



# Le NBT in biologia vegetale e loro applicazioni in paesi non UE

*Alessandro Vitale*  
*Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria*  
*CNR*  
*vitale@ibba.cnr.it*

**Biologia vegetale:** studio di come funzionano le piante

**Biotecnologia vegetale:** miglioramento dell'utilizzo delle piante in agricoltura e industria, tramite l'applicazione pratica:

- delle conoscenze di biologia vegetale
- dello sviluppo tecnologico generale

**NBT: la ricombinazione omologa mirata è possibile in modo efficiente anche nelle piante, finalmente 😊**

**Modificare a piacimento un gene senza spostarlo dalla sua posizione naturale nel genoma e senza aggiungere nuove copie (normali o mutate) dello stesso gene.**

## Perché è utile per la biologia vegetale?

Obiettivo: **definire la funzione di un gene** e come la sua struttura determina tale funzione.

Idealmente: di tutti i geni.

Prima di NBT: cercare (sfruttando la variabilità naturale) o produrre (usando il DNA ricombinante) forme mutate di quel gene e vedere cosa succede.



Mutazioni naturali



Ma: devo sperare di trovare in natura o in piante mutate artificialmente (radiazioni, chimica) la mutazione che ritengo utile

Transgenesi



Ma: Rimane anche la copia normale di quel gene, che devo contemporaneamente disattivare. Oppure devo spostare il gene in una pianta nella quale non esista

NBT

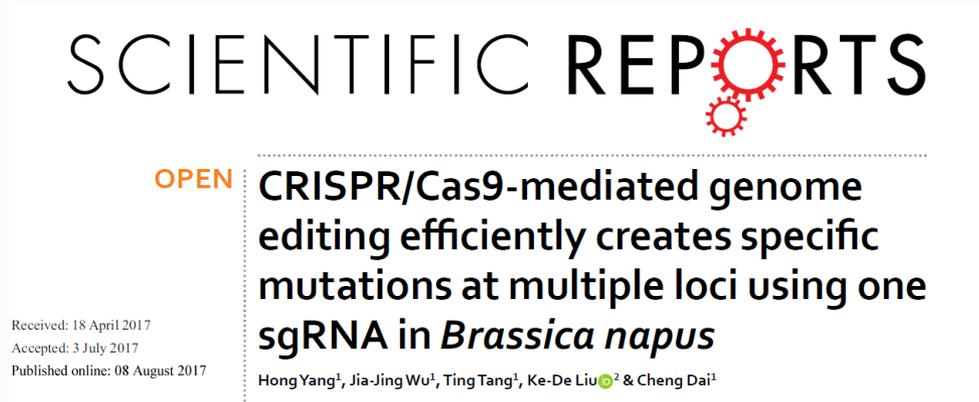


Risolvero i problemi dell'utilizzo di mutazioni naturali e transgenesi

## NBT sono particolarmente utili in biologia vegetale

- Spesso **famiglie multigeniche**
- Spesso **poliploidia** (doppi e tripli genomi)

Le molteplici copie di geni con la stessa funzione (**ridondanza funzionale**) rendono molto difficile studiare tale funzione utilizzando mutanti naturali o transgenesi (tutti devono essere mutati!)



Colza: doppio genoma



The Plant Journal (2017) 91, 714–724

doi: 10.1111/tpj.13599

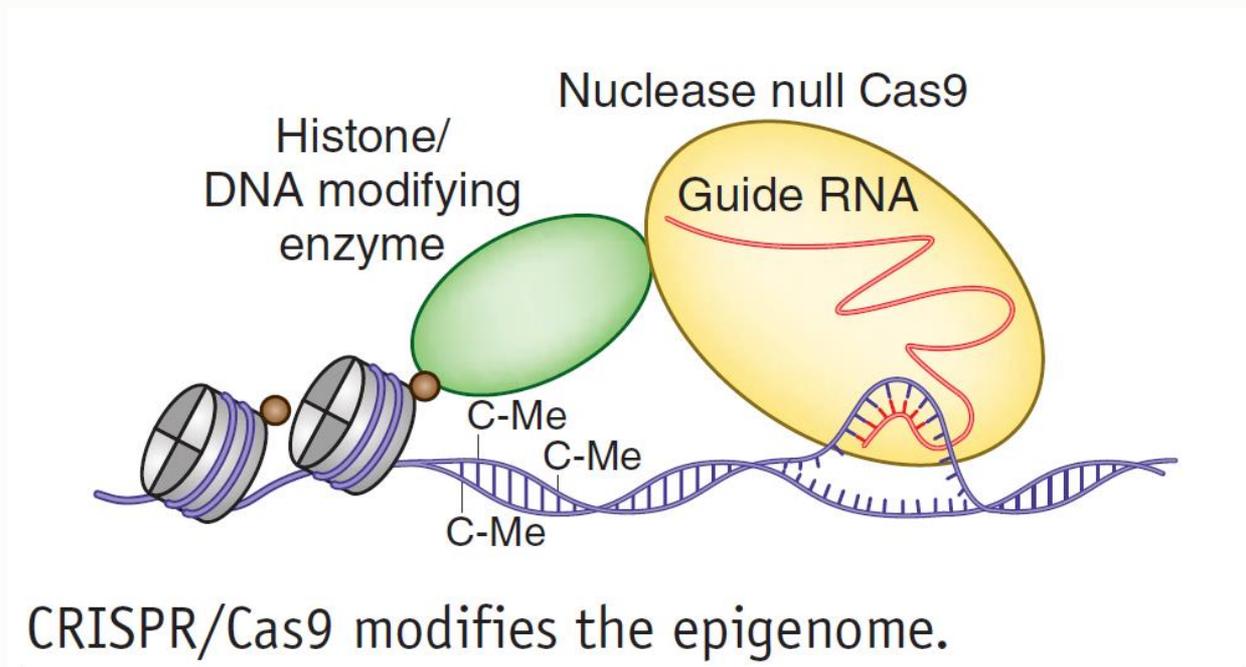
**Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat**

