

**Subgroup on New Genomic Techniques  
(NGTs)**

**2nd meeting**

**14 May 2025**

**Item 5**

*DNA-free genome editing confers disease  
resistance in grapevine*

University of Verona (Italy)

# DNA-free genome editing confers disease resistance in grapevine



Sara Zenoni



UNIVERSITÀ  
di VERONA

Dipartimento  
di BIOTECNOLOGIE

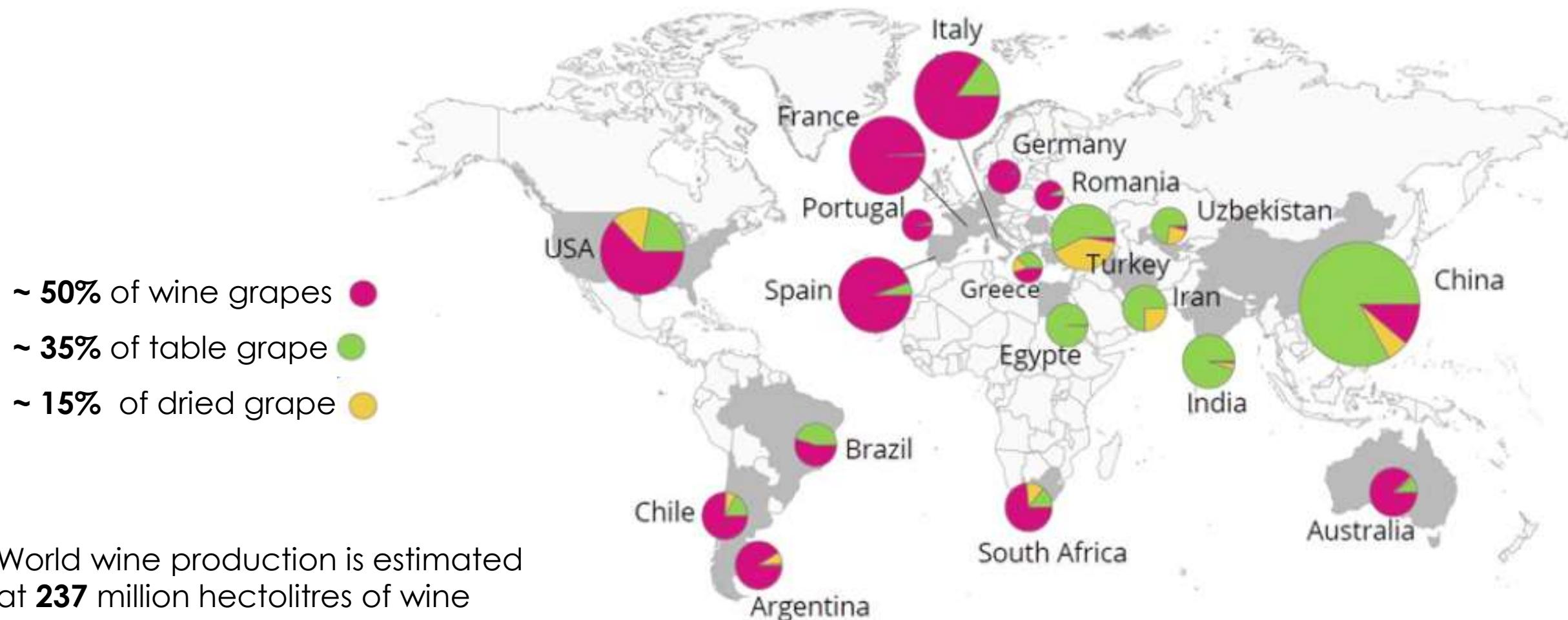


Subgroup on New Genomic Techniques (NGTs)  
2<sup>nd</sup> meeting

# Grapevine cultivation

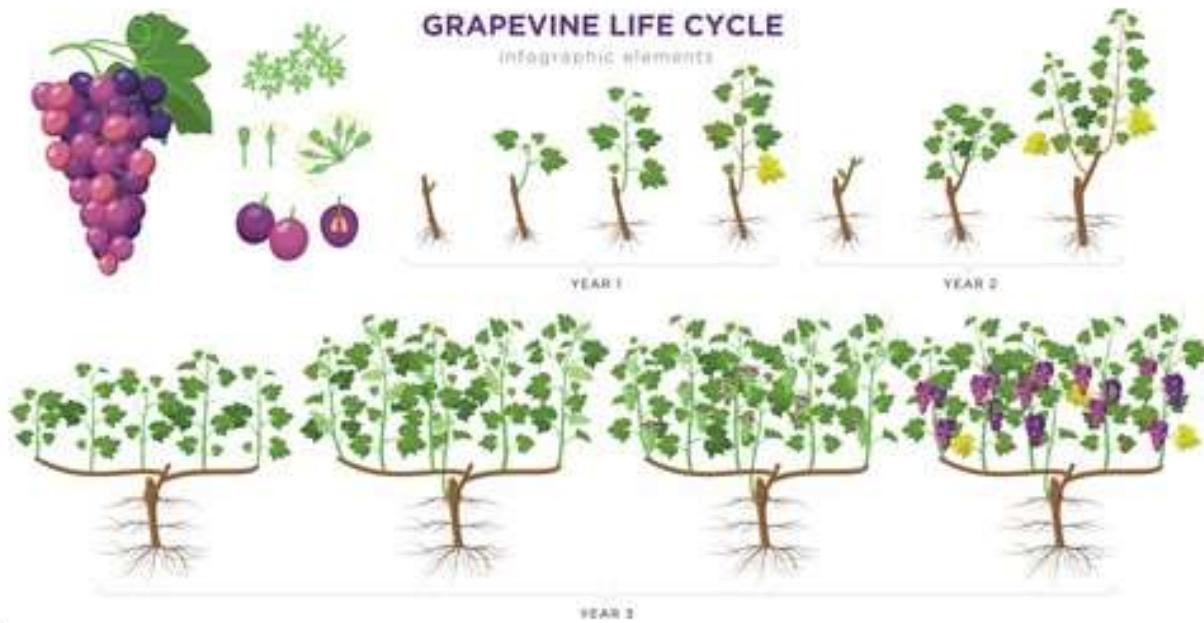
The world vineyard surface area is estimated to be **7.2** million hectares

Global grape production **80.1** million tonnes (mt)

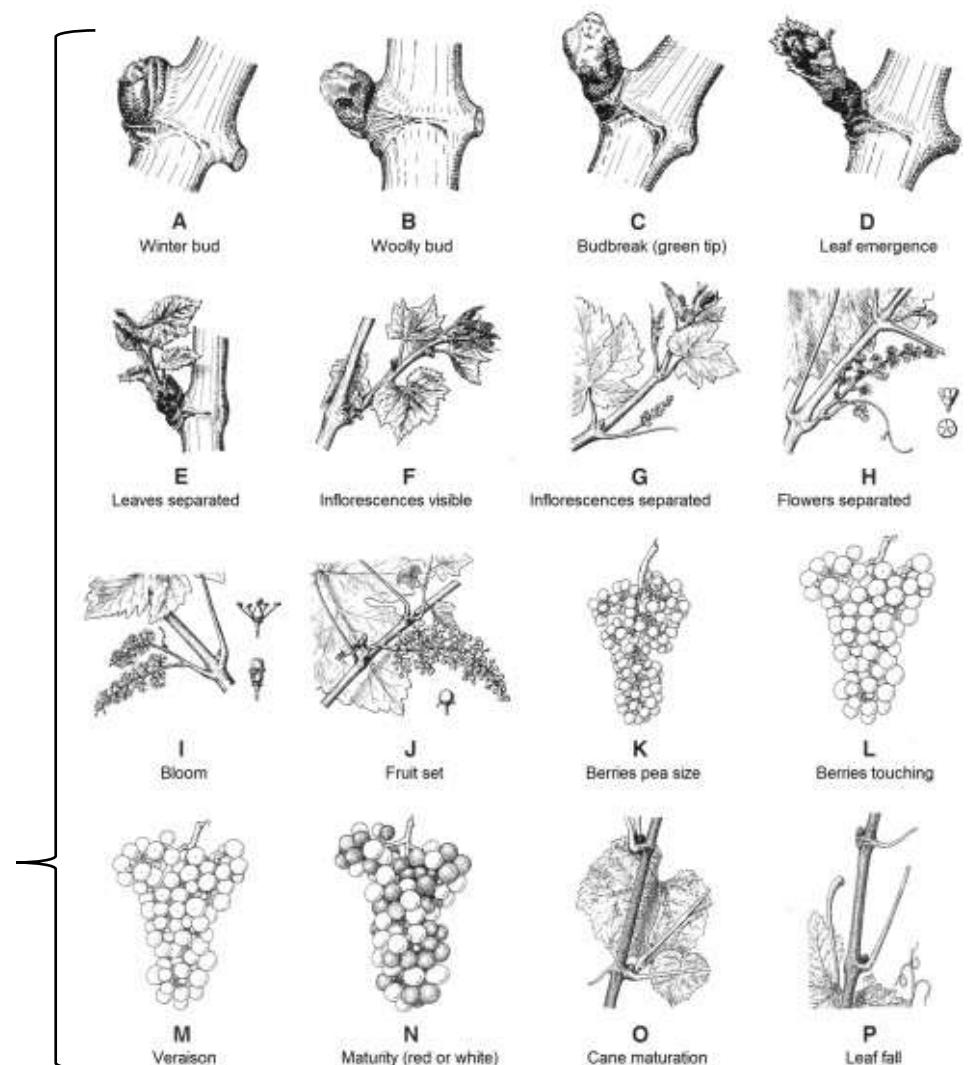


# Grapevine growth cycle

The **juvenile phase** of grapevine life, from seed germination until the reproductive maturity typically **lasts 2-5 years**

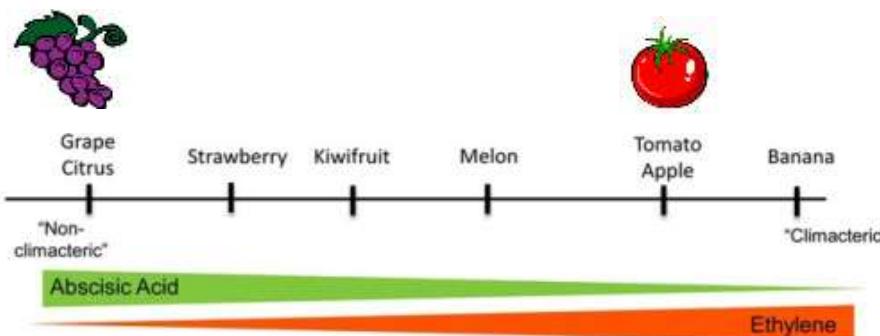


The **annual growth** of grapevine includes several **phenological phases**

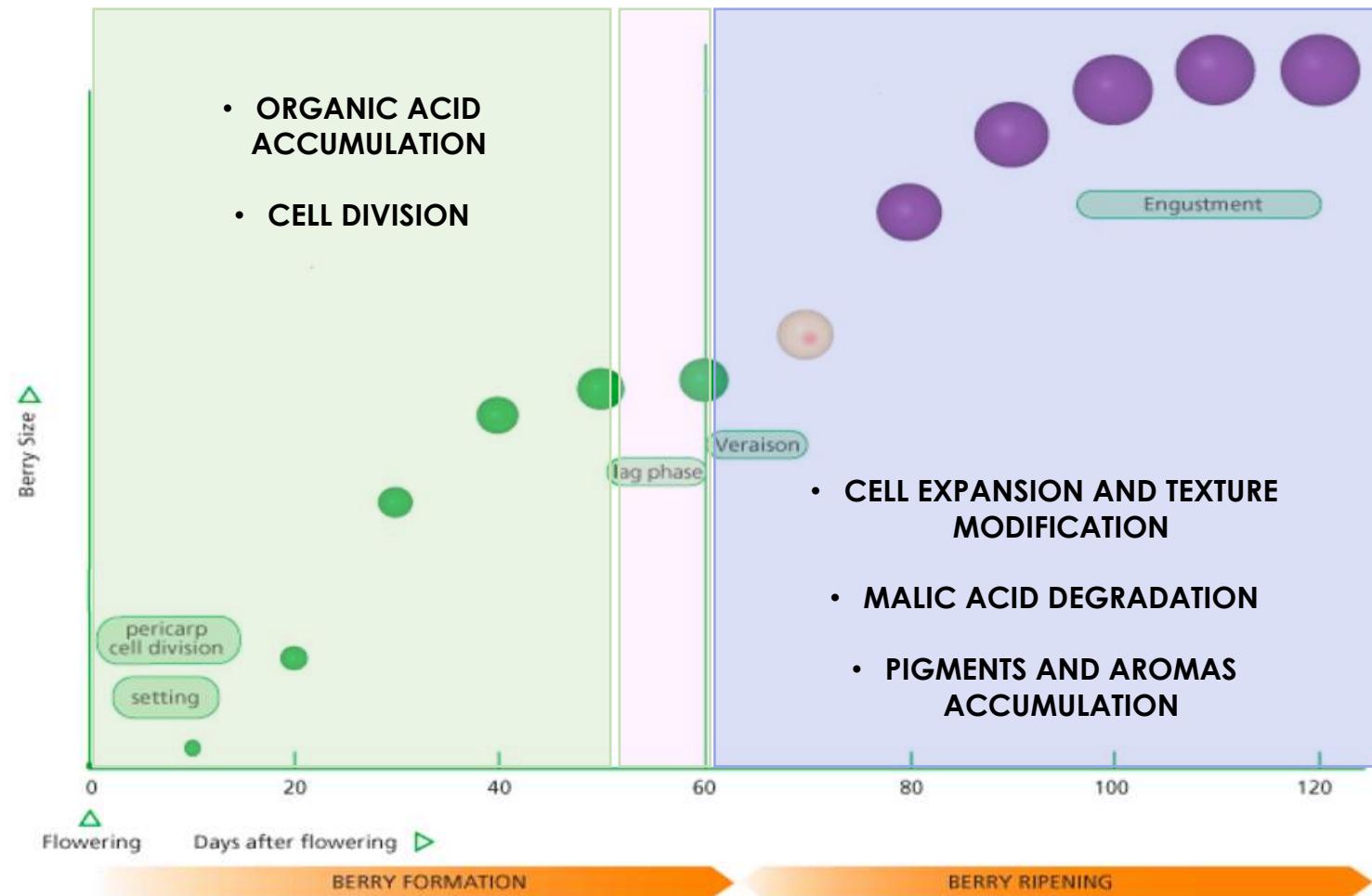


# Grapevine berry development

- non climacteric fruit



- very long ripening, almost 3 months and strongly affected by environment

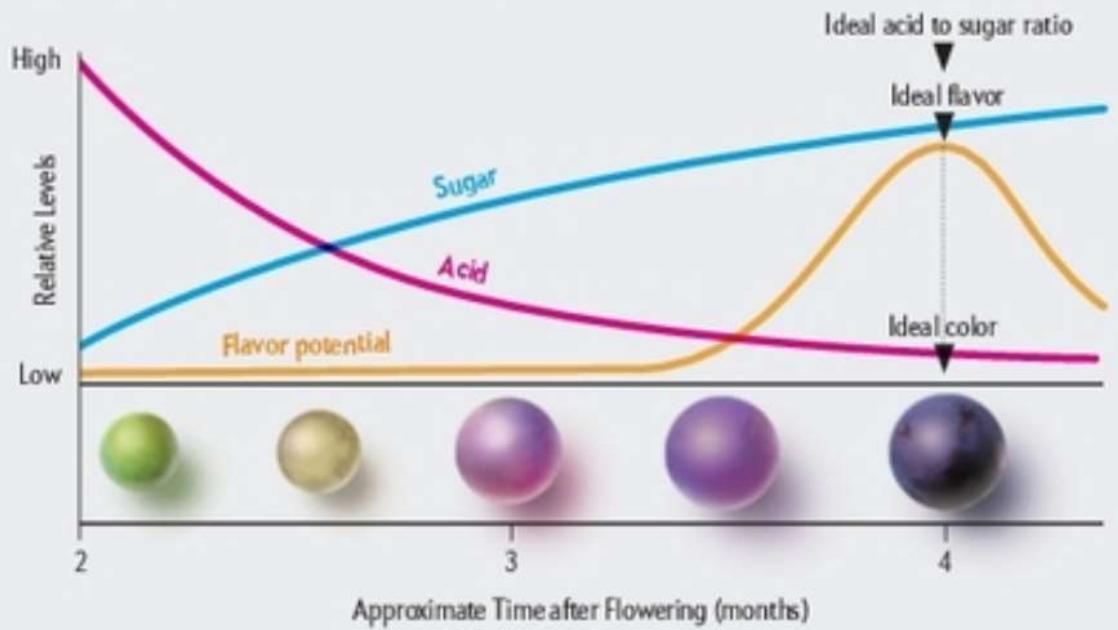


# Berry ripening is highly affected by climate change

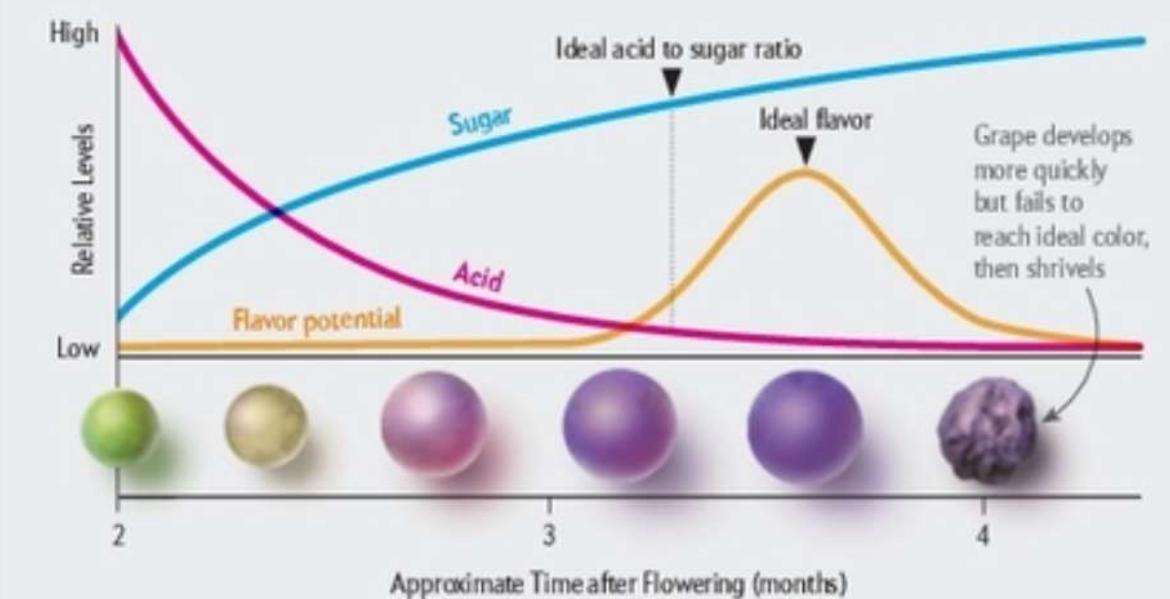
Climate variability is impacting grape ripening by accelerating the process and leading to earlier harvests. Warmer conditions are decoupling the ideal acid to sugar ratio and the flavour right accumulation



Optimal Ripening of a Grape

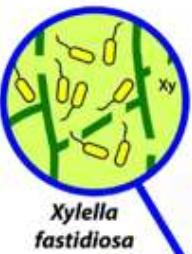


Same Grape under Warmer Conditions



# The vineyard system faces strong pest and disease pressures

Pierce's disease



Downy mildew



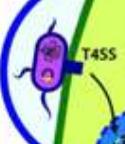
Powdery mildew



Collar tumor



*Agrobacterium vitis*



Gray mold



Armijo et al., 2016

Grapes receive about **40%** of the fungicides used in the EU, despite covering only ~3% of the agricultural area

**Reducing pesticide** use is a key issue to improve **viticulture sustainability**

# What can we do to adapt grapes?

- improvement of viticulture practices (pruning times, training system, water usage...)
- geographical diversification, new winegrowing regions could emerge in previously unsuitable areas
- **development of new cultivars** with a high degree of resistance against pathogens and a higher resilience to abiotic stresses and later budbreak and ripening periods

## **classical breeding**

- time consuming
- loss of the varietal genetic background due to the high level of heterozygosity

## **new genomics techniques**

- recalcitrance in *in vitro* propagation
- lack of information on gene function

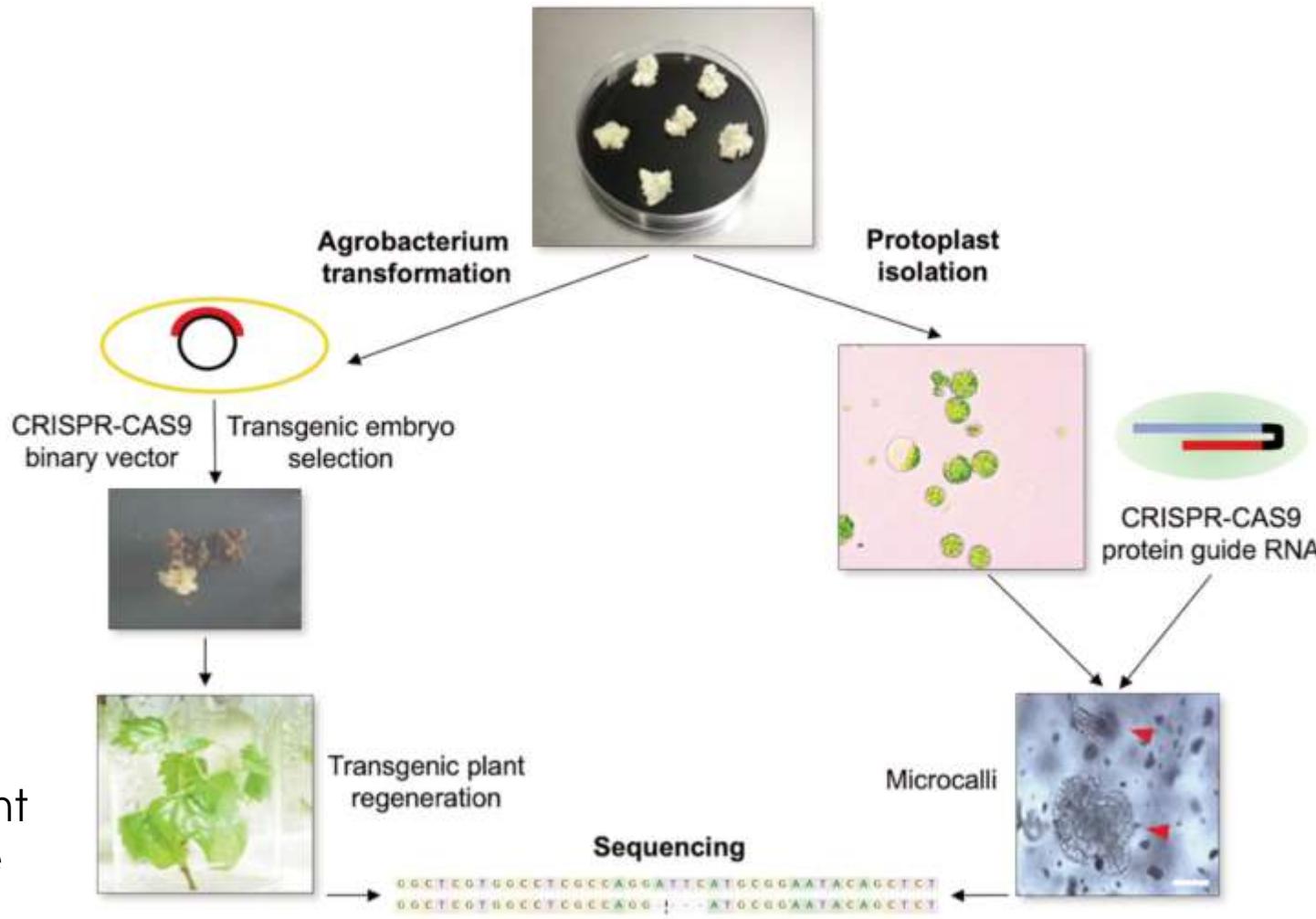
# Genome editing in grapevine: two principal approaches

## Advantages:

-stable transformation in grapevine has been setup and the use of marker genes helps the selection of transformants

## Limits:

-random insertion of the transgene  
-creation of a GMO plant  
-self-cross to remove the transgene changes the genetic background



