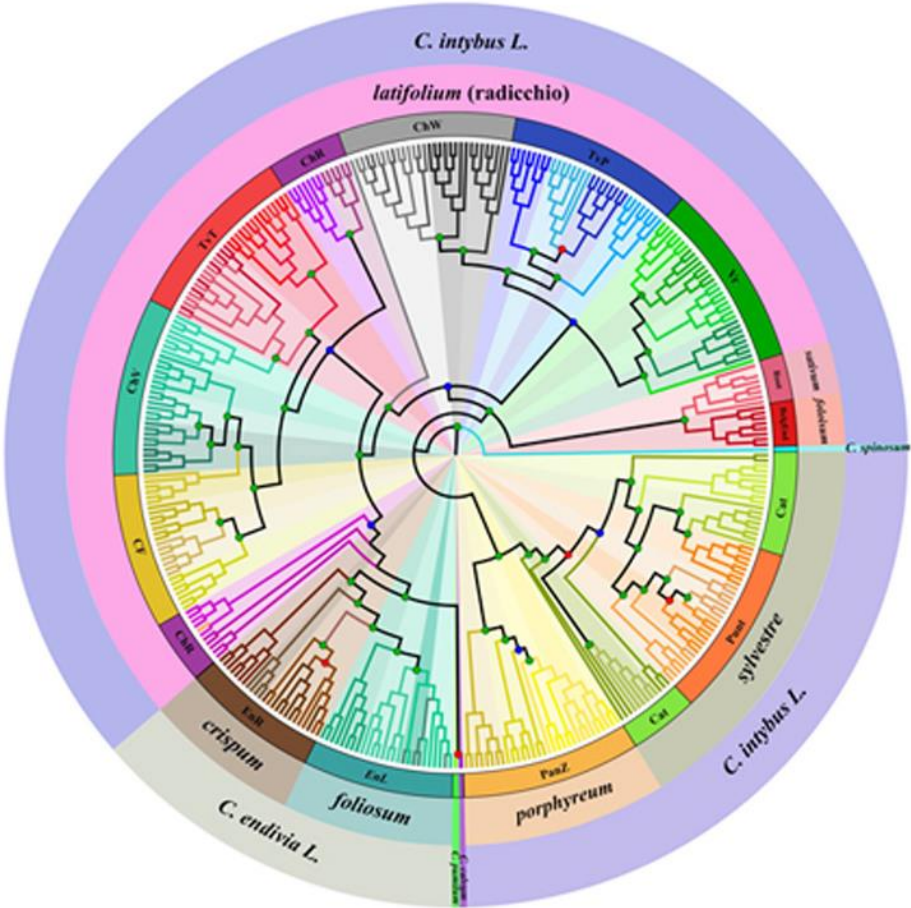
RESEARCH Open Access

A pioneering genotypic and phylogenetic characterisation of *Cichorium* crops through a genome-scale sequencing for future breeding innovations

Francesco Scariolo¹, Samela Draga¹, Damiano Riommi¹, Alessandra Tondello¹, Lydia Grace Griffin^{1,2}, Fabio Palumbo¹, Alessandro Vannozi¹ and Gianni Barcaccia^{1*}

Abstract
The genus *Cichorium*, which comprises economically important crops such as chicory and endive, exhibits significant genetic and phenotypic diversity. This study used genome-scale sequencing based on ddRAD technology to explore the genetic diversity and relationships, and to identify multiple discriminant loci within this genus. Moreover, microscopy analysis was conducted to identify morphological traits, such as pappus structure, to aid species-level identifications. Despite this, the genetic complexity within *Cichorium* remains challenging to resolve based solely on phenotypic characteristics. Our study confirms the efficacy of ddRADseq in generating high-quality genotyping-by-sequencing data, identifying 1,350 multi-allelic polymorphic loci across 368 genotypes and revealing significant genetic differentiation among species, varieties, and biotypes. Lower observed heterozygosity (Ho) compared to expected heterozygosity (Hs) suggests the presence of fixed genotypes within biotype groups, likely due to selection for specific morphological traits. Genetic distance and clustering analyses proved the distinctiveness of self-incompatible species (*C. intybus* and *C. spinosum*) from self-compatible species (*C. endivia* and *C. pumilum*). Notably, a strong genetic relationship was observed between *C. intybus* var. *foliosum* (Witloof) and var. *sativum* (Root chicory), supporting the hypothesis of a common ancestry. These findings may help refine the taxonomic classification of *Cichorium*, offering valuable insights for the conservation of genetic resources and their classification, the precise adoption in breeding decisions and genomic selection of suitable genotypes, as well as the genotypic identity determination of registered cultivars with the protection of breeder's rights.