Frumento tenero:  
triplo genoma

## NBT sono particolarmente utili in biologia vegetale

**Epigenetica:** cambiamenti ereditabili nella funzione di geni senza cambiamenti nella sequenza nucleotidica

- ✓ Modificazioni di nucleotidi o istoni
- ✓ Un fenomeno naturale in tutti gli organismi, importante per lo sviluppo e la risposta a stress
- ✓ Sarebbe molto utile poter **modulare in modo mirato i processi epigenetici**, ma è molto difficile farlo



**Tutte le NBT producono piante che devono essere regolamentate come OGM oppure no?**

**La domanda è correlata al fatto che il termine «Organismo Geneticamente Modificato» ha un significato legale e un utilizzo retorico, ma non ha significato scientifico**

## Regolamentazione NBT extra-EU (al Febbraio 2018)

Nazione	Piante GM		NBT	
	Approccio generale	Coltivazione commerciale	Regolamentazione specifica	Piante già approvate
USA	prodotto	sì	In discussione: non-GM*	sì
Canada	prodotto	sì	no	sì
Argentina	prodotto	sì	Sì: non-GM	no
Brasile	processo	sì	Sì: non-GM*	no
Sud Africa	processo	sì	In discussione: non-GM*	no
Nuova Zelanda	processo	no	In discussione: non-GM*	no
Australia	processo	sì	In discussione: non-GM*	no

\* Se indistinguibili da prodotti che potrebbero ragionevolmente originarsi da mutazioni naturali

# Argentina

**Resolución N° 701/11 definisce gli OGM vegetali:** organismi che posseggono una combinazione di materiale genetico ottenuta mediante l'applicazione delle moderne biotecnologie.

## **Resolución No. 173/15 de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca Argentina, 18/05/2015**

CONABIA: COMISIÓN NACIONAL ASESORA DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA

- Affinché una modifica genetica sia considerata una **nuova combinazione di materiale genetico**, CONABIA analizzerà se si è prodotta **una inserzione nel genoma in forma stabile e congiunta di UNO (1) o più geni, o sequenze di DNA che sono parte di un costrutto genetico definito.**
- [...] CONABIA verificherà anche **se esiste evidenza scientifica sufficiente dell'assenza di eventi impiegati transitoriamente durante il processo di produzione della pianta.** [...]
- **Nel caso CONABIA determini che non è stata prodotta una nuova combinazione di materiale genetico** [...] la Segreteria informerà in modo inequivocabile l'interessato che il suo **prodotto NON RIENTRA nella Resolución N° 763/11** e normativa complementare.

# Brasile



## DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO



Publicado em: 22/01/2018 | Edição: 15 | Seção: 1 | Página: 2-8  
Órgão: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações / Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 16, DE 15 DE JANEIRO DE 2018

22 gennaio 2018

Art. 1º - Sono considerati esempi di Tecniche Innovative per il Miglioramento di Precisione, ma non limitate a queste, le tecnologie descritte nell'Allegato I, che **possono originare un prodotto non considerato come OGM** e suoi derivati, secondo la definizione della Legge nº 11.105, del 24 Marzo 2005. [...]

Allegato I comprende:

- ✓ tecniche di **metilazione** del DNA
- ✓ complessi proteici o proteina/RNA in grado di operare **mutagenesi sito-diretta**
- ✓ mutagenesi diretta da oligonucleotidi (contenenti **una o poche alterazioni di nucleotidi, che possono causare sostituzioni, inserzioni o delezioni nella sequenza bersaglio**)
- ✓ [...]

I prodotti classificati in questo articolo comportano **almeno una delle seguenti caratteristiche:**

III – **prodotto ottenuto con una tecnica che introduce mutazioni sito-dirette, generando un'acquisizione o perdita di funzione genica, con assenza comprovata di DNA/RNA ricombinante nel prodotto;**  
[...]

I casi considerati non si limitano alle tecnologie dell'Allegato I, poiché il rapido e continuo progresso delle diverse tecnologie può portare a **nuovi prodotti, ai quali saranno ugualmente applicate** le disposizioni di questa Risoluzione Normativa.

## Regolamentazione NBT extra-EU (al Febbraio 2018)

Nazione	Piante GM		NBT	
	Approccio generale	Coltivazione commerciale	Regolamentazione specifica	Piante già approvate
USA	prodotto	sì	In discussione: non-GM*	sì
Canada	prodotto	sì	no	sì
Argentina	prodotto	sì	Sì: non-GM	no
Brasile	processo	sì	Sì: non-GM*	no
Sud Africa	processo	sì	In discussione: non-GM*	no
Nuova Zelanda	processo	no	In discussione: non-GM*	no
Australia	processo	sì	In discussione: non-GM*	no