## Advantages:

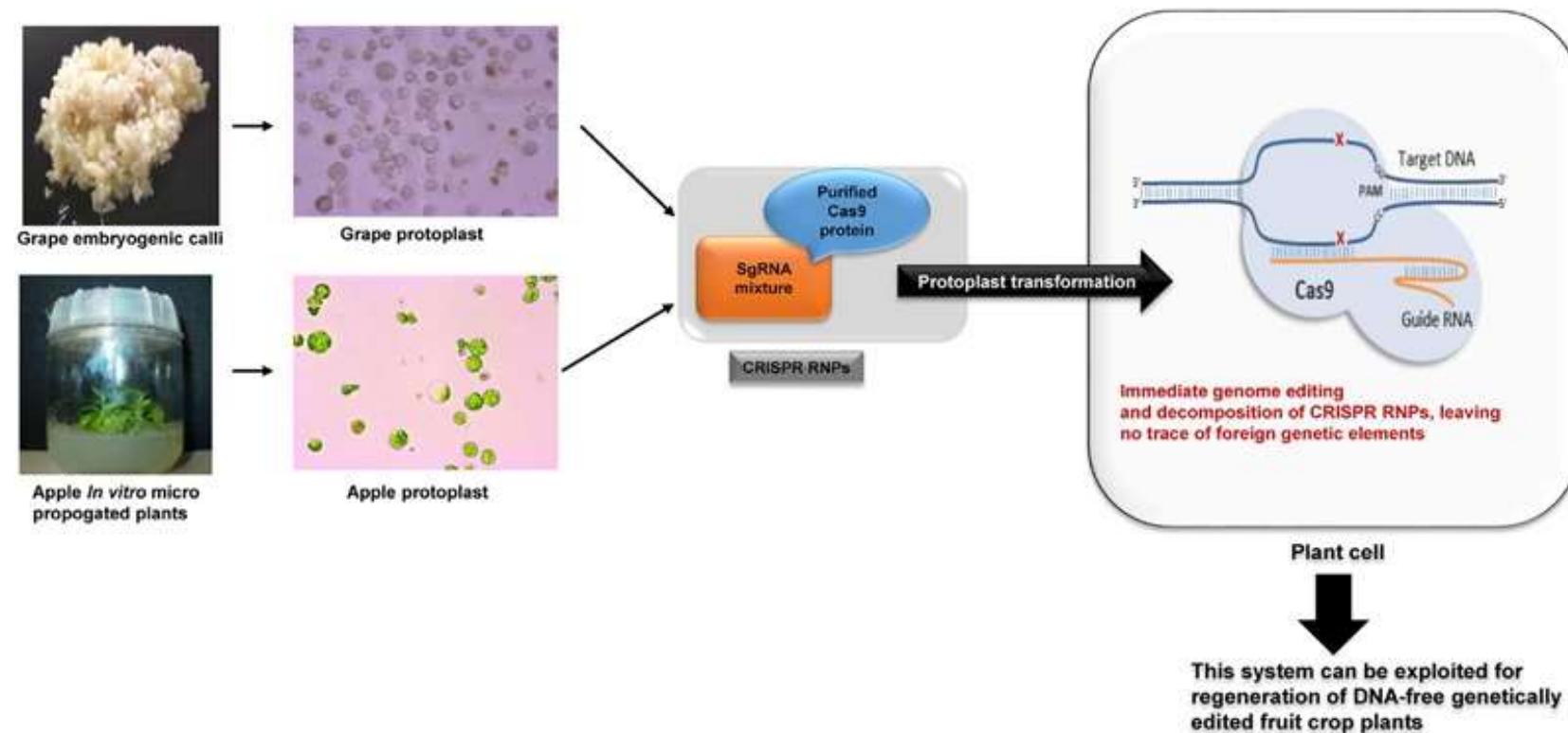
-no transgenes  
-absence of chimeras

## Limits:

-recalcitrance of protoplast regeneration  
-no marker gene

# Editing induction in grapevine protoplasts

In **2016** it was demonstrated that the RNP complexes were able to enter in the protoplasts and induced the mutation. However, it was not possible to regenerate whole plants from these genome-edited protoplasts



## ORIGINAL RESEARCH article

Front. Plant Sci., 20 December 2016  
Sec. Technical Advances in Plant Science  
Volume 7 - 2016 |  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>

This article is part of the Research Topic  
Genome editing for crop improvements  
[View all 19 Articles >](#)

## DNA-Free Genetically Edited Grapevine and Apple Protoplast Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins

**nature**  
**protocols**

**PROTOCOL**

<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.074>

## CRISPR-Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine

Yuriko Osakabe<sup>1,11\*</sup>, Zhenchang Liang<sup>2,11</sup>, Chong Ren<sup>2</sup>, Chikako Nishitani<sup>3</sup>, Keishi Osakabe<sup>1</sup>, Masato Wada<sup>4</sup>, Sadao Komori<sup>5</sup>, Mickael Malnoy<sup>6</sup>, Riccardo Velasco<sup>6,10</sup>, Michele Poli<sup>7</sup>, Min-Hee Jung<sup>8</sup>, Ok-Jae Koo<sup>7,8</sup>, Roberto Viola<sup>9</sup>, Chidananda Nagamangala Kanchiswamy<sup>6,7,11\*</sup>

# Grapevine protoplast regeneration

2019

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)  
<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01619-1>

ORIGINAL ARTICLE



1995

Plant Cell Reports (1995) 15:238–244

**Plant regeneration of grapevine (*Vitis* sp.) protoplasts isolated from embryogenic tissue**

Götz Reustle<sup>1</sup>, Margit Harst<sup>2</sup>, and Gerhardt Alieweldt<sup>2</sup>

1997

Plant Science 123 (1997) 151–157

Highly efficient system of plant regeneration from protoplasts of grapevine (*Vitis vinifera* L.) through somatic embryogenesis by using embryogenic callus culture and activated charcoal

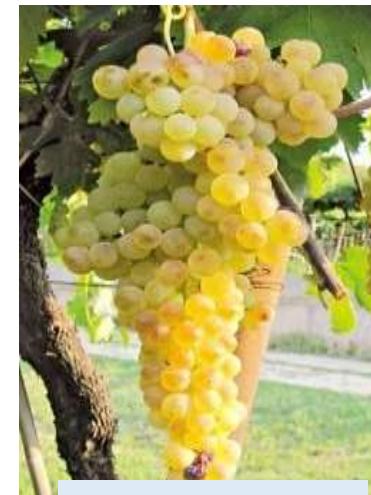
Yan-Ming Zhu<sup>a</sup>, Yoichiro Hoshino<sup>a</sup>, Masaru Nakano<sup>b</sup>, Eikichi Takahashi<sup>c</sup>,  
Masahiro Miura<sup>a,\*</sup>

## Regeneration of plants from embryogenic callus-derived protoplasts of Garganega and Sangiovese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars

Edoardo Bertini<sup>1</sup> · Giovanni Battista Tornielli<sup>1</sup>  · Mario Pezzotti<sup>1</sup>  · Sara Zenoni<sup>1</sup> 

Received: 17 January 2019 / Accepted: 2 May 2019

© Springer Nature B.V. 2019

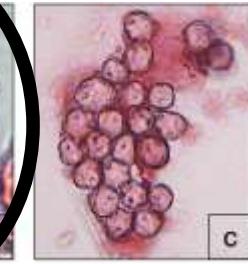
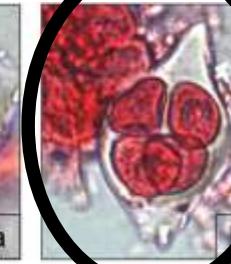


Garganega

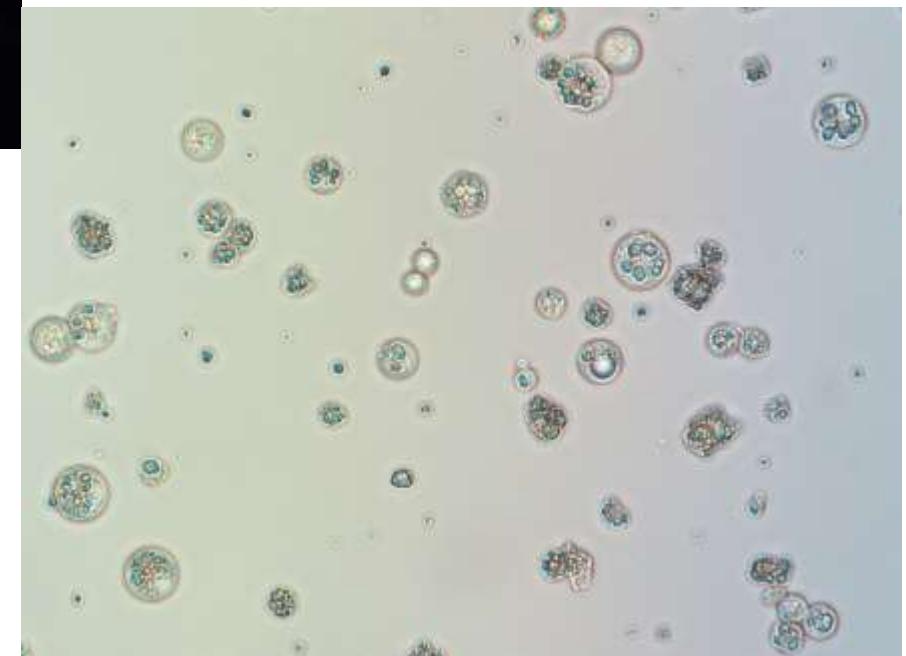


Sangiovese

# Embriogenic callus induction



# Embriogenic callus induction



Embriogenic callus

# Protoplasts regeneration through somatic embryogenesis

First cell division



A

After 10 days

Further cell divisions

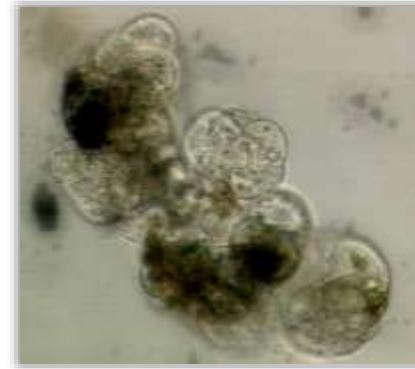


B

C

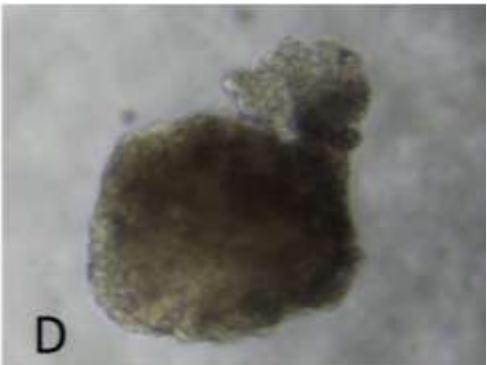
After 30 days

Formation of micro-colonies



After ~40 days

Globular stage



D

After ~60 days

Heart stage



E

After ~70 days

Torpedo stage



F

After ~90 days

Mature embryo



G

After ~100 days

# Protoplasts regeneration through somatic embryogenesis

Embryo



4 weeks in the dark



4-5 weeks  
on the light



Germinated somatic embryo

Shoot and root development

# Protoplasts regeneration through somatic embryogenesis

Final stages of plant regeneration



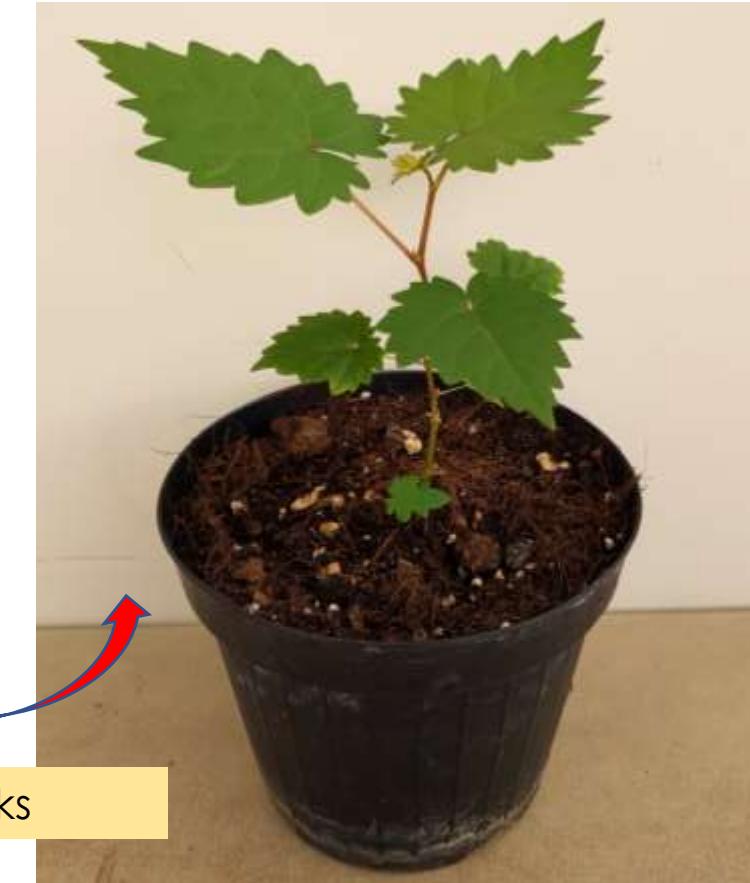
4 weeks

*in-vitro* regenerated plant



8-10 weeks

Regenerated plant



# Grapevine protoplasts regeneration



How much time?



6 Months

4 Months

1 Month

3/4 Months

Anthers  
cultivation

Embriogenic calli  
and protoplasts  
isolation

Embryo

Germination

Regenerated  
plant

After about **15 months** from anthers cultivation, we obtained a whole plant

# Grapevine protoplasts regeneration

protoplast



cotyledonary embryo



0.01–0.15 %

germinated embryo



15–60 %

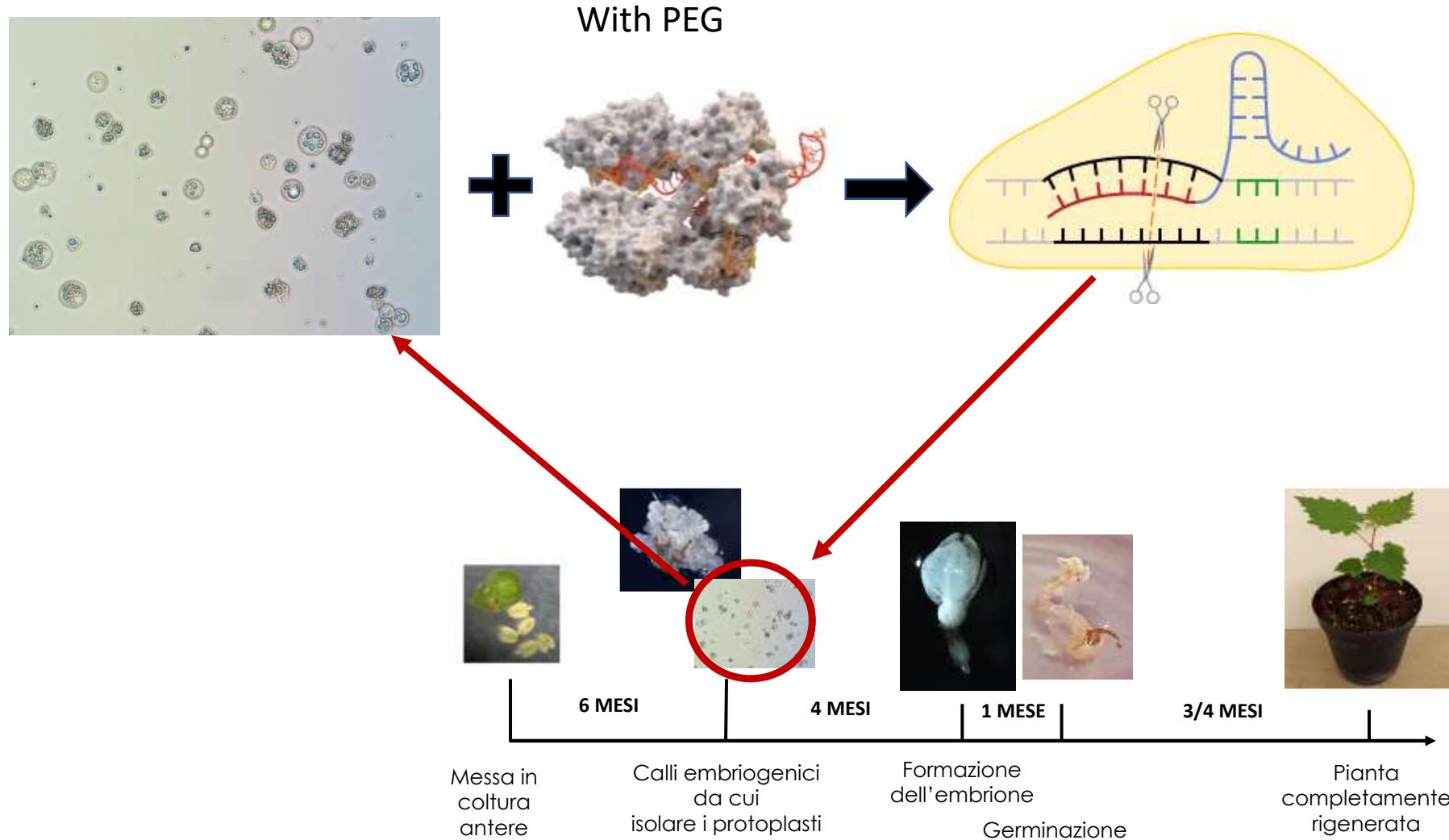
whole plant

9–15 %



~ 2 million protoplasts → ~ 150–200 germinated embryos → ~ 15–20 whole plants

# Editing induction in grapevine protoplasts



# Editing induction in grapevine protoplasts

October 2022 we published the first DNA-free edited grapevine obtained by protoplast transfection and regeneration

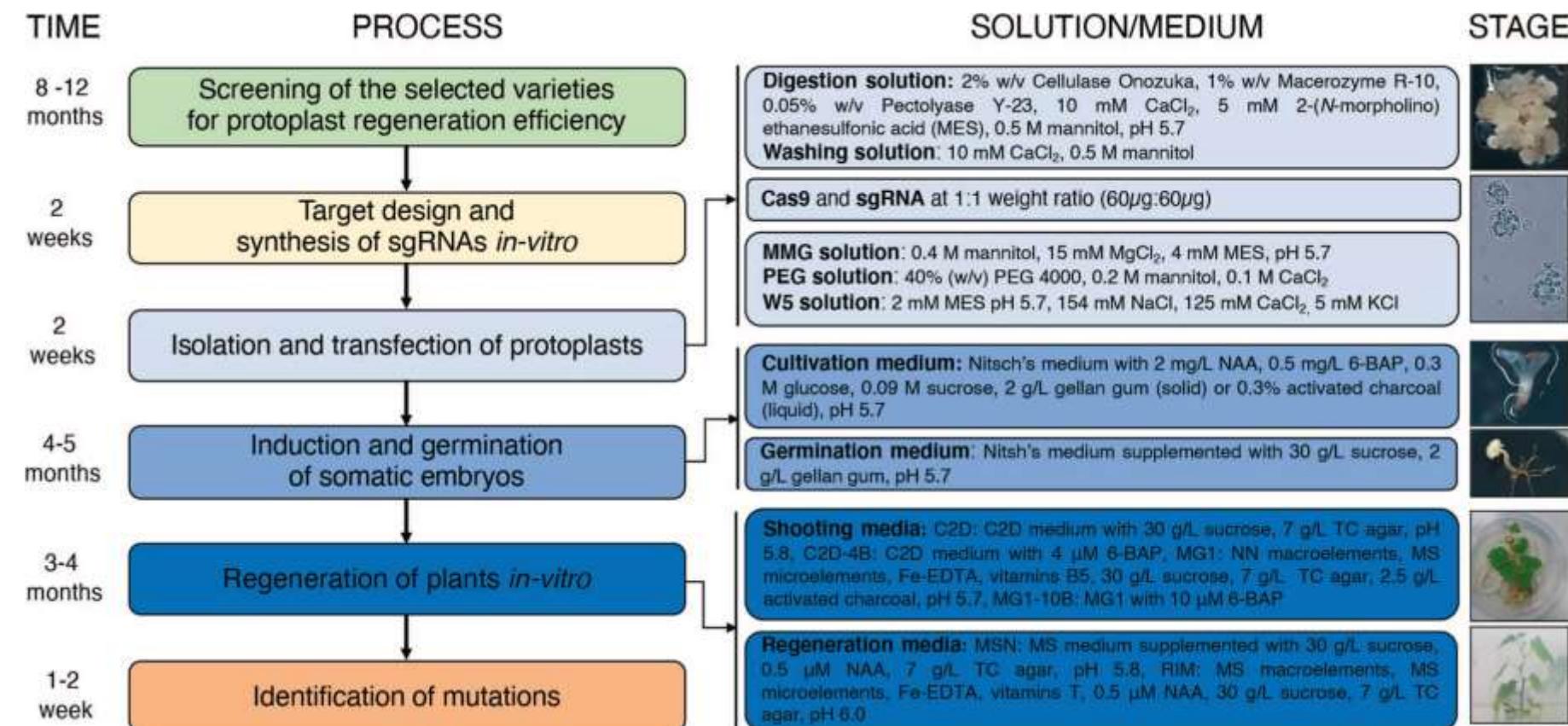
## Article

### DNA-free genome editing in grapevine using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes followed by protoplast regeneration

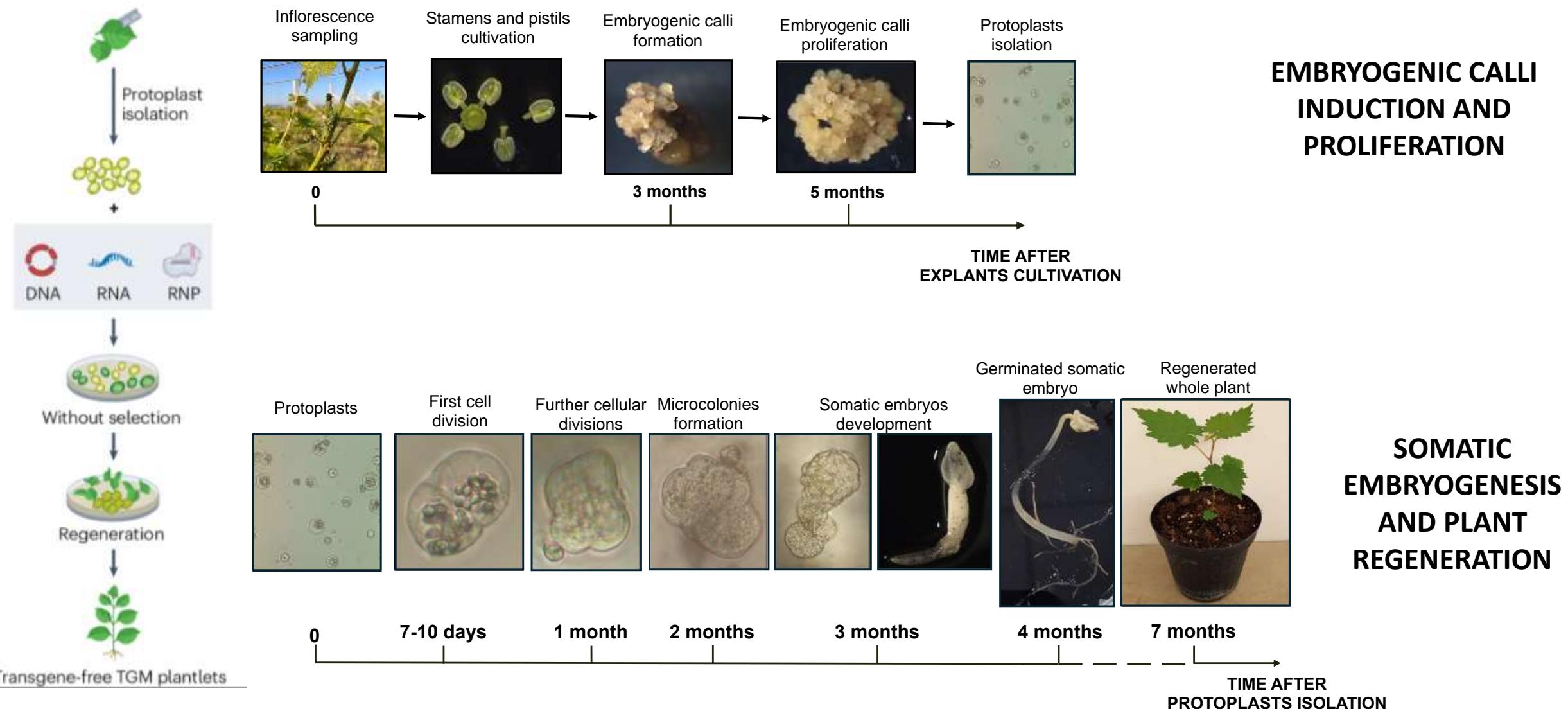
Samaneh Najafi, Edoardo Bertini, Erica D'Incà, Marianna Pasoli and Sara Zenoni 