Keywords Chicory, Endive, Asteraceae, NGS, Genetic diversity



Tecnologia CRISPR/Cas come strumento di precisione per identità varietale e tracciabilità alimentare

Not only gene editing...

- Accertamento dell'identità genetica delle varietà
- Rilevamento di frodi: tracciabilità genetica degli alimenti



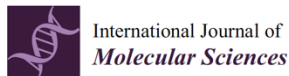
How Helpful May Be a CRISPR/Cas-Based System for Food Traceability?

by Silvia Farinati , Aurélien Devillars , Giovanni Gabelli , Alessandro Vannozzi ,
Francesco Scariolo , Fabio Palumbo and Gianni Barcaccia *

Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment (DAFNAE), Campus of Agripolis,
University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Italy

* Author to whom correspondence should be addressed.

Foods **2024**, *13*(21), 3397; <https://doi.org/10.3390/foods13213397>



Not Only Editing: A Cas-Cade of CRISPR/Cas-Based Tools for Functional Genomics in Plants and Animals

by Aurélien Devillars ^{1,†} , Gabriele Magon ^{1,†} , Carlotta Pirrello ² , Fabio Palumbo ¹ , Silvia Farinati ¹ ,
Gianni Barcaccia ¹ , Margherita Lucchin ¹ and Alessandro Vannozzi ^{1,*}

¹ Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment (DAFNAE), University of Padova, Agripolis,
Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, PD, Italy

² Research and Innovation Centre, Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38098 San Michele all'Adige, TN, Italy

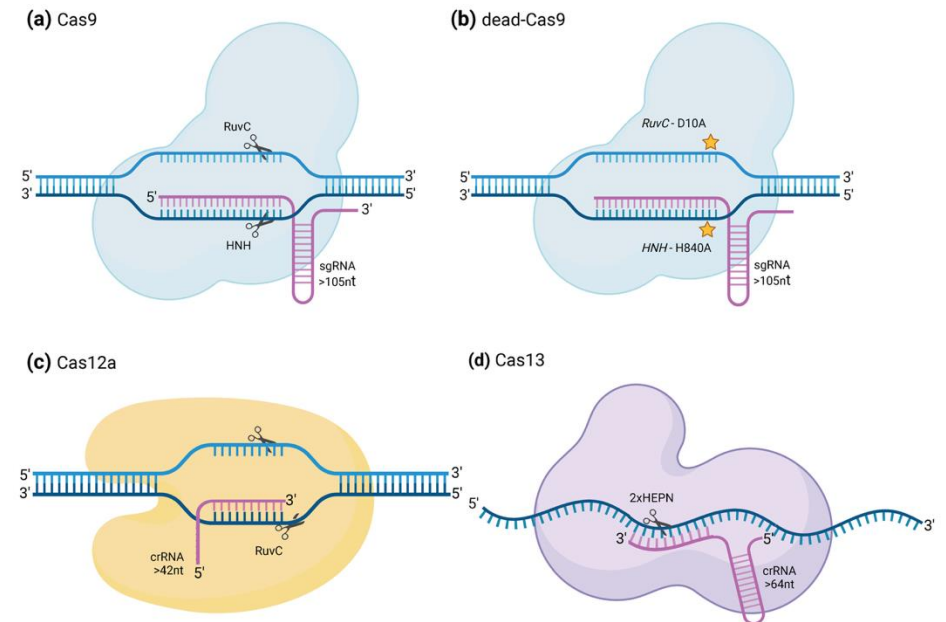
* Author to whom correspondence should be addressed.

[†] These authors contributed equally to this work.