**\* Se indistinguibili da prodotti che potrebbero ragionevolmente originarsi da mutazioni naturali**

# Sud Africa



science  
& technology

Department:  
Science and Technology  
REPUBLIC OF SOUTH AFRICA

THE  
REGULATORY IMPLICATIONS  
OF NEW BREEDING TECHNIQUES



Marzo 2017

- Quando necessaria, la regolamentazione dovrebbe basarsi su **solidi principi scientifici**
- La reale fonte del rischio da considerare **è il prodotto, non il procedimento** utilizzato. **Non è prudente regolamentare i prodotti derivati da NBT che sono indistinguibili** da quelli che potrebbero essere ragionevolmente ottenuti con tecniche più tradizionali, poiché la biosicurezza non sarebbe differente
- La **variabilità genetica che esiste naturalmente dovrebbe essere la soglia** oltre la quale operare la regolamentazione
- A livello internazionale, **i governi dovrebbero cercare di armonizzare** i loro atteggiamenti verso le NBT ed evitare regolamentazioni non necessarie

## CONCLUSIONI

- Le NBT sono **una formidabile innovazione** per gli studi di biologia vegetale
  - ✓ Sarebbe bene che sulla base di tale innovazione si alleviasse in Italia la palpabile scarsità di entusiasmo nel finanziare ricerche, anche di base, che comportano l'utilizzo del DNA ricombinante
- Al di fuori dell'EU, le normative che sono state finora ufficialmente emanate e le decisioni prese su casi specifici concordano nel
  - ✓ **non considerare OGM** le piante ragionevolmente indistinguibili da quelle che si potrebbero originare da mutazioni naturali
  - ✓ lasciare aperta la regolamentazione a **possibili nuovi progressi scientifici**
- Le numerose Società Scientifiche e Accademie EU che si sono espresse concordano con questi orientamenti

## New Plant Breeding Techniques

Joint contribution from 5 French farmer and seed associations (Coop de France - FNSEA - GNIS - JA UFS)  
to the High Council for Biotechnology



Società Italiana di Genetica Agraria

Società Italiana di Biologia Vegetale



### Considerazioni riguardo la tecnica del genome editing

Un'eventuale decisione di regolamentare come OGM i prodotti del *genome editing* che risultano indistinguibili da eventuali mutazioni naturali sarebbe un grave errore sotto l'aspetto scientifico, normativo, logico ed economico. **Fintanto che la Direttiva 2001/18/EC rimarrà invariata, raccomandiamo che i prodotti di *genome editing*, ove non presentino combinazioni di geni diverse da quelle potenzialmente risultanti da mutagenesi casuale naturale o incrocio, siano esclusi dal suo campo d'applicazione.**

SIBV e SIGA, luglio 2016

European Academies



Science Advisory Council

EASAC Statement on New Breeding Techniques



Bundesamt für  
Verbraucherschutz und  
Lebensmittelsicherheit

Opinion on the legal classification of New Plant Breeding Techniques, in particular ODM and CRISPR-Cas9

## Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines

NATURE GENETICS VOLUME 42 | NUMBER 11 | NOVEMBER 2010

several hundred complete genes that show presence/absence variation among these resequenced lines.

## Transposon Insertions, Structural Variations, and SNPs Contribute to the Evolution of the Melon Genome

*Molecular Biology and Evolution*, 32, October 2015

A total of 902 genes are affected by a SV in at least one variety. Of these, 745 fell in deletions, 142 in tandem duplications, and 15 in inverted regions

## Catastrophic Unbalanced Genome Rearrangements Cause Somatic Loss of Berry Color in Grapevine<sup>1</sup>

*Plant Physiology*<sup>®</sup>, October 2017, Vol. 175, pp. 786–801,

we compared the Tempranillo Blanco (TB) white berry somatic variant with its black berry ancestor, Tempranillo Tinto.

Whole-genome sequencing uncovered a catastrophic genome rearrangement in TB that caused the hemizygous deletion of 313 genes

# NEW **HERBICIDE-TOLERANT** OPTIONS COMING SOON FOR CANOLA GROWERS



ABOVE AND OPPOSITE PAGE: Cibus researchers have produced SU Canola, a non-genetically modified seed that is tolerant to solfonylurea herbicide. It has been commercially available in the U.S. for more than two years and is now available in Canada. | CIBUS PHOTO

*Breeders get the all-clear to introduce non-GM crop to Canada*

BY SEAN PRATT | SASKATOON NEWSROOM

**C**ANADIAN canola growers will have a new herbicide tolerant system to choose from in 2018.

"We've got everything in place to be able to introduce our hybrid into Canada," said Jim Radtke, senior vice president of product development with Cibus.

**SU Canola** is a non-genetically modified crop that is tolerant to solfonylurea herbicide.

The crop was developed using the company's patented Rapid Trait Development System (RTDS), which allows breeders to "edit" native plant genes to create desired traits rather than introducing foreign DNA.

It has been commercially available in the United States for two years, with more than 50,000 acres planted in 2017.

"We're starting to get some yield results in and it's meeting our expectations," he said.

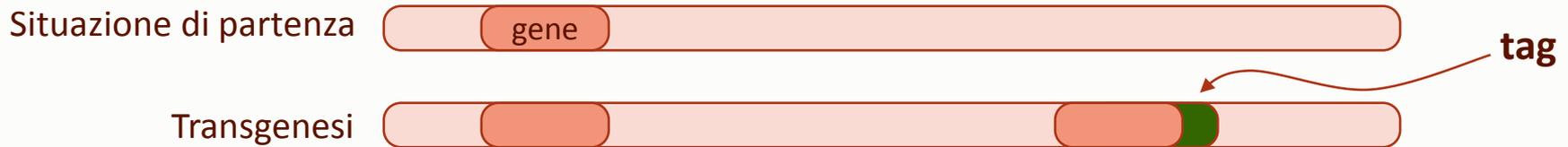
It has taken longer to introduce the product north of the U.S. border due to Canada's variety registration system.