Department of Biotechnology, University of Verona, 37134 Verona, Italy

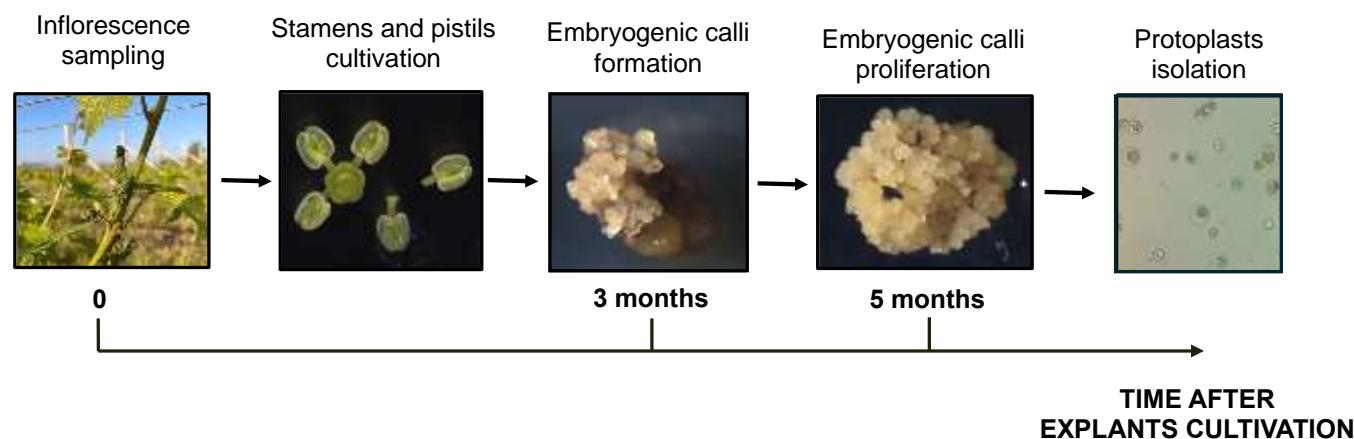
\*Corresponding author. E-mail: [sara.zenoni@univr.it](mailto:sara.zenoni@univr.it)



# PROTOPLAST PLATFORM

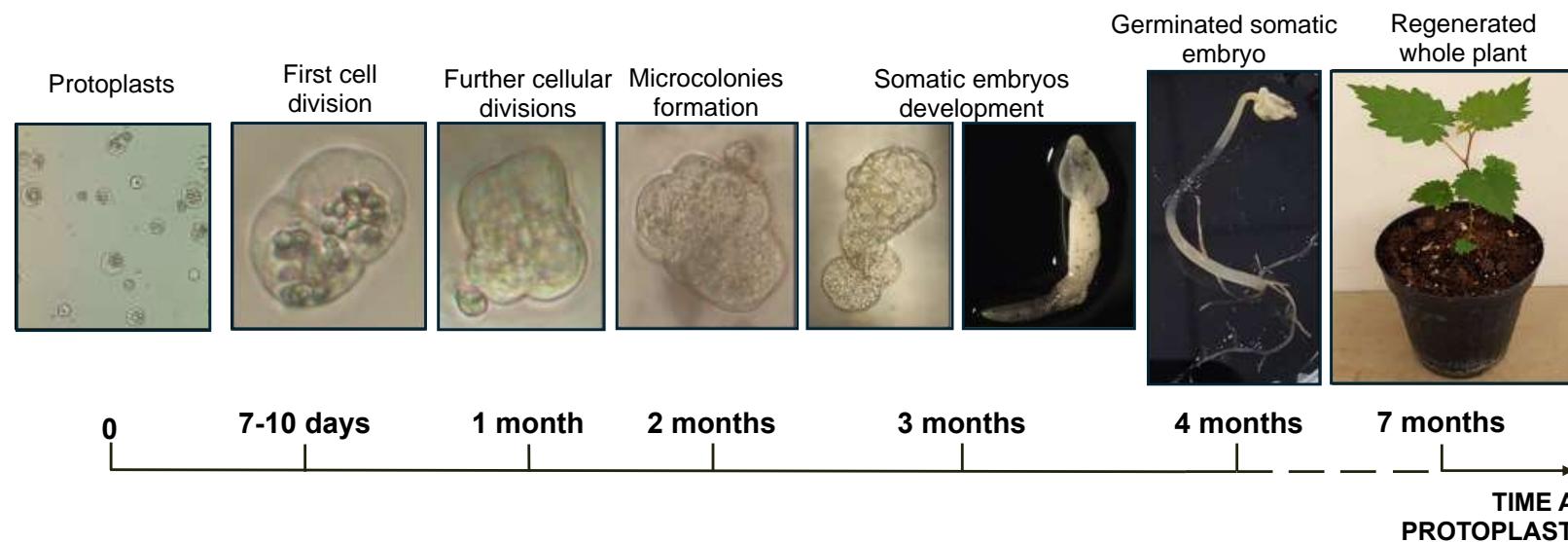


# Adapting the strategy to the genotype



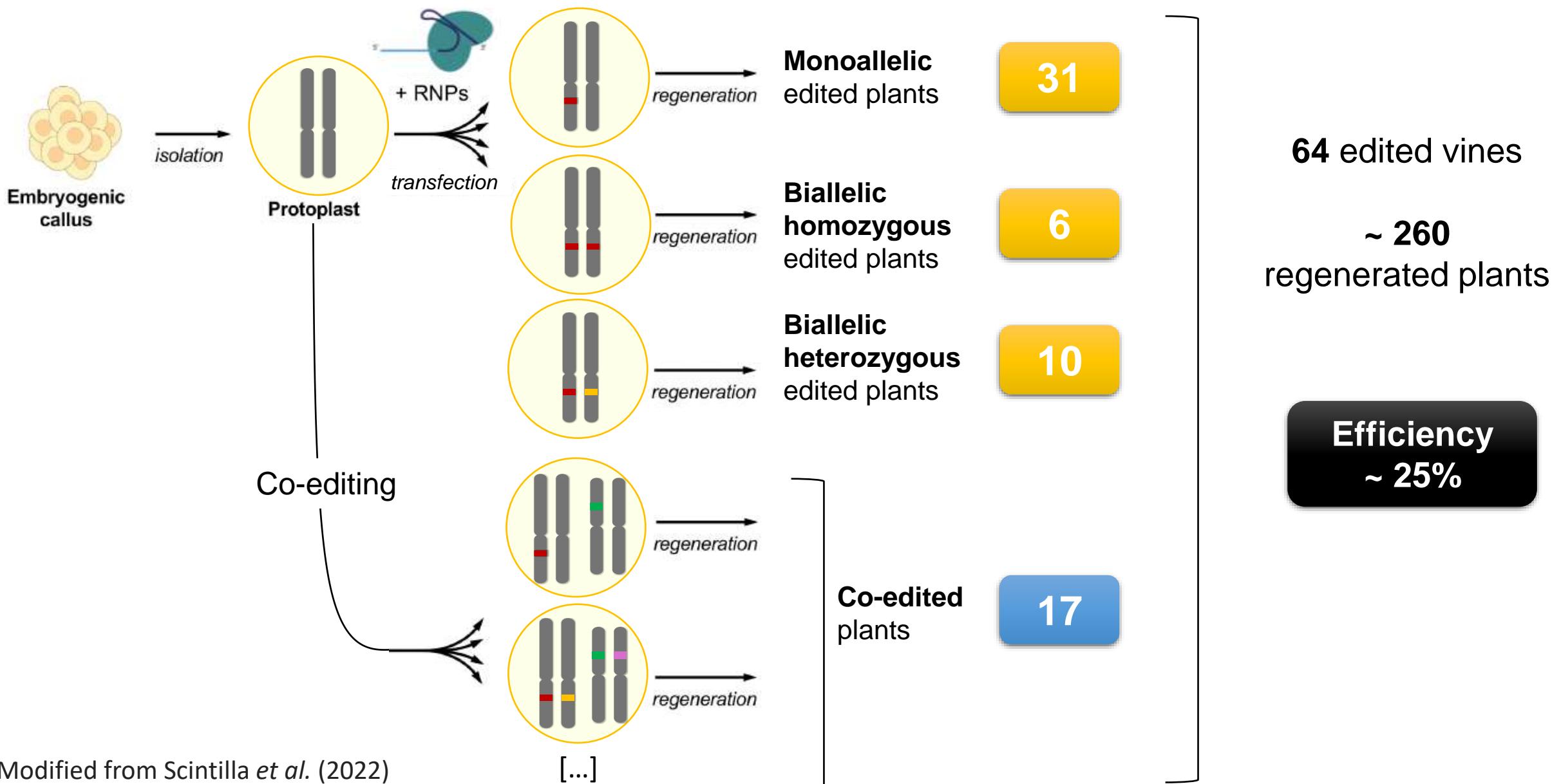
Rank of genotypes performance (1 = best)

1	Chardonnay
2	Merlot
3	Glera
4	Syrah
5	Thomson Seedless
6	Corvina
7	Cabernet



1	Chardonnay
2	Syrah
3	Cabernet
4	Thomson Seedless
5	Corvina
6	Glera
7	Merlot

# Editing events



# Susceptibility genes for downy mildew

Simultaneous editing of two *DMR6* genes in grapevine results in reduced susceptibility to downy mildew

Lisa Giacomelli<sup>1\*</sup>, Tieme Zeilmaker<sup>2</sup>, Oscar Giovannini<sup>1</sup>, Umberto Salvagnini<sup>1†</sup>, Domenico Masuero<sup>1</sup>, Pietro Franceschi<sup>1</sup>, Urska Vrhovsek<sup>1</sup>, Simone Scintilla<sup>1†</sup>, Jeroen Rouppe van der Voort<sup>2</sup> and Claudio Moser<sup>1</sup>

## Grapevine *DMR6-1* Is a Candidate Gene for Susceptibility to Downy Mildew

by Carlotta Pirrello <sup>1,2,†,‡</sup>  , Giulia Malacarne <sup>1</sup>  , Marco Moretto <sup>1</sup>  , Luisa Lenzi <sup>1</sup>  , Michele Perazzolli <sup>1,3</sup>  , Tieme Zeilmaker <sup>4</sup>  , Guido Van den Ackerveken <sup>5</sup>  , Stefania Pilati <sup>1</sup>  , Claudio Moser <sup>1</sup>   and Lisa Giacomelli <sup>1,‡</sup>  

the plant journal

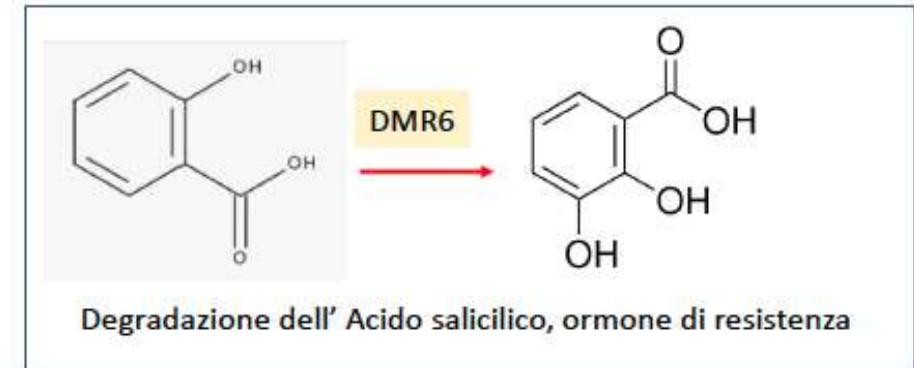
S E B

SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY

 Free Access

Arabidopsis *DMR6* encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated but required for susceptibility to downy mildew

Mireille Van Damme, Robin P. Huibers, Joyce Elberse, Guido Van den Ackerveken 



# DNA-free edited Chardonnay

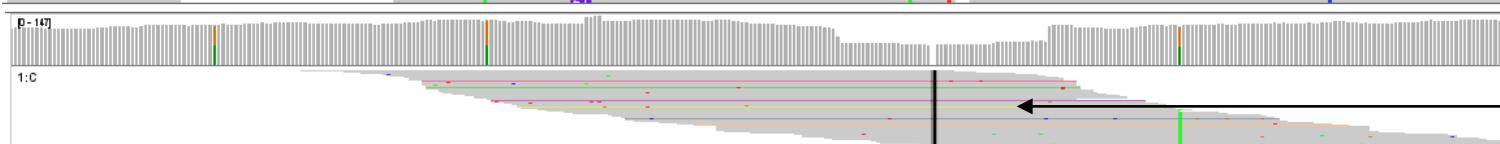
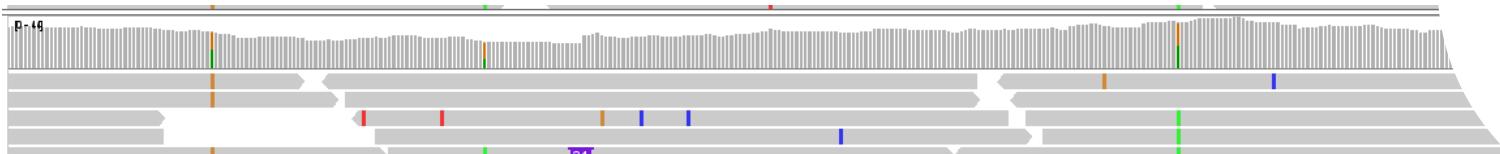
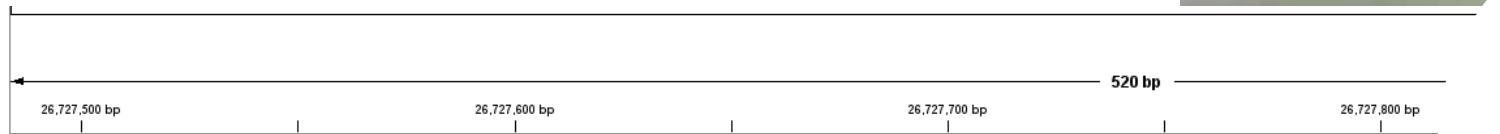
- Chardonnay plant edited for *DMR6.1*

## Genome sequencing

reference  
T2T.v5

vineyard  
plants

DMR6.1  
edited plants



DMR6.1-edited



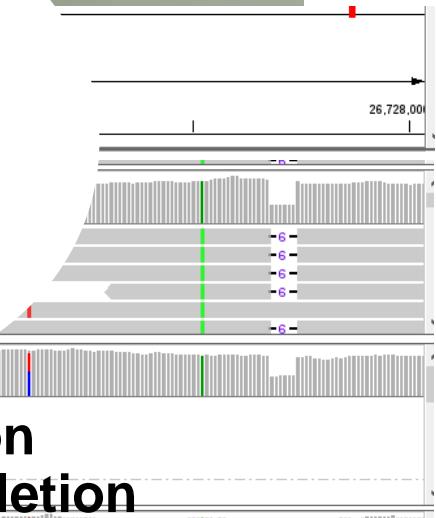
Non-edited



Biallelic  
heterozygous  
mutation



1 bp deletion  
49 bp deletion



# Genomic characterization: off targets

off-target Sequence	Mismatch Position	Locus
TGAATTAGTACAAGCATGAGTGG	..*..*.....*..*....	Intron
TGGATCAGTACATTCCAGACCGG	.....**..*..*	Exon
CCCAACAGTACACGCCCTGAGGAG	***.*.....	Exon
TCCATCAGTAAACGGCTGAGTGG	.**.....*...*.....	Intron
TGGATCAGTACATTCCGGACCGG	.....**..*..*	Exon
TGGAACAGTCGAGGCCTGAGAGG	....*....**.*.....	Intergenic

No predicted off-target sequence modifications

# Resistance assessment

**Leaf disk assay**  
(6 days after inoculation)

**Resistance score**  
(according to OIV 452-1 descriptor)

Test #1

DMR6.1-edited plant



Control plant



Test #2

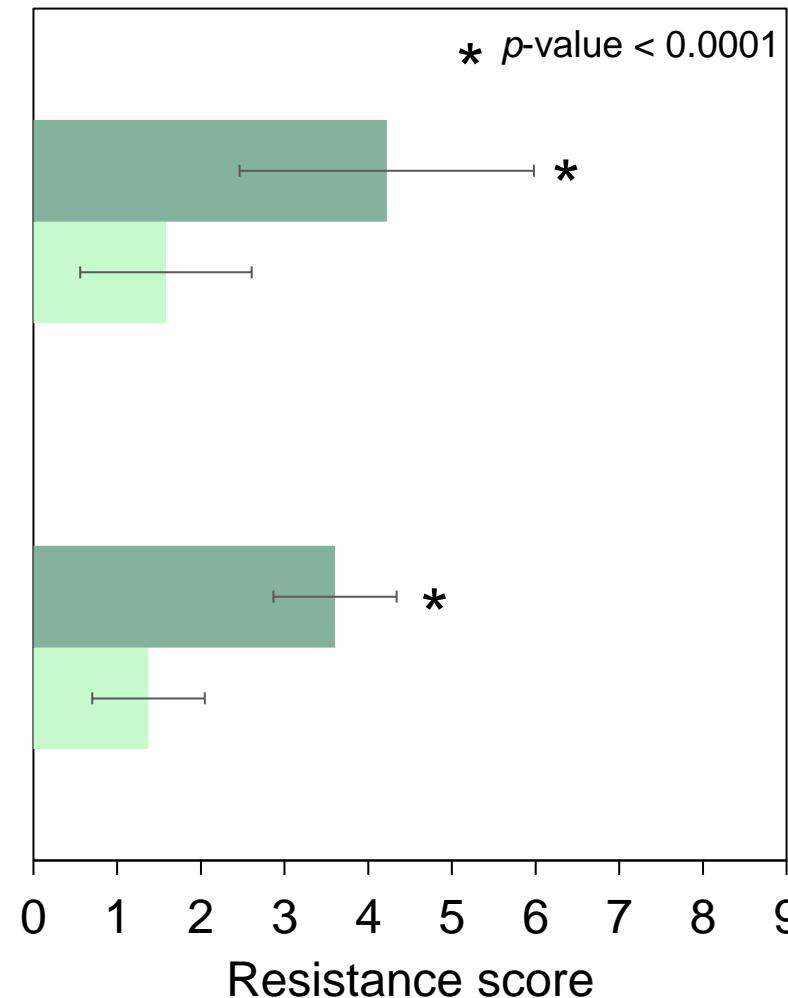
DMR6.1-edited plant



Control plant



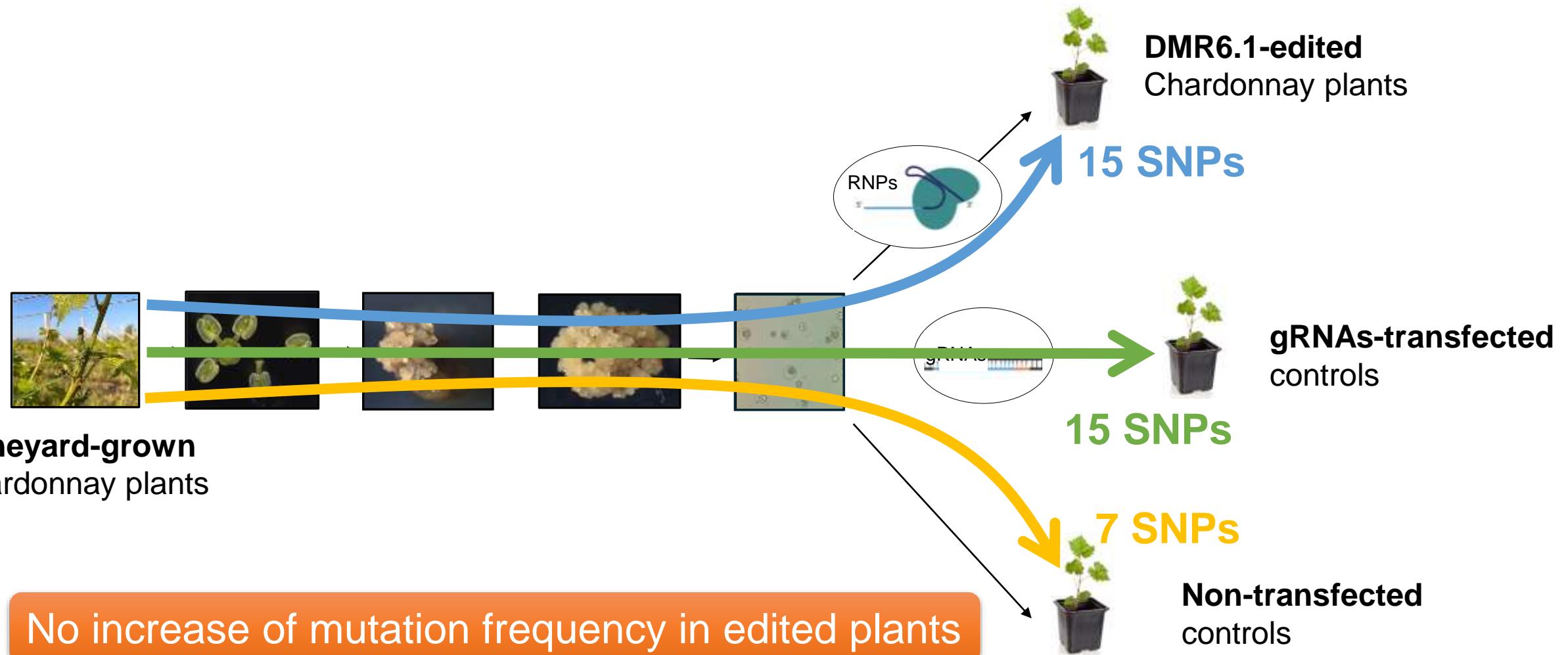
Inoculation: suspension of 50,000 sporangia/ml



■ DMR6.1-edited plant  
■ control plant

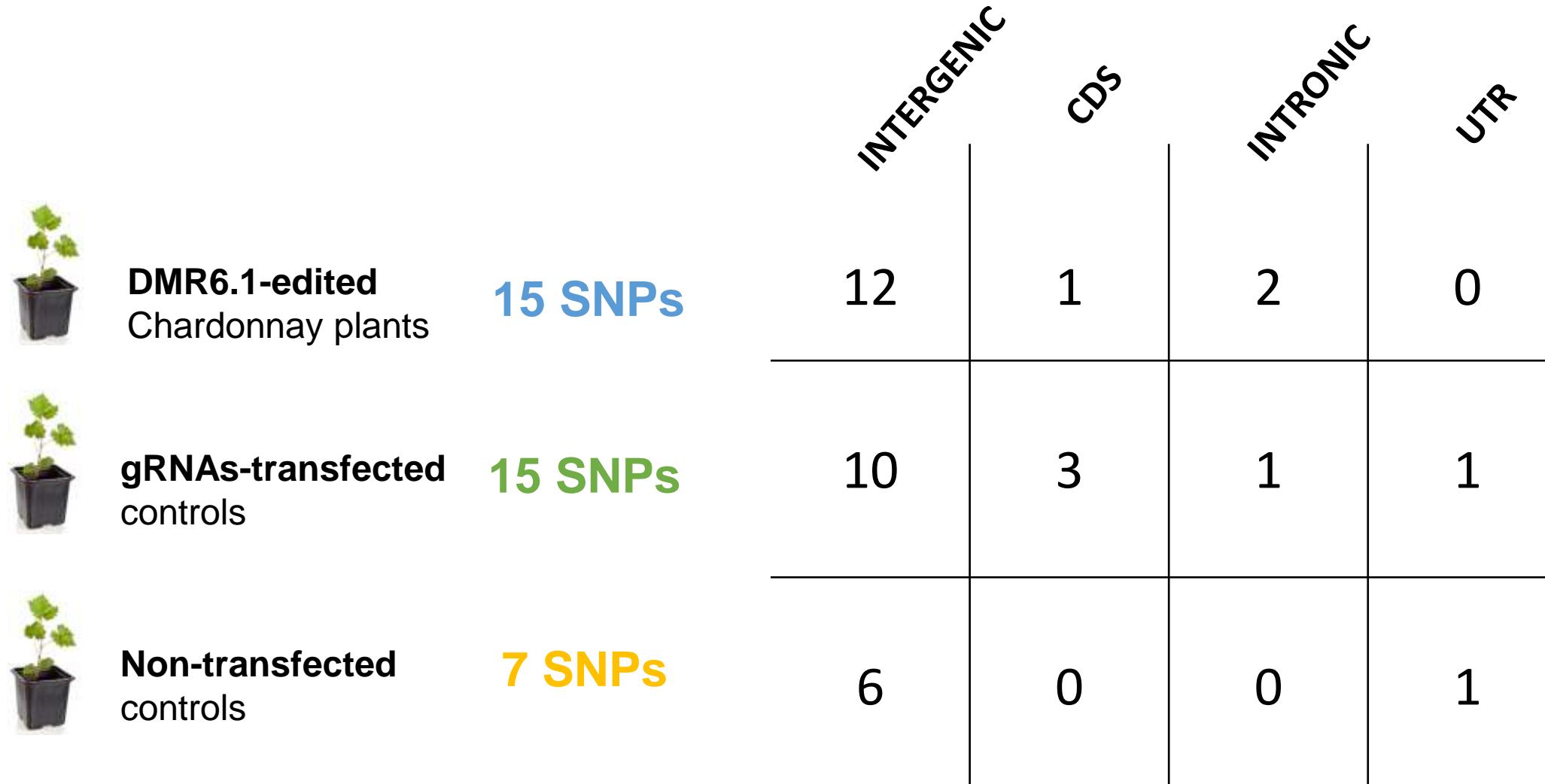
Significant  
increase of  
resistance

# Genomic characterization: neo mutations



Mutations likely accumulated during *in vitro* cultivation

# Genomic characterization: distribution of neo mutations



No differences in neo mutation distribution in edited plants

# CULTIVATION AND CONSUMPTION OF NGTs CROPS



**On May 30th 2023** an amendment to the Drought Law Decree of 14 April is approved which allows field testing of plants obtained with Assisted Evolution Techniques (TEA)

**On June 13th 2023** the decree becomes law and article 9-bis is inserted

«Art. 9-bis (*Disposizioni urgenti in materia di genetica agraria*). — 1. Per consentire lo svolgimento delle attività di ricerca presso siti sperimentali autorizzati, a sostegno di produzioni vegetali in grado di rispondere in maniera adeguata a condizioni di scarsità idrica e in presenza di stress ambientali e biotici di particolare intensità, nelle more dell’adozione, da parte dell’Unione europea, di una disciplina organica in materia, l’autorizzazione all’emissione deliberata nell’ambiente di organismi prodotti con tecniche di *editing* genomico mediante mutagenesi sito-diretta o di cisgenesi a fini sperimentali e scientifici è soggetta, fino al 31 dicembre 2024, alle disposizioni di cui al presente articolo.