Int. J. Mol. Sci. **2024**, *25*(6), 3271; <https://doi.org/10.3390/ijms25063271>



Sistemi CRISPR/Cas derivati per la autenticazione genetica dei vegetali



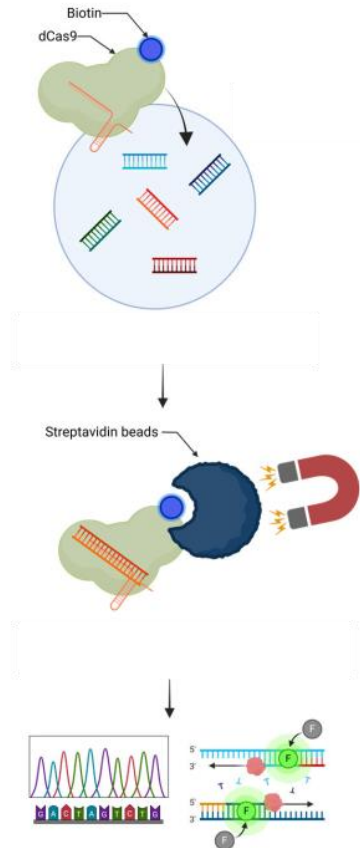
Principio:

- Sistemi CRISPR/Cas programmati come biosensori per riconoscere sequenze specifiche di DNA/RNA (es. barcode varietale, marker specifico, gene allergenico)
- Riconoscimento di sequenze nucleiche bersaglio (sonde fluoresceinate, strip test, sequenziamento arricchito)

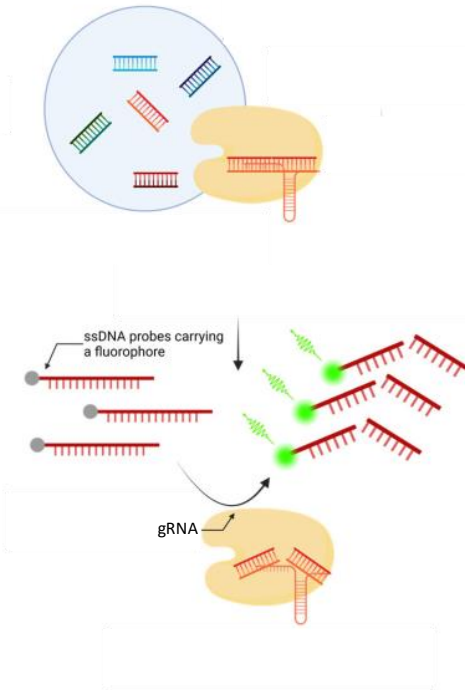
Tecnologia CRISPR/Cas come strumento di precisione per identità varietale e tracciabilità alimentare

Come funziona il sistema di non-editing?

- arricchimento e isolamento del campione attraverso Cas9 biotinilato usando streptavidina



- Identificazione diretta delle sequenze target mediante uso di sonde ssDNA fluoresceinate specifiche per gRNA



frontiers | Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

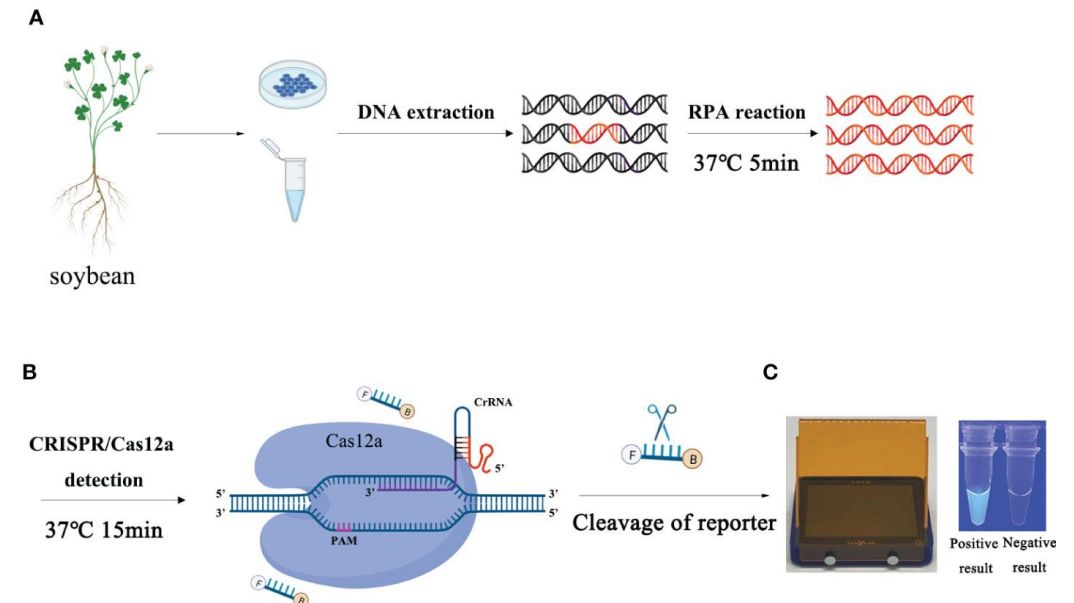
TYPE Original Research

PUBLISHED 26 May 2023

DOI 10.3389/fcimb.2023.1208837

RPA-CRISPR/Cas12a mediated isothermal amplification for visual detection of *Phytophthora sojae*

Yufang Guo¹, Hongming Xia¹, Tingting Dai^{1*} and Tingli Liu^{2*}



Tecnologia CRISPR/Cas come strumento di precisione per identità varietale e tracciabilità alimentare

CRISPR-Cas/barcoding: verso una nuova frontiera di identificazione/autenticazione genetica

Casi di studio in animali

Received: 8 November 2024 | Accepted: 28 April 2025

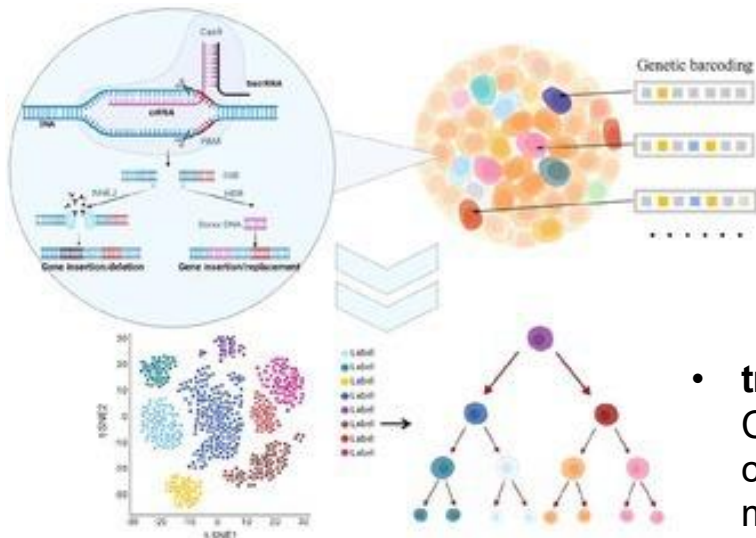
DOI: 10.1002/ame2.70033

REVIEW



Advances in CRISPR-Cas9 in lineage tracing of model animals

Jingchao Cao¹ | Zihang Guo² | Xueling Xu³ | Pan Li⁴ | Yi Fang⁵ | Shoulong Deng²



- **tracciamento di linee cellulari** mediante CRISPR/Cas9 e sequenziamento a singola cellula, con inserimento di barcode specifici mediante editing genomico di tipo HDR



ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-017-01519-y

OPEN

Multiplexed in vivo homology-directed repair and tumor barcoding enables parallel quantification of Kras variant oncogenicity

Ian P. Winters¹, Shin-Heng Chiou¹, Nicole K. Paulk^{1,2}, Christopher D. McFarland³, Pranav V. Lalgudi¹, Rosanna K. Ma¹, Leszek Lisowski^{2,4,5}, Andrew J. Connolly⁶, Dmitri A. Petrov³, Mark A. Kay^{1,2} & Monte M. Winslow^{1,6,7,8}

- **monitoraggio di geni oncosoppressori** via CRISPR/Cas9 con approccio HDR: tumor DNA barcoding e deep sequencing offrono una piattaforma rapida e quantitativa per individuare con precisione mutazioni in modelli murini di tumori umani

Tecnologia CRISPR/Cas come strumento di precisione per identità varietale e tracciabilità alimentare

CRISPR-Cas/barcoding: verso una nuova frontiera di identificazione/autenticazione genetica

Casi di studio in procarioti

Multiplexed precision genome editing with trackable genomic barcodes in yeast

Kevin R Roy^{1-4,11} , Justin D Smith^{1,4,11} , Sibylle C Vonesch^{5,11} , Gen Lin⁵, Chelsea Szu Tu⁵, Alex R Lederer⁵ , Angela Chu^{1,6}, Sundari Suresh^{1,6}, Michelle Nguyen^{1,4}, Joe Horecka^{1,6}, Ashutosh Tripathi⁷, Wallace T Burnett^{1,4} , Maddison A Morgan^{1,4}, Julia Schulz^{1,4}, Kevin M Orsley^{1,4}, Wu Wei^{1,4}, Raeka S Aiyar¹, Ronald W Davis^{1,4,6}, Vytas A Bankaitis⁷⁻⁹, James E Haber¹⁰, Marc L Salit^{2,3} , Robert P St.Onge^{1,6}  & Lars M Steinmetz^{1,3-5}

nature
biotechnology



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY



Microbiology
Spectrum

RESEARCH ARTICLE

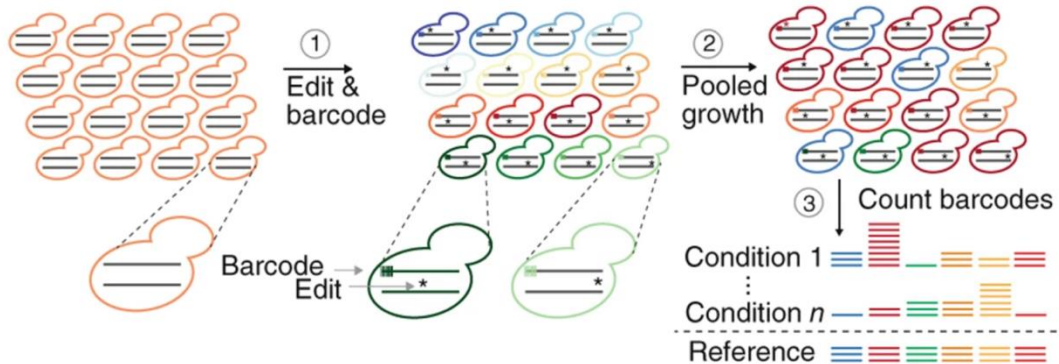
August 2024 Volume 12 Issue 8 e00003-24

<https://doi.org/10.1128/spectrum.00003-24>

CRISPR-Cas9-mediated barcode insertion into *Bacillus thuringiensis* for surrogate tracking

Steven A. Higgins , Fadime Kara Murdoch, Jonathon M. Clifton, Jennifer H. Brooks, Keegan L. Fillinger, Jason K. Middleton, Bradley S. Heater 

C



- Inserimento di barcode in *Bacillus thuringiensis* tramite CRISPR/Cas9, con rilevazione mediante qPCR, utile per lo **sviluppo rapido di ceppi marcati e geneticamente tracciabili** nel genere *Bacillus*

Tecnologia CRISPR/Cas come strumento di precisione per identità varietale e tracciabilità alimentare

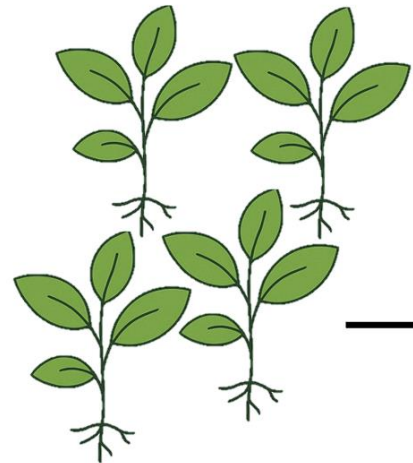
CRISPR-Cas/barcoding: verso una nuova frontiera di identificazione/autenticazione genetica

- Sviluppo di un sistema duale di CRISPR/Cas per inserimento e riconoscimento di sequenze barcode

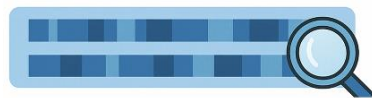
Fase 1:

Target-DNA editing/replacement

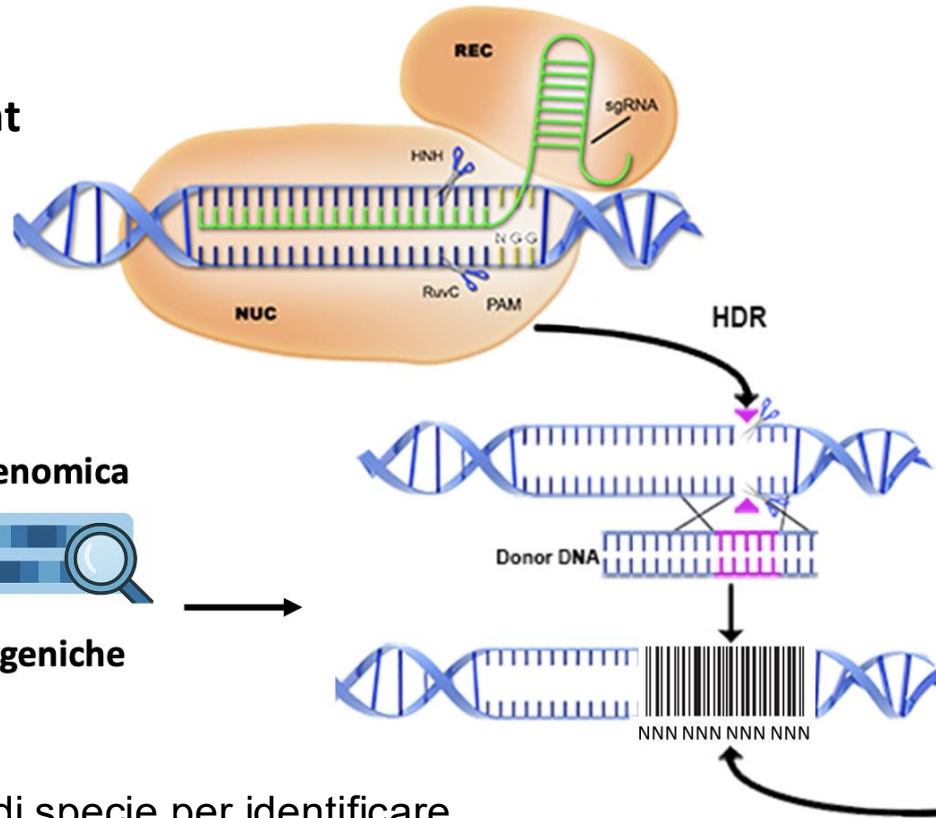
Inserimento della sequenza barcode (<20 nt) tramite HDR



Analisi pangenomica



Regioni intergeniche



Fase 2:

Barcode detection by CRISPR/Cas

Riconoscimento della sequenza barcode editata tramite CRISPR (Cas9 o gRNA)

- Il sistema CRISPR è riutilizzabile con una guida specifica per riconoscere la sequenza barcode integrata/sostituita, consentendo la tracciabilità genetica dell'organismo

- Analisi pangenomica a livello di specie per identificare regioni intergeniche bersaglio potenzialmente idonee alla integrazione o sostituzione della sequenza barcode

Impatto delle TEA nel miglioramento genetico delle specie orticole

Conclusioni [specie orticole]

**Ieri ~~Oggi~~: trasferimento di varianti genetiche utili
tramite incrocio/reincrocio**

processi laboriosi e lunghi con effetti indesiderati sul genotipo dovuti al
“linkage drag”

**Oggi ~~Domani~~: miglioramento via cisgenesi e via
editing genomico**

processi sempre più precisi e veloci grazie all'avanzamento delle
conoscenze -omiche sulle relazioni fra GM e/o QTL e fenotipo

Domani: editing genomico come nuova frontiera in agricoltura

l'impatto delle TEA sulla costituzione di nuove varietà è potenzialmente enorme...
la rivoluzione tecnologica è solo all'inizio e promette di avere ricadute significative non
solo su produttività e qualità dei prodotti e sostenibilità dei sistemi agricoli, ma anche
sugli approcci utilizzabili per la **distinguibilità genetica delle novità vegetali** e la
tracciabilità genetica dei loro derivati alimentari a tutela di produttori e consumatori

L'impatto delle TEA sull'agricoltura del futuro



Dietro il miglioramento genetico delle piante agrarie c'è molta arte, ma ancor più scienza [*There is a great deal of art to plant breeding, but more science*]

Herman Nilsson-Ehle (1873-1949)