Radtke expects 20,000 to 60,000 acres

## NBT sono particolarmente utili in biologia vegetale

- Proteine per le quali è molto difficile produrre anticorpi specifici
  - ✓ famiglie multigeniche, genomi duplicati, scarsa antigenicità
  - ✓ La mancanza di anticorpi compromette gli studi

Da decenni sono disponibili diversi **tags** («etichette») fluorescenti o per i quali esistono in commercio anticorpi specifici

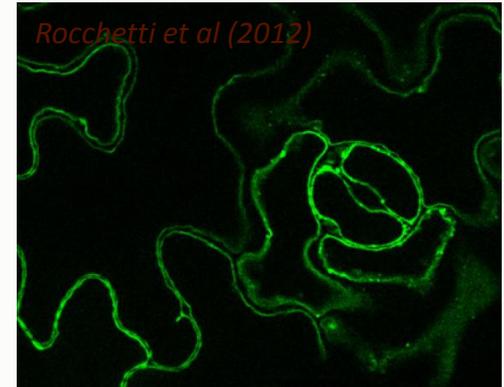


Finora è stata utilizzata la transgenesi

- ✓ Utilissima (si sono riscritti i testi di biologia vegetale...)

Ma con NBT i tag possono essere inseriti nella proteina originale

- ✓ non provoco ridondanza genica
- ✓ mantengo esattamente la stessa regolazione dell'espressione



## United States of America

**USDA-APHIS** - USDA's Animal and Plant Health Inspection Service

- protezione dell'agricoltura da organismi nocivi e malattie
- Regolamenta le piante; si può richiedere uno status di “non regolamentato”

**EPA** - U.S. Environmental Protection Agency

- Registra i pesticidi e ne regola la vendita e distribuzione, per proteggere salute e ambiente

**FDA** - Department of Health and Human Services' Food and Drug Administration

- Assicura la sicurezza alimentare, indipendentemente dal processo con il quale un alimento è stato prodotto

United States  
Department of  
Agriculture

Animal and  
Plant Health  
Inspection  
Service

Biotechnology  
Regulatory  
Services

4700 River Road

Dr. Yinong Yang  
College of Agricultural Sciences  
The Pennsylvania State University  
211 Buckhout Laboratory  
University Park, PA 16802

**April 13, 2016**

Re: Request for confirmation that transgene-free, CRISPR-edited mushroom is not a regulated article

In your October 30, 2015 letter, you describe your CRISPR/Cas9-edited mushroom as having small deletions (1-14 bp) in a specific polyphenol oxidase gene but containing no foreign DNA integrated into the mushroom genome. Your letter states that plant pest

Based on the information cited in your letter, APHIS has concluded that your CRISPR/Cas9-edited white button mushrooms as described in your letter do not contain any introduced genetic material. APHIS has no reason to believe that CRISPR/Cas9-edited white button mushrooms are plant pests. Therefore, consistent with previous responses to similar letters of inquiry, APHIS does not consider CRISPR/Cas9-edited white button mushrooms as described in your October 30, 2015 letter to be regulated pursuant to 7 CFR part 340. Additionally, white button mushroom is not listed as a Federal noxious weed pursuant to 7 CFR part 360, and APHIS has no reason to believe that the anti-browning phenotype of your white button mushroom would increase the weediness of white button mushroom.

Please be advised that your white button mushroom variety described in your letter may still be subject to other regulatory authorities such as FDA or EPA.

United States  
Department of  
Agriculture

Animal and  
Plant Health  
Inspection  
Service

Biotechnology  
Regulatory  
Services

Dr. Daria H. Schmidt  
Director, Registration and Regulatory Affairs – North America  
DuPont Pioneer  
7100 NW 62<sup>nd</sup> Avenue  
Johnston, IA 50131-1000

**April 18, 2016**

Re: Confirmation of Regulatory Status of Waxy Corn Developed by CRISPR-Cas Technology

In your December 14, 2015 letter, you describe your CRISPR-Cas waxy corn as a null segregant line that contains a targeted deletion of the waxy gene (*Wx1*). The genetic sequences that were used to introduce the deletion did not contain any plant pest sequences nor were the sequences introduced into the parent plant with a plant pest vector. Furthermore, any unintended insertion of genetic material used to introduce the deletion of the *Wx1* was segregated out through conventional breeding (null segregant).

plant pests were used in the development of CRISPR-Cas waxy corn. APHIS has no reason to believe that this CRISPR-Cas waxy corn is a plant pest. Therefore, consistent with previous responses to similar letters of inquiry, APHIS does not consider the CRISPR-Cas waxy corn as described in your December 14, 2015 letter to be regulated pursuant to 7 CFR part 340. Additionally, corn is not listed as a Federal noxious weed pursuant to 7 CFR part 360, and APHIS has no reason to believe that the genetic alteration of your CRISPR-Cas waxy corn would increase the weediness of corn.

Please be advised that your CRISPR-Cas waxy corn may still be subject to other regulatory authorities such as FDA or EPA.