2. La richiesta di autorizzazione è notificata all’autorità nazionale competente di cui all’articolo 2 del decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224. L’autorità nazionale competente, entro dieci giorni dal ricevimento della notifica, effettuata l’istruttoria preliminare di cui all’articolo 5, comma 2, lettera *a*), del medesimo decreto legislativo, trasmette copia della notifica al Ministero della salute, al Ministero dell’agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste e a ogni regione e provincia autonoma interessata. L’autorità nazionale competente invia copia della notifica all’Istituto superiore per la protezione e la ricerca ambientale (ISPRA), che svolge i compiti della soppressa Commissione interministeriale di valutazione di cui all’articolo 6 del citato decreto legislativo n. 224 del 2003. **L’ISPRA**, entro i successivi quarantacinque giorni, **effettua la valutazione della richiesta ed esprime il proprio parere all’autorità nazionale competente** e alle altre amministrazioni interessate. Entro dieci giorni dal ricevimento del parere dell’ISPRA, l’autorità nazionale competente adotta il provvedimento autorizzatorio. Dell’esito della procedura è data comunicazione alle regioni e alle province autonome interessate.

# AUTHORIZATION FOR FIELD TESTING OF EDITED CHARDONNAY



Request made on **5 June 2024**



Authorization received on **5 September 2024**

After a long bureaucratic process

**m\_amte.MASE.REGISTRO UFFICIALE.USCITA.0161182.05-09-2024**



*Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica*  
DIREZIONE GENERALE TUTELA DELLA BIODIVERSITA' E DEL MARE

---

IL DIRETTORE GENERALE

**Oggetto: Notifica B/IT/24/03 per l'emissione deliberata nell'ambiente di OGM per qualsiasi fine diverso dall'immissione sul mercato ai sensi dell'articolo 9-bis, comma 2, del decreto-legge 14 aprile 2023, n. 39, convertito, con modificazioni, dalla legge 13 giugno 2023, n. 68 – Rilascio del provvedimento di autorizzazione**

Si trasmette in allegato il provvedimento in oggetto con cui si autorizza codesta Società a effettuare la sperimentazione in pieno campo di piante di vite (*Vitis vinifera L.*), varietà Chardonnay, modificate con tecniche di *editing* del genoma per resistere alla peronospora della vite, di cui alla notifica B/IT/24/03

# SEPTEMBER 30, 2024 – second Italian trial

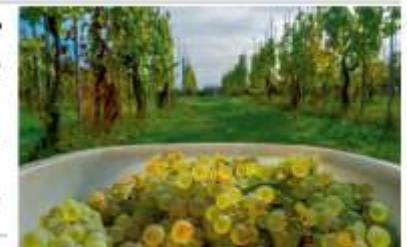


## News

### Italy tests first gene-edited vines for winemaking

Europe's first field trial of gene-edited vines began in northern Italy on 30 September 2024. Developed by EdiVite, a spin-off from the University of Verona, these Chardonnay vines have undergone genetic edits to enable them to better defend themselves against downy mildew, a major fungal disease. The trial is being conducted on university land, with plans to expand to another site in the Veneto region. Researchers aim to gather initial data by 2025, with the potential for experimental winemaking in 2026.

By Anna Melchiorri



**FEBRUARY 13, 2025**



# CONCLUSIONS

- The possibility to apply genome editing via the CRISPR/Cas9 system and produce DNA-free genetically improved grapes have been demonstrated
- NGTs (TEA in Italy) plants currently are classified as **GMOs** even if they are characterized by a precise mutation of the target gene(s) and the absence of exogenous DNA
- At the moment in Europe, the proposed law is being evaluated which classifies these plants as **NGT1**, for which the application of GMO regulations is not expected.
- We have other TEA grapevines in the greenhouse for which we are ready to request authorization for deliberate release for open field testing

**THANK YOU FOR THE ATTENTION**

**Subgroup on New Genomic Techniques  
(NGTs)**

**2nd meeting**

**14 May 2025**

**Item 6**

*Ris8imo: the first NGT field trial in Italy*

University of Milan (Italy)

# Ris8imo: the first NGT field trial in Italy

14.5.25

VITTORIA BRAMBILLA

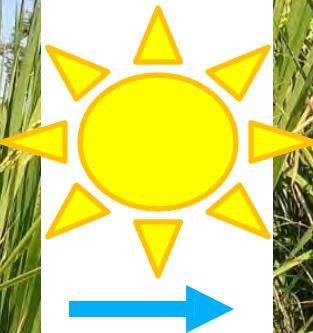


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



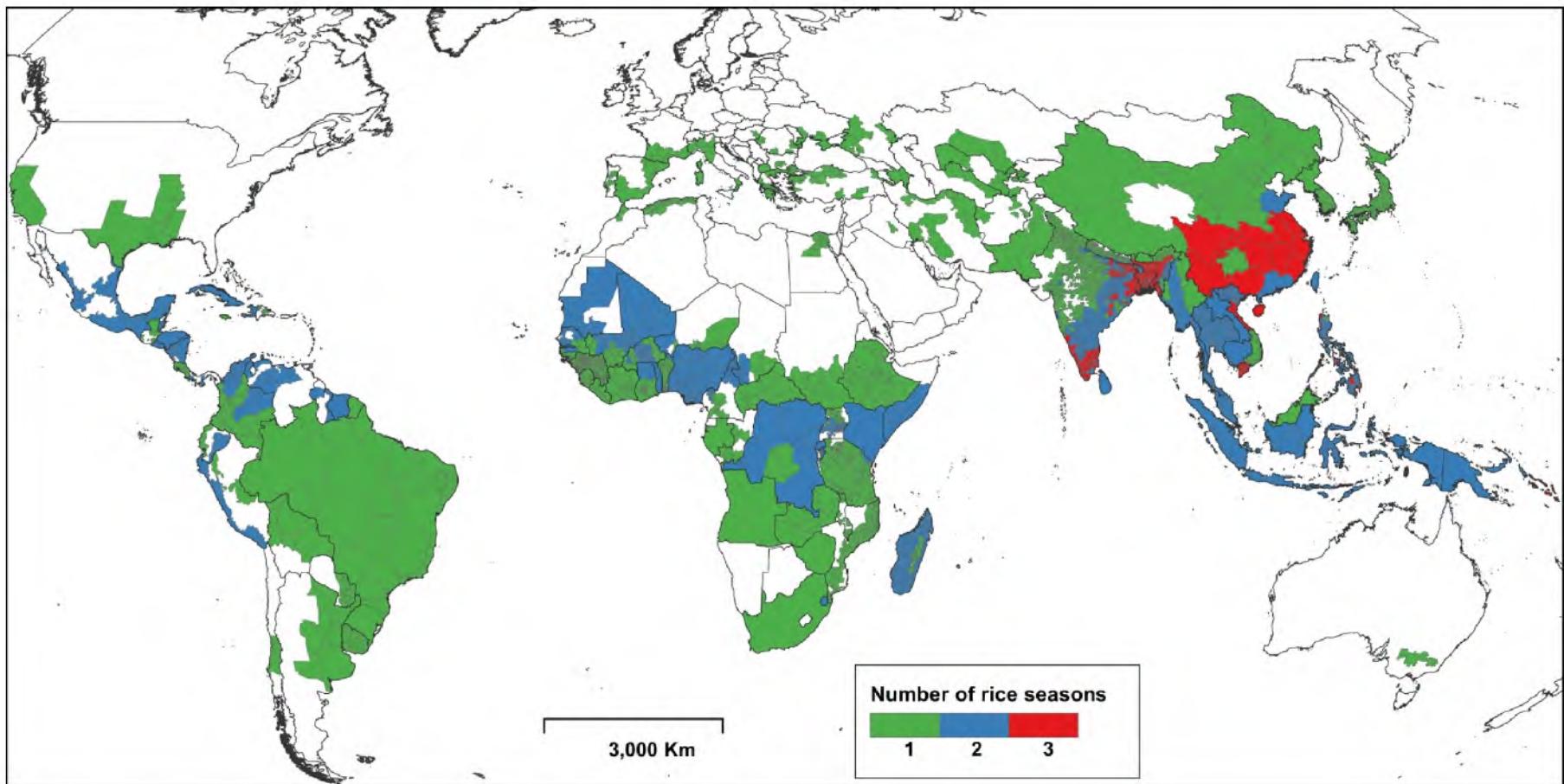
**DiSAA**  
DIPARTIMENTO  
di SCIENZE  
AGRARIE e  
AMBIENTALI

in our lab we are interested in  
studying the molecular bases of  
photoperiodic flowering



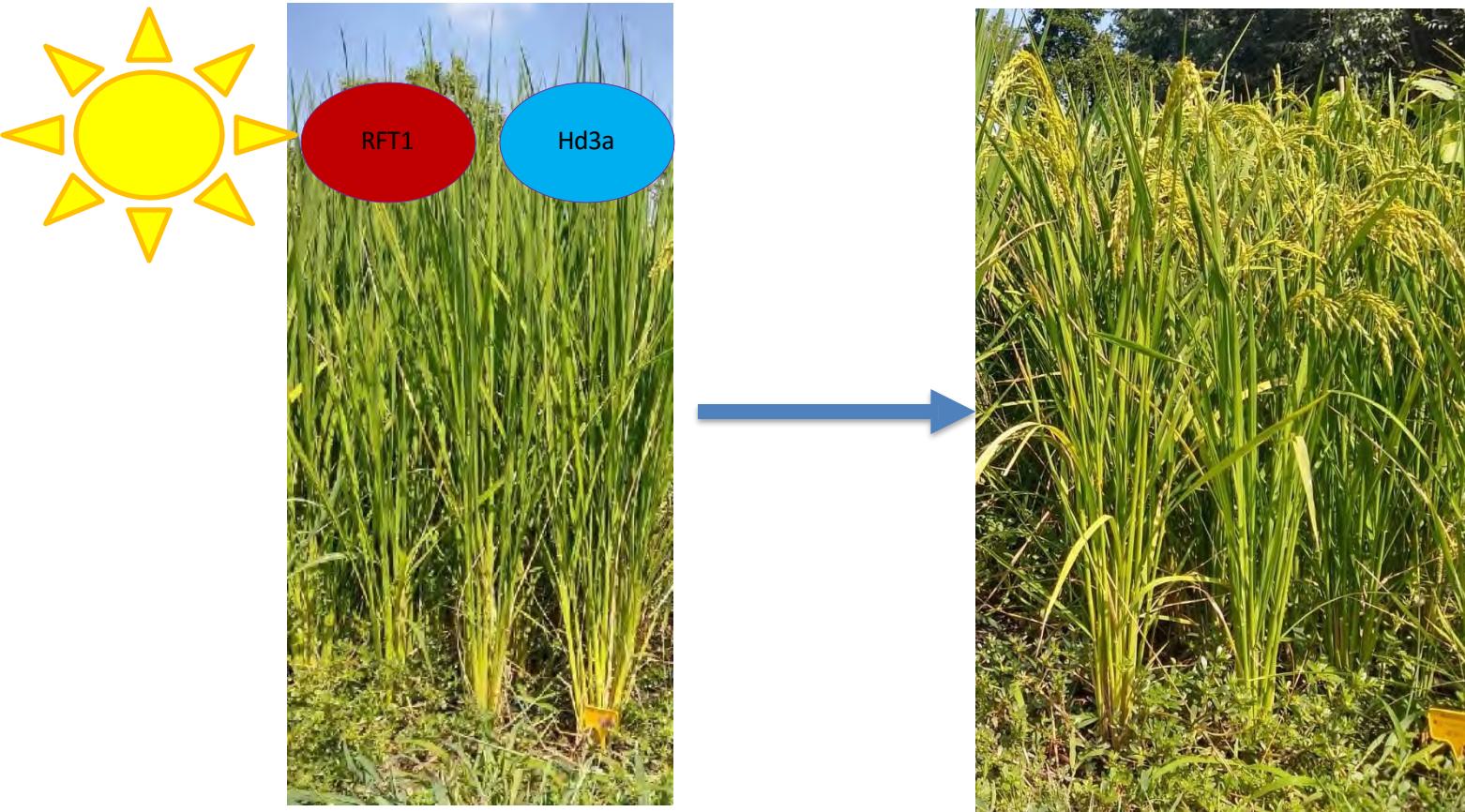
# rice growing areas

From: [RiceAtlas, a spatial database of global rice calendars and production](#)



Spatial units covered in RiceAtlas and the number of rice-growing seasons.

we know that two florigenic proteins, Hd3a and RFT1 are expressed in leaves under photoperiodic inductive conditions

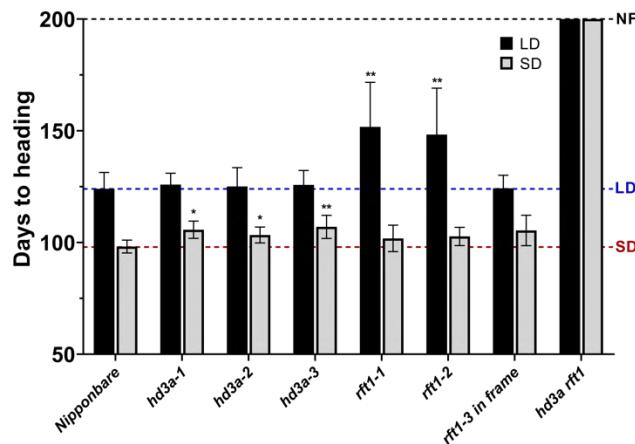
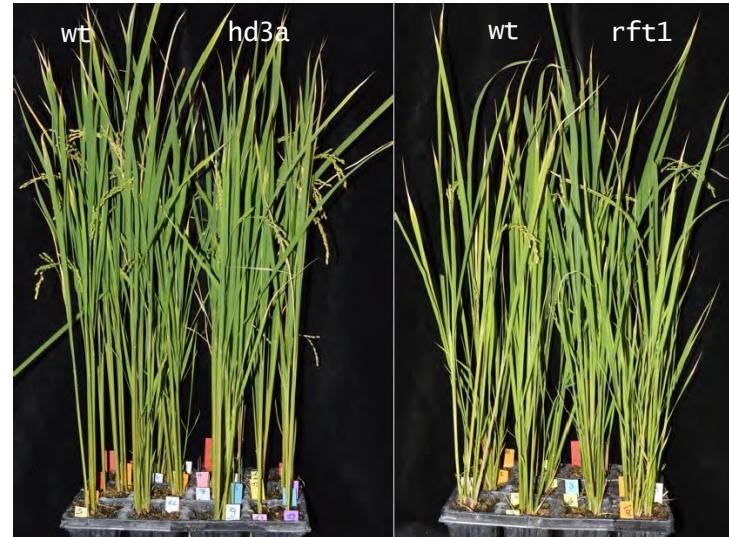


in 2014 we mutated by CRISPR/Cas9 the rice florigens to observe how flowering was affected

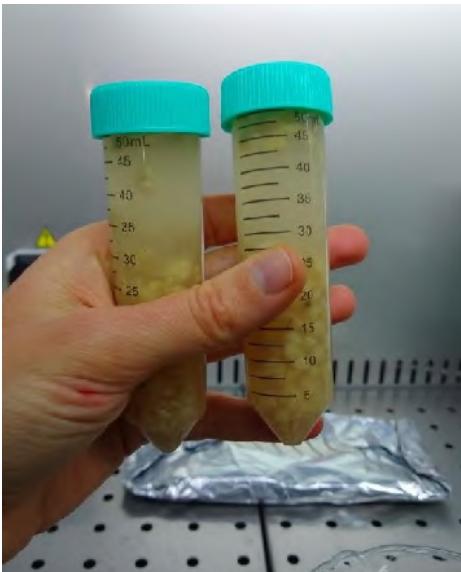
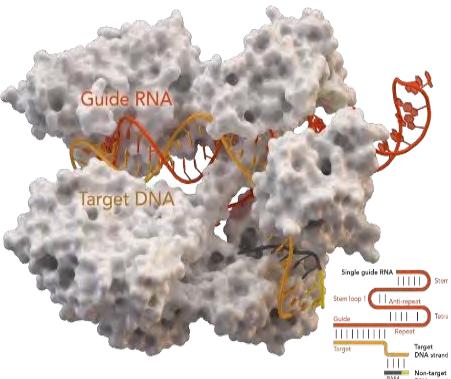
the single mutants have different flowering behaviours in growth chambers



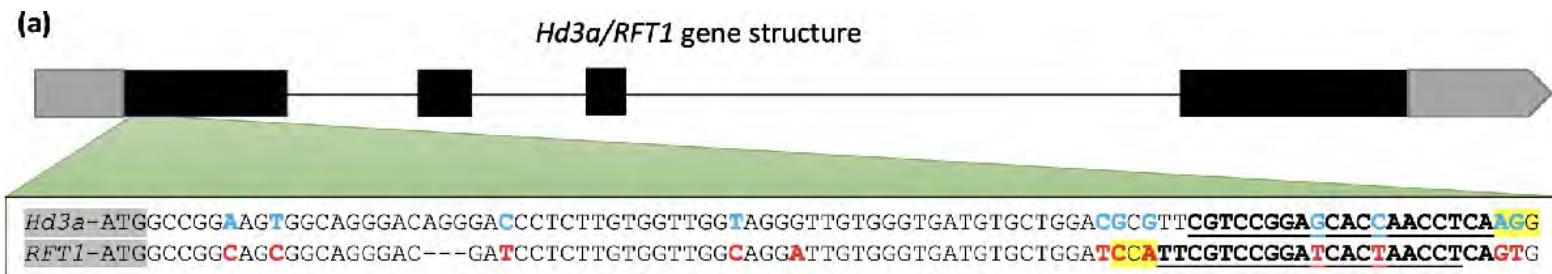
the double mutant is non-flowering



# LAB PROTOCOL



these mutants contained no transgene but only small insertions or deletions, we therefore thought that we could also make field experiments



(b)

(c)

Hd3a CRISPR alleles (5' - 3')		type of mutation
<i>wt</i>	CGTCCGGAGCACCAACC-TCAAGGTACCTATGGCT	none
<i>hd3a-1</i>	CGTCCGGAGCACCAACC <b>TCAAGGTACCTATGGCT</b>	1 C insertion
<i>hd3a-2</i>	CGTCCGGAGCACCAAC <b>---TCAAGGTACCTATGGCT</b>	1 C deletion
<i>hd3a-3</i>	CGTCCGGAGCACCAACC <b>--CAAGGTACCTATGGCT</b>	1 T deletion
<i>hd3a-4</i>	CGTCCGGAGCACC <b>-----TCAAGGTACCTATGGCT</b>	4 bp deletion
<i>hd3a-5</i>	CGTCCGGAGCAC <b>CCCAACCTCAAGGTACCTATGGCT</b>	1 C insertion
<i>hd3a-6</i>	CG <b>-----GGTACCTATGGCT</b>	19 bp deletion
<i>hd3a-7 IN FRAME</i>	CGTCCGGAGCACCAAC <b>-----GGCT</b>	15 bp deletion

(d)

RFT1 CRISPR alleles (5' - 3')		type of mutation
<i>wt</i>	CCATT <del>CG</del> -TCCGGATCACTAACCTCAGTG	none
<i>rft1-1</i>	CCATT <del>CG</del> <b>A</b> TCCGGATCACTAACCTCAGTG	1 A insertion
<i>rft1-2</i>	CCATT <del>CG</del> <b>T</b> TCCGGATCACTAACCTCAGTG	1 T insertion
<i>rft1-3 IN FRAME</i>	CCATT <del>CG</del> <b>-----TC</b> ACTAACCTCAGTG	6 bp deletion

On November 11, 2016 Fabio Fornara wrote to the Italian Ministry of the Environment to confirm that he were allowed to grow these mutants outdoors

the answer came 1 month later: we were told to wait for the ruling of the European Court of Justice



Ministero dell'Ambiente  
e della Tutela del Territorio e del Mare

DIREZIONE GENERALE PER LE VALUTAZIONI  
E LE AUTORIZZAZIONI AMBIENTALI

DIVISIONE IV – VALUTAZIONE E RIDUZIONE DEI RISCHI  
DERIVANTI DA PRODOTTI CHIMICI  
E ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI

AI Professor Fabio Fornara  
Università di Milano  
Dipartimento di Bioscienze  
Via Celoria 26  
20133 Milano  
fabio.fornara@unimi.it

e, p.c., Al Ministero della Salute  
Dir. Generale per l'Igiene e la Sicurezza  
degli Alimenti e la Nutrizione  
dgsan@postacert.sanita.it

Al Ministero delle Politiche Agricole,  
Alimentari e Forestali  
Dir. Generale dello Sviluppo Rurale  
cosvir.direzione@pec.politicheagricole.gov.it

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

**Objetto: Richiesta di chiarimenti per il rilascio nell'ambiente a scopo sperimentale di mutantipuntiformi ottenuti tramite CRISPR.**

Si fa riferimento alla Sua richiesta di pari oggetto pervenuta a mezzo posta elettronica in data 13 ottobre c.a. con la quale venivano richiesti chiarimenti in merito all'inquadramento normativo per l'emissione deliberata nell'ambiente a scopo sperimentale di piante ottenute con la tecnologia *del genome editing CRISPR/Cas9*.

Questa Amministrazione ha formulato un quesito alla Commissione europea per sapere se gli organismi ottenuti con la tecnologia in questione ricadano o meno nel campo di applicazione della direttiva 2001/18/CE c, quindi, del decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224, di attuazione a livello nazionale della citata direttiva.

La Commissione europea, con la nota che si allega, ha evidenziato che si è in attesa della sentenza della Corte di giustizia europea in merito alla richiesta di parere avanzata dal Consiglio di Stato francese (Causa pregiudiziale C-528/16) sullo status giuridico degli organismi ottenuti mediante alcune tecniche di miglioramento genetico quali la mutagenesi sito indotta.

Per quanto sopra evidenziato, stante il quadro normativo vigente, potranno pertanto essere fornite informazioni circa i permessi necessari per la coltivazione in campo a scopo sperimentale di piante ottenute con la tecnologia del *genome editing CRISPR/Cas9* non appena saranno state definite le questioni giuridiche in merito alle nuove tecniche impiegate nel *breeding vegetale*.