## January 2017 UPDATE

- **APHIS is proposing to revise its regulations** This would be the first comprehensive revision of the regulations since they were established in 1987.
- **APHIS would not consider an organism to be a GE organism if any of the following are the case:**
  - The genetic modification to the organism is solely **a deletion of any size or a single base pair substitution which could otherwise be obtained through the use of chemical or radiation-based mutagenesis**
  - The genetic modification to the organism is solely **introducing only naturally occurring nucleic acid sequences from a sexually compatible relative that could otherwise cross with the recipient organism and produce viable progeny** through traditional breeding (including, but not limited to, marker-assisted breeding, as well as tissue culture and protoplast, cell, or embryo fusion).
  - The organism is a “null segregant”.



## UPDATE

### Modernizing the Regulatory System for Biotechnology Products: Final Version of the 2017 Update to the Coordinated Framework for the Regulation of Biotechnology

**It is the characteristics of the biotechnology product, the environment into which it will be introduced, and the application of the product that determine its risk (or lack thereof).**

[...] Future scientific developments will lead to further refinements [...] **as science progresses, regulatory regimens can be modified** to reflect a more complete understanding of the potential risks involved.

# Canada

I prodotti agricoli sono regolamentati da:

- Canadian Food Inspection Agency
- Health Canada and Environment Canada

Le Direttive si basano su questi principi generali:

- To **build on current legislation where possible**, rather than creating new legislation
- To **regulate products based on the expression of a novel trait, rather than the method that was used** in its development.
- To conduct **evaluations for each product on the basis of its unique characteristics** and to establish appropriate safety levels based on the **best scientific information**. Safety is defined, not as the complete absence of risk, but rather as the level of "**acceptable risk**". If the risk is not acceptable, the application will be refused.

# Sud Africa



science  
& technology

Department:  
Science and Technology  
REPUBLIC OF SOUTH AFRICA

## THE REGULATORY IMPLICATIONS OF NEW BREEDING TECHNIQUES



March 2017

- (i) Regulation, where appropriate, should be **based on sound scientific principles and be proportionate** to the potential risks that are being managed.
- (ii) The actual source of the **risk that should be managed is the NBT-derived product, not the process through which it was developed.** [...]
- (iii) Induced changes to genomes need to be **evaluated in light of the inherent natural variability of genomes** and their associated impacts on the biosafety profiles of the related organisms. Moreover, **it is not prudent to regulate NBT-derived products that are indistinguishable from products that could conceivably also be produced via more traditional methods** as these products will not differ in their biosafety profiles.
- (iv) The current definition of a GMO in the GMO Act can comfortably accommodate the above considerations regarding NBTs and clearly establishes **genetic variation – beyond that which may occur naturally – as the threshold for regulation.**[...]
- (vii) **Internationally, governments should seek to harmonise their approach towards NBTs** and avoid the unnecessary regulation of products developed through NBTs and other genetic engineering techniques.



## Food Standards Australia New Zealand

- ✓ Determina gli standard alimentari per l'Australia e la Nuova Zelanda

Participants concluded: New Plant Breeding Techniques - 2013 workshop report (**June 2014**)  
[...]

- where targeted mutagenic techniques are used to introduce **small, site-specific mutations involving only one or a few nucleotides**, and any transgenes have been segregated away from the final food producing lines, derived food products **would be similar to food produced using traditional mutagenic techniques and should not be regarded as GM food**
- when targeted mutagenic techniques are **used to insert new genes, they are equivalent to transgenesis** and, as such, any food products should be regarded as GM

**December 2017** Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) is reviewing how the Food Standards Code applies to food derived using new breeding techniques. The review is expected to be completed by mid-2018, at which time FSANZ will consider whether to prepare a proposal to amend the Code.



**Beehive.govt.nz**

The official website of the  
New Zealand Government

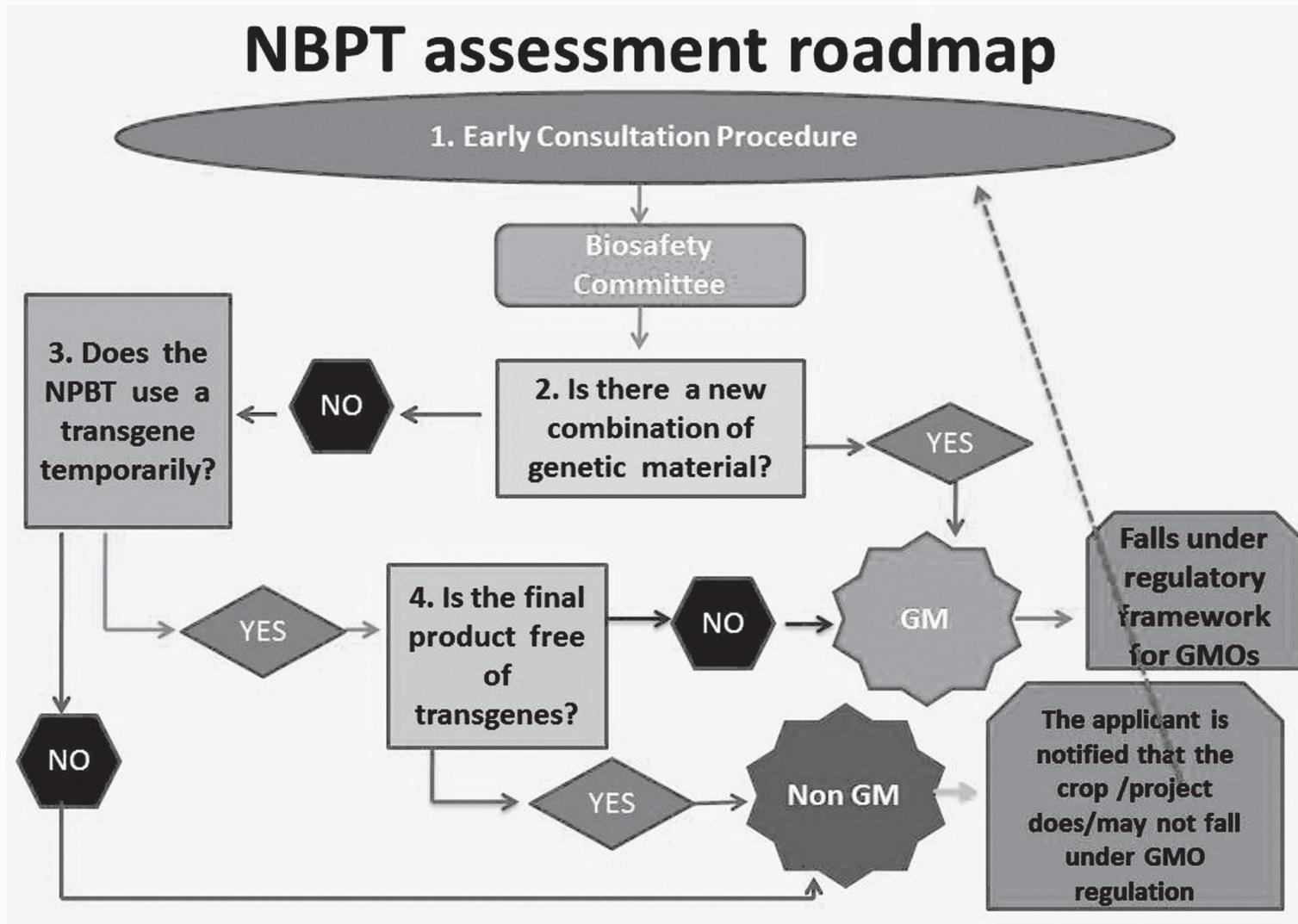
**6 April 2016** The changes agreed by Cabinet yesterday **clarify that all organisms developed through conventional and longstanding chemical and radiation treatments do not require HSNO Act approval as GMOs.**

The definition of what is and is not a GMO is difficult because humans have been changing the genetic content of organisms for over a century. These changes are not controversial and simply ensure the workability of the existing regulatory system

**There is some frustration by those in the science community that similarly low-risk biotechnologies developed since 1998 have not been included in the new 'not GM' regulations.**

We will continue to monitor global rules around the regulation of GMOs and adapt our system over time in line with international developments