**Il Dirigente**

Dott. Carlo Zaghi

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

ID Cliente: 288  
ID Documento DVA.D4.OF.288.2016.0019  
Data stampa: 13/12/2016

✓ Resp. Sez.: Andrelini M.  
Ultimo: DVA.D4.OF  
Data: 13/12/2016

Tuteliamo l'ambiente! Non stampate se non necessario. I fogli di carta formato A4 = 7.5g di CO<sub>2</sub>

Via Cristoforo Colombo, 44 – 00147 Roma Tel. 06-57225017 - Fax 06-57225062 e-mail: dva-4@minambiente.it  
e-mail PEC: DGSelvaguardia.Ambientale@PEC.minambiente.it

the Judgement comes **2 years later** and says that CRISPR plants should not be exempted from the definition of GMO, whatever mutation they contain



## Reports of Cases

### JUDGMENT OF THE COURT (Grand Chamber)

25 July 2018\*

(Reference for a preliminary ruling — Deliberate release of genetically modified organisms into the environment — Mutagenesis — Directive 2001/18/EC — Articles 2 and 3 — Annexes I A and I B — Concept of 'genetically modified organism' — Techniques/methods of genetic modification conventionally used and deemed to be safe — New techniques/methods of mutagenesis — Risks for human health and the environment — Discretion of the Member States when transposing the directive — Directive 2002/53/EC — Common catalogue of varieties of agricultural plant species — Herbicide-tolerant plant varieties — Article 4 — Acceptability of genetically modified varieties obtained by mutagenesis for inclusion in the common catalogue — Human health and environmental protection requirement — Exemption)

In Case C-528/16,

On November  
16, 2018,  
Fabio  
receives the  
final answer  
from the  
Italian  
Ministry:  
our CRISPR  
plants will  
not be able  
to go into  
the field



Il DIRETTORE GENERALE

Al Professor Fabio Fornara  
Università di Milano  
Dipartimento di Bioscienze  
Via Celoria 26  
20133 Milano  
fabio.fornara@unimi.it

c. p.c., Al Ministero delle Politiche Agricole,  
Alimentari e Forestali

Direzione Generale dello Sviluppo Rurale  
cosvir.direzione@pec.politicheagricole.gov.it

DISR V - Servizio fitosanitario centrale, produzioni vegetali  
cosvir5@pec.politicheagricole.gov.it

DISR IV - Ricerca e sperimentazione  
cosvir4@pec.politicheagricole.gov.it

**Oggetto: Coltivazione sperimentale mutanti CRISPR.**

Con riferimento alla Sua richiesta di pari oggetto pervenuta a mezzo posta elettronica in data 11 novembre c.a. si evidenzia quanto segue.

In Italia l'emissione deliberata nell'ambiente di OGM per qualsiasi fine diverso dell'immissione sul mercato, ovvero per scopi sperimentali, è regolata dal Titolo II del D.L.vo n. 224/2003 di attuazione della direttiva 2001/18/CE.

Chiunque intenda effettuare un'emissione deliberata nell'ambiente di un OGM è tenuto a presentare preventivamente una notifica (una copia elettronica in lingua italiana ed una in lingua inglese) all'Autorità Nazionale Competente:

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare  
Direzione generale per le valutazioni e le autorizzazioni ambientali (DVA)  
Via Cristoforo Colombo, 44  
Cap.00147, Roma, Italia  
PEC: DGSalvaguardia.Ambientale@PEC.minambiente.it

Ai sensi dell'articolo 8 del D.L.vo n. 224/2003, la notifica deve comprendere:

a. un fascicolo tecnico, su supporto cartaceo ed informatico, contenente le informazioni di cui all'allegato III del D.L.vo n. 224/2003, *"Informazioni obbligatorie per la notifica"*, necessarie per valutare il rischio ambientale connesso all'emissione deliberata dell'OGM e in particolare:

- 1) informazioni generali, comprese quelle relative al personale e alla sua formazione;
- 2) informazioni relative all'OGM;

ID Utente: 7106

ID Documento: DVA-DI-01-7106\_2018-0119

Data stesura: 16/11/2018

✓ Resp. Sca.: Andreola M.

Ufficio: DVA-DI-01

Data: 16/11/2018

✓ Resp. Div.: Zaghi C.

Ufficio: DVA-D4

Data: 16/11/2018

Tuteliamo l'ambiente! Non stampate se non necessario. Il foglio di carta formato A4 - 7,5g di CO<sub>2</sub>.

Via Cristoforo Colombo, 44 - 00147 Roma Tel: 06-57223649 - Fax 06-57223649 e-mail: dva-dv@minambiente.it  
e-mail PEC: DGSalvaguardia.Ambientale@PEC.minambiente.it

Firmato digitalmente in data 16/11/2018 alle ore 15:08

Fabio Fornara



We are interested in flowering: but what are the main concerns of rice farmers?



Blast susceptible variety grown in Vercelli

rice blast is the main problem for rice cultivation worldwide, caused by the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*

it is known that mutations in *Pi21* gene cause durable resistance to rice blast

21 AUGUST 2009 VOL 325 SCIENCE www.sciencemag.org

---

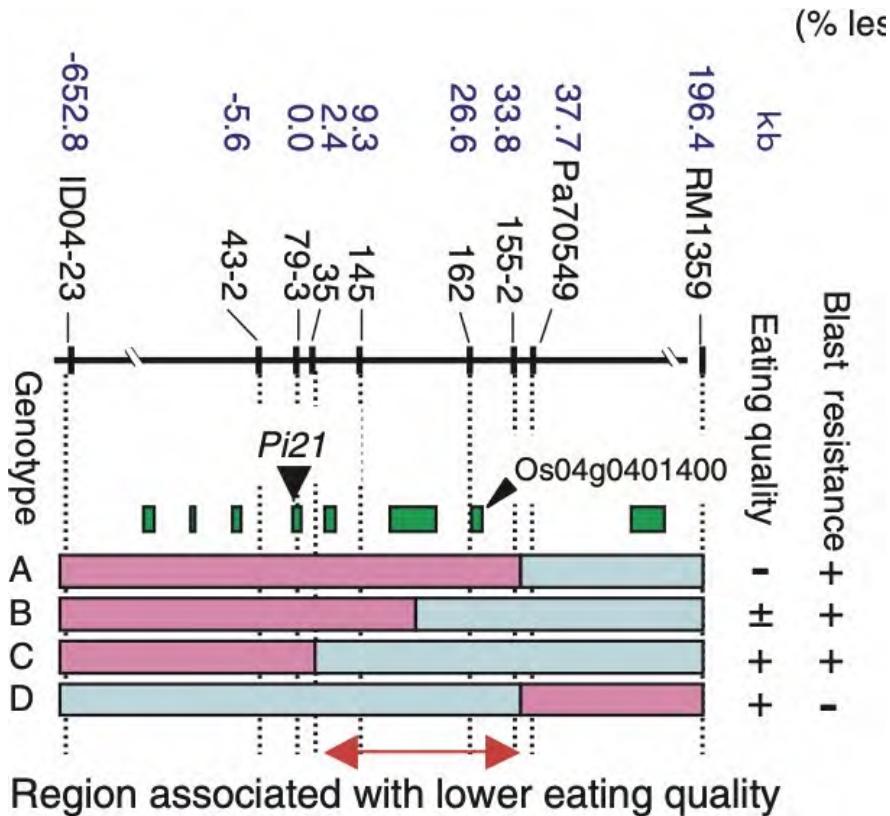
## Loss of Function of a Proline-Containing Protein Confers Durable Disease Resistance in Rice

Shuichi Fukuoka,<sup>1\*</sup> Norikuni Saka,<sup>2</sup> Hironori Koga,<sup>3</sup> Kazuko Ono,<sup>1</sup> Takehiko Shimizu,<sup>4</sup> Kaworu Ebana,<sup>1</sup> Nagao Hayashi,<sup>5</sup> Akira Takahashi,<sup>5</sup> Hirohiko Hirochika,<sup>6</sup> Kazutoshi Okuno,<sup>7</sup> Masahiro Yano<sup>1</sup>

Blast disease is a devastating fungal disease of rice, one of the world's staple foods. Race-specific resistance to blast disease has usually not been durable. Here, we report the cloning of a previously unknown type of gene that confers non-race-specific resistance and its successful use in breeding. *Pi21* encodes a proline-rich protein that includes a putative heavy metal-binding domain and putative protein-protein interaction motifs. Wild-type *Pi21* appears to slow the plant's defense responses, which may support optimization of defense mechanisms. Deletions in its proline-rich motif inhibit this slowing. *Pi21* is separable from a closely linked gene conferring poor flavor. The resistant *pi21* allele, which is found in some strains of *japonica* rice, could improve blast resistance of rice worldwide.



mutations in *Pi21* were not introgressed into Italian varieties by breeders because the gene is within a region that confers lower eating quality



In 2017 we simultaneously mutated by CRISPR/Cas9 *Pi21* (OsHIPP5), *HMA1* (OsHIPP19) and *HMA2* (OsHIPP20), that are two other genes important for *M. oryzae* penetration into the plant cell

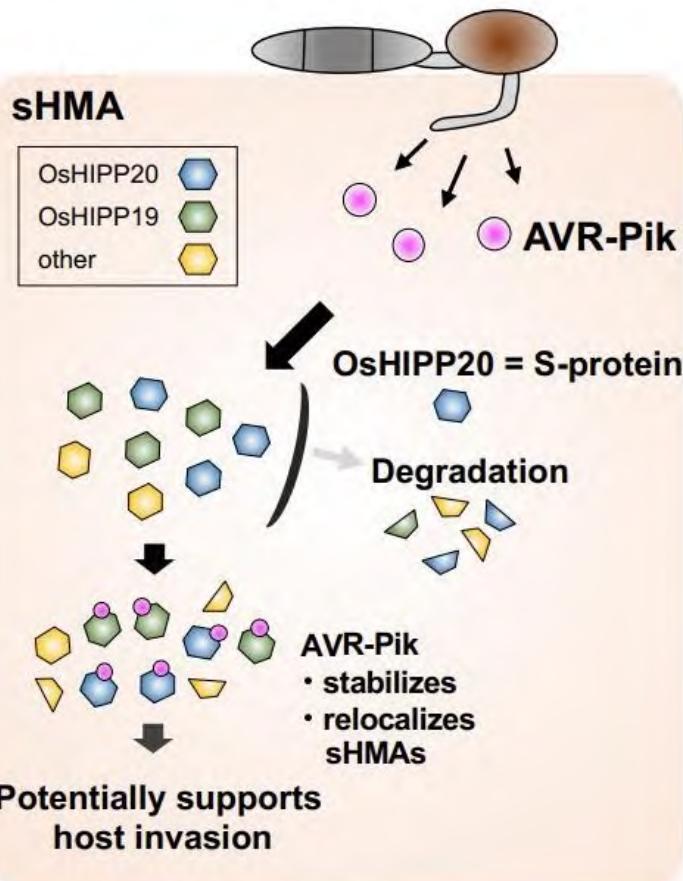
Sophien Kamoun Thorsten Langner



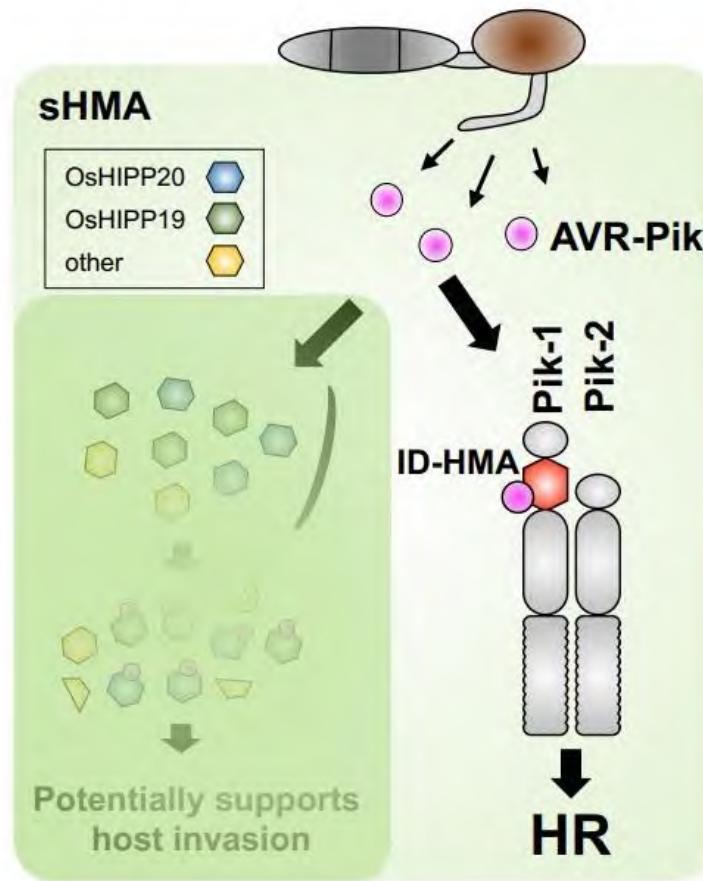
The project was developed in collaboration with plant pathologists Sophien Kamoun and Thorsten Langner

# HMA1 (OsHIPP19) and HMA2 (OsHIPP20) can stabilize AVR-Pik effector to improve fungal penetration in the rice cells

## Compatible interaction

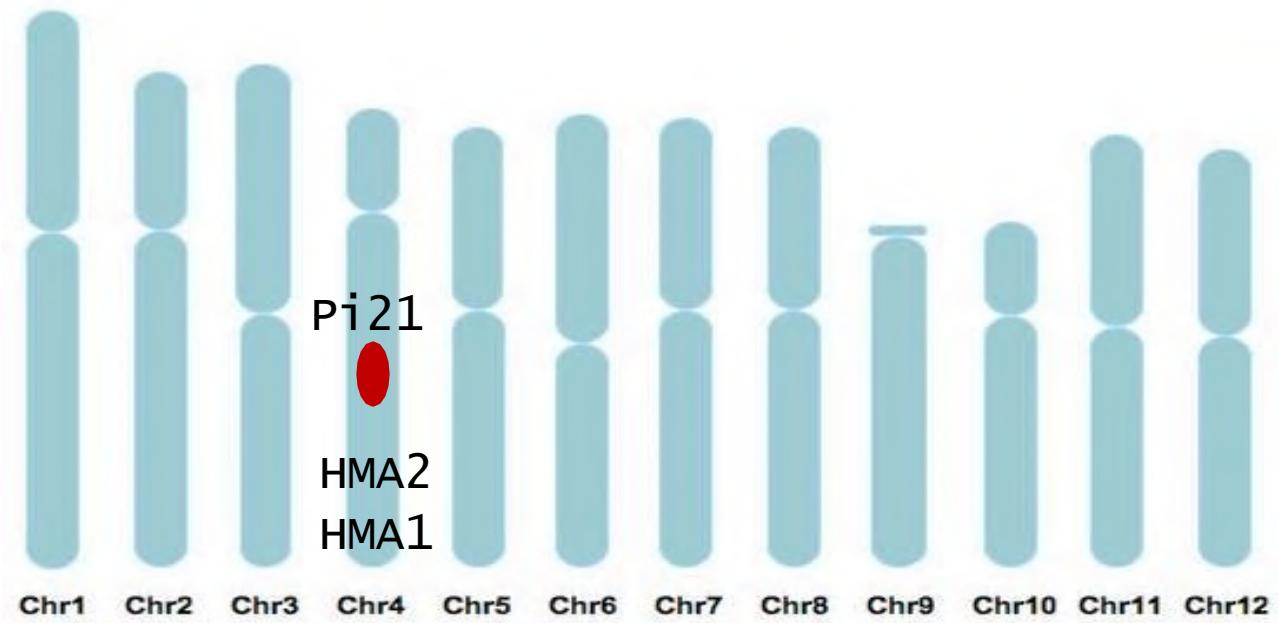
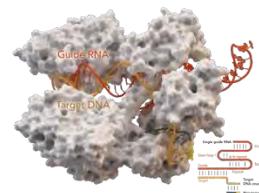


## Incompatible interaction



we chose a widely grown (in 2016) Italian blast susceptible élite variety named Telemaco of the Arborio risotto type

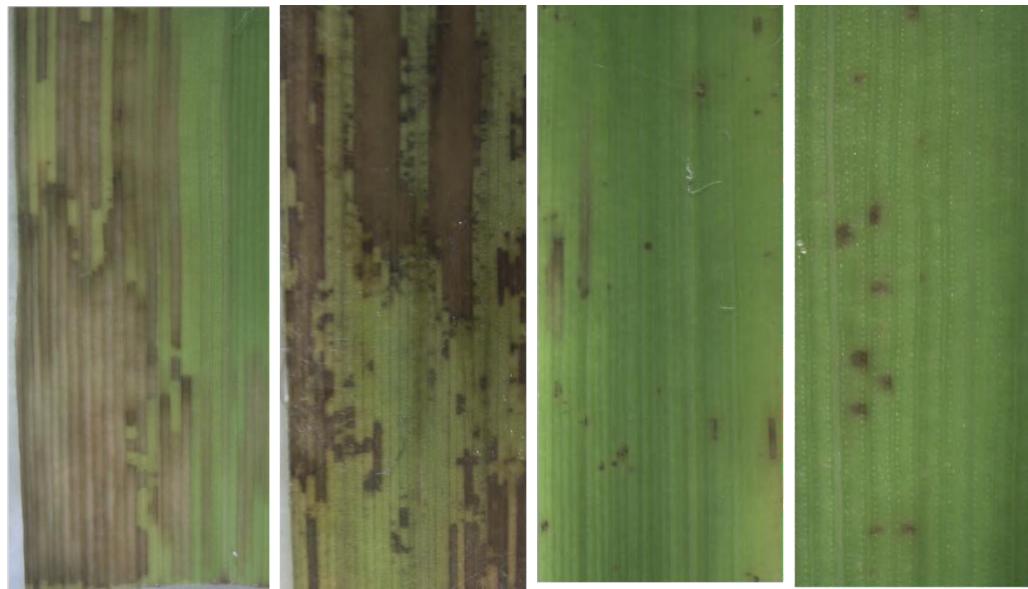
Telemaco variety  
Arborio type



Lower eating quality region

TELEMACO TEA Ris8imo

Laboratory tests proved a reduced susceptibility to blast after leaf inoculation



TELEMACO

TELEMACO TEA Ris8imo

We chose and propagated two «TELEMACO TEA» lines without transgene

These contain the following mutations:

- **Nome linea: TELEMACO TEA 1**
- -gene *Pi21*: delezione di 4 bp + inserzione di 1A frameshift
- -gene *HMA1*: delezione di 19 bp + inserzione di 1T frameshift
- -gene *HMA2*: inserzione di 1T e di 1 A frameshift
- 
- **Nome linea: TELEMACO TEA 2**
- -gene *Pi21*: delezione di 4 bp + inserzione di 1A frameshift
- -gene *HMA1*: inserzione di 1T + inserzione di 1T frameshift
- -gene *HMA2*: delezione di 74 bp – frameshift



# Regione Lombardia

## LA GIUNTA

---

DELIBERAZIONE N° XI / 7526

Seduta del 15/12/2022

---

Presidente **ATTILIO FONTANA**

Assessori regionali **FABRIZIO SALA** Vicepresidente  
**GUIDO BERTOLASO**  
**STEFANO BOLOGNINI**  
**DAVIDE CARLO CAPARINI**  
**RAFFAELE CATTANEO**  
**MELANIA DE NICHILIO RIZZOLI**  
**PIETRO FORONI**  
**STEFANO BRUNO GALLI**

**GUIDO GUIDESI**  
**ROMANO MARIA LA RUSSA**  
**ELENA LUCCHINI**  
**LARA MAGONI**  
**ALAN CHRISTIAN RIZZI**  
**FABIO ROLFI**  
**MASSIMO SERTORI**  
**CLAUDIA MARIA TERZI**

Con l'assistenza del Segretario Enrico Gasparini

Su proposta dell'Assessore Fabio Rolfi

Oggetto

DETERMINAZIONI IN ORDINE ALLA SPERIMENTAZIONE IN CAMPO APERTO DI NUOVE VARIETA' VEGETALI D'INTERESSE AGRARIO OTTENUTE CON NUOVE TECNICHE GENETICHE (NGT)

# LEGGI ED ALTRI ATTI NORMATIVI

DECRETO-LEGGE 14 aprile 2023, n. 39.

Disposizioni urgenti per il contrasto della scarsità idrica e per il potenziamento e l'adeguamento delle infrastrutture idriche.

Testo in vigore dal: **14-6-2023**

since 2023 in Italy fields trials are allowed

[aggiornamenti all'articolo](#)

Art. 9-bis

*(( (Disposizioni urgenti in materia di genetica agraria). ))*

*((1. Per consentire lo svolgimento delle attivita' di ricerca presso siti sperimentali autorizzati, a sostegno di produzioni vegetali in grado di rispondere in maniera adeguata a condizioni di scarsita' idrica e in presenza di stress ambientali e biotici di particolare intensita', nelle more dell'adozione, da parte dell'Unione europea, di una disciplina organica in materia, l'autorizzazione all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi prodotti con tecniche di editing genomico mediante mutagenesi sito-diretta o di cisgenesi a fini sperimentali e scientifici e' soggetta, fino al 31 dicembre 2024, alle disposizioni di cui al presente articolo.*

To notify the field trial the procedure is the same as that for GMOs except that there is no need to provide risk evaluation for agrobiodiversity

**La notifica deve comprendere:**

- a. un **fascicolo tecnico** contenente le informazioni di cui all'allegato III del decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224, "*Informazioni obbligatorie per la notifica*", necessarie per valutare il rischio ambientale connesso all'emissione deliberata dell'OGM, e in particolare:
  - 1) informazioni generali, comprese quelle relative al personale e alla sua formazione;
  - 2) informazioni relative all'OGM;
  - 3) informazioni relative alle condizioni di emissione e al potenziale ambiente ospite;
  - 4) informazioni sulle interazioni tra OGM e ambiente;
  - 5) un piano di monitoraggio conforme alle pertinenti parti dell'allegato III e diretto a individuare gli effetti dell'OGM sulla salute umana, animale e sull'ambiente;
  - 6) informazioni relative ai piani di controllo, ai metodi di bonifica, al trattamento dei rifiuti e ai piani di intervento in caso di emergenza;
  - 7) una **sintesi delle informazioni (SNIF)** di cui ai punti precedenti, redatta in lingua italiana e in lingua inglese in conformità alla [decisione 2002/813/CE del Consiglio del 3 ottobre 2002](#), che contenga anche tutte le informazioni di cui all'articolo 27, comma 4, del decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224;
- b. la **valutazione del rischio ambientale e le conclusioni** prescritte dall'allegato II, parte D del decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224, con i riferimenti bibliografici e l'indicazione dei metodi utilizzati, su supporto cartaceo ed informatico;
- c. la **valutazione del rischio per l'agrobiodiversità, i sistemi agrari e la filiera agroalimentare**, solo nel caso in cui la sperimentazione riguardasse una specie vegetale di interesse agronomico, secondo quanto stabilito dal decreto 19 gennaio 2005 "Prescrizioni per la valutazione del rischio per l'agrobiodiversità, i sistemi agrari e la filiera agroalimentare, relativamente alle attività di rilascio deliberato nell'ambiente di OGM per qualsiasi fine diverso dall'immissione sul mercato".