# Resolución No. 173/15 de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca Argentina



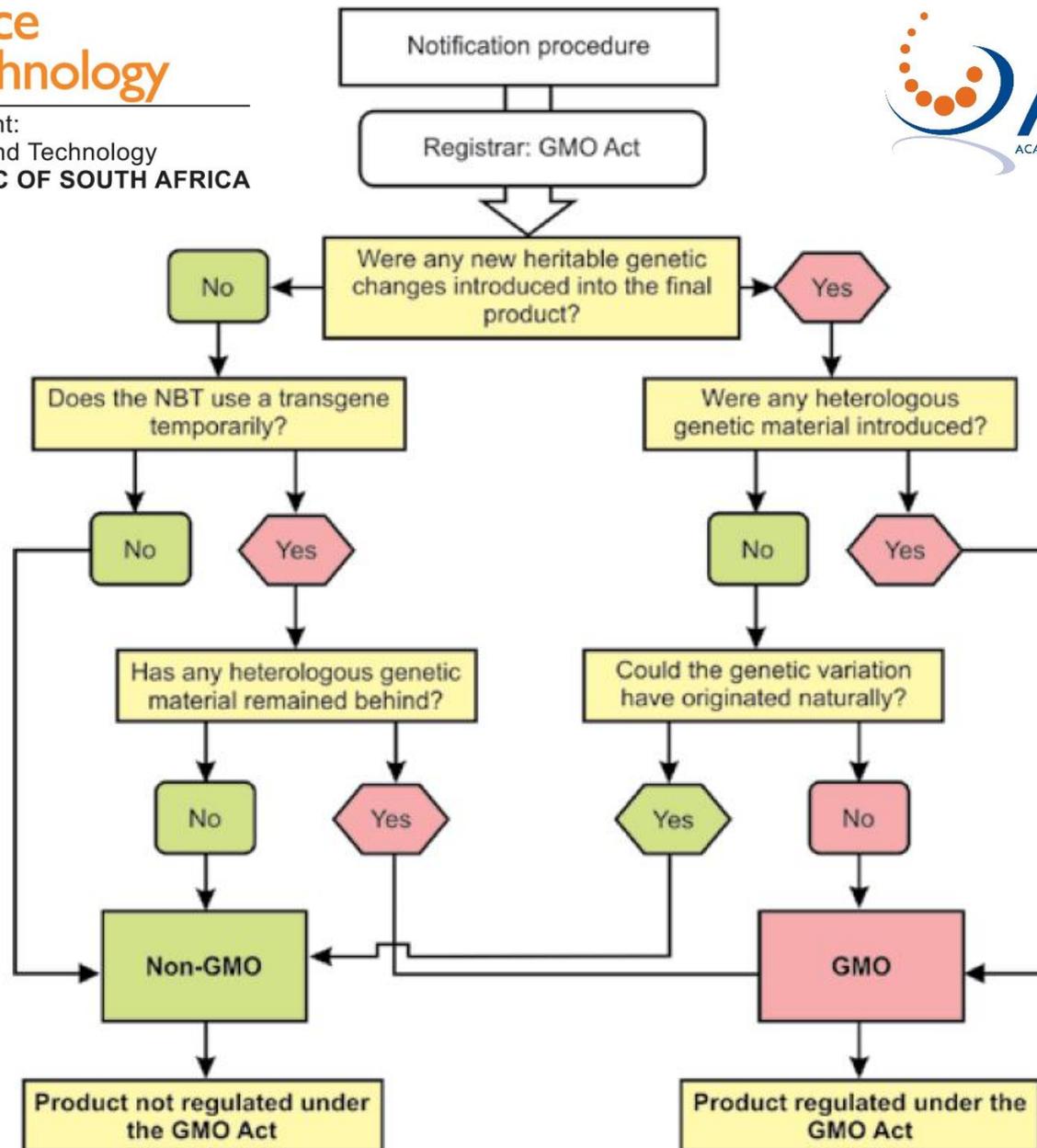
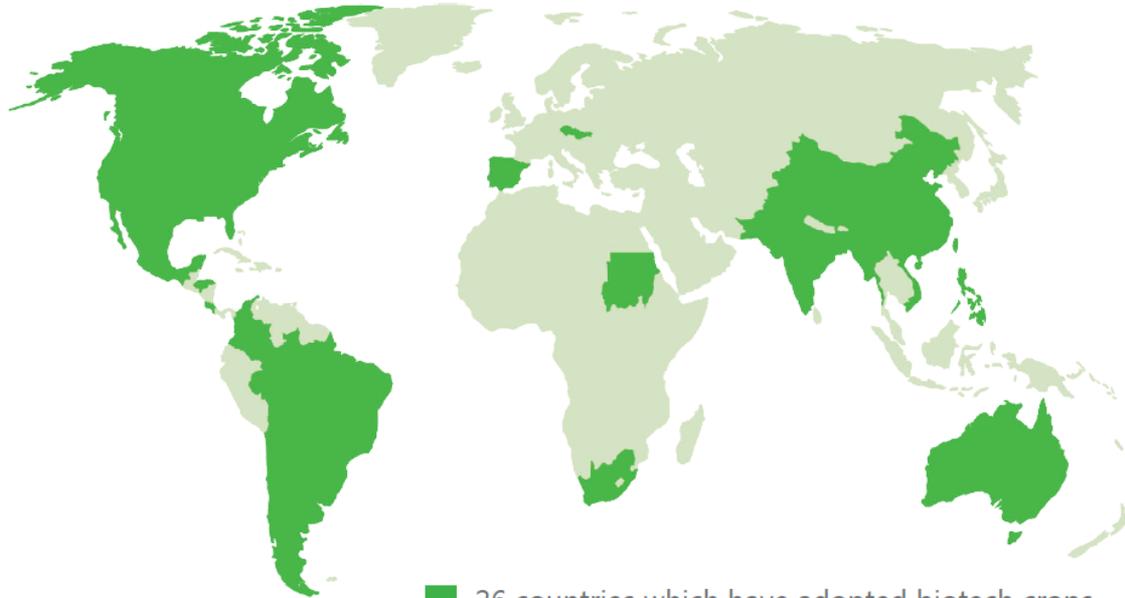


Figure 7.2 Proposed NBT decision tree for determining whether a specific NBT, or any other genetic engineering organism, should be subjected to regulation under the GMO Act or not

## Le Americhe sono le principali coltivatrici di piante GM



■ 26 countries which have adopted biotech crops

In 2016, global area of biotech crops was 185.1 million hectares, representing an increase of 3% from 2015, equivalent to 5.4 million hectares.

Source: ISAAA, 2016.

**3%**  
Increase  
from 2015

### 50,000 hectares, or more

1. USA	72.9 million
2. <i>Brazil*</i>	49.1 million
3. <i>Argentina*</i>	23.8 million
4. Canada	11.6 million
5. <i>India*</i>	10.8 million
6. <i>Paraguay*</i>	3.6 million
7. <i>Pakistan*</i>	2.9 million
8. <i>China*</i>	2.8 million
9. <i>South Africa*</i>	2.7 million
10. <i>Uruguay*</i>	1.3 million
11. <i>Bolivia*</i>	1.2 million
12. Australia	0.9 million
13. <i>Philippines*</i>	0.8 million
14. <i>Myanmar*</i>	0.3 million
15. Spain	0.1 million
16. <i>Sudan*</i>	0.1 million
17. <i>Mexico*</i>	0.1 million
18. <i>Colombia*</i>	0.1 million

### Less than 50,000 hectares

<i>Vietnam*</i>	<i>Bangladesh*</i>
<i>Honduras*</i>	<i>Costa Rica*</i>
<i>Chile*</i>	Slovakia
Portugal	Czech Republic