Stante quanto disposto dal comma 5 dell'articolo 9-bis, della [legge 13 giugno 2023, n. 68](#), per l'autorizzazione all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi vegetali prodotti con tecniche di editing genomico mediante mutagenesi sito-diretta o di cisgenesi a fini sperimentali e scientifici, il notificante non deve fornire la sopracitata valutazione del rischio per l'agrobiodiversità, i sistemi agrari e la filiera agroalimentare, prevista dal decreto 19 gennaio 2005.

to send a notification it is required to pay  
1549,37 euro

## Tariffe e modalità di pagamento

---

### Emissione deliberata nell'ambiente di OGM per qualsiasi fine diverso dell'immissione sul mercato

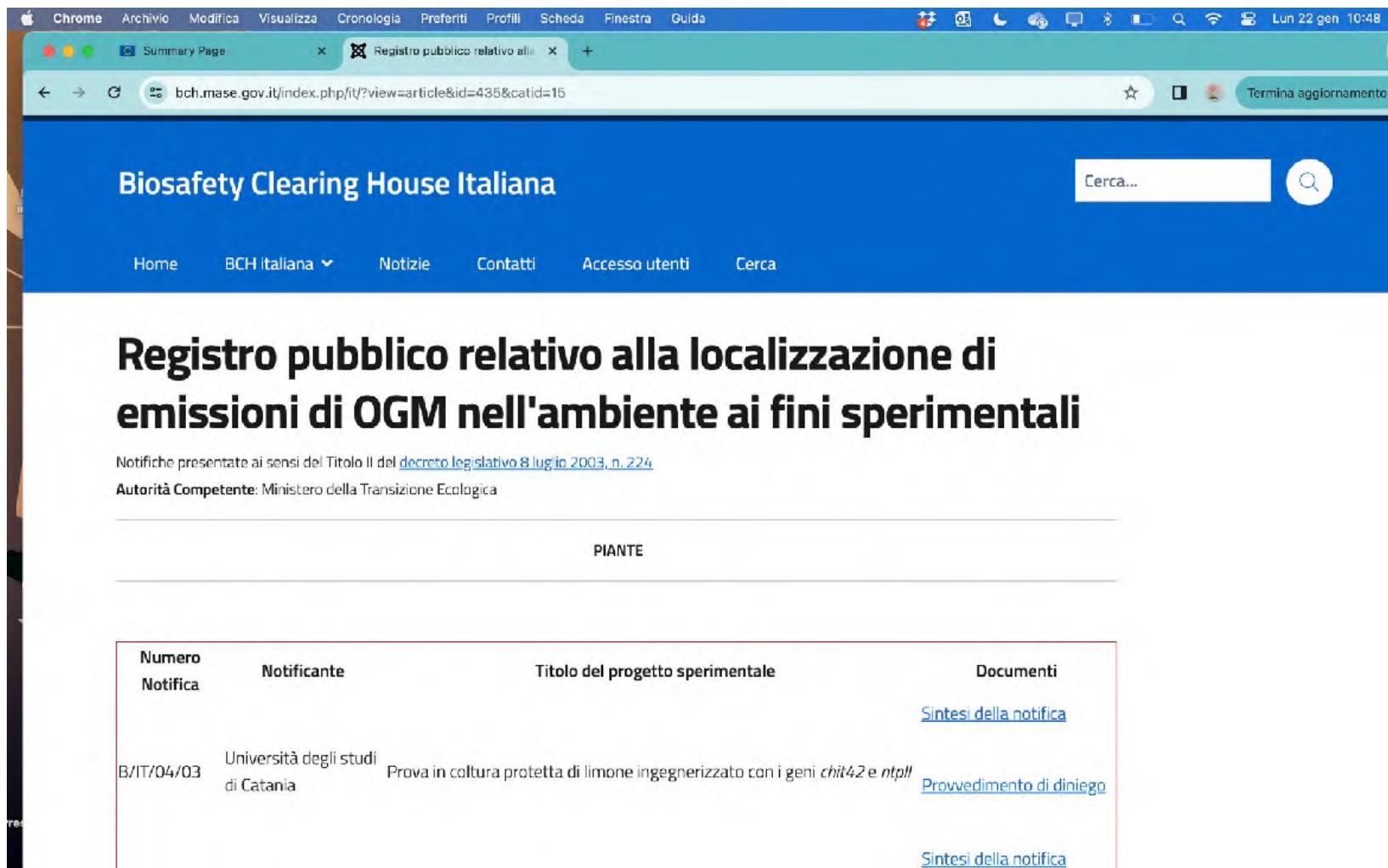
La presentazione di una notifica al Ministero dell'ambiente e della sicurezza energetica per l'emissione deliberata nell'ambiente di un OGM a scopo sperimentale prevede il pagamento di due distinte tariffe.

Dal 1° gennaio 2025, secondo quanto disposto con [Circolare RGS del 16/12/2024, n. 41](#), tali pagamenti devono essere effettuati sul conto corrente della Tesoreria Unica della Banca d'Italia:

- 1. Pagamento di € 1549,37**, per l'istruttoria della notifica, effettuato a cura del notificante sul conto corrente della Tesoreria Unica della Banca d'Italia (Capitolo 2592/12 CAPO 32, CODICE IBAN IT98T0100003245BE00000001ZM);
- 2. Pagamento di € 51,65**, per il rilascio del provvedimento di autorizzazione o diniego, effettuato a cura del notificante sul conto corrente della Tesoreria Unica della Banca d'Italia (Capitolo 2592/12 CAPO 32, CODICE IBAN IT98T0100003245BE00000001ZM).

Per entrambi i pagamenti deve essere riportata la seguente causale: *Notifica di emissione deliberata nell'ambiente di OGM a scopo di ricerca e sviluppo (art. 38 D.Lvo n. 224/2003), cap. 2592, art. 12, Ministero dell'Ambiente e della sicurezza energetica.*

Last notification of GMO plants before ours was from 2004 and was rejected

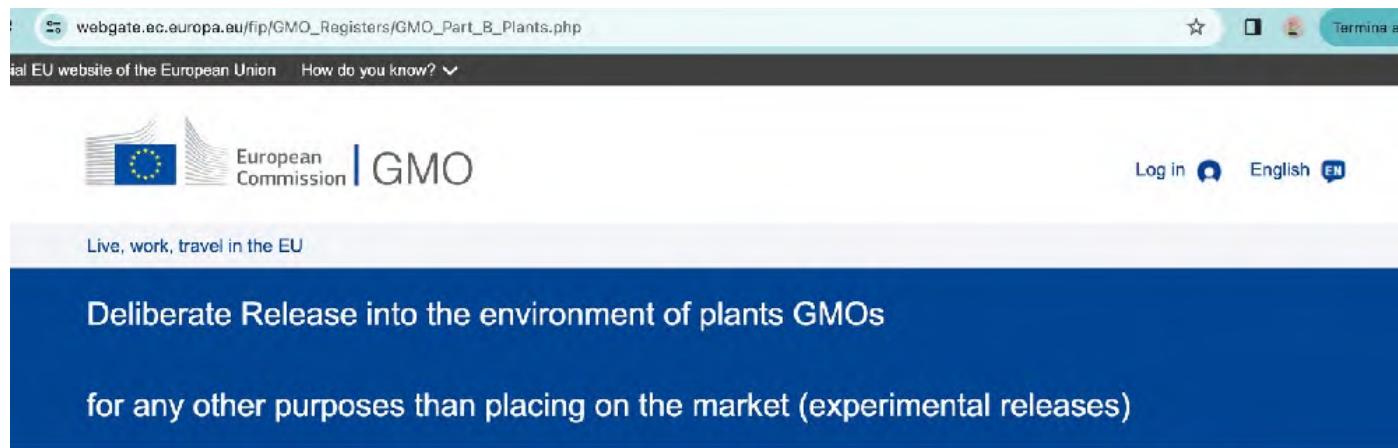


The screenshot shows a Chrome browser window with the following details:

- Address Bar:** bch.mase.gov.it/index.php/it/?view=article&id=435&catid=15
- Page Title:** Registro pubblico relativo alla localizzazione di emissioni di OGM nell'ambiente ai fini sperimentali
- Header:** Biosafety Clearing House Italiana, Home, BCH Italiana, Notizie, Contatti, Accesso utenti, Cerca
- Content:** Registro pubblico relativo alla localizzazione di emissioni di OGM nell'ambiente ai fini sperimentali. Notifiche presentate ai sensi del Titolo II del [decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224](#). Autorità Competente: Ministero della Transizione Ecologica.
- Section:** PIANTE
- Table:** A table showing a single notification entry:

Numero Notifica	Notificante	Titolo del progetto sperimentale	Documenti
B/IT/04/03	Università degli studi di Catania	Prova in coltura protetta di limone ingegnerizzato con i geni <i>chit42</i> e <i>ntp11</i>	<a href="#">Sintesi della notifica</a> <a href="#">Provvedimento di diniego</a>

exact location of experimental field has to be published online even before approval- requirement of the Italian law



The screenshot shows a web browser window with the URL [webgate.ec.europa.eu/fip/GMO\\_Registers/GMO\\_Part\\_B\\_Plants.php](http://webgate.ec.europa.eu/fip/GMO_Registers/GMO_Part_B_Plants.php). The page is titled 'Deliberate Release into the environment of plants GMOs' and 'for any other purposes than placing on the market (experimental releases)'. The header includes the European Commission logo and links for 'Log in' and 'English'. The main content area displays a table of data, with the first row visible. The table includes columns for 'Notification Number', 'Member State', 'Publication', and 'Consent given by the Member State Competent Authority'. The 'Member State' column shows 'Italy' and the 'Consent given by the Member State Competent Authority' column shows 'Not known'. The 'Additional filters' section on the left lists 'Name of the Institutes or Companies', 'Project title', and 'Notification Number', all of which are currently empty.

Notification Number	Member State	Publication	Consent given by the Member State Competent Authority
BIT/24/01	Italy	20/01/2024	Not known

Additional filters

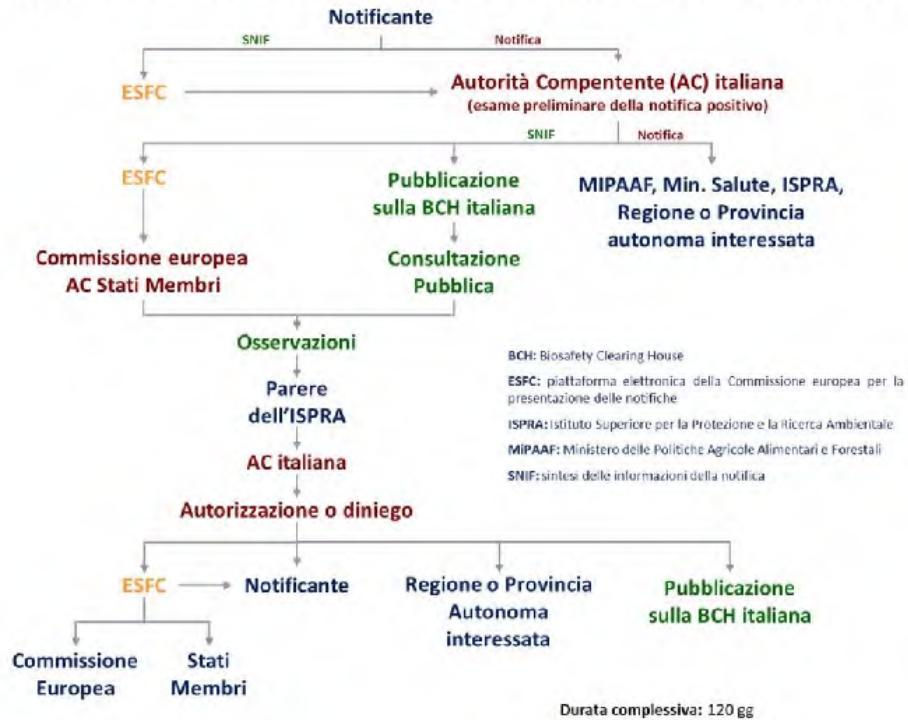
Name of the Institutes or Companies: Università degli Studi di Milano

Project title: Field trial of NGT1/TEA rice experimental lines for resistance to rice blast

Notification Number

# subsequently, the EXACT location is also published on the Ministry of the Environment website

## PROCEDURA DI AUTORIZZAZIONE AI SENSI DEL TITOLO II DEL DECRETO LEGISLATIVO n. 224/2003



- Pubblico registro delle notifiche presentate in Italia (vedi anche GMO Register della Commissione europea)
- Modalità di presentazione delle notifiche per l'emissione deliberata nell'ambiente di OGM a scopo sperimentale

1a

GEOLOCALIZZAZIONE è richiesta da:  
**-decreto legislativo n. 224/2003 -art. 12, comma 6, art. 27, comma 4, articolo 30, comma 1, e allegato III B e -Consiglio 813 del 2002 che stabilisce il modello del Summary Notification Information Format**

On the 2nd of January we submitted an application to plant our **Ris8imo** rice plants in Federico Radice Fossati farm in Lomellina (PAVIA)



FONDAZIONE BUSSOLERA BRANCA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE  
E AMBIENTALI - PRODUZIONE,  
TERRITORIO, AGROENERGIA



Pi21  
HMA2  
HMA1

**AL Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica**  
DIREZIONE GENERALE PATRIMONIO NATURALISTICO E MARE  
Al Capo Dipartimento amministrazione generale, pianificazione e patrimonio naturale (DiAG) dott.ssa Loredana Gulino DiAG@mase.gov.it

**NOTIFICA RELATIVA ALLA RICHIESTA DI EMISSIONE IN PIENO CAMPO DI PIANTE DI RISO TEA (prodotto tramite Tecniche di Evoluzione Assistita) DEL TIPO NGT-1 (New Genomic Techniques di categoria 1)**, in coerenza con il Titolo II del decreto legislativo 8 luglio 2003, n. 224, per organismi prodotti con tecniche di **editing genetico** e del comma 5 dell'articolo 9-bis, della legge 13 giugno 2023, n. 68, per l'autorizzazione all'emissione deliberata nell'ambiente di organismi prodotti mediante **mutagenesi sito-diretta** o di cisgenesi a fini sperimentali e scientifici.  
Secondo le indicazioni contenute nell'allegato III del decreto legislativo 8 luglio 2003 numero 224.

**ACRONIMO: *RIS8imo***

Richiesta di sperimentazione in pieno campo con riso (*Oryza sativa*) della tipologia NGT-1, varietà Telemaco con delezioni in nei geni **Pi21, HMA1 e HMA2**.  
In coerenza con la legge 68/2023 che recita "Per consentire lo svolgimento delle attività di ricerca presso siti sperimentali autorizzati, a sostegno di produzioni vegetali in grado di rispondere in maniera adeguata a condizioni di scarsità idrica e in presenza di stress ambientali e biotici di particolare intensità, nelle more dell'adozione, da parte dell'Unione europea, di una disciplina organica in materia"  
In coerenza con la Deliberazione N° XI / 7526 Seduta del 15/dicembre/2022 della Regione Lombardia

# On the 27th of march we received authorization



## Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica

DIREZIONE GENERALE PATRIMONIO NATURALISTICO E MARE

IL DIRETTORE GENERALE

All'Università degli Studi di Milano  
Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali,  
Produzione, Territorio e Agroenergia  
c.a. responsabile della sperimentazione prof.ssa Vittoria Francesca Brambilla  
direzione.disaa@pec.unimi.it  
direttore.disaa@unimi.it  
vittoria.brambilla@unimi.it

Alla Regione Lombardia  
Direzione Generale Agricoltura, Sovranità Alimentare e Foreste  
c.a. dott. Andrea Massari  
agricoltura@pec.regione.lombardia.it

c.a. dott.ssa Elena Brugna  
elena\_brugna@regione.lombardia.it

e, p.c., Al Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste  
Direzione generale dello sviluppo rurale  
c.a. dott.ssa Simona Angelini  
cosvir.direzione@pec.politicheagricole.gov.it

Al Ministero della Salute  
Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione  
c.a. dott. Ugo Della Marta  
dgsan@postacert.sanita.it

**Oggetto: Notifica B/IT/24/01 per l'emissione deliberata nell'ambiente di OGM per qualsiasi fine diverso dall'immissione sul mercato ai sensi dell'articolo 9-bis del decreto-legge 14 aprile 2023, n. 39, convertito con modificazioni dalla legge 13 giugno 2023, n. 68 – Rilascio del provvedimento di autorizzazione**

Si trasmette in allegato il provvedimento in oggetto con cui si autorizza codesto Dipartimento a effettuare la sperimentazione concernente prove in pieno campo con piante di riso varietà "Telemaco", modificate con tecniche di *editing* del genoma in grado di incrementarne la tolleranza

Div. IV/MA/mb  
ID Utente: 7106  
ID Documento: PNM\_04-7106\_2024-0025  
Data stessa: 11/03/2024

✓ Resp. Div.: Andreella M.  
Ufficio: PNM\_04  
Data: 26/03/2024



FONDAZIONE BUSSOLERA BRANCA



# **SPERIMENTAZIONE DI RISO «RIS8imo» TEA**

Notifica «B/IT/24/01» autorizzata dal Ministero dell'Ambiente e della Sicurezza Energetica in data 27 marzo 2024 per l'emissione deliberata nell'ambiente di OGM per qualsiasi fine diverso dall'immissione sul mercato ai sensi dell'articolo 9-bis del decreto-legge 14 aprile 2023, n. 39, convertito con modificazioni dalla legge 13 giugno 2023, n. 68

on the 13th of may be brought the plants to the field





NEWS | 28 January 2024

# Green shoots of hope for Italy's first gene-edited crop field trial

Temporary relaxing of regulations brings request for outdoor trial of fungus-resistant rice variety.

By [Anna Meldolesi](#)[Leggi in italiano](#)

Israele Governo Meloni

# CI VUOLE UNA SCIENZA

**"POST****Cosa vuol dire davvero "farmaco carente"**Listen to this episode from Ci vuole una scienza on Spotify. Negli ultimi giorni si è parlato molto della... [open.spotify.com](#)**IL FOGLIO**

Editoriali Leggi il Foglio News

L'ANALISI

## Il riso della vittoria. Dopo aver perso il treno degli ogm, l'italia prenda quello delle Tea

DI ROBERTO DEFEZ / 31 GEN 2024

**Rai Radio 3 | Canale | RaiPlay Sound**Cultura, musica e approfondimenti. Segui la diretta di Rai Radio 3, scopri i podcast e i tuoi programmi preferiti.  
[www.raiplaysound.it](#)dalle 11.30 in poi Vittoria a Radio 3 Scienza: <https://www.raiplaysound.it/radio3>

11:54



in the night of the 21st of June 2024 unknown vandals destroyed the field



# Distrutto! Vandals destroy experimental rice field in Italy



KamounLab · Follow  
6 min read · 3 days ago



FAMIGLIA VITA ECONOMIA CIVILE OPINIONI NEWSLETTER PODCAST

Home Economia

Bes - Lavoro - Motori - Risparmio - Sviluppo futuro

**Agricoltura. Un attacco vandalico ha compromesso la sperimentazione del riso Tea**

Paolo Viana venerdì 23 giugno 2024

SCIENZA ECONOMIA CULTURA GADGET SECURITY DIRITTI IDEE VIDEO PODCAST WIRED CONSIGLI

PIETRO DERAGNI IL CASO 21.06.2024

## Riso Tea, il primo campo in Italia è stato distrutto

Si trova in provincia di Pavia, è gestito dalla Statale di Milano e serve a sperimentare le potenzialità di questa tecnologia, alternativa agli ogm

**Sconcerto e tristezza: distrutto il primo campo TEA italiano**



'POST

ITALIA Venerdì 23 giugno 2024

**È stata distrutta una coltivazione sperimentale di riso in provincia di Pavia**

Era stata realizzata dall'Università Statale di Milano ed era il primo esperimento in campo autorizzato sui nuovi metodi di modifica genetica: qualcuno ha rimosso le protezioni e distrutto le piante

[Commenta](#) [Condividi](#)



## DISTRUTTA LA RISAIA TEA

da admin | 23 Giu 2024 | NEWS



Radio3 Scienza  
@Radio3scienza

"Il riso Telemaco #RisoBimo è stato ottenuto con le tecniche di evoluzione assistita, non è un OGM. In una notte è stato distrutto il campo frutto del lavoro di anni del nostro gruppo e degli agricoltori, per cui questo riso è stato pensato" @vittoriabr @LaStatale



IL FOGLIO  
quadriportico

zioni europee

Podcast Editoriali Leggi il Foglio

RISO AMARO

**Gli ecoterroristi responsabili di aver distrutto i campi sperimentali di riso Tea non prevarranno**

DI ROBERTO DEFEZ / 22 GIU 2024

[Facebook](#) [Twitter](#) [Stampa](#)

**Sconcerto e tristezza: distrutto il primo campo TEA italiano**

# some plants survived but the experiment was not significant



15th of July 2024



17th of September 2024

«La Commissione Industria e Agricoltura del Senato ha accolto l'emendamento del DL Agricoltura presentato da Luca De Carlo e Giorgio Bergesio che proroga la sperimentazione in campo delle Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) fino al 31 dicembre 2025»

we collected seeds and started  
working for a Ris8imo - bis



# We applied for a Ris8imo bis with more varieties

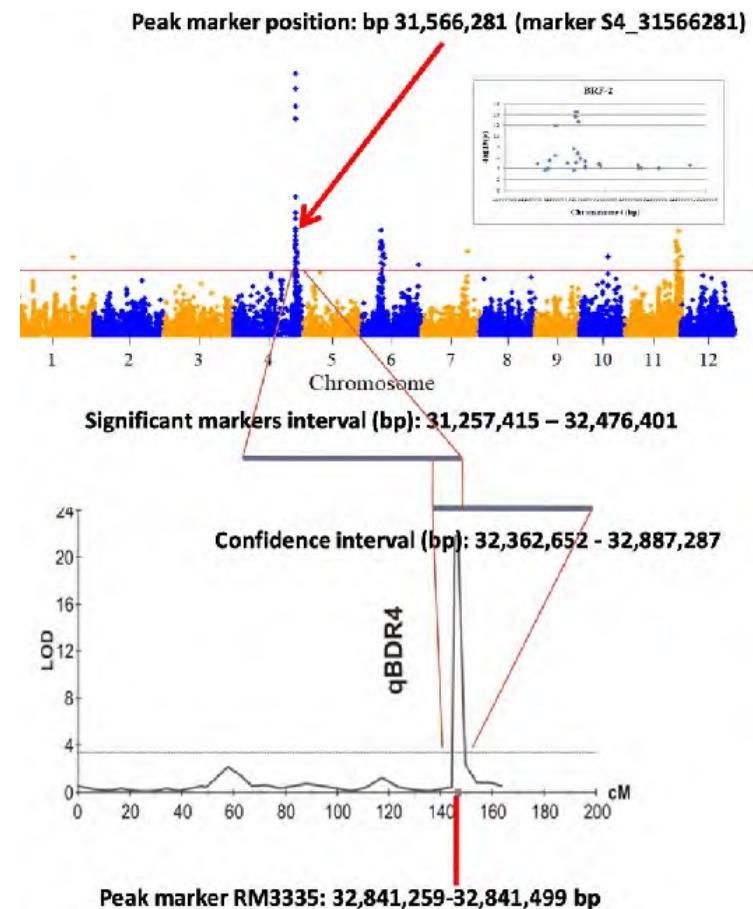
- **Nome linea: VIALONE NANO TEA 1\***  
-gene *Os04g0621500*: delezione di 2bp
- 
- **Nome linea: TOMMASO TEA 1**  
-gene *Pi21*: inserzione di 1A;  
-gene *Gn1a/OsCKX2* delezione di 5bp;
- 
- **Nome linea: TOMMASO TEA 2**  
-gene *Pi21*: inserzione di 1A;  
-gene *Gn1a*: delezione di 2bp
- 
- **Nome linea: TOMMASO TEA 3**  
-gene *Pi21*: inserzione di 1A;  
-gene *Gn1a* delezione di 5 bp
- 
- **Nome linea: PACIFICO TEA 1**  
-gene *Pi21*: inserzione di 1G;  
-gene *Gn1a*: sequenza identica al *wt*
- 
- **Nome linea: PACIFICO TEA 2**  
-gene *Pi21*: inserzione di 1A;  
-gene *Gn1a*: inserzione di 1C;

APPLICATION NUMBER: B/IT/25/01

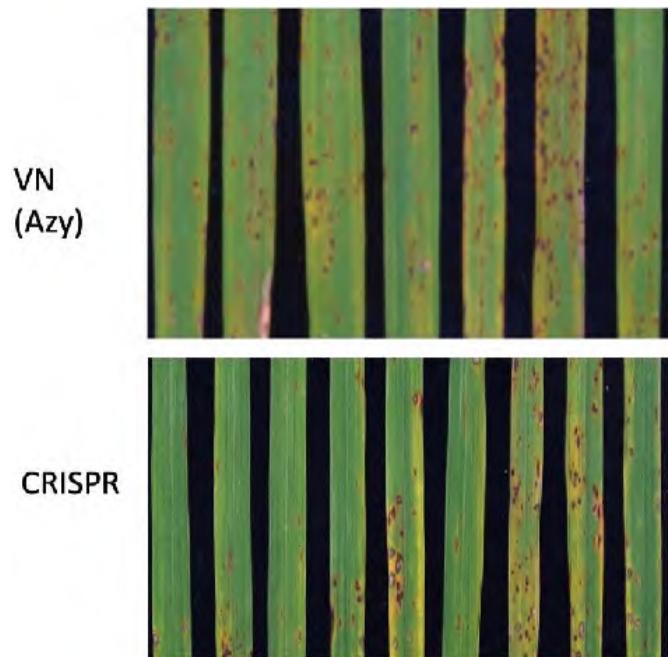
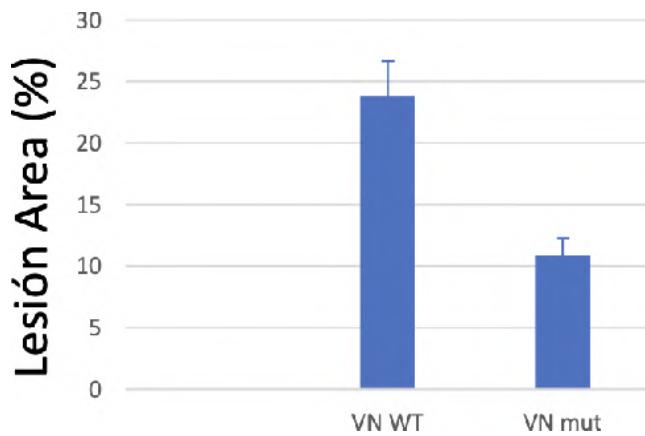
# \*Another gene possibly involved in blast resistance

collaboration with:

- Giampiero valè Università del Piemonte Orientale, Vercelli
- Blanca San Segundo CRAG, Barcellona, Spagna



# CRISPR lines show increased resistance to leaf inoculation in the lab



# opponents publish the sites online

Food and Feed Information Portal

ec.europa.eu/food/food-feed-portal/screen/gmob/search/details/POL-GMOB-12341

General information

Genetically modified plant

Genetic modification

Experimental release

Environmental Impact and Risk Management

European Commission Administrative Information

Final report

Is the recipient or parental plant a forest tree species? No

## Experimental Release

Purpose of the release: The purpose of the release is to verify in a field trial the tolerance to rice blast of plants carrying deletions compared to their parental lines, when no fungicides are applied during the cultivation period.

Geographical location of the site: Società Agricola Federico Radice Fossati, Mezzana Bigli (PV), Lombardia - 45°03'38.5"N 8°51'10.5"E; Ente Ris, azienda agricola di Castello d'Agogna (PV), Lombardia - 45°14'46.1"N 8°41'58.2"E; Società Agricola Lovat S.S., Cascina Cavallina, Borgolavezzaro (NO), Piemonte - 45°18'22.8"N 8°41'01.1"E.

Size of the site (m<sup>2</sup>): 304m<sup>2</sup> per site

Relevant data regarding previous releases carried out with the same GM-plant, if any, specifically related to the potential environmental and human health impacts from the release: Iletemaco TEA1 and Iletemaco TEA2 plants have already been released following authorization from the Italian Ministry of environment (MASE-notification B/II/24/C1).

## Environmental Impact and Risk Management

Questo documento è di proprietà della CROCEVIA

Questa mappa riporta le coordinate geografiche così come dichiarate nelle richieste depositate al Ministero dell'Ambiente da enti pubblici e 218 visualizzazioni. Pubblicato 13 giorni fa.

CONDIVIDI

Sperimentazioni di nuovi OGM/TEA (NGT)

- Vite OGM/TEA
- Pomodoro OGM/TEA
- Vite OGM/TEA
- Vite OGM/TEA
- Riso OGM/TEA
- Riso OGM/TEA
- Riso OGM/TEA
- Riso OGM/TEA

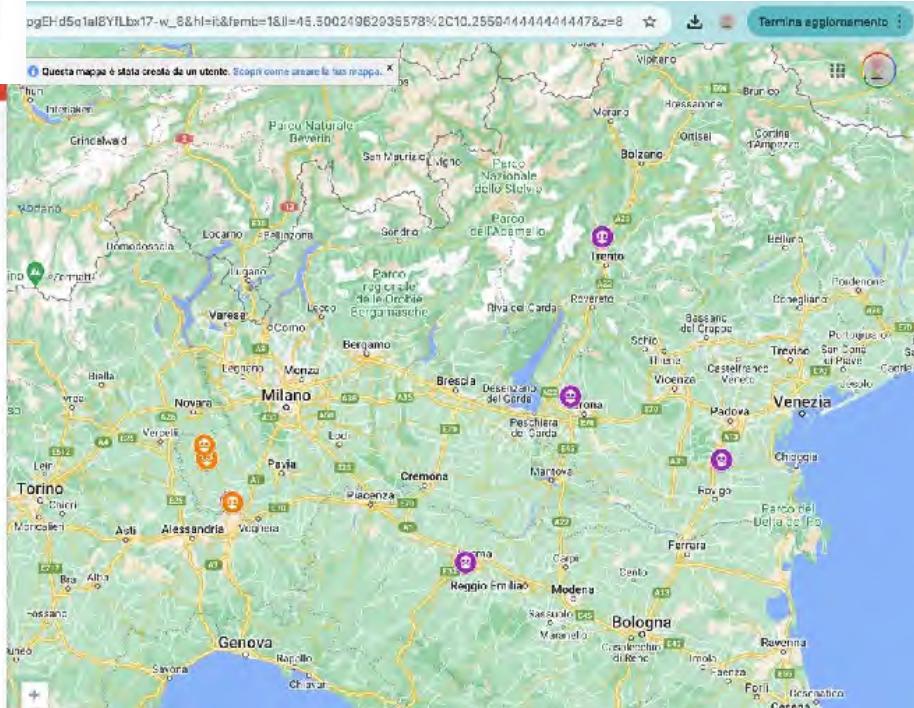
crocevia.it/mappa-delle-sperimentazioni-di-nuovi-ogm

CROCEVIA

1 febbraio 2024

## Mappa delle sperimentazioni di nuovi OGM

L'Italia è tra i paesi che più stanno tentando di accelerare lo sviluppo dei **nuovi OGM / TEA**, grazie a **sperimentazioni in pieno campo** portate avanti da enti con interessi sovrappponibili a quelli dell'agricoltura industriale e delle multinazionali agrochimiche e sementiere. In questa mappa sono raccolte le posizioni dei campi sperimentali già approvati (viola) o ancora oggetto di istruttoria (arancione), dove i test di nuovi OGM dovrebbero svolgersi.



on the 30th of September 2024 the group of Sara Zenoni and Mario Pezzotti planted in Valpolcella (VR) the first field trial with genome edited grapevine, resistant to downy mildew

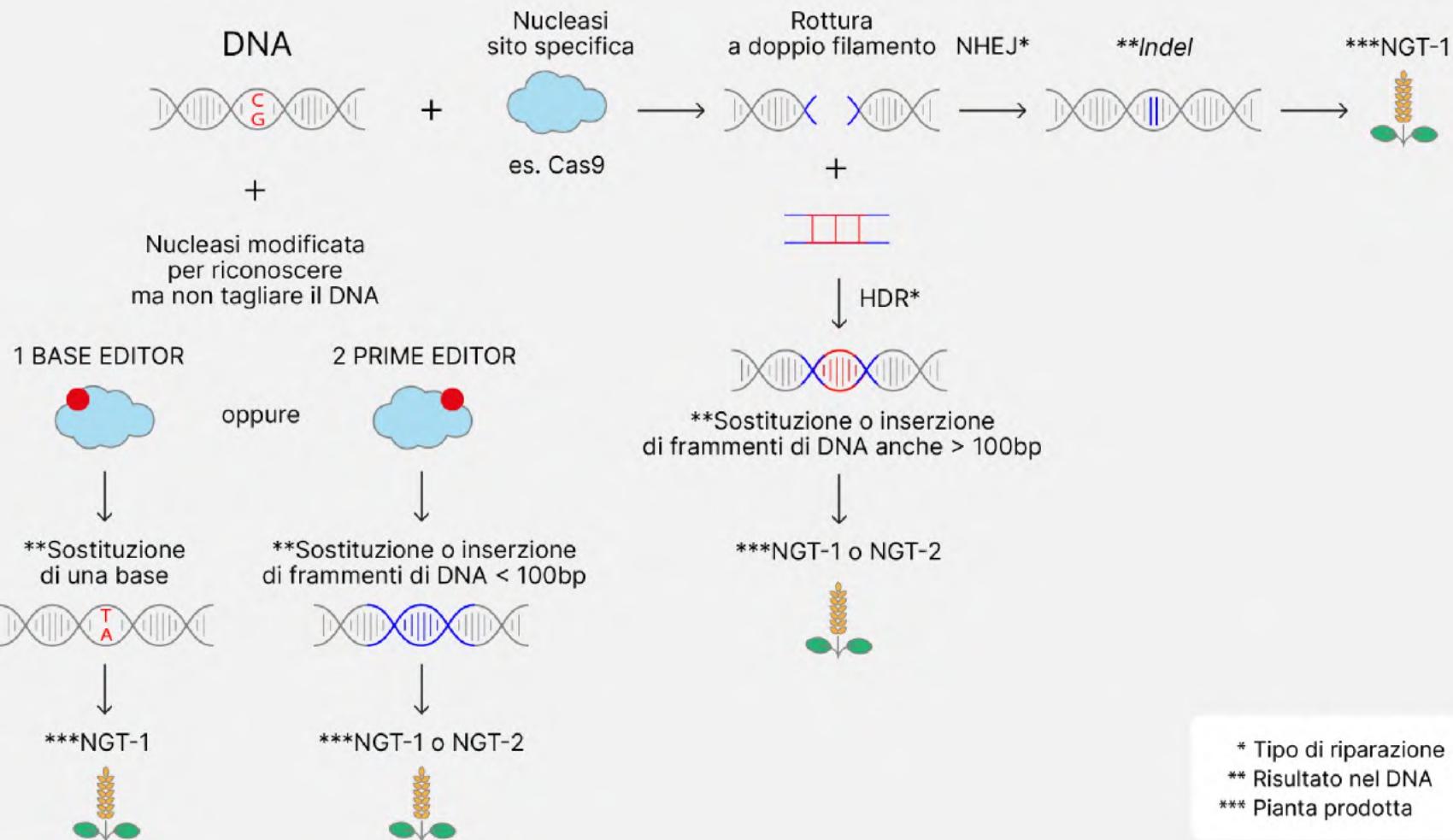


november 2024

Destroyed by  
unknown  
vandals on  
the 13th of  
February 2025



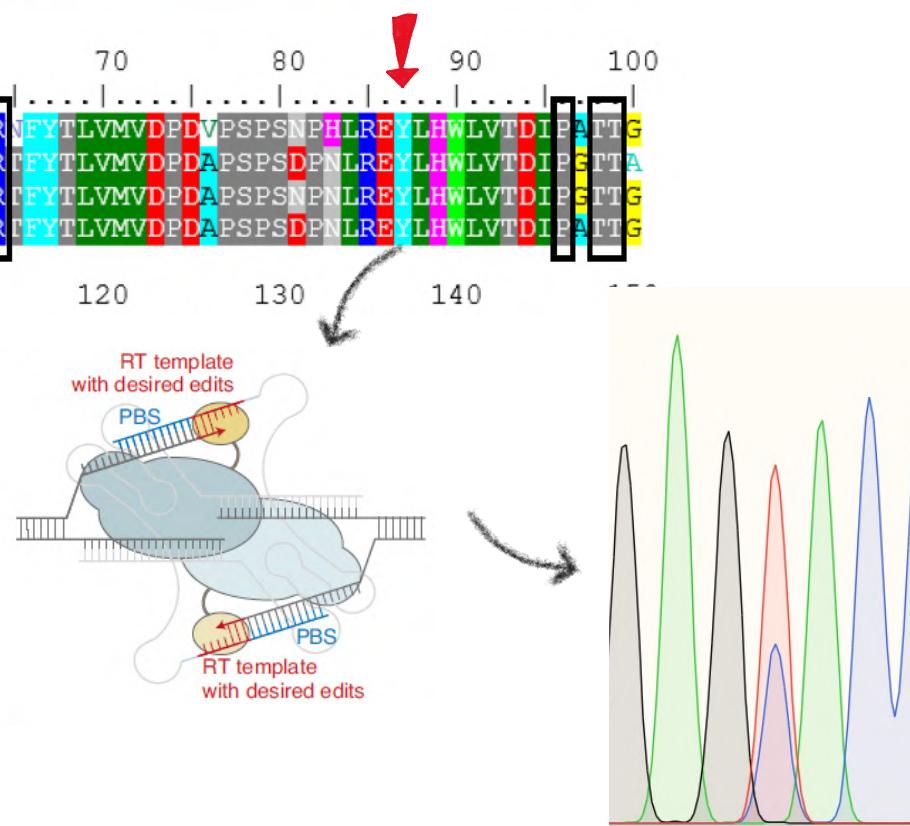
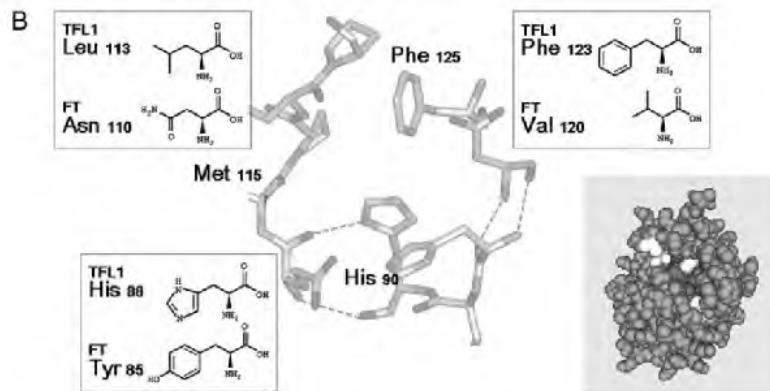
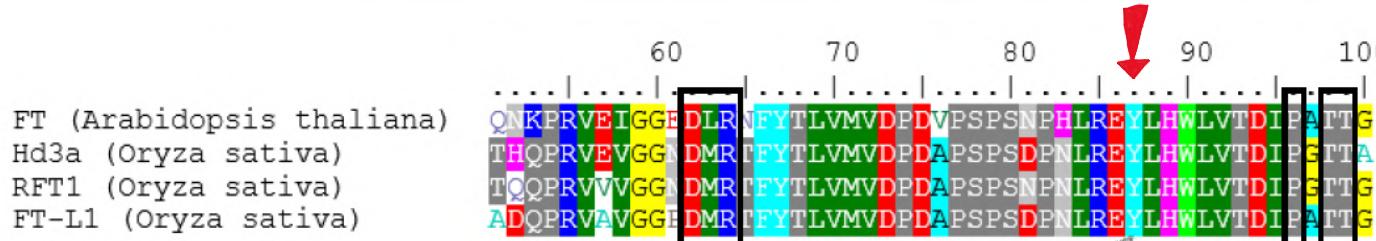
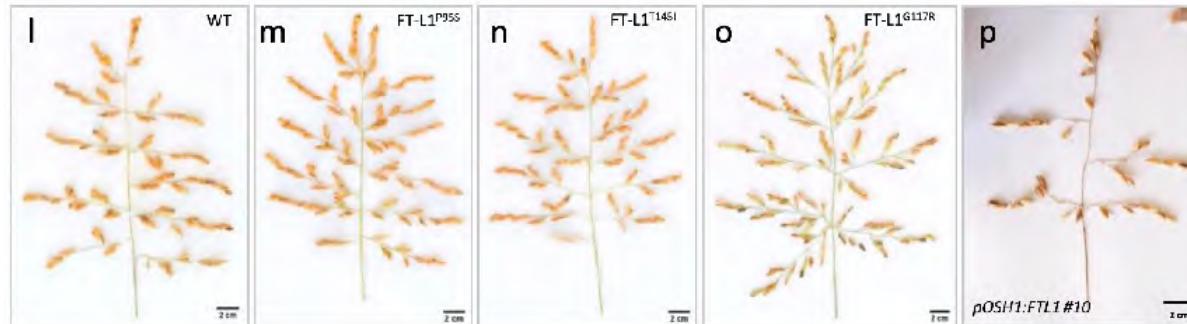
# BEYOND SINGLE GENES KNOCK OUT





# PRIME EDITING TO ACHIEVE AN AMINOACIDIC SUBSTITUTION IN OSFT-L1 AND IMPROVE SEED NUMBER PER PANICLE

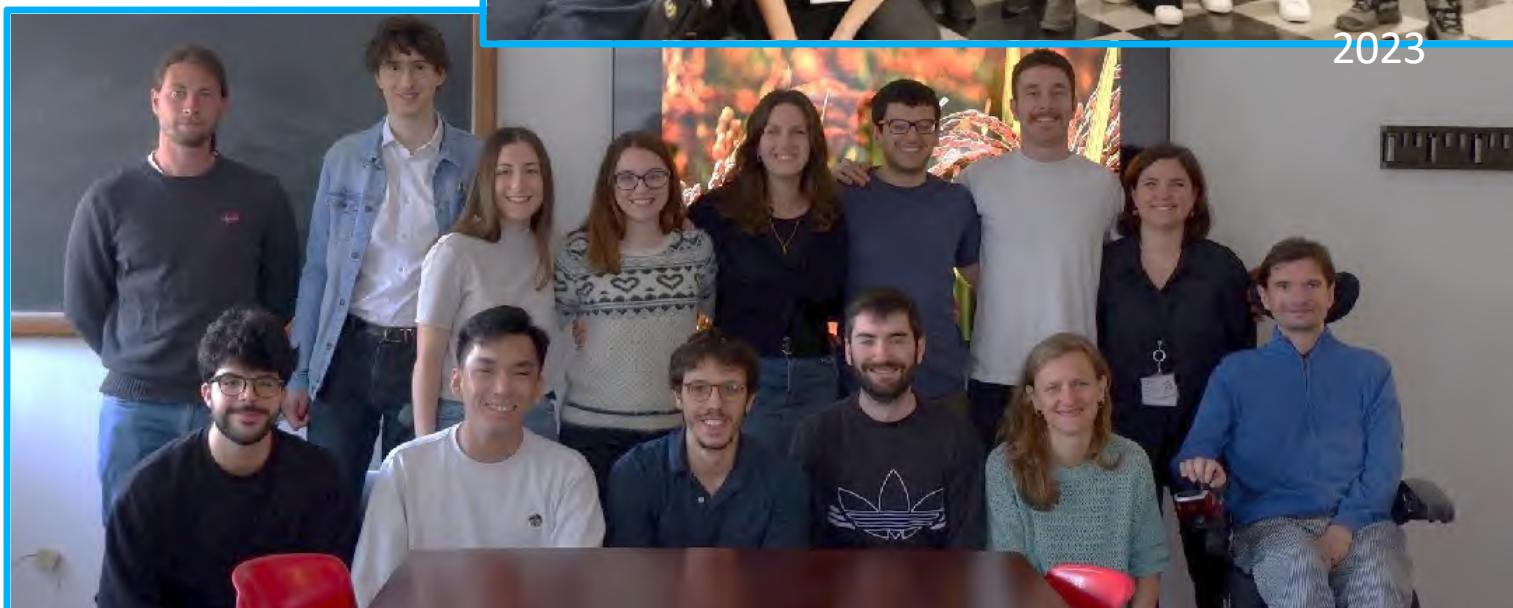
Giulia Ave Bono



thanks to the young researchers of the lab and  
to you for your attention



2023



WEBSITE (soon online) [www.ricelab.unimi.it](http://www.ricelab.unimi.it)

**Subgroup on New Genomic Techniques  
(NGTs)**

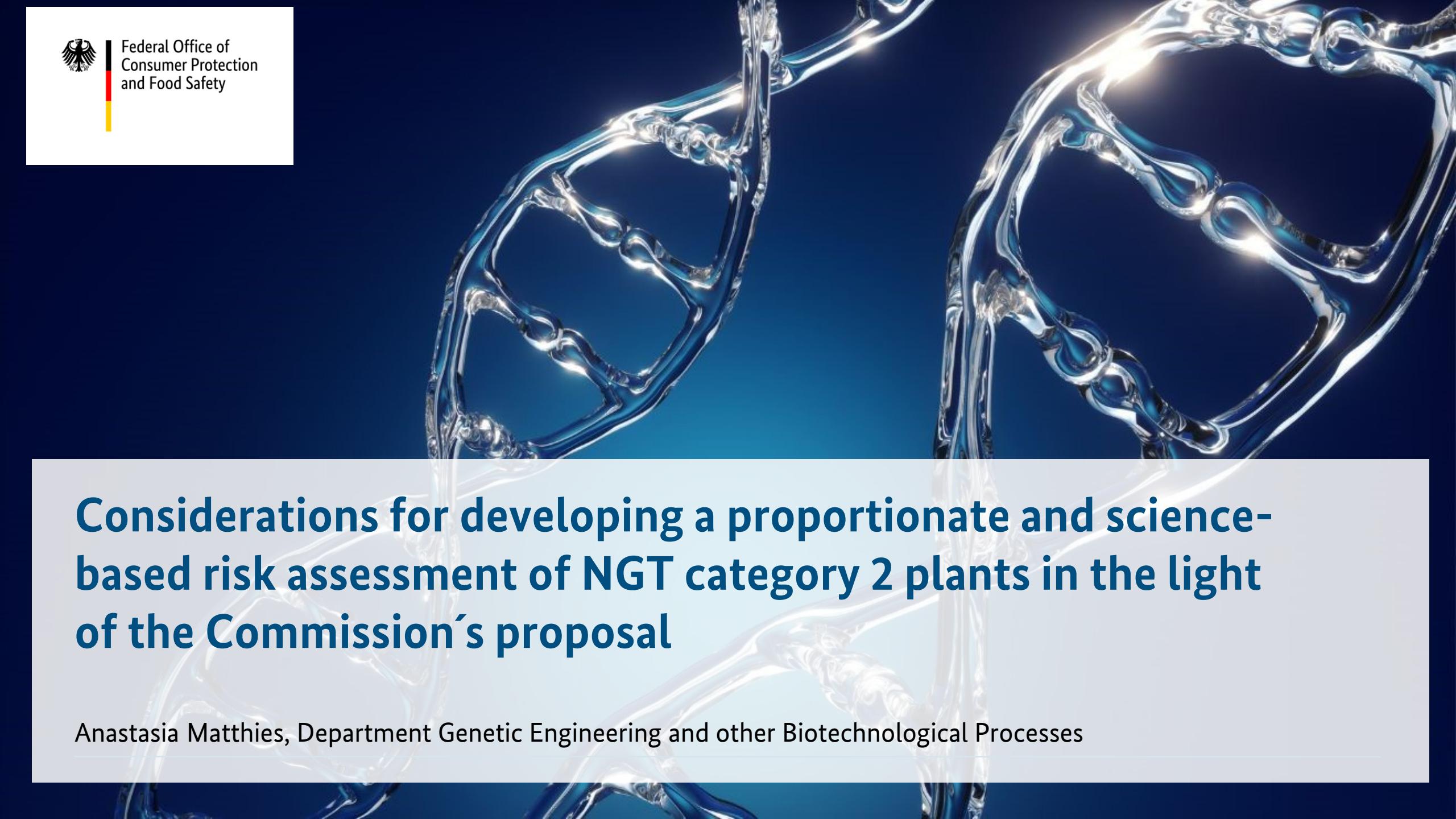
**2nd meeting**

**14 May 2025**

**Item 8**

*Considerations for developing a proportionate  
and science-based risk assessment of NGT  
plants in the light of the Commission's proposal*

Federal Office of Consumer Protection and  
Food Safety (BVL) (Germany)



# **Considerations for developing a proportionate and science-based risk assessment of NGT category 2 plants in the light of the Commission's proposal**

Anastasia Matthies, Department Genetic Engineering and other Biotechnological Processes



### Can we use existing guidelines and adapt them to the new regulation by simply omitting certain requirements?

- Exercise on ticking the requirements of the guidance material using NGT plant case studies
- did not work well - too many "if" and "in case of" - impossible to omit requirements in general due to big variety of possible traits/editings .
- Actual guidance materials are based on the assumption that a transgene is always introduced, i.e. that there is a specific, characterized hazard . This allows for certain test hypotheses and thus specific requirements for risk assessment.



For the NGT, we need a separate approach that is more case specific.  
Generally applicable requirements will not be possible.



### Consideration of scientific and regulatory frameworks for tailoring of appropriate risk assessment

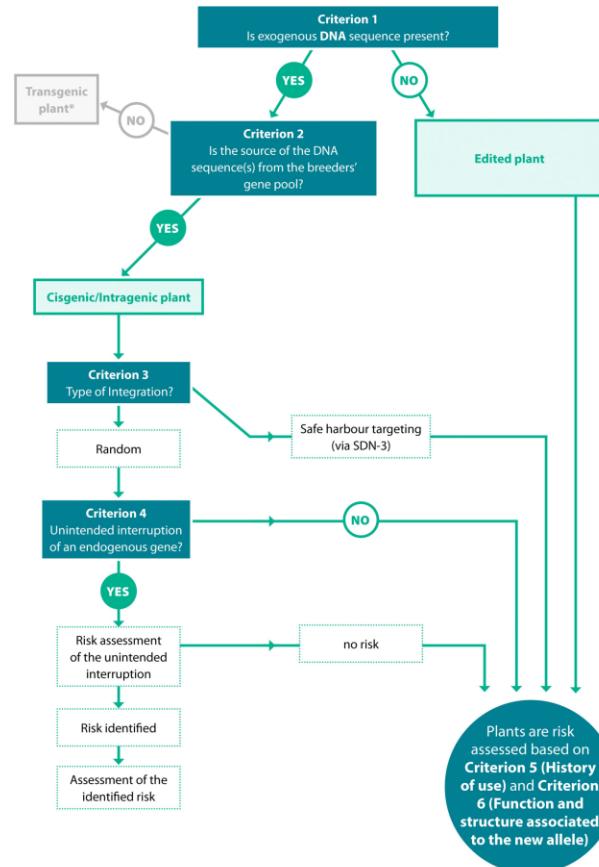
#### Scientific principles of risk assessment

- A science-based approach
- Case-specific
- Principle of problem formulation and hazard identification
- Tiered approach

#### Regulatory circumstances

- Political reality reflected in compromises
- Possible strict specifications for risk profiles
- Exemptions/specific regulatory requirements for certain NGT-trait, e.g. HR

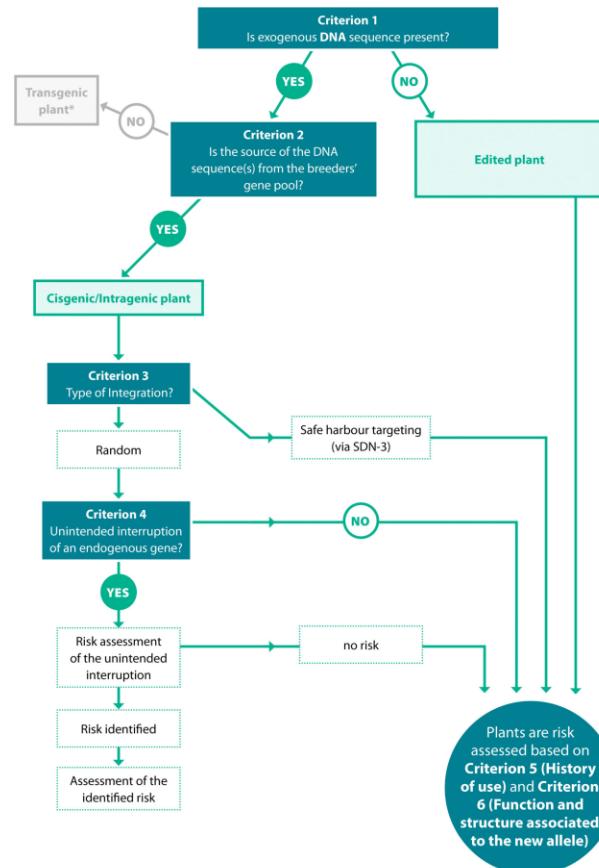
## Consideration of scientific and regulatory frameworks for tailoring of appropriate risk assessment



Proposal for a

**REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL  
on plants obtained by certain new genomic techniques and their food and feed, and  
amending Regulation (EU) 2017/625**

## Consideration of scientific and regulatory frameworks for tailoring of appropriate risk assessment

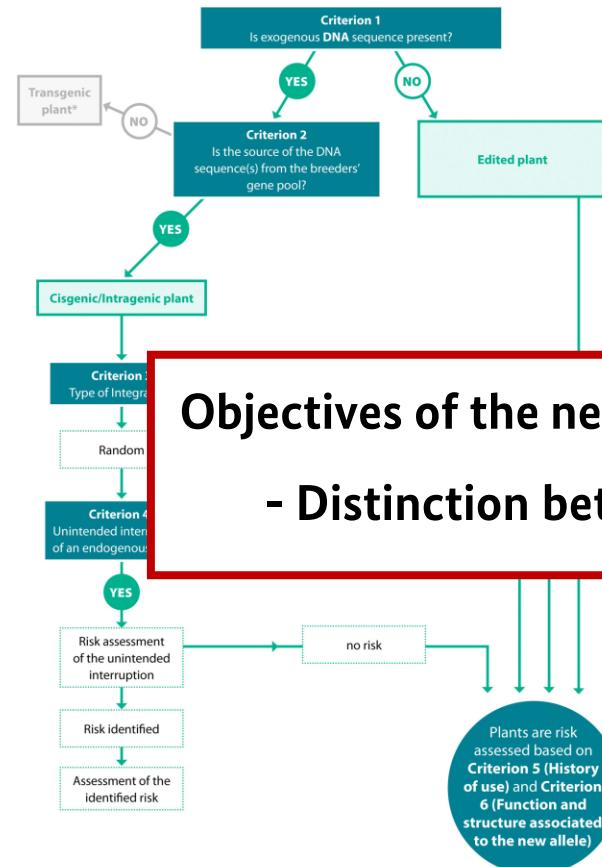


Proposal for a

### REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on plants obtained by certain new genomic techniques and their food and feed, and amending Regulation (EU) 2017/625

- provides a basic structure within risk assessment should take place.
- set out in Annexes I and II.

## Consideration of scientific and regulatory frameworks for tailoring of appropriate risk assessment



Proposal for a

### REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

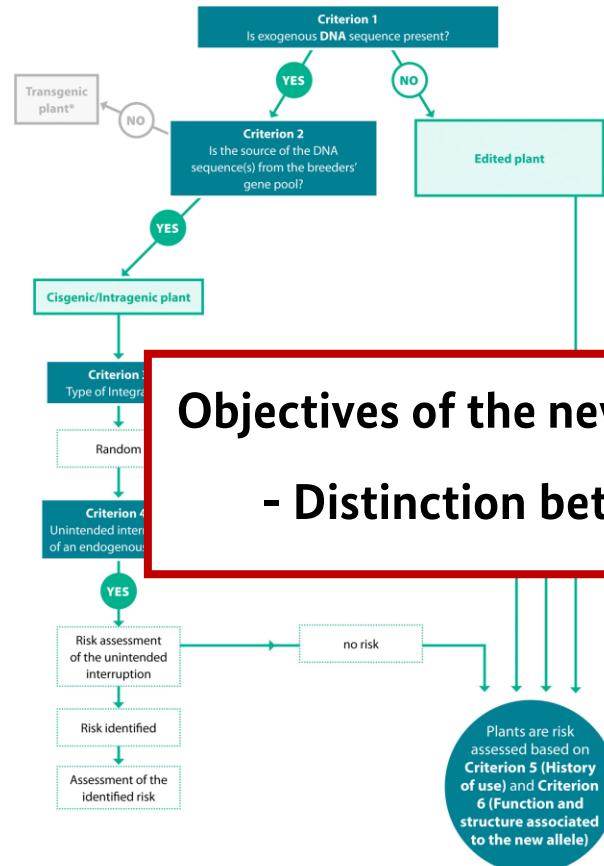
Objectives of the new regulation: to be appropriate to certain risk profiles

- Distinction between NGT Category 1 and NGT Category 2 plants

should take place.

- set out in Annexes I and II.

## Consideration of scientific and regulatory frameworks for tailoring of appropriate risk assessment



Proposal for a

### REGULATION OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL

Objectives of the new regulation: to be appropriate to certain risk profiles

- Distinction between NGT Category 1 and NGT Category 2 plants

their food and feed, and

assessment

What is the framework for a  
proportionate risk assessment for  
NGT category 2 plants set out in the  
Commission proposal?

EUROPEAN COMMISSION, 2023

EFSA, 2022



## General framework and principles for risk assessment of NGT category 2 plants

### Part 1

- defines general principles of risk assessment (hazard identification and characterization, exposure assessment, risk characterization)
- defines the mandatory and optional requirements
- specifies the conditions under which optional data may be required in addition to the mandatory requirements.

### Parts 2 and 3

- describe optional data requirements



### General framework and principles for risk assessment of NGT category 2 plants

**General principles of risk assessment according to the Directive 2001/18/EC remain:**

- Hazard identification and characterization
- Exposure assessment
- Risk characterization

**The type and scope of the requirement are adapted to the respective risk profile:**

- Characteristics of the NGT plant (trait, function of the inserted/modified or deleted sequences)
- Experience/History of use of the plant/product as food/feed/cultivation (including similar products)
- Scope and circumstances/conditions of release
- Intended use of the NGT plant/product

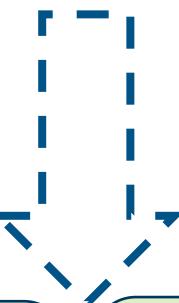


## General framework and principles for risk assessment of NGT category 2 plants

### Part 1

Molecular characterization and information on recipient plant  
**(obligatory)**

Part 2: specific information for the environmental risk  
assessment of category 2 NGT plants  
**(optional)**



Part 3: specific information for the safety  
assessment of category 2 NGT food and feed  
**(optional)**



## General framework and principles for risk assessment of NGT category 2 plants

### Part 1

Molecular characterization and information on recipient plant  
**(obligatory)**

Additional information from Part  
2 and 3 only if a plausible test  
hypothesis exists!

Part 2: specific information for the environmental risk  
assessment of category 2 NGT plants  
**(optional)**

Part 3: specific information for the safety  
assessment of category 2 NGT food and feed  
**(optional)**



## General framework and principles for risk assessment of NGT category 2 plants

### Part 1

**Molecular characterization and information on recipient plant  
(obligatory)**

Additional information from Part 2 and 3 only if a plausible test hypothesis exists!

Can we better navigate the hazard identification process by using the Annex I criteria to establish “hazard categories”?

**Part 2: specific information for the environmental risk assessment of category 2 NGT plants  
(optional)**

**Part 3: specific information for the safety assessment of category 2 NGT food and feed  
(optional)**



## Identification of “hazard categories” based on equivalence criteria

In addition to the definition of the boundary between category 1 and category 2 NGT plants for management and regulatory purposes, Annex I indicates which aspects may be relevant to risk and thus have to be considered in the risk assessment:

- Interruption of endogenous gene (by cis/intragenesis)
- Expression of chimeric protein(s)
- Long insertions/substitutions (> x bp) in protein coding sequence(s)
- Targeting of multiple genes/gene families

Further politically discussed issues:

- Hazardous characteristics/trait of the recipient plant (e.g. HR)

### ANNEX I

#### Criteria of equivalence of NGT plants to conventional plants

A NGT plant is considered equivalent to conventional plants when it differs from the recipient/parental plant by no more than 20 genetic modifications of the types referred to in points 1 to 5, in any DNA sequence sharing sequence similarity with the targeted site that can be predicted by bioinformatic tools.

- (1) substitution or insertion of no more than 20 nucleotides;
- (2) deletion of any number of nucleotides;
- (3) on the condition that the genetic modification does not interrupt an endogenous gene:
  - (a) targeted insertion of a contiguous DNA sequence existing in the breeder's gene pool;
  - (b) targeted substitution of an endogenous DNA sequence with a contiguous DNA sequence existing in the breeder's gene pool;
- (4) targeted inversion of a sequence of any number of nucleotides;
- (5) any other targeted modification of any size, on the condition that the resulting DNA sequences already occur (possibly with modifications as accepted under points (1) and/or (2)) in a species from the breeders' gene pool.



# Possible approach to risk assessment in the light of the COM proposal

**STEP 1: NGT2 STATUS CONFIRMED (INCLUDING CONFIRMATION OF THE ABSENCE OF UNINTENDED rDNA-RESIDUES) – Annex I of COM Proposal**



# Possible approach to risk assessment in the light of the COM proposal

STEP 1: NGT2 STATUS CONFIRMED (INCLUDING CONFIRMATION OF THE ABSENCE OF UNINTENDED rDNA-RESIDUES) – Annex I of COM Proposal



STEP 2: MOLECULAR CHARACTERISATION UNDER CONSIDERATION OF INFORMATION ON RECIPIENT PLANT - Part 1 of Annex II of COM Proposal

**OBLIGATORY**

types of modification/risk profiles

according to Annex I of the COM proposal – identification of potential hazards associated with specific characteristics of the introduced modification in a particular recipient plant

Interruption of  
endogenous gene  
(by cis/intragenesis)

Expression of chimeric  
protein

Long insertions/substitutions (> xbp) in protein  
coding sequence(s) – the protein is EXPRESSED but  
LOSS/REDUCTION/MODIFICATION of original  
function

Long insertions/substitutions  
> xbp in protein coding  
sequence(s) – the protein is NOT  
EXPRESSED/KNOCKED OUT

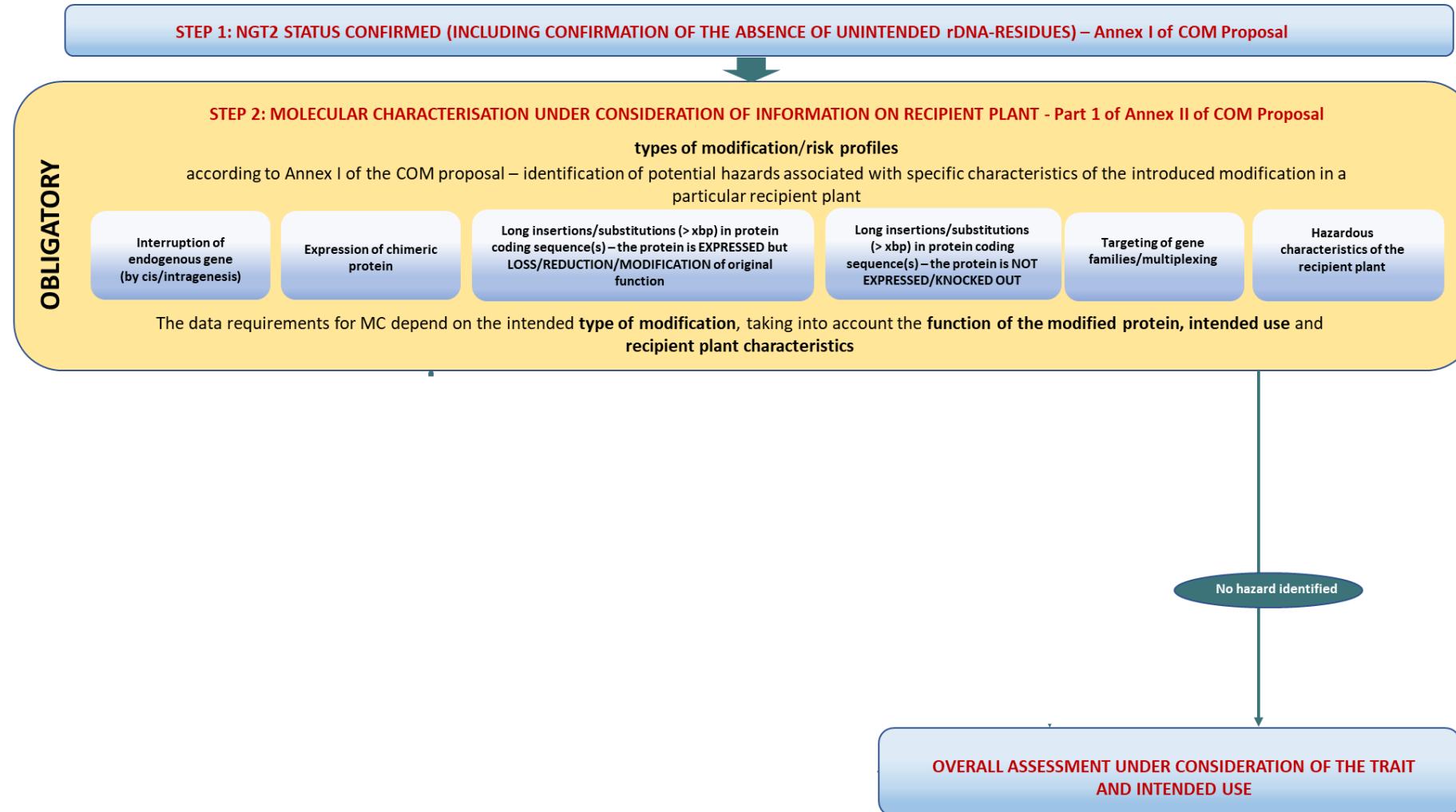
Targeting of gene  
families/multiplexing

Hazardous  
characteristics of the  
recipient plant

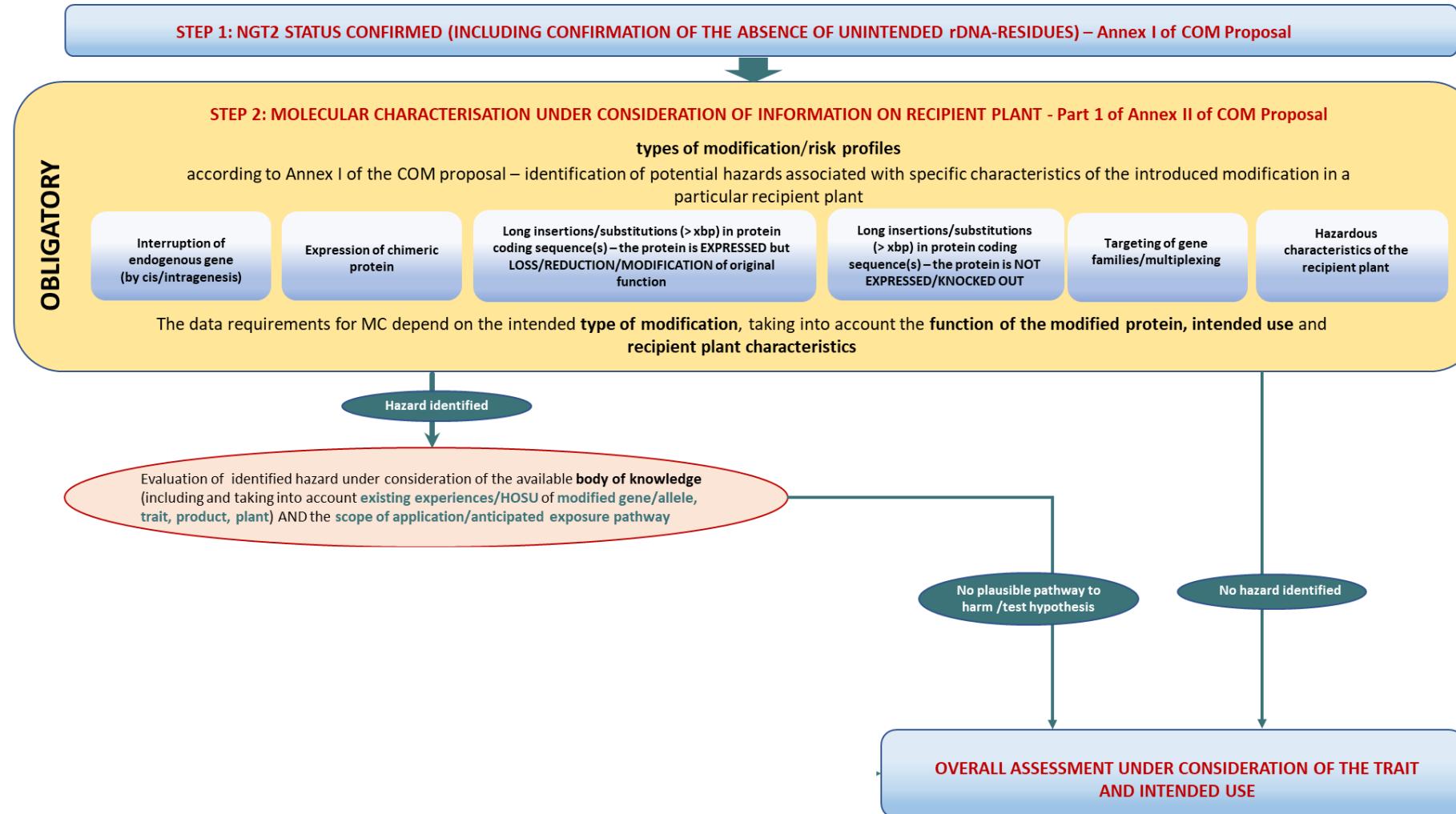
The data requirements for MC depend on the intended **type of modification**, taking into account the **function of the modified protein, intended use and recipient plant characteristics**



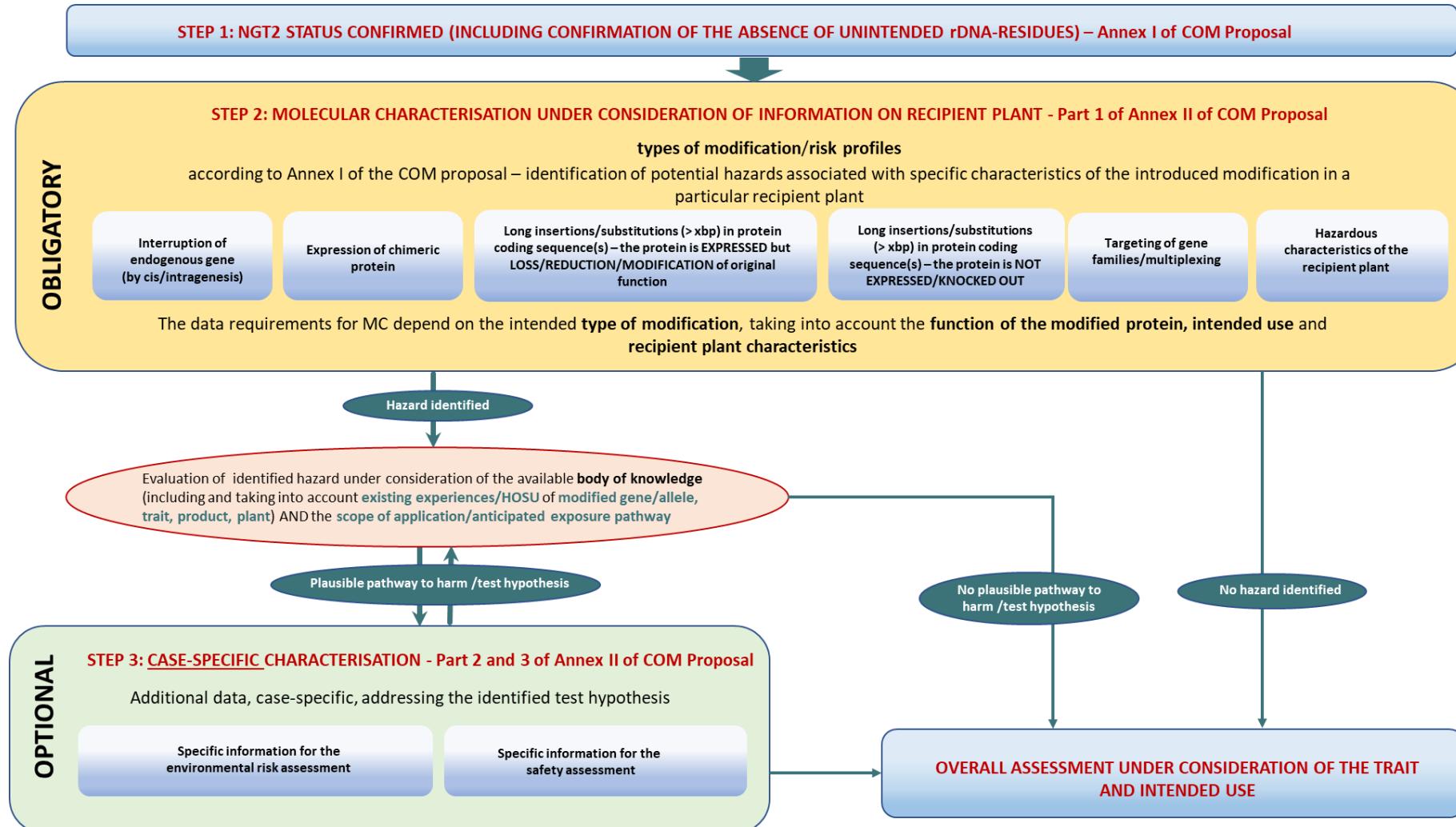
# Possible approach to risk assessment in the light of the COM proposal



# Possible approach to risk assessment in the light of the COM proposal



# Possible approach to risk assessment in the light of the COM proposal





## Questions, critics, challenges...

- How to reflect both – scientific considerations, facts and principles **and** political specifications
- Technological approach (fitting in with the regulatory reality)
- How to provide both groups - risk assessors and applicants - with reliable navigation for risk assessment
- Balance between formalized and tailored assessment
- ...



Federal Office of  
Consumer Protection  
and Food Safety

We live

Consumer Protection and  
Food Safety

Contact:

[anastasia.matthies@bvl.bund.de](mailto:anastasia.matthies@bvl.bund.de)

Thank you for your attention!