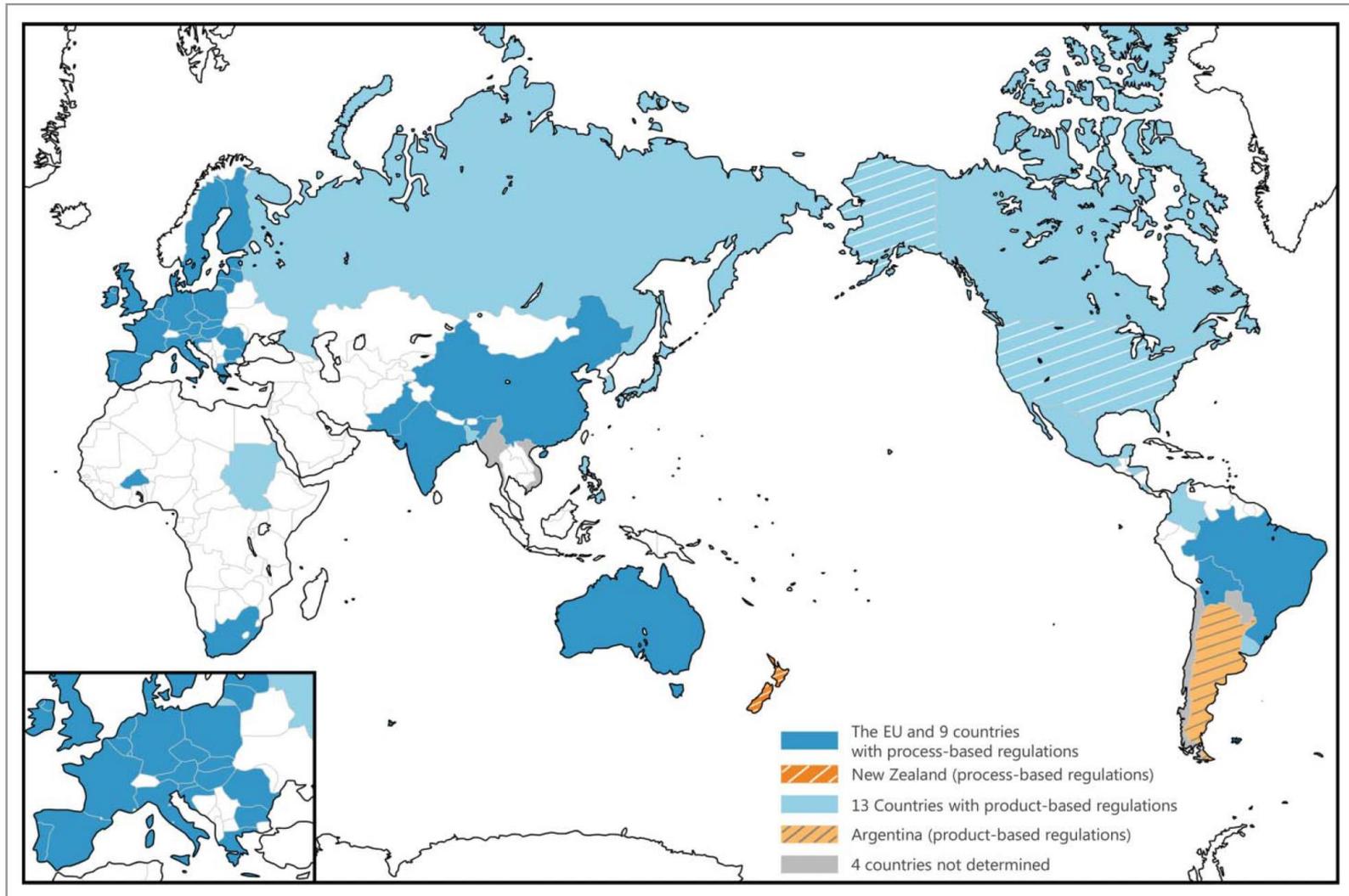
\* *Developing countries*

AS OF **2015**, GMOS ARE **GROWN, IMPORTED, AND/OR USED IN FIELD TRIALS** IN MORE THAN **70 COUNTRIES**.

 Growing Biotech and Granting Import    Granting Import Approvals    Approving Research Field Trials



FIGURE 1. The international regulatory landscape regarding genetically modified organisms (GMOs). The 29 countries are colored according to the survey on the regulatory concepts that they employ regarding GMOs. The blue countries have adopted process-based GMO regulations. The light blue countries have employed product-based GMO regulations. The USA (product-based GMO regulations), Argentina (product-based GMO regulations) and New Zealand (process-based GMO regulations) are highlighted with stripes because they have made the regulatory responded to genome-edited crops.



# Cina

China has developed its own biotech-derived food safety risk-assessment approach that is based on substantially equivalent, risk-based methods and conducted on a case-by-case basis.

According to the “Regulation on Administration of Agricultural Genetically Modified Organisms Safety” (Regulation) issued by the State Council in 2001, Agricultural GMOs refer to animals, plants, microorganisms and their products whose genetic structures have been modified by genetic engineering technology for use in agricultural production or processing. From this point of view, genome editing derived products will fall in the scope of this Regulation.

# Argentina

## Resolución No. 173/15 de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca Argentina, 18/05/2015

**Resolución N° 701/11 define OVGM** como aquel organismo vegetal que posea una combinación de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna. [...]

Para que un cambio genético sea considerado una **nueva combinación de material genético**, CONABIA analizará si se ha producido **una inserción en el genoma en forma estable y conjunta de UNO (1) o más genes o secuencias de ADN que forman parte de una construcción genética definida**.

[...] Asimismo, de corresponder, la CONABIA corroborará **si existe evidencia científica suficiente sobre la ausencia de evento/s empleados transitoriamente durante el proceso de obtención del cultivo**. [...]

**En caso de que la CONABIA dictamine que no se ha producido una nueva combinación de material genético** y, de corresponder, que no subsisten eventos no autorizados en el cultivo, la Secretaría informará fehacientemente al interesado que **su producto no se halla alcanzado por la citada Resolución N° 763/11 y su normativa complementaria**.

CONABIA: COMISIÓN NACIONAL ASESORA DE BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA