VENETO AGRICOLTURA

Azienda Regionale per i servizi Agricoli, Forestale e Agro-Alimentare

Agro-biotecnologie: diffusione dell'informazione per una scelta consapevole

Autori

Maria Elisabetta Cosulich,
Centro di biotecnologie avanzate, Genova

Claudio Bonghi, Margherita Lucchin, Serena Varotto,
Dipartimento di agronomia ambientale e produzioni vegetali,
Università degli Studi di Padova

Martino Cassandro, Chiara Dalvit, Chiara Targhetta,
Dipartimento di Scienze zootecniche, Università degli Studi di Padova

Valerio Bondesan,
Veneto Agricoltura, Settore Ricerca e Sperimentazione Agraria ed Ittica

Arianna Greco,
Studio legale, Genova

Angiolella Lombardi, Giorgio Marcazzan,
Veneto Agricoltura, Istituto per la qualità e le tecnologie alimentari, Thiene-Vi

Giampaolo Peccolo,
Fondazione Lanza, Padova

Coordinamento Tecnico-scientifico
Giuseppe Crocetta, Veneto Agricoltura,
Settore Ricerca e Sperimentazione Agraria ed Ittica

Pubblicazione edita da
Azienda Regionale Veneto Agricoltura
Sezione ricerca e sperimentazione
Viale dell'Università, 14 – 35020 Legnaro (Pd)
Tel. 049.8293711 – fax 049.8293815
e-mail: info@venetoagricoltura.org
www.venetoagricoltura.org

Realizzazione editoriale
Azienda Regionale Veneto Agricoltura
Coordinamento Editoriale
Isabella Lavezzo
Settore Divulgazione Tecnica e Formazione Professionale
Via Roma, 34 - 35020 Legnaro (Pd)
Tel. 049.8293920 – Fax 049.8293909
e-mail: divulgazione.formazione@venetoagricoltura.org

Presentazione

L'argomento delle Biotecnologie - applicazione della tecnologia ai processi biologici - è da alcuni anni al centro dell'attenzione di tutti e necessita di una informazione chiara e trasparente.
Informare il pubblico e i consumatori sui progressi della ricerca è un compito a cui bisogna dedicare la massima attenzione per far acquisire consapevolezza, per educare a porre nella giusta prospettiva i fatti e per fornire gli strumenti atti a valutare le conoscenze scientifiche raggiunte.
Veneto Agricoltura, con il patrocinio della Regione Veneto, presenta questo libro che ha lo scopo di fornire informazioni corrette, obiettive ed attendibili in materia di biotecnologie applicate all'agricoltura.
L'intento è quello di trasmettere al lettore le conoscenze di base affinché possa trarre le proprie conclusioni sul tema senza pregiudizi, contribuendo ad avvicinare il mondo scientifico al pubblico e cercando di aumentare il dialogo tra le due realtà.

L'Amministratore Unico
di Veneto Agricoltura
Giorgio Carollo

Indice

Premessa .....pag. 7

1. Le biotecnologie tra storia e ricerca .....pag. 9

2. Trasformazione genetica dei vegetali.....pag. 16

3. Applicazioni delle biotecnologie vegetali.....pag. 35

4. Le nuove biotecnologie “accettabili” nel settore zootecnico .....pag. 64

5. Disciplina europea sulla sicurezza alimentare
e gli organismi geneticamente modificati .....pag. 79

6. Legislazione e problematiche analitiche per la rilevazione
degli ogm nei prodotti alimentari.....pag. 93

7. Regime giuridico e problematiche della brevettabilità
delle invenzioni biotecnologiche .....pag. 100

8. Conclusioni .....pag. 110

9. Glossario.....pag. 114

Premessa

Veneto Agricoltura, azienda regionale per i settori agricolo, forestale e agro-alimentare, è stata promotrice di un progetto informativo, di durata biennale, sulle biotecnologie applicate all'agricoltura. Il progetto, dal titolo "Agro-biotecnologie: diffusione dell'informazione per una scelta consapevole", è stato finanziato dalla Regione Veneto ai sensi dell'art.5 della Legge Regionale 9 agosto 1999 n. 32 ("Informazione in materia di biotecnologie. Azione 2").

L'esigenza di indagare e comprendere il ruolo e l'effetto delle tecniche molecolari applicate agli organismi viventi è nata dalla diversità degli atteggiamenti che gli utenti (cittadini e consumatori, operatori agricoli, associazioni di categoria, esponenti del mondo politico, etc.) hanno nei confronti di queste tecnologie ad alto potenziale di sviluppo. In generale, infatti, se il comportamento a valenza positiva è proprio di chi conosce l'argomento a livello professionale e lo valuta su basi scientifiche, quello negativo è tipico della maggioranza degli utenti che non ha conoscenze specifiche, ma basa i propri giudizi su motivazioni a volte irrazionali, spesso scaturite sia da una inadeguata e frettolosa informazione da parte dei "media", sia da un'incomprensibile o ermetica informazione da parte del mondo della ricerca.

L'obiettivo del progetto è stato dunque quello di ampliare le conoscenze in materia di agro-biotecnologie raccogliendo informazioni equilibrate, autorevoli, aggiornate e scientificamente documentate. Il tutto accompagnato da un linguaggio comprensibile e alla portata del maggior numero possibile di destinatari.

Il lavoro è stato articolato in una serie di interventi, presentati in maniera divulgativa, nei quali hanno trovato un adeguato spazio gli aspetti più critici ed attuali della materia. Gli autori, che operano in prima persona nel settore delle biotecnologie agro-alimentari, appartengono sia al mondo universitario che a quello della ricerca e della sperimentazione. Le loro trattazioni hanno affrontato il problema non solo sotto l'aspetto tecnico-scientifico, ma anche approfondendo gli aspetti legislativi riguardanti la disciplina europea che regola l'immissione nell'ambiente degli organismi geneticamente modificati e la loro rintracciabilità negli alimenti, a tutela della salute del consumatore, della sicurezza alimentare e del rispetto dell'ambiente.

Gli argomenti riguardanti in modo più specifico le applicazioni della tecnologia del Dna ricombinante occupano quattro ampi capitoli. Nell'ordine, nel capitolo 1 viene presentato un sintetico quadro storico sulle biotecnologie ed una attenta valutazione dei benefici che queste possono apportare anche in campo agro-alimentare facendo un doveroso richiamo ad una politica di controllo per la valutazione del rischio nel breve e nel lungo periodo. Il capitolo successivo, riguardante la trasformazione genetica dei vegetali, è invece un manuale tecnico di facile e piacevole consultazione che spiega, anche ai non addetti ai lavori, i vari metodi impiegati per ottenere piante transgeniche, le problematiche che possono insorgere in seguito alla loro coltivazione e le attuali ricerche finalizzate al superamento di tali problematiche.
Ampio spazio viene poi dato, nel terzo capitolo, ai risultati ottenuti dall'applicazione dell'ingegneria genetica in agricoltura. La lettura di questo lavoro offre l'opportunità agli scettici di capire ed apprezzare il ruolo che le piante transgeniche esercitano non solo in ambito agronomico, ma anche alimentare, ambientale e farmaceutico.
Il capitolo 4, che presenta le biotecnologie applicate al settore zootecnico, conferma la validità di tali strumenti anche nel miglioramento della produttività animale, della qualità dei prodotti, dell'efficienza riproduttiva e della salute e del benessere degli animali.
Nei capitoli 5 e 6, riguardanti invece l'area legislativa, il problema delle biotecnologie applicate all'agricoltura, è stato affrontato sia secondo un ragionamento di carattere prettamente giuridico, sia dal punto di vista di chi utilizza i metodi di analisi e di campionamento per verificare la presenza di ogm nei prodotti alimentari. Chiude il presente documento il settimo capitolo, dedicato a questioni di bioetica, che, oltre a ricordare gli innegabili vantaggi dell'adozione delle biotecnologie, non nasconde alcuni aspetti problematici.

1 - Le biotecnologie tra storia e ricerca

Maria Elisabetta Cosulich
(Centro di Biotecnologie Avanzate, Genova)

Il termine "biotecnologie" coniato recentemente in occasione degli enormi sviluppi effettuati dalle scienze biologiche negli ultimi decenni, si ritrova nei comuni dizionari definito come *"applicazione della tecnologia ai processi biologici"* o alternativamente come *"tecniche che permettono la produzione di beni e servizi tramite l'utilizzo di organismi viventi o loro componenti purificate"*. Quindi può essere interpretato con un significato più ampio intendendo tutte le modificazioni degli organismi e dell'ambiente in funzione di particolari obiettivi, o alternativamente in maniera più riduttiva considerando solo quelle procedure che prevedono un intervento diretto sul materiale genetico.

Da un punto di vista formale, la prima interpretazione sembra più opportuna, in quanto in tal modo si possono considerare in un unico ampio spettro tutte le varie attività svolte dall'uomo nel corso dei secoli per modificare ambiente ed organismi: basti pensare all'addomesticazione di specie animali effettuata in funzione dell'allevamento e alla selezione delle specie vegetali in agricoltura.

Si possono considerare quindi biotecnologiche tutte le operazioni di selezione che hanno portato alla disponibilità di cultivar di piante per la produzione agricola e di razze selezionate per l'allevamento. La capacità di allevatori ed agricoltori nel produrre varietà e specie sempre più rispondenti alle necessità applicando metodi di selezione artificiale sempre più complessi ed articolati ha portato pertanto ad una situazione che difficilmente può essere classificata come "naturale". Entrano a far parte delle "biotecnologie" anche tutte quelle tecniche di trasformazione alimentare basate su fermentazioni come la panificazione, le produzioni derivate dal latte (formaggi etc.) e la produzione di vino e birra.

In realtà nell'immaginario collettivo il termine "biotecnologie" evoca altre realtà che hanno a che vedere con la modifica del patrimonio genetico e con l'utilizzo di tutta quell'ampia gamma di tecniche derivate dalla biologia molecolare del DNA ricombinante.

Anche in questo caso però bisogna considerare che le radici di queste metodiche affondano nella nostra storia e nella nostra cultura. Infatti, lo studio e l'analisi degli organismi viventi iniziata dai Greci che con Aristotele

proposero una prima classificazione degli animali e delle piante, prosegue in età classica e medioevale fino a che nel XVII secolo, con la messa a punto del primo microscopio, si pongono le basi della moderna biologia fondata sul metodo empirico. Nel XVIII secolo una sistematica raccolta di dati porta Linneo ad un'organica sistemazione della botanica e della zoologia. Nel secolo successivo Darwin formula la teoria evoluzionistica mentre Gregor Mendel pone le basi della moderna genetica con le sue leggi sull'ereditarietà.

Nel XX secolo Louis Pasteur dà inizio alla batteriologia e dal 1878 al 1906 vengono identificati venti microrganismi patogeni. Sarà poi nel 1945 che verranno messi a punto ed entreranno nella pratica medica gli antibiotici per la terapia delle infezioni batteriche.

Le conoscenze di base sull'organizzazione degli organismi viventi procede durante il XX secolo con l'identificazione da parte di Frederick Griffith dell'acido nucleico come base molecolare della trasmissione dei caratteri facendo anche riferimento alle basi puriniche (adenina e guanina) e pirimidiniche (citosina e timina). Nel 1941 G. Beadle ed E. Tatum scoprono che i geni controllano la sintesi degli enzimi ed infine nel 1953 gli esperimenti di diffrazione ai raggi X di Rosalind Franklin e Maurice Wilkins forniscono a James Watson e Francis Crick il mezzo per ipotizzare la struttura del DNA.

A questo punto assistiamo ad un susseguirsi incessante di nuove acquisizioni metodologiche e procedurali come l'identificazione della DNA polimerasi nel 1958, la produzione del primo microrganismo geneticamente modificato nel 1973, delle prime proteine ricombinanti (ad esempio l'insulina), ed infine degli animali e piante transgeniche nel 1988[1].

Quindi mediante un'azione diretta sul materiale genetico vengono modificate le caratteristiche di microrganismi, piante ed animali con una tecnologia innovativa, mai sperimentata in precedenza che si contrappone alle tecniche tradizionali dove i caratteri di interesse venivano conservati e migliorati esclusivamente con tecniche di selezione e di incroci.

Di fronte a queste nuove tecnologie che hanno una forte connotazione molecolare e che appaiono come processi ad alto potenziale di sviluppo, troviamo una serie molto eterogenea di atteggiamenti, alcuni dei quali con valenza positiva, altri invece con valenza negativa.

La prima distinzione (un poco come nel campo dell'Informatica, Internet etc.) è da farsi tra chi conosce e chi no; in genere chi conosce, e quindi è

[1] Per una descrizione completa e documentata delle varie tappe nella storia delle scoperte in biologia vedi il sito http://www.duepiu.net/dossier/genetica/date/index.asp.

nel campo, può giudicare su basi logiche, mentre chi non conosce, si appella spesso a motivazioni irrazionali esercitando un classico pre-giudizio difensivo.

Si possono considerare i punti di vista di alcuni gruppi:

- Gli scienziati o più semplicemente gli addetti al lavoro sono portati a pensare le biotecnologie e le loro innovazioni come fondamentalmente benefiche e quindi meritevoli di fiducia; come conseguenza, anche gli scienziati sono meritevoli di fiducia e di ovvia considerazione da parte dei cittadini. Conoscono infatti il loro campo, i successi e gli insuccessi del loro lavoro e dovrebbero essere anche in grado di valutare i rischi e i benefici delle nuove applicazioni, comunicandoli con sincerità ed efficacia ai cittadini.

  Spesso questa sincerità manca per una varietà di ragioni. Pochi scienziati sono capaci di spiegare ai cittadini la questione in esame poiché mancano di comunicativa, o sono restii a rinunciare all'ausilio della loro terminologia, o spesso ancora solo per semplice "superbia intellettuale".
- Il pubblico tende invece a valutare le biotecnologie a seconda delle sue applicazioni. Nel campo della medicina e della farmacologia c'è in genere un'accettazione fiduciosa; l'impatto delle biotecnologie nella produzione farmaceutica è stato straordinario ed ha portato alla messa a punto di tutta una serie di prodotti (proteine ricombinanti come l'insulina, l'eritropoietina, l'ormone della crescita, l'albumina) che si sono rivelati efficaci in un ampio spettro di patologie.

Grandi progressi sono stati fatti anche nel campo della diagnostica medica, con l'utilizzo della tecnologia legata all'uso di anticorpi monoclonali, policlonali e ricombinanti. Anche la terapia genica, che dopo un inizio promettente sembrava rallentare il suo sviluppo, ultimamente grazie anche alle nuove tecniche legate all'utilizzo delle cellule staminali sembra riguadagnare un posto predominante nell'ambito della ricerca avanzata in terapia.

Nel campo agro-alimentare e veterinario, invece, in Europa e soprattutto in Italia c'è una tendenza fortemente negativa, come emerge dai media e da polemiche continue e recenti.

Nonostante ci sia la coscienza che scienza e tecnologia (ivi incluse le biotecnologie) siano rilevanti per il progresso e lo sviluppo economico e culturale del Paese, nello stesso tempo permangono degli atteggiamenti antiscientifici e tecnofobi. A questo concorrono anche gli atteggiamenti dei media che presentano spesso in maniera impropria e scandalistica le problematiche associate, ad esempio, all'uso del transgenico in campo alimen-

tare. Anche il mondo politico risente forse di una scarsa informazione e questo si riflette negativamente non solo sui finanziamenti per la ricerca tecnologica, ma anche su quella parte di organi istituzionali deputati ai controlli sugli sviluppi delle biotecnologie (mancanza di personale, formazione culturale tecnica, apparecchiature etc.).

Considerazioni generali

Ci riferiamo alle applicazioni biotecnologiche in campo agroalimentare poiché questa è attualmente la tematica più controversa e dibattuta e, nello stesso tempo, quella che richiede più sicurezza di controlli tramite ricerca e sviluppo di tecnologie.
Dalla pubblicazione negli anni '60 del famoso libro di R. Carson "Silent Spring", il mondo agricolo e alimentare ha preso coscienza della necessità di migliorare sempre di più la produzione agricola.
La popolazione mondiale cresce al ritmo di circa 80 milioni all'anno; da ciò deriva automaticamente la diminuzione percentuale di superfici disponibili per attività agricolo-alimentare, peggiorata inoltre dall'estensione delle aree urbane ed industriali e, in talune parti del mondo, dall'inaridimento del suolo.
D'altro canto un trasferimento *sic et simpliciter* del surplus agroalimentare dai mondi "ricchi" a quelli "affamati", non sembra applicabile poiché comporterebbe una neo colonizzazione e una totale dipendenza di milioni di persone, oltre l'ovvia cancellazione delle biodiversità locali e un peggioramento (erosione/inaridimento) del suolo per dismissione di attività oramai inutili. Paesi come l'Africa e l'Asia, che vogliono essere capaci di gestire e sviluppare le loro potenzialità, osteggiano questa soluzione.
L'uso continuato e progressivo di fertilizzanti e pesticidi pone problemi notevoli all'ambiente: i costi di questa progressione non sono affrontabili nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo dove la fame è tuttora una realtà. Il tentativo di risolvere questo problema attraverso tecniche di lotta integrata o di agricoltura biologica, è di scarsa o nulla utilità per paesi in via di sviluppo. Qui infatti "non c'è il problema del surplus di produzione, ma il problema degli affamati" (F. Wambugu, genetista delle piante, Kenia, citata da " Il manifesto" 21.9.2000 pag. 6).
Sembra quindi auspicabile una variazione di tendenza, per cui per favorire la produzione agroalimentare si rinunci almeno parzialmente alla modifica dell'ambiente (utilizzo di fertilizzanti e fitofarmaci), per favorire metodiche

che comportino una modifica delle piante, così da passare da una agricoltura "chimica" ad una agricoltura "biologica". Questa tendenza esiste anche nel settore biomedico e farmaceutico dove, per particolari terapie come ad esempio le terapie antineoplastiche, si è passati da terapie "chimiche", che utilizzano chemioterapici, a terapie "biologiche" che utilizzano citochine, RNA antisenso, anti angiogenici, cellule modificate, etc.
Per tali ragioni l'applicazione delle tecniche del DNA ricombinante per ottenere ogm (organismi geneticamente modificati) non può essere scartata a priori poiché, con la dovuta saggia e regolata applicazione, potrebbe portare ad effettivi benefici.
Nei paesi sviluppati porterebbe ad un minor rischio ambientale dovuto all'uso di prodotti chimici, con vantaggi per l'ecosistema. Nei paesi in via di sviluppo, garantirebbe l'autonomia agroalimentare di milioni di esseri umani attraverso l'aumento di quantità e qualità della produzione. Grazie inoltre alle nuove capacità delle piante ottenute attraverso tecniche ricombinanti, potrebbero essere riscattate vaste zone agricole ora non utilizzabili a causa di siccità, erosione dei suoli, contaminazione chimica, etc.

Considerazioni finali e prospettive

La rivoluzione portata dalla scoperta del DNA e dei suoi sviluppi successivi (alcuni solo degli ultimi 10-20 anni) sono riportate, descritte, raccontate ma ancora non completamente "digerite" dai cittadini in genere.
La velocità delle applicazioni biotecnologiche, amplificata dalla sua associazione con l'informatica, è straordinaria già per gli addetti ai lavori, e ancora di più è frastornante per i cittadini.
Biotecnologie ed informatica in genere sono scienze in espansione. Nessuno può leggere nel futuro sulle loro possibilità. Ma è anche più grave escludere le biotecnologie dall'attenzione nazionale. Ci sarebbero conseguenze culturali ed economico-occupazionali disastrose. Valga come esempio storico l'effetto che ebbe il divieto della genetica da parte di Stalin sull'agricoltura della Russia (V. I filosofi e l'essere vivente. B. Muller, Garzanti 1984, pag. 129 e segg.).
Non è corretto sostenere che le biotecnologie in genere sono solo un tentativo monopolistico delle multinazionali per vendere i loro prodotti cancellando le diversità biologiche e culturali. Il punto di vista di Paesi come Cina, India, Cuba, Indonesia, Filippine ed anche alcune nazioni africane, è invece in favore delle biotecnologie agro-alimentari, non "comperate" ma

sviluppate autonomamente o in collaborazione con paesi avanzati per "cavalcare" le biotecnologie e non svendere il proprio patrimonio genetico naturale. Valga di nuovo come esempio l'immissione in coltura di patate dolci modificate per resistenza a virus in Kenia (Kenia Agricoltural Research Institute) diretto da F. Wambugu, genetista sulle piante, che si pone lo scopo di ovviare alla bassa resa dei raccolti.
È anche vero che le applicazioni derivate dagli avanzamenti della scienza devono essere opportunamente vagliate e controllate per quanto riguarda i possibili effetti a medio e lungo termine. Se si guarda indietro nel settore nucleare ad esempio, sono stati sottovalutati alcuni aspetti importanti come i problemi legati allo smaltimento delle sostanze radioattive, la sicurezza delle centrali dopo un certo numero di anni di funzionamento etc. Quindi è evidente che anche nel caso dell'applicazione delle nuove biotecnologie nel settore agroalimentare bisogna prevedere e mettere in conto una seria politica di controlli per la valutazione di eventuali rischi a medio e lungo termine.

Raccomandazioni

- Sostenere la ricerca biotecnologica in campo agroalimentare, dal momento che è iniziata appena ora una seconda fase che promette:
  a) esplosione di conoscenza per genomica e proteomica delle piante;
  b) sviluppo di piante qualitativamente migliori. A questo proposito è opportuno menzionare i "nutraceutical", parola inglese coniata per indicare cibi con caratteristiche alimentari e farmacologiche nello stesso tempo. Ad esempio soia e colza con tratti modificati per la qualità dell'olio ed in particolare per l'alto contenuto di acido stearico e laurico ed assenza di acidi grassi in forma trans destinata a soggetti con problemi cardiovascolari;
  c) sviluppo di piante resistenti a funghi e batteri (grazie alle ricerche sui geni della "resistenza");
  d) sviluppo delle tecnologie sulle piante per la produzione di sostanze d'interesse farmaceutico (riso per produzione di lactoferrina per il trattamento terapeutico delle anemie o di lisozima per il trattamento di patologie gastroenteriche). La produzione di farmaci in piante, nonostante sia autorizzata negli Stati Uniti, viene fortemente ostacolata da organizzazioni ambientaliste, dagli agricoltori e dalle associazioni agricole alimentari per timore di contaminazioni con il riso coltivato a

scopi alimentari ("California edges towards farming drug-producing rice". Nature 2004: 428; 591);

e) sviluppo dei vaccini vegetali che attraverso il consumo della pianta stessa (ad es., banana transgenica per patogene x) possono indurre risposta immune attraverso un meccanismo di sensibilizzazione di tipo gastrointestinale.

f) sviluppo di ogm per scopi ambientali (depurazione suolo, etc.) o industriali (ad es., biocarburanti, bioplastica). L'Italia non può e non deve rinunciare a questi sviluppi, anche per non escludersi dalla cooperazione internazionale.

- Progettare e sostenere in maniera continuativa e paziente programmi educativi su queste tematiche, non per convincere ma informare i cittadini con una corretta e sincera conoscenza dei rischi e benefici legati alle biotecnologie. In questa ottica si possono quindi prevedere iniziative editoriali con la preparazione di manuali informativi, come la pubblicazione di cui fa parte il presente contributo, ed altre iniziative scientifico-divulgative volte a coinvolgere un numero più alto possibile di persone.

2 – Trasformazione genetica dei vegetali

Serena Varotto - Claudio Bonghi
(Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali, Università di Padova)

Introduzione

Nelle piante l'introduzione di uno o più geni desiderati tramite i metodi convenzionali di miglioramento genetico richiede un incrocio sessuale tra due individui, seguito da ripetuti reincroci tra la progenie ibrida e uno dei progenitori fino ad ottenere una pianta con le caratteristiche desiderate. Tale procedura di miglioramento genetico è possibile solo nelle piante sessualmente compatibili e, oltre ad essere dispendiosa in termini di tempo, comporta spesso il trasferimento dalla pianta donatrice alla ricevente di altri geni insieme a quello desiderato. Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante ha consentito di aggirare alcuni dei limiti insiti nei metodi convenzionali di miglioramento genetico dei vegetali, permettendo ai genetisti di introdurre nelle piante solo i geni codificanti per caratteri desiderati, eliminando anche il problema della compatibilità sessuale. Le piante ottenute inserendo nel loro genoma un gene esogeno d'interesse (transgene) vengono definite piante geneticamente modificate (PGM) o transgeniche. I geni esogeni o transgeni possono essere derivati da qualsiasi specie vivente. Una pianta trasformata viene definita transgenica quando è in grado di trasmettere il transgene alla propria progenie mediante riproduzione sessuale.
In questo capitolo verranno descritte le metodologie utilizzate per l'ottenimento di PGM.

Da singole cellule vegetali si possono ottenere plantule intere

La possibilità di trasformare geneticamente una cellula vegetale è stata realizzata combinando la tecnologia del DNA ricombinante con la coltura dei tessuti vegetali *in vitro*. Con il termine di colture *in vitro* si intende l'ottenimento, in opportune condizioni, di piante intere a partire da cellule vegetali. Questo può accadere mediante due percorsi alternativi: l'organogenesi e l'embriogenesi somatica. Nell'organogenesi, la morfogenesi inizia con la formazione di germogli cui fa seguito la produzione della radice, mentre nell'embriogenesi somatica si formano embrioni direttamente in coltura. La capacità di una cellula di intraprendere il percorso di organogenesi o

embriogenesi somatica, in assenza di un processo fecondativo, è definito totipotenza. La coltura *in vitro* di organi e tessuti vegetali si è notevolmente sviluppata a partire dagli anni '60, per facilitare gli studi relativi alla biologia e alla fisiologia vegetale e per la risoluzione di problemi legati al miglioramento genetico dei vegetali. Attualmente le applicazioni delle colture *in vitro* riguardano il miglioramento genetico delle piante, la produzione di piante risanate da virus e micoplasmi, la produzione di metaboliti secondari da piante impiegate come biofabbriche, la conservazione del germoplasma e la propagazione clonale. In particolare quest'ultima tecnica si avvale della presenza di cellule indifferenziate (o meristematiche) presenti in tessuti vegetali per la moltiplicazione delle piante. Nei vegetali è possibile infatti con facilità, partendo da una pianta madre, ottenere numerosi cloni, cioè insiemi di individui con genotipo identico alla pianta madre. La clonazione è una tecnica di propagazione ampiamente impiegata nel miglioramento genetico delle specie coltivate.
Più recentemente le colture *in vitro* sono state utilizzate per rigenerare piante intere da cellule geneticamente modificate.

Come si colturano i tessuti in vitro?

I tessuti vegetali vengono colturati *in vitro* su idonei substrati di coltura. I substrati di coltura sono di norma costituiti da macrosali, microsali, miscele vitaminiche e addizionati di uno zucchero, generalmente saccarosio. Componenti fondamentali dei substrati sono gli ormoni vegetali; in particolare, giocano un ruolo fondamentale sulle capacità di rigenerazione dei tessuti due tipi di composti: le auxine e le citochinine. Il rapporto tra i due tipi di ormoni è di fondamentale importanza per indirizzare la rigenerazione verso la produzione di germogli o verso la differenziazione delle radici ed è specifico per ciascuna specie vegetale. In alcuni casi ai substrati di coltura vengono aggiunte anche giberelline, un terzo tipo di ormoni vegetali, la cui azione varia in relazione alla specie vegetale e al tessuto colturato. I substrati di coltura sono generalmente preparati con pH compreso tra 5-6 e resi solidi mediante aggiunta di Agar; dopo la preparazione i terreni vengono di norma sterilizzati in autoclave a 120°C per almeno 20 minuti.
Ponendo in coltura un espianto fogliare, radicale o di altri tessuti vegetali in condizioni asettiche e con un idoneo substrato è possibile ottenere la produzione di numerosi germogli, che dal punto di vista genetico sono identici alla pianta che ha fornito l'espianto. I germogli vengono quindi separati per permettere a ciascuno la formazione di un proprio apparato radicale.

Le plantule (cloni) così ottenute sono trasferite in vaso e dopo un breve periodo di ambientamento sono allevate in serra o in pieno campo. La rigenerazione di germogli e delle radici dai germogli viene detta rigenerazione per organogenesi diretta.
Alcuni espianti vegetali colturati *in vitro* formano un tessuto chiamato callo, costituito da cellule indifferenziate. Questo tessuto è in grado di rigenerare, una volta trasferito in un idoneo substrato di coltura, per organogenesi. La rigenerazione da callo viene definita organogenesi indiretta.

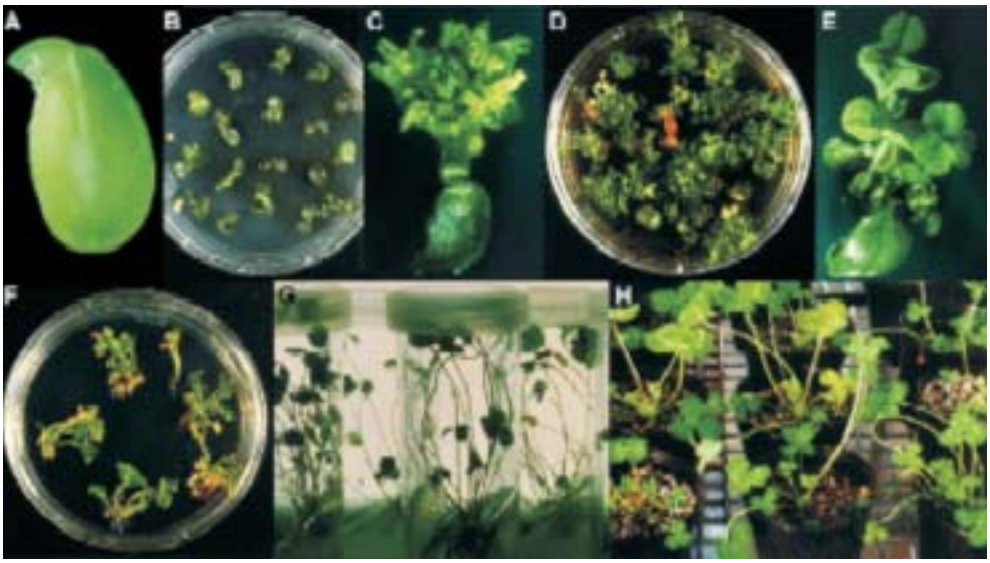


FIGURA 1. Ponendo in coltura un cotiledone (foto 1A) in un idoneo substrato è possibile ottenere da cellule indifferenziate la produzione di numerosi germogli (foto 1 B e C) che dal punto di vista genetico sono identici alla pianta che ha fornito il cotiledone. I germogli vengono quindi separati per permettere a ciascuno la formazione di un proprio apparato radicale (foto 1 E-G). Le plantule così ottenute sono trasferite in vaso (foto 1 G ed H) e dopo un breve periodo di ambientamento sono allevate in serra o in pieno campo. La rigenerazione di germogli e delle radici dai germogli viene detta rigenerazione per organogenesi diretta.

In alcune specie vegetali (la carota è un esempio), la rigenerazione da callo avviene per embriogenesi somatica. Nell'embriogenesi somatica, che ha origine a partire da una o più cellule somatiche senza eventi di fecondazione, una o poche cellule del callo danno origine ad un embrione somatico che presenta le caratteristiche e la fasi di sviluppo di un embrione zigotico. Gli embrioni somatici producono plantule provviste di radice e apice vegetativo, le quali dopo un periodo di crescita *in vitro* vengono ambientate e trasferite in serra o in pieno campo.

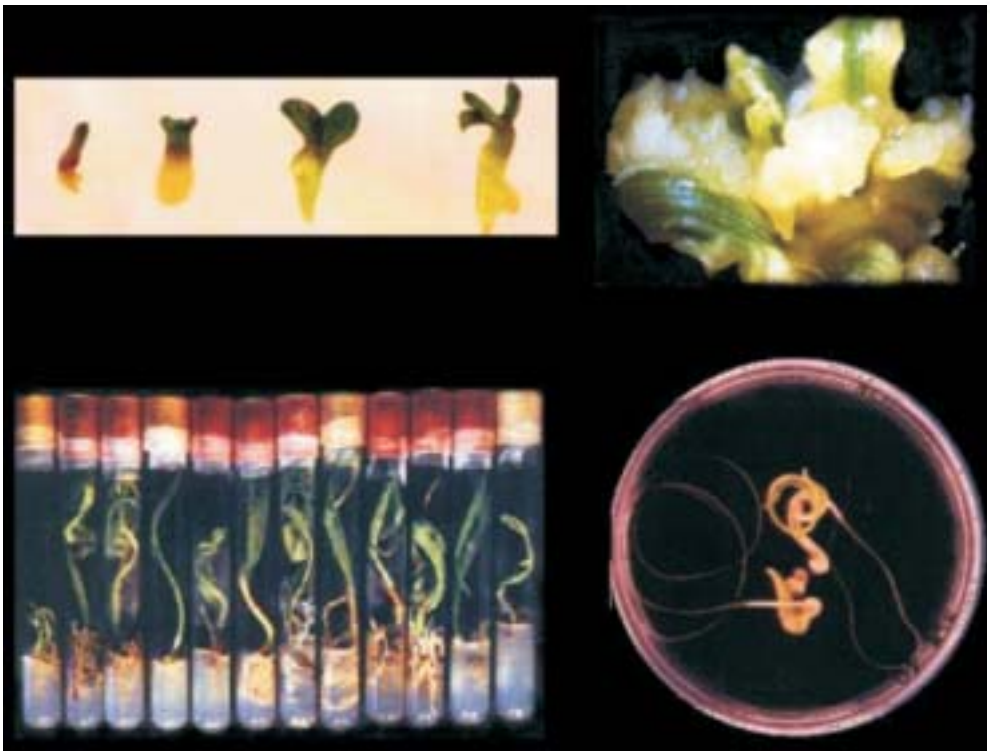


FIGURA 2. Nella figura sono osservabili le fasi dello sviluppo dell'embrione somatico, la produzione degli embrioni in un tessuto in coltura e l'ottenimento di plantule dagli embrioni.

Molte specie vegetali sono colturate *in vitro* sia a scopo di ricerca che a scopo di miglioramento genetico o semplicemente per essere moltiplicate in condizioni asettiche (micropropagazione). La clonazione *in vitro* è utilizzata soprattutto per la produzione di piante orticole e da fiore. L'osservazione attenta di numerosi cloni ottenuti *in vitro* in diverse specie vegetali da parte dei ricercatori ha permesso di individuare un fenomeno particolarmente importante definito variabilità somaclonale. Nell'ambito dei cloni ottenuti a partire da un espianto iniziale sono di norma osservate piante con mutazioni più o meno frequenti ed evidenti a carico di caratteri morfologici. La variabilità somaclonale è stata studiata sia allo scopo di ridurre la sua insorgenza quando è necessario mantenere l'uniformità genetica del materiale propagato, sia perchè si è pensato di utilizzarla come fonte di variabilità genetica da impiegare nei programmi di miglioramento genetico. Le cause della variabilità somaclonale non sono costituite da mutazioni nelle sequenze geniche degli individui mutati, bensì da mutazio-

ni epigenetiche (paramutazioni), che provocano variazioni nell'espressione di alcuni geni. L'entità delle paramutazioni osservabili è risultata essere in relazione alla durata della coltura e al tipo di substrato impiegato: la variabilità somaclonale aumenta quando vengono utilizzate dosi elevate di ormoni vegetali. Generalmente, dosi elevate di ormoni favoriscono la proliferazione di callo; infatti la variabilità somaclonale risulta maggiore quando un clone è ottenuto *in vitro* per organogenesi indiretta.

Come si ottiene una pianta transgenica?

Ricombinazione genetica

Prima di affrontare le metodologie utilizzate per la trasformazione dei vegetali, è utile ricordare che l'inserimento di un transgene in un genoma rappresenta un evento di **ricombinazione genetica**. La ricombinazione è un evento che si verifica normalmente durante la formazione dei gameti e la riproduzione degli organismi e comporta un riarrangimento della sequenza del DNA. L'introduzione del transgene avviene mediante meccanismi di ricombinazione genetica. I meccanismi di ricombinazione genetica possono essere classificati in:

a) **ricombinazione omologa** che avviene tra regioni di DNA sostanzialmente simili come, ad esempio, lo scambio di DNA tra cromosomi omologhi (CROSSING-OVER) durante la meiosi,
b) **ricombinazione illegittima** che avviene in seguito all'inserimento di un transgene in una posizione qualsiasi del genoma, quindi anche in regioni non omologhe al transgene,
c) **ricombinazione sito specifica** in cui gli eventi ricombinazione riguardano siti specifici dei cromosomi e non richiedono una estesa omologia nella regione interessata dall'evento.

Trasformazione mediante Agrobacterium

Le prime piante transgeniche sono state prodotte agli inizi del 1980, quando è stato scoperto che il batterio *Agrobacterium tumefaciens* è in grado di trasferire il proprio materiale genetico nel nucleo e quindi nel genoma delle cellule vegetali. Il batterio è cioè in grado di trasformare le cellule delle piante: in particolare può infettare numerose specie dicotiledoni, mentre sono meno suscettibili le specie appartenenti alle monocotiledoni.
L' *A. tumefaciens* si trova nel terreno e può infettare le piante penetrando

attraverso ferite presenti nella zona del colletto, in risposta all'emissione dalle ferite di composti fenolici prodotti dalla pianta quali acetosiringhone e idrossiacetosiringone. Queste molecole inducono l'attività dei geni di virulenza (*vir*) contenuti in un plasmide del batterio, il plasmide Ti (Tumor inducing). Infettata la cellula, il batterio inserisce una parte del plasmide Ti, il T-DNA (transfer DNA), nel genoma della cellula inducendola a sintetizzare prodotti genici necessari alla sua proliferazione. I geni vir si trovano in una regione al di fuori del T-DNA ma sono indispensabili per farlo trasferire ed integrare nel genoma della cellula vegetale. Il T-DNA si trasferisce sotto forma di molecola lineare ad un solo filamento che passa dal plasmide Ti alla cellula vegetale e alla fine si integra nel DNA cromosomiale della pianta. Quasi tutti i geni presenti nel T-DNA vengono attivati solo a seguito del suo inserimento nel genoma della cellula. La trasformazione genetica e la produzione di sostanze necessarie alla moltiplicazione del batterio determinano la formazione del tumore, o galla, al colletto delle piante infette. Nel T-DNA sono presenti due geni responsabili della sintesi dell'ormone vegetale auxina (*tms1 e tms2*) e un gene codificante per un enzima indispensabile per la sintesi delle citochinine. Sia l'auxina che le citochinine regolano la crescita delle cellule vegetali e lo sviluppo della pianta. Inoltre, la regione T-DNA di ogni particolare plasmidio ha un gene per la sintesi di un'opina. Le opine sono prodotti di condensazione tra un aminoacido e un chetoacido oppure tra un aminoacido e uno zucchero. Le diverse opine vengono sintetizzate all'interno del tumore del colletto e poi secrete, affinché un *A. tumefaciens* presente nel terreno che abbia in un plasmide il gene per catabolizzare l'opina presente possa utilizzarla come fonte di carbonio. In pratica ciascun ceppo di *A. tumefaciens* modifica geneticamente le cellule vegetali al fine di farle produrre un composto carbonioso che solo esso è in grado di metabolizzare.

Il plasmide Ti, quindi, rappresenta un eccellente vettore per il trasferimento di transgeni alle cellule vegetali. Per poter svolgere questa funzione, dal plasmide Ti vengono eliminati i geni *vir* affinché sia possibile clonare i transgeni nel T-DNA e contestualmente si inserisce:

a) un gene marcatore selezionabile;
b) un'origine della replicazione del DNA che consente al plasmide di replicarsi in cellule di *E. coli* e di *A. tumefaciens*;
c) la regione del confine del T-DNA indispensabile affinchè quest'ultimo si integri nel DNA della cellula vegetale.

I plasmidi Ti modificati, mancando dei geni *vir*, non sono in grado di tra-

sferire il loro T-DNA alle cellule vegetali. Per poter trasferire il T-DNA è neccessario affiancare a questi plasmidi un altro plasmide Ti che contenga i geni *vir*, ma non il T-DNA (plasmide disarmato). Tale tecnica è detta sistema del vettore binario.

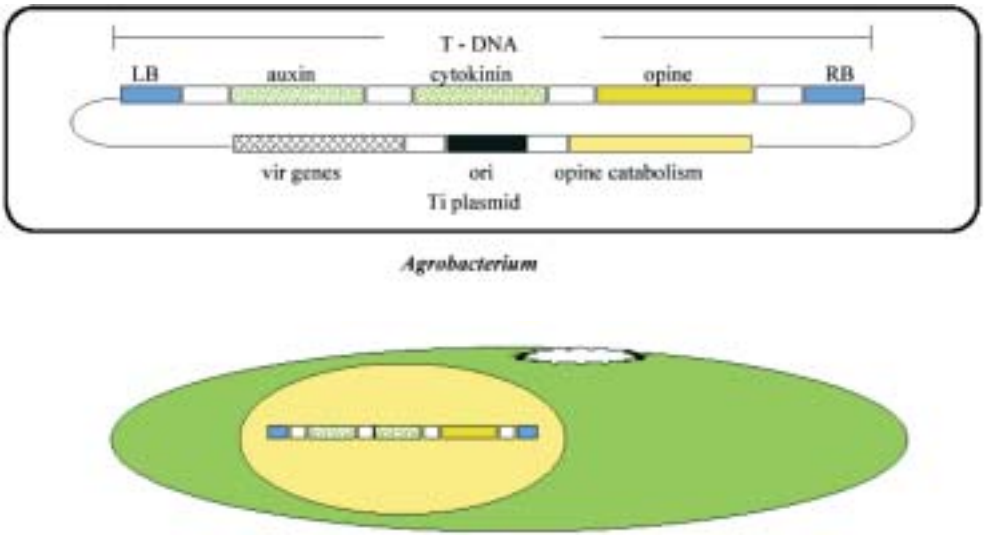


FIGURA 3. Struttura del plasmide Ti e del T-DNA (in alto): all'esterno del T-DNA sono codificate funzioni per la replicazione del plasmide e il suo trasferimento alla cellula vegetale i geni vir e i geni per il metabolismo delle opine. Il T-DNA comprende le sequenze: Left and Right Border (LB e RB), i geni per la sintesi di auxina e citochinina (provocano la proliferazione tumorale delle cellule vegetali) e i geni per la sintesi di opine.
In basso: La cellula vegetale infettata porta nel nucleo il T-DNA.

Una volta ottenuto l'*A. tumefaciens* contenente i due vettori, si procede alla trasformazione delle cellule vegetali. Dischi fogliari sono co-coltivati *in vitro* con una sospensione del batterio contenente il plasmide Ti ingegnerizzato. Il batterio trasforma, inserendo il transgene in singola copia, le cellule vegetali che successivamente saranno indotte a rigenerare per organogenesi o embriogenesi somatica. Il gene marcatore consente la selezione delle piante trasformate.
È utile sottolineare che nel 30% dei casi in cui ha successo la trasformazione, l'inserzione del transgene avviene all'interno di sequenze codificanti con la conseguente perdita del prodotto genico.
L'esito della trasformazione dipende sia dalla capacità del batterio di infettare le cellule che di inserire il suo T-DNA nel genoma della pianta prima

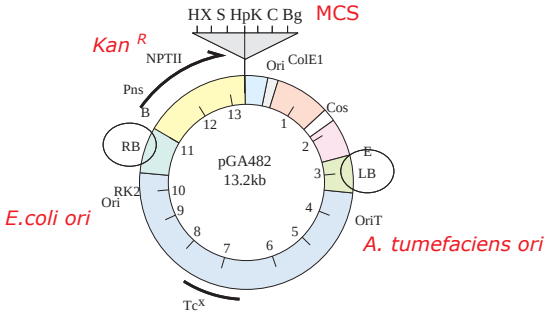


FIGURA 4. Il vettore di clonazione binario contiene origini della replicazione del DNA (ori) sia per *E. coli* che per *A. tumefaciens*, un gene marcatore selezionabile per la resistenza alla kanamicina (KAN) e un sito di policlonaggio (Multiple Cloning Site) inseriti tra i confini destro (RB) e sinistro (LB).

che esso venga distrutto dalle cellule vegetali. In molti casi, in particolare nelle monocotiledoni, *l'A. tumefaciens* non è in grado di trasferire efficacemente il transgene, per cui si sono dovute sviluppare tecniche di trasformazione alternative.

Trasformazione mediante metodi fisici

Un metodo alternativo alla trasformazione mediata dall'*A. tumefaciens* è il metodo del cannone a particelle di DNA. Utilizzando un cannone appositamente costruito, piccole molecole di DNA legate a particelle (diametro 0,4-1,2 μ) di metallo (oro o tungsteno) vengono "sparate" alla velocità di 300-600 m/s direttamente nelle cellule della pianta colturata *in vitro*. Le cellule colpite rimarginano velocemente le ferite e in alcune il DNA viene incorporato nei cromosomi della pianta. Con questo metodo di trasformazione non è possibile controllare il numero di transgeni che si inserisce nel genoma di una cellula trasformata. Solo alcune cellule risultano trasformate e sono indotte a differenziare per organogenesi o embriogenesi somatica. Anche in questo caso le piante trasformate sono selezionate grazie a geni marcatori.

Il sistema del cannone viene largamente impiegato nella trasformazione di numerose monocotiledoni. Nella figura 6 è mostrata la trasformazione di embrioni immaturi di riso mediante il cannone a particella di DNA.

In essa è possibile notare come gli embrioni (pannello 1), raccolti all'interno dell'area cerchiata (pannello 2), vengono bombardati utilizzando il cannone e micro-proiettili contenenti molecole di DNA. Dopo il bombarda-

mento gli embrioni sono trasferiti a una piastra più grande dove sono lasciati a "riprendersi" (pannello 3). Successivamente sono stimolati a produrre calli (pannello 4), i calli vengono indotti a produrre germogli (pannello 5). I germogli sono poi trasferiti su un terreno che induce la produzione di radici. Le piantine di riso rigenerate sono trasferite in vaso, dove verranno portate a seme.

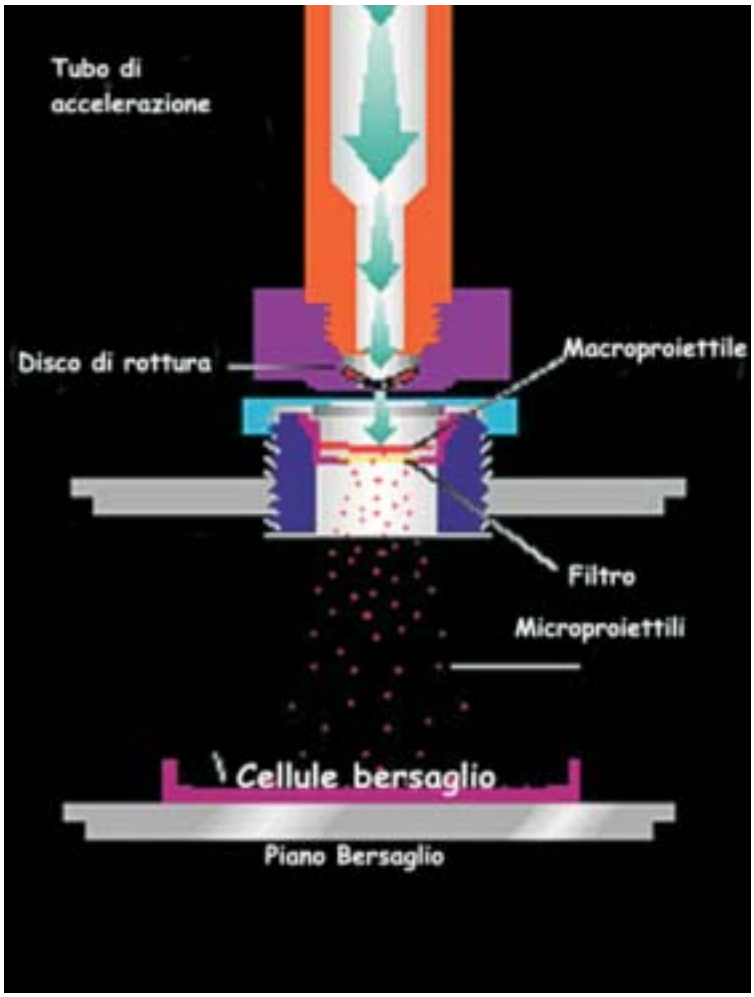


FIGURA 5. Schematizzazione di un cannone per la trasformazione di tessuti vegetali.

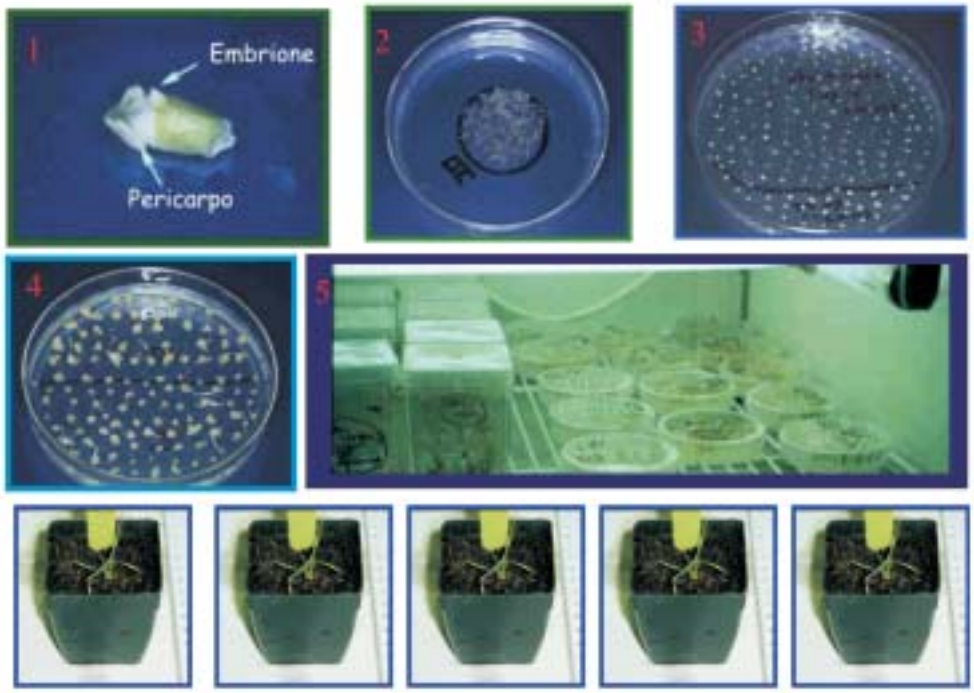


FIGURA 6. Trasformazione di embrioni di riso.

Trasformazione e fusione di protoplasti

Una tecnica di trasformazione delle cellule vegetali prevede l'utilizzo di protoplasti, cioè di cellule vegetali private della parete cellulare. La parete cellulare costituisce una vera e propria barriera alla trasformazione genetica delle cellule. È, tuttavia, possibile digerire la parete cellulare delle cellule vegetali utilizzando enzimi cellulosolitici prodotti da funghi e ottenere protoplasti. I protoplasti possono essere trasformati mediante trattamenti che permeabilizzano la membrana plasmatica (un esempio è il trattamento con polietilenglicole) e permettono l'entrata nella cellula di DNA plasmidico, il quale successivamente si integra nel genoma cellulare. Una volta trasformati geneticamente i protoplasti, in idonee condizioni di coltura, formano nuovamente la parete, producono colonie cellulari, piccoli calli e possono rigenerare per organogenesi o embriogenesi somatica piante geneticamente modificate.

Piante transgeniche a tutti gli effetti si possono ottenere inducendo i protoplasti alla fusione. Mediante fusione somatica (cioè di cellule ottenute da tessuti somatici) si ottiene la produzione di ibridi somatici. Ibridi somatici

possono essere ottenuti tra due specie sessualmente incompatibili: i prodotti della fusione formano calli che sono indotti a rigenerare per ottenere plantule ibride, considerate transgeniche poiché derivano dalla fusione di due genomi appartenenti a specie che in natura non sono in grado di incrociarsi. Generalmente durante la moltiplicazione cellulare dei calli si ha l'eliminazione parziale di uno dei due genomi, in modo che nell'ibrido un solo genoma risulta dominante. Inoltre, spesso gli ibridi somatici sono sterili o comunque hanno fertilità ridotta.
Questa procedura di trasformazione genetica è stata impiegata per trasferire geni di resistenza a patogeni da specie selvatiche a specie affini di interesse agrario.

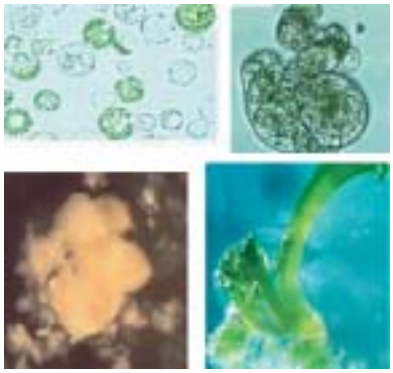


FIGURA 7. Rigenerazione di un ibrido somatico a seguito della fusione tra protoplasti (pannello 1). Le cellule fuse formano colonie cellulari (pannello 2), le quali producono calli (pannello 3) in grado di rigenerare plantule per organogenesi indiretta (pannello 4).

L'identificazione delle cellule trasformate

Avvenuta la trasformazione, lo sperimentatore deve essere in grado di identificare e propagare selettivamente le cellule che portano il transgene. Per poter operare questa selezione accanto al transgene vengono trasferiti dei geni il cui prodotto sia facilmente quantificabile o in grado di conferire resistenza a sostanze chimiche tossiche, come antibiotici ed erbicidi. Questi geni sono indicati con il termine di **geni reporter** o **marcatori**. Alcuni prodotti di geni reporter (per esempio la â-di-glucoronidasi o GUS e le due luciferasi batterica e della lucciola) si possono rilevare nei tessuti vegetali. Il più popolare di questi sistemi si basa sul gene GUS di *E. coli*: esso codifica per un enzima che catalizza la scissione di un gruppo di glucoronidi. Questi ultimi per idrolisi producono una sostanza di colore blu visibile ad occhio nudo nei tessuti vegetali trasformati.

Pur non essendoci sufficienti studi scientifici che dimostrino in maniera inequivocabile il trasferimento di resistenze ad antibiotici alla microflora batterica umana o degli animali, si è verificata una forte pressione da parte dell'opinione pubblica per la rimozione di tali geni marcatori dalle piante transgeniche. Tutto ciò ha portato allo sviluppo di sistemi per la generazione di piante transgeniche prive di marcatori. Il primo approccio impiegato è consistito nell'eliminazione del gene marcatore dopo la trasformazione. Questo sistema tuttavia risulta estremamente dispendioso in termini di tempo, per cui si è sviluppata una tecnica molecolare alternativa, che porta alla escissione del marcatore attraverso un meccanismo di taglio sito specifico del DNA inducibile chimicamente.
In alcuni virus esistono sistemi di ricombinazione sequenza-specifica. Un esempio è presente nel fago P1, il quale si serve della ricombinazione sito-specifica quando si replica nei batteri. Il sistema di ricombinazione si basa su due elementi fondamentali: *Cre*, un enzima ricombinasi e *Lox*, una sequenza agli estremi del genoma del fago. Cre riconosce in maniera specifica Lox ed ha bisogno di 2 sequenze Lox per fare avvenire la ricombinazione. È possibile creare una pianta transgenica avente il gene Cre, chimicamente inducibile, e 2 sequenze Lox agli estremi di un gene marcatore. In generale in questi sistemi, il marcatore ed il transgene sono separati dall'attività di un enzima i cui siti specifici di riconoscimento si trovano ai bordi del marcatore che deve essere escisso.

FIGURA 8. A sinistra, espressione di GUS in organi riproduttivi del fiore di Arabidopsis. A destra, semi di avena transgenici per la GFP (green fluorescent protein) gene della medusa *Aequoria victoria,* il suo prodotto emette fluorescenza verde se eccitato con luce UV (365nm).

Alcuni ricercatori statunitensi hanno usato la ricombinasi Cre del batteriofago di *E. coli* P1 per rimuovere dei geni marcatori selettivi fiancheggiati da siti lox in un locus transgenico di tabacco trasformato. In seguito alla rimo-

zione del locus che codifica per Cre, mediante segregazione, venivano selezionate le piante che avevano incorporato solo il transgene desiderato. Di seguito e nella figura si descrive un sistema indotto chimicamente accoppiato all'uso del sistema Cre-Lox, sistema indotto da beta-estradiolo.

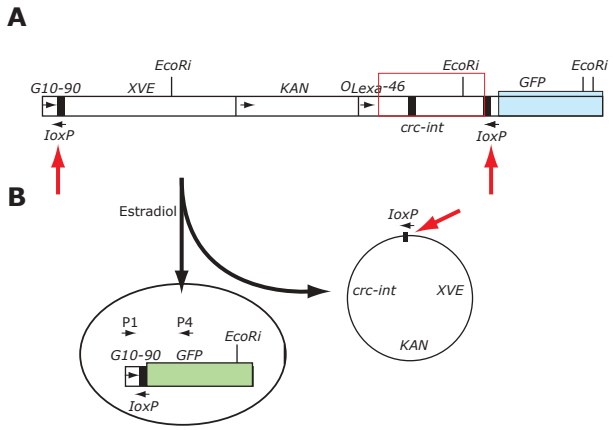


Figura 9. Schematizzazione di un vettore impiegato per la trasformazione ed escissione del gene marcatore indotta dal beta-estradiolo. (A) Caratteristiche strutturali del vettore, che porta tre unità trascrizionali all'interno dei due siti *loxP*: ***XVE*** è la sequenza dell'attivatore trascrizionale che risponde al beta-estradiolo ed è attivato dalla sequenza del promotore *G10-90* posta prima del sito *loxP*; **KAN** è il gene codificante per i geni di resistenza alla kanamicina; **cre-int** contiene il promotore costitutivo CaMV*35S* r, necessario alla sua espressione. Segue il secondo sito *loxP* il cDNA della *GFP*. (B) Prodotto putativo della ricombinazione sito specifica del DNA indotta dal beta-estradiolo.

La manipolazione dell'espressione genica nelle piante

Anatomia di un transgene

La configurazione del transgene utilizzato per la trasformazione delle piante ha una notevole influenza sia sulla sua integrazione nel genoma vegetale sia sulla sua successiva espressione.

Uno dei fattori più importanti per regolare l'espressione del transgene è la scelta del promotore, una sequenza di DNA a monte del gene contenente gli elementi necessari alla trascrizione della sequenza codificante. In numerose piante transgeniche attualmente in commercio l'espressione del transgene è regolata dal promotore costitutivo 35S (CaMV35S) che appartiene al virus del mosaico del cavolfiore. Questo promotore fa sì che l'espressione del transgene si realizzi in tutti i tessuti della pianta trasformata e in qualsiasi fase del suo sviluppo. La strategia basata sul 35S è vantaggiosa se si vuole ottenere la

produzione ad elevati livelli del transgene, ma ciò può comportare effetti negativi sulla funzionalità fisiologica della pianta transgenica. Per ovviare a questo problema e per avere una espressione del transgene localizzata in senso spaziale e/o temporale sono stati isolati, studiati e utilizzati promotori dei vegetali tessuto e stadio specifici. Un esempio è quello dell'utilizzo di un promotore di un gene specificatamente espresso nelle antere del fiore per l'ottenimento di piante maschiosterili. La disponibilità di piante maschiosterili è uno degli elementi essenziali per l'ottenimento degli ibridi di prima generazione (F1). Per ottenere la sterilità maschile nelle piante da utilizzare come portaseme nella costituzione degli ibridi di prima generazione sono stati utilizzati numerosi metodi tra cui la demasculazione e trattamenti con prodotti in grado di determinare alterazioni sulla funzionalità del granulo pollinico (gametocidi). Più recentemente è stata sviluppata in tabacco e successivamente trasferita anche ad altre specie (ad es. mais), una tecnica per ottenere piante maschiosterili basata sull'impiego della tecnologia del DNA ricombinante. La disponibilità di un promotore di un gene espresso in maniera specifica nel tapetum (TA29), il tessuto delle antere necessario allo sviluppo del granulo pollinico, ha permesso l'epressione di un gene batterico citotossico (*BARNASE*) solo a livello delle antere della pianta trasformata ottenendo così una pianta maschiosterile. Per ripristinare la fertilità nell'ibrido, la maschiosterilità è stata corretta inducendo l'espressione di una proteina inibitrice (BARSTAR) della *BARNASE*. Questo sistema permette, incrociando una pianta femmina che esprime il TA29::BARNASE con una pianta maschio trasformata con il transgene TA29::BARSTAR, di ottenere ibridi F1 fertili.

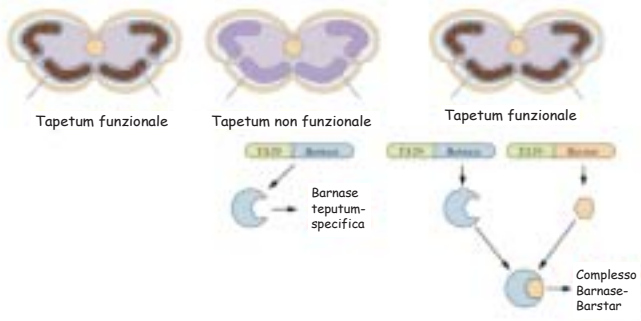


Figura 10. Maschiosterilità ingegnerizzata. Il promotore TA29 guida l'espressione della tossina barnase esclusivamente nel tapetum delle antere, inducendo la maschiosterilità nelle piante transgeniche. In seguito all'incrocio tra piante transgeniche trasformate con il gene Barnase (portaseme) e piante trasformate con il gene Barstar (impollinanti), la tossina viene inattivata e la fertilità ripristinata negli ibridi di prima generazione.

Limiti della trasformazione nucleare

Le metodologie di trasformazione descritte consentono di introdurre transgeni in numerose specie vegetali comprese quelle d'interesse agrario, come il cotone e il mais, ritenute fino a poco tempo fa specie recalcitranti alla trasformazione.

Una delle limitazioni più importanti della trasformazione nucleare riguarda il livello d'espressione del transgene che, pur in presenza dello stesso promotore, varia da specie a specie. Il motivo di tale variabilità non è ancora chiaro, ma potrebbe essere correlato alla posizione in cui si inserisce il transgene nel genoma vegetale. Per ovviare a questo incoveniente si sta sviluppando una tecnica che dovrebbe consentire l"indirizzamento del gene" (gene-targeting) sfruttando la ricombinazione omologa. Nei vegetali, a seguito di trasformazione genetica, gli eventi di ricombinazione omologa sono piuttosto rari, ma il loro sfruttamento potrebbe consentire di controllare l'espressione del trasgene e di sostuitire un gene presente con suo omologo più funzionale. Un esempio in tal senso è il lavoro compiuto con il gene WAXY, responsabile della consistenza del riso dopo la cottura. È noto infatti che le varietà giapponesi (*Oryza sativa*, var japonica) rispetto a quelle indiane (*Oryza sativa*, var. indica) risultano più "collose" a fine cottura. Per introdurre una maggiore resitenza alla cottura nelle varietà giapponesi si è sotituito il gene *WAXY* giapponese con quello proveniente dalla *var indica.* A tale scopo è stato assemblato un *T-DNA* contenente una regione di circa 6000 paia di basi ad elevata omologia con il gene *WAXY* in modo da determinare un evento di ricombinazione omologa a seguito della trasformazione.

Le piante transgeniche ottenute utilizzando i metodi di trasformazione, precedentemente descritti, contengono nella maggior parte dei casi un singolo gene esogeno. Poichè la maggior parte dei caratteri d'interesse agronomico è controllata da più geni, si è posto ai miglioratori vegetali il problema dell'inserimento in piante di interesse agrario di pacchetti di geni, allo scopo di trasferire caratteri agronomici desiderati. Un esempio di come è stato affrontato questo problema in una specie coltivata è la produzione del riso dorato (golden rice). Il piano progettuale, che prevedeva l'inserimento nel genoma di riso di tre geni responsabili della produzione del ß-carotene in sequenza, ha richiesto l'impegno di numerosi ricercatori per un periodo di ben 7 anni di attività.

Tra le problematiche legate alla coltivazione delle piante transgeniche c'è quella inerente la possibilità di trasferimento del transgene a specie selvati-

che affini mediante il polline (gene flow). Il polline infatti potrebbe favorire il trasferimento e l'ntrogressione (incorporazione di geni nell'insieme dei geni di una popolazione) del transgene in specie affini alla specie coltivata: il fenomeno del gene flow si verifica frequentemente in natura ed è considerato un meccanismo importante a fini evolutivi. La domanda che ci si pone è la seguente: la possibilità che piante transgeniche coltivate e specie selvatiche affini si incrocino può portare all'evoluzione di "superinfestanti", a fenomeni di inquinamento genetico e alla perdita di germoplasma di valore?
Allo scopo di superare questo ed altri problemi legati alla trasformazione genetica nucleare delle piante, i ricercatori stanno sperimentando la possibilità di trasformare geneticamente il genoma plastidiale, in particolare quello dei cloroplasti, le strutture che nelle cellule del mesofillo fogliare svolgono attività di fotosintesi.

L'ingegnerizzazione dei cloroplasti

Le cellule del mesofillo fogliare possiedono circa 100 cloroplasti ciascuna e ciascun cloroplasto possiede 100 copie di genoma circolare. Il genoma cloroplastico della maggior parte delle piante codifica per circa 150 geni e molti dei prodotti proteici presenti nei cloroplasti sono codificati dal nucleo cellulare. Utilizzando il cannone a particelle di DNA è possibile trasformare il genoma dei cloroplasti (plastoma). La trasformazione genetica del loro cromosoma è possibile bombardando foglie colturate in vitro. Anche in questo caso, le foglie vengono indotte a rigenerare e le plantule rigenerate, che possiedono cloroplasti trasformati, vengono selezionate grazie ad un gene marcatore e ad un substrato selettivo. Il bombardamento delle foglie consente perciò di rigenerare piante i cui cloroplasti sono trasformati; tali piante vengono selezionate in terreni in cui la sopravvivenza è garantita dall'espressione dei geni marcatori.
Uno dei principali vantaggi della trasformazione dei cloroplasti è quello che l'integrazione del transgene avviene per ricombinazione omologa e quindi può essere diretta in un punto specifico del plastoma. Inoltre, il numero di copie del transgene presente nelle cellule è molto elevato e di conseguenza anche il suo prodotto è sintetizzato in maggiori quantità; questa tecnica di trasformazione può perciò vantaggiosamente essere impiegata per trasformare piante da utilizzare come biofabbriche nella produzione

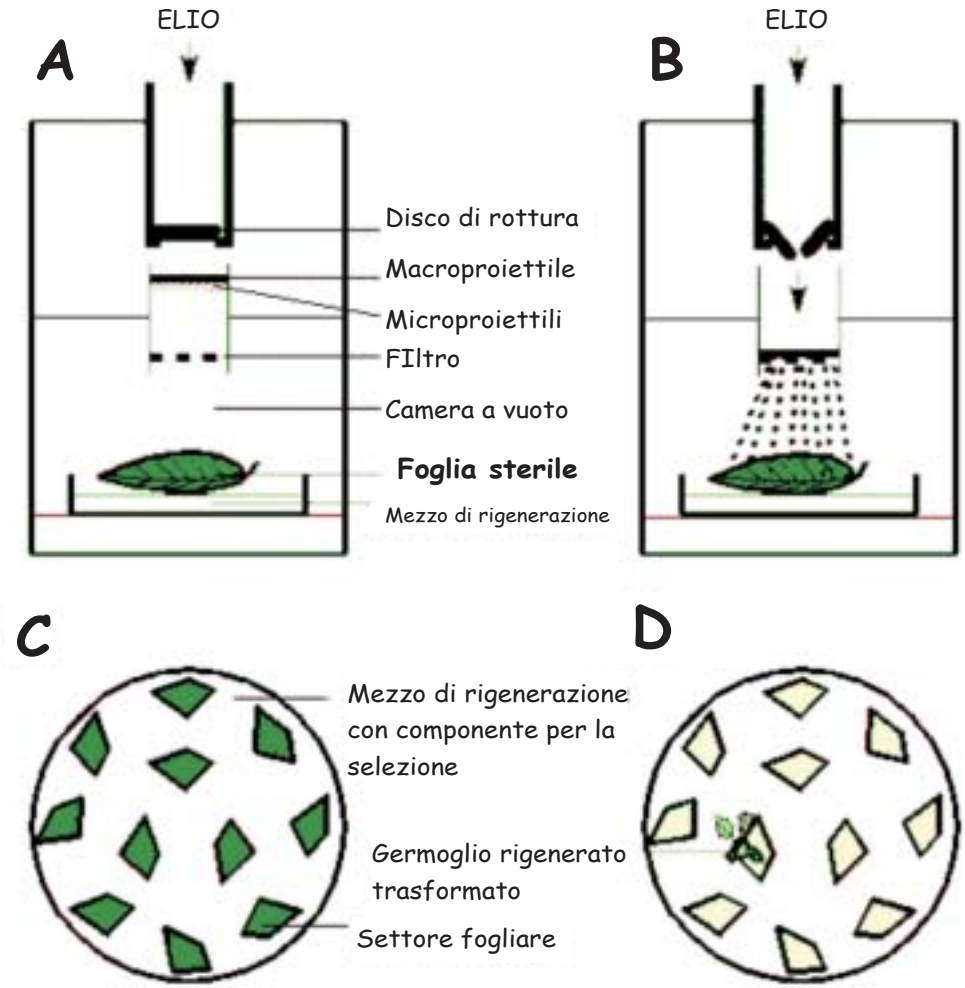


FIGURA 11. Utilizzando il cannone a particelle di DNA è possibile trasformare il genoma dei cloroplasti, gli organelli tipici delle piante che svolgono la fotosintesi clorofilliana. Al loro interno i cloroplasti possiedono un genoma circolare (plastoma) presente in numerose copie. La trasformazione genetica del loro cromosoma è possibile bombardando foglie colturate *in vitro*. Anche in questo caso, le foglie vengono indotte a rigenerare e le plantule rigenerate, che possiedono cloroplasti trasformati, selezionate grazie ad un gene marcatore e ad un substrato selettivo.

di vaccini, farmaci ecc.

Molti geni cloroplastici sono organizzati in operoni: ciò significa che un singolo promotore regola la trascrizione contemporanea di più geni posti in sequenza. Quando si trasformano i cloroplasti è perciò possibile introdurre un pacchetto di geni esogeni costituenti un singolo operone: questo evita

le complicazione che si hanno nella trasformazione nucleare, in cui più geni debbono essere inseriti in eventi successivi di trasformazione e di conseguenza si posizionano in punti diversi e casuali del genoma.
Un ulteriore vantaggio offerto da questa procedura di trasformazione è la possibilità di limitare la dispersione del transgene mediante il polline. Infatti nella maggior parte delle piante il citoplasma e gli organelli hanno eredità materna e non sono presenti nel polline. Nel polline non è inoltre espresso il prodotto del transgene a vantaggio degli insetti che del polline si nutrono.
La trasformazione del plastoma è stata realizzata in alcune specie (tabacco, pomodoro, medica) ed è al momento ancora in fase di messa a punto per la produzione di piante transgeniche.

Bibliografia

Materiale Didattico allegato al corso "Biotecnologie Vegetali Modulo 2" - Università di Milano. A cura della Fondazione Parco Tecnologico Padano – Lodi.

S. Varotto, E. Nenz, M. Lucchin, P. Parrini (2001), *Production of asymmetric somatic hybrid plants between Cichorium intybus L. and Helianthus annuus L.* Theoretically and Applied Genetics 102:950-956.

Roberta H. Smith (2000), *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. Academic Press.

American Society of Plant Physiologists (2000), *Biochemestry and Molecular Biology of Plants*. Edited by B.B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones.

J. Zuo, Q.W. Niu, S.G. Moller and N.H. Chua (2001), *Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants*. Nature Biotech. 19: 157-161.

J.D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller (1994), *DNA Ricombinante*. Zanichelli Editore S.p.A., Bologna.

B.R. Glick, J.J. Pasternak (1999*), Biotecnologia Molecolare: principi ed applicazioni del DNA ricombinante*. Zanichelli Editore S.p.A., Bologna.

L. Bogorad (2000). *Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products*. Tibtech 18: 257-264.

B. Hohn and H. Puchta (2003), *Some like it sticky: targeting of the rice gene waxy*. Trends in Plant Science 8 (2) 51-53.

3 - Applicazioni delle biotecnologie vegetali

Margherita Lucchin
(Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali - Università degli Studi di Padova)

Applicazioni dell'ingegneria genetica in agricoltura

Con lo sviluppo delle tecniche per introdurre e far esprimere un gene esogeno nelle cellule vegetali, nelle ultime due decadi sono state prodotte piante transgeniche che presentano caratteri innovativi, quali una maggiore resistenza agli insetti e alle malattie, migliorate caratteristiche qualitative di semi e frutti o un migliore adattamento a condizioni ambientali sfavorevoli. Sono state inoltre sviluppate piante transgeniche capaci di produrre vaccini contro importanti malattie umane o di sintetizzare nuovi prodotti. Attualmente molti laboratori, sia di industrie private che di organismi pubblici, sono impegnati per ottenere piante ingegnerizzate per caratteristiche di interesse agronomico e qualitative.

L'applicazione al miglioramento genetico vegetale di nuove strategie, basate sulla tecnologia transgenica, è oggi limitata soltanto dalla ancora scarsa conoscenza della funzione dei geni. Le nuove strategie di genomica funzionale per l'identificazione e la caratterizzazione di geni stanno aprendo la strada all'acquisizione di una grande quantità di informazioni con elevato potenziale per l'ottenimento di piante ingegnerizzate capaci di rispondere ad obiettivi specifici.

Il tipo di caratteri sino ad ora modificati nelle piante transgeniche deriva principalmente da considerazioni di tipo economico. In alcuni casi l'espressione dei transgeni avviene essenzialmente nei semi e nei frutti, in altri è l'intera pianta che esprime i geni esogeni.

Le piante geneticamente modificate (gm) di prima generazione erano quasi esclusivamente piante resistenti agli erbicidi o agli insetti, erano state sviluppate dalle industrie biotecnologiche per il controllo del mercato e i benefici di tale tecnologia ricadevano esclusivamente sul settore produttivo. Successivamente, le piante transgeniche di seconda e terza generazione hanno permesso l'ottenimento di prodotti con migliorate caratteristiche qualitative o di nuovi prodotti (ad esempio, farmaci, vaccini) il cui impatto a livello commerciale non è però ancora quantificabile.

Resistenza agli erbicidi

La crescente attenzione del mondo agricolo alle problematiche derivanti dall'impatto ambientale dell'impiego di erbicidi ha portato allo sviluppo di nuove molecole che, pur dotate di un'adeguata attività fitotossica, presentassero un contenuto impatto ambientale. Composti con tali caratteristiche sono stati identificati soprattutto tra gli inibitori della sintesi degli aminoacidi essenziali, come la fosfinotricina, un aminoacido non convenzionale che blocca l'organicazione dell'azoto nella pianta, le sulfoniluree e gli imidazolinoni, che interferiscono con la biosintesi degli aminoacidi leucina, isoleucina e valina, e il glifosate che inibisce la biosintesi degli aminoacidi aromatici bloccando l'attività dell'enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfatosintasi (EPSPS). Per quanto riguarda quest'ultimo erbicida, la sua mancanza di selettività, e quindi la tossicità nei confronti delle specie coltivate, è stata superata in seguito all'identificazione e al clonaggio di geni procariotici che codificano forme mutanti dell'enzima bersaglio, come l'allele *AroA* di *Salmonella tiphimurium*, che produce un enzima EPSPS insensibile al glifosate. Questi geni sono stati inseriti nelle piante sotto il controllo di un adeguato promotore di espressione e con la dotazione di una sequenza capace di assicurarne la localizzazione funzionale nel cloroplasto. In questo modo sono state ottenute piante transgeniche di soia (Padgette *et al.*, 1996), colza, cotone e bietola (Briggs e Koziel, 1998), in grado di esprimere geni di origine batterica codificanti una EPSPS e resistenti a elevate concentrazioni di glifosate. Il primo prodotto commerciale di questo tipo è stato la soia Roundup Ready, autorizzata alla coltivazione negli USA nel 1996 e il cui gene EPSPS proviene dal batterio del terreno *Agrobacterium tumefaciens*, che si è dimostrata capace di coniugare un'elevata tolleranza all'erbicida con una produttività in campo non inferiore a quella delle cultivar tradizionali. Negli anni successivi questa coltivazione è stata autorizzata in Argentina, Brasile, Canada, Uruguay, Giappone, Sud-Africa, Romania, Bulgaria, mentre nell'UE ne è autorizzata, sin dal 1996, solamente la commercializzazione. Il pacchetto tecnologico Roundup Ready è stato poi esteso al mais (glifosate + ibridi resistenti al glifosate).

È di questi giorni la notizia (Castle *et al.,* 2004) di un nuovo carattere che potrebbe dar luogo ad una strategia alternativa di resistenza al glifosate sviluppato da una compagnia privata che ha caratterizzato, nel batterio del terreno *Bacillus licheniformis*, nuovi enzimi con attività glifosate N-acetiltransferasica (GAT).

A sinistra, parcella di soia non trattata con erbicida; a destra parcella di soia Roundup-Ready diserbata con Roundup (fonte Monsanto).

La fosfinotricina, il principio attivo di molti erbicidi, e in particolare del glufosinate ammonio non selettivo, è un inibitore enzimatico della glutaminosintetasi coinvolta nell'organicazione dell'ammonio. Piante gm tolleranti all'erbicida sono state ottenute attraverso l'inserimento del gene *bar* di *Streptomyces* spp. che codifica per l'enzima fosfinotricina acetiltransferasi (PAT). Le specie di interesse agrario trasformate per la resistenza al glufosinate ammonio comprendono soia, mais, colza, cotone, riso, bietola e radicchio. Anche in questo caso si tratta di coltivazioni autorizzate negli Usa a partire nel 1995, dove viene commercializzato il pacchetto tecnologico Liberty Link costituito da glufosinate ammonio + ibridi/varietà resistenti), e diffusesi poi in Canada, Argentina, Uruguay e dal 2002 anche in India, mentre nell'UE la coltivazione è limitata ad aree modeste in Spagna e Germania. Altre realizzazioni già disponibili commercialmente riguardano cotone, colza e tabacco resistenti a erbicidi oxinilici di largo uso, come il bromoxynil (Cotone BXN), cotone, lino e garofano resistenti alle sulfuniluree, in particolare a triasulfuron e metasulfuron-metil, il riso Clearfield resistente all'imazetapir e il grano Clearfield resistente all'imazamox (Baldwin e Baldwin, 2002).

Tra le colture transgeniche per la resistenza ad erbicidi, la soia gm resistente a glifosate e a glufosinate ammonio ha avuto un impatto significativo sull'agricoltura di numerosi Paesi e in particolare quella nordamericana, determinando una sensibile diminuzione del prezzo di numerosi diserbanti tradizionali e dello stesso Roundup (Pogna, 2002). Gli oppositori dell'utilizzo di queste tecnologie avanzano una serie di motivazioni, la principale delle quali è il maggiore uso di erbicidi, facilmente contestabili dal punto di vista tecnico (Zanin e Catizone, 2003), mentre rimane aperto il problema legato alla possibile diffusione dei geni di resistenza a seguito di incrocio tra le piante coltivate ed eventuali infestanti interfertili con que-

ste. Il trasferimento del transgene è stato dimostrato tra colza e *Raphanus raphanistrum* (Rieger *et al.*, 2002) e tra riso e riso crodo (Dillon et al., 2002) e tali evidenze impongono la necessità di operare con prudenza nel caso di colture che presentano il rischio concreto di trasmettere la tolleranza agli erbicidi a specie infestanti.

Resistenza alle malattie

Tutte le piante sono tolleranti alla maggior parte degli agenti patogeni, ma ciascuna specie ha un suo particolare spettro di patogeni e di insetti ai quali è suscettibile e i cui danni determinano perdite di prodotto, sia in campo che durante la conservazione degli stessi. A livello mondiale tali perdite sono così gravi che, nonostante l'ampio uso di agenti chimici di controllo (insetticidi, fungicidi, pesticidi), il miglioramento della resistenza a patogeni rappresenta uno dei principali obiettivi dei programmi di selezione. L'obiettivo finale del miglioramento genetico per la resistenza ai patogeni è di inserire uno o più geni di resistenza in varietà con buone caratteristiche produttive e qualitative. I principali ostacoli al miglioramento genetico convenzionale sono rappresentati dalla mancanza di fonti di resistenza naturali e dall'impossibilità di trasferire i geni di interesse tra *taxa* filogeneticamente non affini e sessualmente incompatibili. Le biotecnologie hanno consentito di superare queste difficoltà e di accelerare enormemente il progresso per l'ottenimento di resistenze genetiche.

Resistenza agli insetti

L'ottenimento di piante resistenti all'attacco degli insetti si propone di ridurre l'uso degli insetticidi nella pratica agricola al fine di contenere l'impegno tecnico richiesto per la loro utilizzazione, i costi di produzione e, contemporaneamente, ridurre l'impatto ambientale determinato dalla spesso scarsa selettività e dalla bassa degradabilità di questi prodotti.
Lo studio delle interazioni insetto-pianta ha permesso l'isolamento di una serie di molecole e di geni in grado di interferire con i processi digestivi e di assorbimento dei nutrienti degli insetti fitofagi. Una delle simbiosi antagoniste più ampiamente studiate è quella tra alcuni insetti ed il *Bacillus thuringensis* (Bt). Le numerose ricerche su questo argomento hanno prodotto una consistente mole di dati molecolari che hanno permesso lo sviluppo delle prime applicazioni biotecnologiche, attraverso l'ottenimento di

piante transgeniche, per il controllo degli insetti. La strategia più utilizzata è quella che prevede l'inserimento nelle piante di geni Bt che controllano la produzione di proteine che, quando trasformate nella loro forma attiva, sono tossiche per le larve di specifiche famiglie di insetti. Bt è un batterio del suolo che produce, durante la sporulazione, proteine chiamate δ-endotossine le quali, quando vengono ingerite dagli insetti, manifestano la loro tossicità legandosi alle cellule epiteliali dell'intestino e provocandone la lisi osmolitica. Oltre 130 geni Bt sono stati clonati da ceppi diversi del batterio. Questi esprimono endotossine differenti, ciascuna con un proprio spettro di attività contro diversi specie di insetti lepidotteri o coleotteri. Alcuni esempi sono riportati nella tabella sottostante:

Denominazione del gene	**Ordine di insetti per i quali manifesta tossicità**
Cry1A(a), Cry1A(b), Cry1A(c)	Lepidotteri
Cry1B, Cry1C, Cry1D	Lepidotteri
Cry2	Lepidotteri, Ditteri
Cry3	Coleotteri
Cry4	Ditteri
Cry5	Lepidotteri, Coleotteri

Tali geni sono stati manipolati producendo costrutti parzialmente o completamente sintetici in modo da aumentare l'efficienza di espressione nelle piante (Mazier *et al.*, 1997). Queste, quando vengono aggredite dagli insetti, subiscono danni molto limitati, mentre le larve muoiono rapidamente in quanto la pro-tossina ingerita viene attivata da una proteasi specifica che ne libera la parte tossica.

Effetti prodotti da un attacco di insetti su cotone suscettibile (a sinistra) s su cotone Bt (a destra). (fonte USDA).

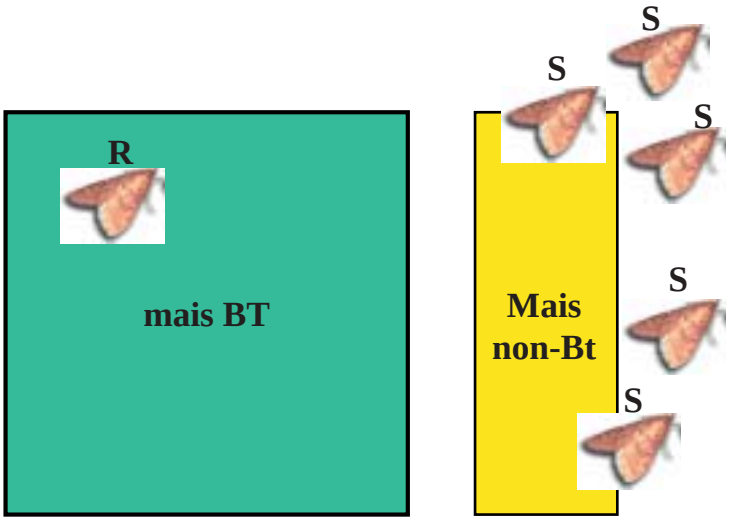
Le piante transgeniche che esprimono endotossine di ceppi diversi di Bt comprendono tabacco, pomodoro, cotone, patata, mais, colza, soia, riso e pioppo. Cotone transgenico, noto con il nome Bollgard, che esprime il

gene *cry1Ac* del Bt, è coltivato negli Stati Uniti a partire dal 1996. La proteina prodotta nelle piante dal gene *cry1Ac* è quasi identica a quella presente in natura e nella formulazione spray di insetticidi Bt ed ha specificità di azione solamente contro le larve dei lepidotteri. Da questa linea sono state in seguito ottenute nuove varietà nelle quali è stato inserito un secondo gene proveniente dal batterio, noto come *cry2Ab*, per aumentare lo spettro di lepidotteri nocivi controllati e, contemporaneamente, limitare la possibilità di comparsa di fenomeni di resistenza.
Anche il mais Bt è stato uno dei primi prodotti di questo tipo ad essere autorizzato alla coltivazione in molti Paesi: le piante presentano un'eccellente protezione contro la piralide, anche con una pressione da parte degli insetti di qualche centinaio di volte superiore a quella di un'infestazione naturale (Estruch *et al.*, 1997). Più recente è la coltivazione di mais trangenico per la resistenza a *Diabrotica* sp. che esprime il gene *cry3Bb1*. Questo gene produce una δ-endotossina che agisce selettivamente contro i coleotteri. Le larve di questo insetto, infatti, attaccano l'apparato radicale delle piante di mais, determinando uno scarso sviluppo dello stesso con diffusi allettamenti della coltura.

A sinistra un ibrido di mais Bt, a destra ibrido di mais suscettibile alla piralide.
(fonte Monsanto)

Per prevenire la probabilità della comparsa di ceppi di piralide resistenti alle tossine Bt, è stata proposta la presenza di aree rifugio coltivate con mais non transgenici, in modo da mantenere un sufficiente numero di insetti suscettibili. I pochi insetti eventualmente resistenti sopravvissuti nei campi Bt dovrebbero, con buona probabilità, incrociarsi con gli individui suscet-

tibili sviluppatisi nell'area rifugio. La loro discendenza sarà suscettibile e morirà se andrà ad infestare un campo Bt, provocando in questo modo un effetto di diluizione degli alleli di resistenza. Attorno a quest'idea si è sviluppato un acceso dibattito sulle dimensioni richieste da tali aree. Attualmente negli Stati Uniti si tende a raccomandare una superficie rifugio pari al 20% di quella coltivata con la coltura transgenica per cotone e mais, ma alcuni ritengono che si debba arrivare al 50%, prevedendo l'esecuzione di trattamenti per proteggere la coltura dalla piralide.



La strategia delle aree rifugio prevede una superficie del 20% investita con mais non Bt.
R= adulti di piralide resistente, S= adulti di piralide suscettibile. (Fonte: Environmental Protection Agency USA).

In patata la resistenza alla dorifora è stata ottenuta mediante l'inserimento del gene *cryA3* di *B. thuringensis* subsp. *tenebrionis*. La proteina prodotta da questo gene ha un'attività insetticida altamente selettiva, dovuta alla specificità dei recettori delle specie bersaglio, per cui agisce contro un numero ristretto di coleotteri. Una nuova linea di patata transgenica, coltivata nel nord-America, in Australia e, dal 2003, nelle Filippine e commercializzata con il nome NewLeaf Y, abbina alla resistenza alla dorifora, la resistenza al virus Y della patata conferita dall'inserimento del gene che codifica per la proteina del capside del virus stesso.
In pomodoro è stata sviluppata una linea transgenica con resistenza a diversi lepidotteri, in particolare nottue, che esprime il gene cry1Ac di *B. thuringensis* subsp. *kurstaki*. Il comportamento agronomico di questa linea è risultato del tutto comparabile con quello delle varietà tradizionali, salvo che per la resistenza ai lepidotteri bersaglio.

Resistenza ai virus

Il fenomeno mediante il quale la presenza di un ceppo virale relativamente innocuo fornisce la resistenza ad un successivo attacco da parte di un ceppo virulento è noto da tempo e va sotto il nome di "*cross protection*". La resistenza incrociata può quindi essere considerata il primo esempio di resistenza non convenzionale e su questa base è nata l'idea di convertire i geni virali in geni vegetali in modo da fornire alla pianta una "*cross protection*" permanente (Sanford e Johnston, 1985). La strategia più ampiamente utilizzata per l'ottenimento di piante resistenti a virus è quella basata sul clonaggio di sequenze del genoma virale, codificanti o non, e sulla loro espressione in piante transgeniche. L'espressione di tali sequenze nelle piante determina una marcata riduzione della suscettibilità verso i virus corrispondenti. La resistenza acquisita risulta in genere a largo spettro nel senso che piante che esprimono un gene di un virus, risultano resistenti anche ad altri virus affini.

Le sequenze codificanti più utilizzate nelle trasformazioni sono quelle che codificano per le proteine del capside del virus e sono poste sotto il controllo di promotori adeguati, quali il 35S del virus del mosaico del cavolfiore o il promotore Ubi-1 del gene della poliubiquitina 1 del mais, utilizzato in costrutti per la resistenza al virus del nanismo giallo dell'orzo. Questi, come altri promotori derivati da *Agrobacterium*, sono costitutivi, perchè in grado di esprimersi in tutti i tessuti dell'ospite, ma si ritiene che in futuro verranno sempre più utilizzati promotori organo- o tessuto-specifici o, preferibilmente, promotori inducibili che permettono l'espressione del gene solo dopo che è avvenuto l'attacco parassitario (Monti *et al.*, 2003).

Negli esperimenti nei quali il gene che codifica per la proteina del capside di un virus patogeno è stato inserito in piante, queste sono risultate resistenti all'infezione del virus stesso. Il meccanismo attraverso il quale ciò si verifica non è ancora completamente chiarito e potrebbe derivare dall'interferenza diretta con le fasi iniziali dell'infezione o con la sua diffusione o con la replicazione del patogeno, forse anche in funzione della collocazione del transgene nei cromosomi o dell'interazione virus-ospite (Hammond *et al.,* 1999). Se questo è l'approccio più consolidato, sono state sviluppate anche altre strategie per indurre resistenza a virus, quali quelle basate sull'utilizzo di proteine di trasporto virale, di proteine coadiuatrici della trasmissione mediante afidi, oppure quelle basate su sequenze virali non codificanti come gli RNA antisenso e i ribozimi, o su RNA satellite. L'RNA satellite non è presente in tutti i ceppi di un virus e la sua presenza è associata ad un

ridotta virulenza. Se questo RNA satellite è presente nelle cellule vegetali prima che si verifichi l'infezione da parte di un ceppo virulento, ne determina una significativa riduzione dell'entità dell'infezione. Nel caso della tecnologia antisenso, geni virali antisenso vengono inseriti nel DNA della pianta che, producendo RNA antisenso, è in grado di bloccare l'RNA del virus infettante (la maggior parte dei fitovirus hanno, come materiale genetico, RNA anziché DNA). Questo approccio è ancora a livello sperimentale, ma i primi risultati sembrano promettenti.
Lo sfruttamento commerciale della resistenza transgenica ai virus è a tutt'oggi ancora molto limitato. La prima specie gm, coltivata a partire dal 1998, è stata la papaia trasformata con la proteina del capside del virus per la maculatura anulata (PRSV, *papaya ringspot virus*) (Gonsalves, 1998). Le coltivazioni di papaia nelle isole Hawaii erano infatti crollate del 40% nei cinque anni precedenti a causa delle ripetute infezioni di PRSV e l'unica possibilità di controllo della malattia consisteva nell'eliminazione delle piante infette. Un gruppo di ricerca della Cornell University ha sviluppato due varietà gm resistenti al virus mettendo gratuitamente il seme a disposizione degli agricoltori.

Sulla destra piante di papaia gm resistenti alla maculatura anulata, a sinistra piante suscettibili (Foto Gonsalves, Cornell University).

Utilizzando geni che codificano per proteine del capside, sono stati sviluppati zucchini gm resistenti a tre importanti patologie virali, il virus del mosaico del cetriolo (CMV), il virus del mosaico dell'anguria (WMV) e il virus del mosaico giallo dello zucchino (ZYMV). Oggi viene commercializz-

zata da due diverse società sementiere una linea di zucchino, CZW-3, che presenta tutte tre le resistenze e che, dal punto di vista agronomico, non risulta inferiore alle varietà tradizionali. Le proteine del capside virale, sulla base delle conoscenze attuali, sembrano non possedere alcuna caratteristica allergenica, né tossica. Va rilevato che lo zucchino è una specie a fecondazione prevalentemente allogama entomofila e che è possibile l'incrocio con forme spontanee della stessa specie, nelle regioni in cui queste sono presenti.

Zucchini della varietà Freedom II resistenti a ZYMV e WMV, a destra. Piante non trasformate suscettibili, a sinistra. Sono visibli le differenze di produzione tra le due file (Foto Gonsalves, Cornell University).

Come ricordato in precedenza, un'altra specie gm coltivata a livello commerciale è la patata. Questa è stata trasformata sia per la resistenza al virus Y della patata (PVY), mediante la proteina del capside, sia per la resistenza al virus dell'accartocciamento fogliare (PLRV), utilizzando una strategia diversa, basata sulla replicasi virale. Le varietà NewLeaf Plus e NewLeaf Y presentano, oltre alla resistenza alla dorifora, fornita da geni Bt, la resistenza al virus dell'accartocciamento e al virus Y, rispettivamente.

In Cina sono coltivate da anni varietà di tabacco e di pomodoro resistenti a diversi virus ottenute utilizzando la strategia delle resistenze multiple derivanti da proteine del capside (CMV e PVY), RNA satellite (CMV) e replicasi virale (TMV) (Yie e Tien, 1998).

In Italia, uno dei problemi più importanti relativamente alle virosi è quello che riguarda il pomodoro da industria coltivato nell'Italia meridionale e, in particolare, la varietà San Marzano. In questa varietà i danni provocati principalmente dal CMV hanno toccato, nell'ultimo decennio fino ai 2/3 del prodotto commerciale inducendo molti agricoltori ad abbandonare la coltivazione di una varietà locale tipica del nostro territorio. Il miglioramento

genetico tradizionale non è stato in grado di fornire alcuna soluzione a questo pressante problema per la difficoltà di reperire fonti naturali di resistenza, sia nel materiale coltivato che in specie selvatiche affini. L'introduzione non convenzionale della resistenza è stata ottenuta inserendo nel San Marzano un gene dello stesso virus che produce RNA satellite. In seguito ad infezione da CMV, si determina una sorta di antagonismo di replicazione tra l'RNA satellite prodotto dalla pianta e il virus stesso. Le piante transgeniche sono risultate, in prove sperimentali, tolleranti all'infezione del CMV e hanno fornito una resa di prodotto commerciale che, in presenza di infezione, è risultata del 30% superiore a quella dei controlli infetti.
Per quanto riguarda la possibilità che la resistenza transgenica, analogamente a quanto avviene per quella convenzionale, possa essere superata dall'insorgenza di ceppi mutanti più aggressivi, non è possibile al momento attuale fornire alcuna risposta, a causa del breve tempo di coltivazione del materiale gm. Alcuni segnali negativi sembrano tuttavia confermare questa possibilità: piante di tabacco trasformate per la resistenza al virus della maculatura anulare del *Cymbidium* (CymRSV) sono diventate suscettibili allo stesso virus dopo pre-inoculazione con PVY o CMV (Di Serio *et al.,* 2002).

Resistenza a funghi e batteri

I meccanismi naturali di difesa contro i patogeni includono un'ampia serie di proteine ed altre molecole organiche prodotte dalle piante prima o durante l'attacco parassitario. Mediante l'ingegneria genetica è possibile ottenere nelle piante una resistenza a patogeni più ampia e più durevole inducendo sia una risposta di ipersensibilità, sia l'acquisizione di una resistenza sistemica (Honèe, 1999). Nonostante tali fenomeni siano complessi e la loro conoscenza incompleta, questo rappresenta un settore di enorme potenzialità per la protezione delle colture. Idealmente, infatti, una pianta potrebbe essere ingegnerizzata per dare, in risposta all'attacco di un patogeno, una reazione incompatibile che porta alla morte delle cellule intorno al punto di infezione (risposta ipersensibile) e, contemporaneamente, la stessa pianta potrebbe essere trasformata per esprimere, anche in assenza del patogeno, una resistenza sistemica acquisita.
Le proteine legate alla risposta patogenetica comprendono un gruppo di proteine il cui accumulo è innescato dall'attacco di un patogeno, o da uno stress di tipo abiotico, e sono state classificate in 12 famiglie principali, alcune delle quali presentano attività antifungina. La funzione della maggior

parte di tali proteine è tuttora sconosciuta, ma per alcune di esse, come ad esempio le β-1,3-glucanasi e le chitinasi, è nota (Honèe, 1999). In linea teorica, l'espressione costitutiva di tali proteine, singolarmente o in combinazione, potrebbe conferire una minore suscettibilità a diversi gruppi di patogeni (Jongedick *et al.*, 1995; Bent e Yu, 1999).

La resistenza ad una malattia in piante transgeniche è stata migliorata utilizzando per la prima volta un gene proveniente da un fungo impiegato nella lotta biologica. Il gene *ThEn-42*, isolato dal fungo micoparassitico *Trichoderma harzianum*, codifica per una endochitinasi a forte attività antifungina ed è stato trasferito in tabacco e patata, ottenendo elevati livelli di espressione costitutiva in diversi tessuti delle piante (Lorito *et al.*, 1998). Queste non presentavano alcun effetto visibile dal punto di vista dell'accrescimento e dello sviluppo. Le piante trasformate mostravano differenze sostanziali nell'attività chitinasica e alcune linee sono risultate completamente resistenti a patogeni fogliari quali *Alternaria alternata, A. solani, Botrytis cinerea* e *Rizoctonia solani*. L'alto livello di resistenza e l'ampio spettro di resistenze ottenuto con l'inserimento di un unico transgene di origine fungina hanno permesso di superare la scarsa efficacia dell'espressione transgenica dei geni per le chitinasi di origine vegetale o batterica.

Altri ricercatori hanno prodotto linee transgeniche di cotone e di tabacco inserendo un clone cDNA che codifica per una endochitinasi di 42 kDa isolato anche in questo caso da un fungo micoparassita, il *Trichoderma virens* (Emani *et al.,* 2003). L'attività endochitinasica è stata analizzata nelle foglie di tabacco e in foglie, radici, semi di cotone. Tutte le piante transgeniche con elevata attività chitinasica hanno evidenziato la presenza della chitinasi di 42kDa. Da queste linee sono state ottenute piante di cotone omozigoti per il transgene che sono state valutate per la risposta ad attacchi di *R. solani* e *A. alternata*. Tutte le piante di cotone trangenico hanno mostrato una resistenza significativa ad entrambi i patogeni.

Approcci diversi utilizzati da altri gruppi di ricerca hanno focalizzato l'attenzione su composti differenti come, ad esempio, le fitoalessine. Si tratta di composti a basso peso molecolare, di natura non proteica, con attività antifungina e antimicrobica, prodotte dalle piante in risposta all'esposizione a questi agenti patogeni. In tabacco è stata ottenuta l'espressione della stilbene sintasi di vite. Questa ha determinato la sintesi del resveratrolo, una fitoalessina che ha consentito di dimezzare il numero di piante infettate dalla muffa grigia, *Botrytis cinerea* (Hain *et al.,* 1993).

Nonostante i promettenti successi ottenuti a livello sperimentale da ricerca-

tori pubblici e da compagnie private, non sono a tutt'oggi disponibili cultivar commerciali di nessuna specie coltivata con resistenza transgenica a patogeni fungini o batterici.

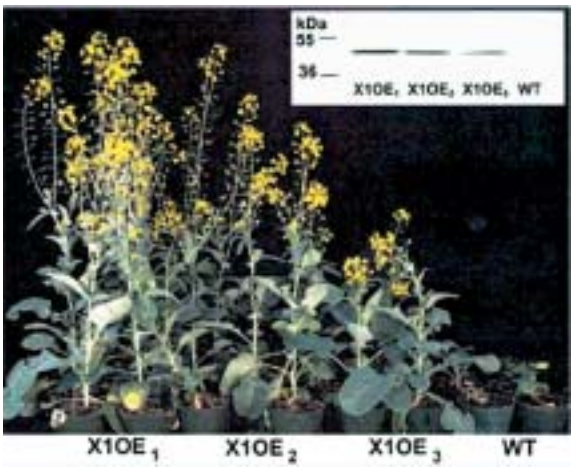
Resistenza a stress abiotici

Siccità, salinità e basse temperature, producendo nelle piante stress osmotici, sono tra i principali fattori che determinano perdite produttive alle colture agrarie. Lo sviluppo di nuove cultivar con una maggiore tolleranza agli stress abiotici potrebbe avere un impatto significativo sulla produzione mondiale di cibo. Una strategia per aumentare la tolleranza a questo tipo di stress è la produzione di composti osmoprotettivi (osmoliti), come zuccheri, alcool, aminoacidi e composti ammonici quaternari che innalzano il potenziale osmotico cellulare, consentendo l'afflusso di acqua, e stabilizzano le membrane e/o le strutture macromolecolari. Alcune piante naturalmente adatte a vivere in condizioni di stress, producono questi osmoliti, mentre la maggior parte delle specie coltivate non è in grado di accumulare composti osmoprotettivi in quantità sufficiente. Qualche risultato è stato raggiunto attraverso la produzione di piante transgeniche. Ad esempio, sono state ottenute piante di tabacco che, grazie ad un gene batterico, producono glicinbetaina risultando tolleranti lo stress da NaCl (Lillus e Büllow, 1996). Linee di *Arabidopsis* contenenti nel genoma cloroplastico geni che codificano per la sintesi di glicinbetaina sono risultate più tolleranti agli stress salini e da freddo, essendo capaci di accrescersi in presenza di NaCl 100mM (Hayashi *et al.*, 1997).

Una strategia alternativa alla produzione di composti osmoprotettivi è la sovraespressione di geni che codificano per trasportatori ionici, come l'antiporto vacuolare Na^+/H^+ che trasporta il sodio lontano dal citosol e lo compartimentalizza nel vacuolo, mantenendo l'equilibrio osmotico. Piante di pomodoro trasformate con il gene *AtNHX1* di *Arabidopsis* sovraproducono l'antiporto Na^+/H^+ risultando in grado di crescere, fiorire e produrre frutti in presenza di alte concentrazioni saline (200 mM), pur preservando la qualità dei frutti che presentano un basso contenuto di sodio.

Un altro aspetto interessante riguarda la tolleranza all'alluminio che è il metallo più abbondante sulla crosta terrestre e, quando presente in soluzione, è tossico per molte piante anche in basse concentrazioni, come succede nei terreni acidi (Lee, 1998). La produzione di acidi organici e la loro emissione nel suolo come essudati è una strategia utilizzata dalle piante tol-

leranti per legare l'alluminio formando una sorta di chelati e bloccandone la tossicità. Piante di tabacco e di papaia sono state trasformate con un gene per la citrato-sintasi del batterio *Psudomonas aeruginosa*: queste piante secernono dalle radici una quantità di citrato quattro volte superiore a quella delle piante controllo ottenendo una tolleranza a livelli tossici di alluminio 10 volte superiore (De la Fuente *et al.* 1997). Questi risultati non hanno però trovato piena conferma in studi successivi. Un gruppo di ricercatori dell'Università del Minnesota ha ottenuto piante transgeniche di erba medica che sovraesprimono il gene *neMDH* (nodule enhanced-malato deidrogenasi) capaci di accumulare nei tessuti malato ed altri acidi organici in misura superiore ai controlli, di emettere una maggiore quantità di essudati e di presentare una maggiore tolleranza all'allumino (Tesfaye *et al.*, 2001). Risultati analoghi sono stati ottenuti in linee di soia trasformate con un gene per l'enzima fosfoenolpiruvato carbossilasi (Ermolayev *et al.*, 2003).



Resistenza alla salinità in piante di *Brassica* suscettibili (WT) e transgeniche, che sovraesprimono il gene *AtNHX1,* coltivate per 10 settimane in presenza di NaCl 200 mM. È evidente il diverso livello di sovraespressione del gene: alto in $X10E_1$, medio in $X10E_2$, basso in $X10E_3$. Nel riquadro: *Western blotting* ottenuto con anticorpo contro AtNHX1 (Fonte: Zhang *et al.*, 2001).

Negli ultimi anni si è inoltre sviluppato un interesse crescente per il metabolismo del trealosio come mezzo per produrre piante ingegnerizzate con un'accresciuta tolleranza agli stress. Il trealosio è un disaccaride con elevata capacità di proteggere le biomolecole in risposta a diversi tipi di stress ambientali ed è presente in natura in molti batteri, funghi e in alcune piante superiori che tollerano la disidratazione (*resurrection plants*). Agisce come un carboidrato di riserva e presenta la caratteristica di assorbire l'acqua in modo reversibile proteggendo le molecole biologiche dai danni indotti dalla disidratazione. La sintesi del trealosio avviene, a partire dall'UDP-glucosio e dal glucosio-6-fosfato, grazie agli enzimi trealosio-6-

fosfato sintasi (TPS) e trealosio-6-fosfato fosfatasi (TPP). In *E. coli* i due enzimi sono codificati rispettivamente dai geni *OtsA* e *OtsB*, mentre nel lievito *S. cerevisiae,* oltre ai geni *TPS1* e *TPS2* che codificano per TPS e TPP rispettivamente, il gene *TSL1* codifica per una subunità proteica con funzioni di regolazione. In *Arabidopsis thaliana* sono stati recentemente identificati 11 geni *TPS* coinvolti nella sintesi del trealosio. Piante di tabacco contenenti il gene *TPS1* di lievito sono in grado di produrre trealosio e presentano una maggiore tolleranza alla siccità, ma anche alcune modificazioni morfologiche come un accrescimento stentato e foglie lanceolate (Romero *et al.*, 1997). L'accumulo di trealosio è stato ottenuto in tabacco utilizzando un promotore foglia-specifico (Rubisco, subunità piccola) (Holmstrom *et al.*, 1996), mentre in patata l'espressione dell'enzima TPS è regolata da un promotore tubero-specifico che non consente la produzione di trealosio a livello significativo (Goddjinn e Van Dun, 1999). Recentemente è stato ottenuta una sovrapproduzione di trealosio in piante transgeniche di riso in cui è stato inserito un gene per la trealosio-6-fosfato sintasi/fosfatasi (TPSP) ottenuto dalla fusione dei geni *OtsA* e *OtsB* di E. coli (Garg *et al.*, 2002).

Miglioramento delle caratteristiche qualitative e nutrizionali dei prodotti

Miglioramento del bilancio aminoacidico

I semi rappresentano la più importante fonte alimentare di origine vegetale in quanto contengono proteine, lipidi e carboidrati e possono essere conservati e trasportati senza che le loro proprietà nutrizionali vengano significativamente alterate. L'uomo e gli animali non sono in grado di sintetizzare 10 dei 20 aminoacidi essenziali che pertanto devono essere assunti con la dieta. La composizione aminoacidica dei semi è molto variabile tra le specie vegetali e non esiste nessuna specie capace di produrre semi con una proporzione ottimale dei diversi componenti necessari per l'alimentazione umana. La principale fonte di proteine per un'ampia quota della popolazione umana è rappresentata da semi di cereali e di leguminose che sono carenti, rispettivamente, degli aminoacidi lisina, cisteina e metionina. Una soluzione a questo problema potrebbe essere rappresentata dal consumo in proporzione adeguata di entrambi i tipi di semi, ma ciò si scontra con ostacoli insuperabili determinati da tradizioni culturali e da fattori economici. Un'alternativa è allora quella di modificare la composizione delle proteine di

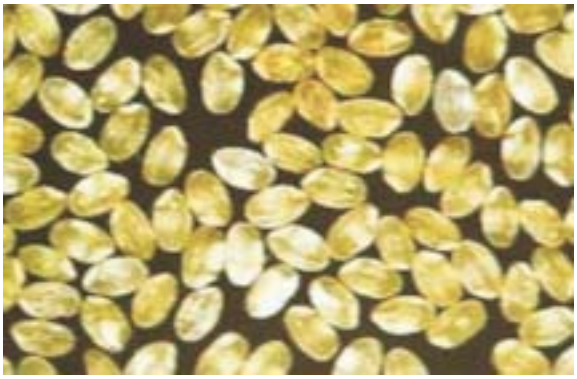
alcune colture. È in quest'ottica che sono state ottenute piante di colza con semi che presentano un incremento del tenore di metionina fino al 33% (Altenbach *et al.*, 1992), piante di lupino nei cui semi viene espresso un gene di girasole che controlla la sintesi di albumina determinando il raddoppiamento del tenore di metionina (Molving *et al.*, 1997) e semi di tabacco nei quali un gene sintetico codifica per una proteina che presenta un 43% di lisina (Keeler *et al.*, 1997). Sia in soia che in colza è stato inoltre ottenuto un incremento pari a 100 volte il contenuto di lisina libera modificando le proprietà di regolazione di enzimi coinvolti nella sua sintesi (Falco *et al.*, 1995). La patata, la più importante coltura orticola, è stata trasformata con un gene dell'amaranto che codifica per una specifica proteina allergenica (AmA1) con una composizione aminoacidica bilanciata che dovrebbe consentire di migliorarne il valore nutrizionale (Chakraborty *et al.*, 2000).

Miglioramento dell'equilibrio dei lipidi e delle vitamine

I lipidi di origine vegetale sono ritenuti avere qualità nutrizionali migliori rispetto a quelli di origine animale in quanto non contengono colesterolo e sono ricchi di acidi grassi polinsaturi. Uno degli aspetti più importanti della qualità degli oli vegetali è il rapporto tra acidi grassi saturi e polinsaturi, per cui molti sforzi sono stati concentrati per alterare la composizione degli oli vegetali. A questo proposito possiamo ricordare uno dei primi successi nella produzione di piante transgeniche con composizione dei lipidi di riserva modificata: la canola (un tipo di colza a basso tenore di acido erucico e di glucosinolati, ottenuto per via convenzionale), capace di accumulare il 40% di acido laurico grazie all'inserimento di un gene proveniente dall'albero *Umbellularia californica* che codifica per l'enzima tioesterasi, attivo nella biosintesi degli acidi grassi durante l'accrescimento dei semi (Murphy, 1999). L'elevato tenore di acido laurico consente di utilizzare quest'olio per la produzione di detergenti, involucri, imbottiture, in sostituzione dell'olio di cocco o di palma.

Un altro risultato importante riguarda la soia, una delle principali colture da olio per alimentazione umana. L'olio di soia è molto ricco di acidi grassi polinsaturi, instabili alle alte temperature, che lo rendono poco adatto ad utilizzi che prevedano la cottura. Attraverso l'introduzione di una seconda copia del gene *fad2*, una denaturasi naturalmente presente in soia e coinvolta nella desaturazione degli acidi grassi, sono state ottenute linee di soia ad alto tenore di acido oleico, un acido grasso monoinsaturo. La presenza di una seconda copia del gene *fad2* determina un fenomeno di "silenziamen-

to genico", il cui risultato è il blocco dell'espressione di entrambe le copie del gene. Questo blocco della via biosintetica degli acidi grassi polinsaturi, presenti solamente in quantità molto limitate, produce un accumulo di acido oleico il cui contenuto può essere dell'80% superiore a quello dell'olio di oliva. Il gene *fad2* è stato isolato da una specie selvatica di soia ed è stato inserito nella soia coltivata mediante tecnica biolistica. La modificazione riguarda solamente i semi, mentre in tutti gli altri organi della pianta la biosintesi degli acidi grassi avviene regolarmente.
La carenza di vitamina A (retinolo), che porta alla cecità, rappresenta un problema nutrizionale molto importante in diversi Paesi, soprattutto del Sud-Est asiatico, nei quali oltre 100 milioni di bambini soffrono della carenza di tale vitamina. Come potenziale soluzione al problema, due gruppi di ricerca europei hanno sviluppato piante di riso nelle quali sono stati inseriti tre geni, due di origine vegetale, isolati dal narciso, e uno di origine batterica, isolato da *Erwinia uredovora*, che codificano per altrettanti enzimi che presiedono alla sintesi di β-carotene (pro-vitamina A). La sintesi di β-carotene avviene a partire da un composto naturalmente presente nell'endosperma immaturo di riso, il geranylgeranyl difosfato (GGDP) che, in presenza di determinati enzimi non naturalmente presenti nel riso, può produrre provitamina A. I tre geni inseriti sono controllati da promotori specifici per cui vengono espressi solamente nell'endosperma delle cariossidi. Il riso transgenico ha un fenotipo del tutto normale, eccetto che per il colore giallo dorato dei chicchi dopo la brillatura e per questo motivo è noto come *Golden rice* (Ye *et al.*, 2000). Quando il *Golden rice* viene ingerito, l'organismo umano trasforma la provitamina-A in vitamina A; ovviamente l'intento è quello di fornire alle popolazioni dei Paesi in via di sviluppo un'integrazione della quantità di vitamina A necessaria, non certamente di soddisfarne il fabbisogno al 100%.



Semi di Golden rice.
I chicchi presentano un caratteristico colore giallo dorato.

Miglioramento della conservabilità dei prodotti

Un'altra applicazione interessante è quella che deriva dalla necessità di alcuni frutti, come il pomodoro, di conservare inalterate le loro proprietà dopo la raccolta. Il problema principale è rappresentato dal rammollimento del frutto dovuto al processo di maturazione e in particolare alla degradazione della pectina presente nelle pareti cellulari ad opera dell'enzima poligalatturonasi (PG). I frutti vengono raccolti precocemente, ma durante le fasi di trasporto e/o lavorazione l'etilene da essi stessi prodotto ne determina la maturazione e, spesso, il deterioramento prima che possano raggiungere il consumatore. Utilizzando geni vegetali inseriti in piante trasformate con direzione antisenso, è possibile bloccare l'espressione di geni importanti per la maturazione come quelli coinvolti nella degradazione della parete cellulare o nella biosintesi dell'etilene. In quest'ottica è stato ottenuto un pomodoro ingegnerizzato, noto come *Flavr Savr*, che esprime un ritardo del processo di rammollimento attraverso l'inserimento di una copia addizionale del gene per la PG con orientamento invertito, determinando una traduzione ridotta dell'mRNA della poligalatturonasi endogena. L'attività PG pertanto diminuisce, fino all'1%, a seguito dell'ibridazione tra mRNA senso e antisenso, consentendo il rallentamento del processo di degradazione delle pareti cellulari del frutto e caratteristiche di migliore viscosità. I pomodori *Flavr Savr* possono pertanto essere raccolti quando hanno sviluppato il loro sapore naturale accumulando zuccheri e acidi caratteristici e mantenendo contemporaneamente la loro saldezza.

Pomodoro transgenico della linea 579 HO (Nat. Biotechn).

Un approccio diverso allo stesso problema ha portato allo sviluppo di linee di pomodoro transgenico attraverso l'inserimento della sequenza incompleta del gene per l'ACC sintasi, normalmente presente in pomodoro. L'enzima endogeno è responsabile della conversione della S-adenosyl-metionina (SAM) ad acido 1-aminociclopropano-1-carbossilico (ACC), che è il precursore immediato dell'etilene, il fitormone che, come noto, ha un ruolo chiave nella maturazione dei frutti. La presenza di una sequenza tronca del gene della ACC sintasi è responsabile di un meccanismo di "sottoregolazione" che sopprime l'espressione del gene nativo riducendo l'accumulo *in situ* di etilene di circa 50 volte.
Lo stesso approccio è stato applicato anche in melone per sviluppare linee a maturazione rallentata attraverso un accumulo ridotto di SAM. Il risultato è stato ottenuto mediante l'inserimento del gene per la s-adenosyl-metionina idrolasi del fago T3 capace di degradare la SAM, impedendone l'accumulo. La mancanza di una sufficiente quantità di SAM determina una significativa riduzione della sintesi di etilene.
Queste tecnologie hanno consentito a tre diverse compagnie di ottenere e commercializzare linee di pomodoro con il processo di maturazione rallentato (Briggs and Koziel, 1998).
Tale tecnologia ha potenzialità applicative enormi per le colture da frutto tropicali che vanno incontro a perdite molto sensibili nei Paesi in via di sviluppo a causa della maturazione rapida e delle inappropriate condizioni di conservazione e di trasporto per raggiungere il consumatore finale.

Produzione di fitofarmaci e vaccini

Il settore maggiormente innovativo delle biotecnologie vegetali riguarda la sperimentazione di piante geneticamente modificate per la produzione di sostanze di interesse terapeutico. Negli ultimi anni è stata ripetutamente dimostrata la capacità delle piante di sintetizzare e assemblare con grande precisione proteine eterologhe per la produzione di farmaci, vaccini, anticorpi, ormoni. Inoltre, l'impiego di piante per la produzione di proteine ricombinanti presenta, rispetto alle colture di cellule animali o di microrganismi, numerosi vantaggi: 1) i sistemi vegetali sono più economici degli impianti industriali che utilizzano la fermentazione o altri sistemi di bioreattori; 2) la tecnologia per la raccolta e la trasformazione dei prodotti vegetali è già disponibile; 3) non è necessario purificare la proteina ricom-

binante se il tessuto vegetale che la contiene è utilizzato direttamente come alimento (vaccini edibili); 4) nelle piante le proteine ricombinanti possono essere accumulate in compartimenti intracellulari, o direttamente espresse in specifici compartimenti (ad esempio, i cloroplasti), nei quali sono maggiormente stabili; 5) la quantità di proteine ricombinanti che possono essere prodotte è simile a quella ottenibile su scala industriale; 6) gli organismi patogeni per l'uomo non utilizzano le piante come ospite per cui i rischi per la salute, derivanti da possibili contaminazioni, sono minimi.

Le piante più utilizzate per la produzione di composti terapeutici sono mais, tabacco, pomodoro, patata, riso, ma anche frumento, colza, erba medica e i prodotti ottenuti, almeno a livello sperimentale, sono molti. Il transgene viene trasferito nelle piante unitamente ad un promotore idoneo, in modo che la sintesi della proteina desiderata avvenga, solitamente, in organi specifici in funzione del successivo utilizzo del prodotto. Al momento si tratta per lo più di realizzazioni che sono ancora in fase di sperimentazione più o meno avanzata, ma che sono molto promettenti generando quindi grosse aspettative.

In piante transgeniche di tabacco, ad esempio, è stata ottenuta la produzione di glucocerebrosidasi, un enzima lisosomiale la cui assenza nell'uomo determina una patologia nota come malattia di Gaucher. Questo risultato fa intravedere per il futuro una nuova possibilità terapeutica (Giddings *et al.*, 2000), dato che attualmente l'enzima viene estratto dalla placenta per cui la cura è molto costosa. In colza è stata ottenuta la produzione di irudina, un anticoagulante per il trattamento della trombosi (Boothe *et al.*, 1997). La somatotropina, un ormone umano impiegato nel trattamento del nanismo ipopituitario dei bambini, è stata prodotta in batteri e recentemente il gene è stato integrato nel genoma cloroplastico di tabacco consentendo di produrre la proteina ricombinante in quantità rilevanti, tanto da far ritenere questi organelli dei veicoli molto efficienti per la produzione di proteine farmaceutiche (Staub *et al.*, 2000).

È stato inoltre dimostrato che inserendo nelle piante geni virali o batterici che codificano per proteine immunogene di un agente patogeno, è possibile indurre nella pianta l'espressione di proteine immunogeniche potenzialmente utilizzabili come vaccini per l'uomo o per gli animali. Un risultato interessante riguarda la produzione in piante di tabacco di anticorpi contro gli antigeni di *Streptococcus mutans* responsabile della carie dentaria (Giddings *et al.*, 2000), risultato che potrebbe permettere di preparare un "chewing gum", a base di estratto di foglie di tabacco, per la prevenzione

della carie. Un anticorpo contro l'antigene carcinoembrionico (CEA) è stato recentemente espresso in riso e frumento (Stoger *et al.*, 2000). Gli anticorpi contro il CEA, uno degli antigeni tumorali meglio caratterizzati, possono essere utilizzati sia a scopo diagnostico che terapeutico ed il loro contenuto nelle cariossidi sembra non diminuire significativamente anche dopo sei mesi di conservazione a temperatura ambiente.

La prevenzione dell'epatite B, causata dal virus HBV (*Hepatis B Virus*), rappresenta un obiettivo primario, soprattutto per i Paesi in via di sviluppo nei quali l'assistenza sanitaria è spesso carente e molti individui sono portatori cronici di questo virus. Il gene *HbsAg*, che codifica per l'antigene di superficie del virus, è stato in precedenza inserito in cellule di lievito e l'antigene prodotto e purificato ha dimostrato, sia in animali da laboratorio che nell'uomo, di essere efficace contro il patogeno e di poter essere utilizzato su larga scala. Questo vaccino ricombinante ha avuto infatti un grande successo commerciale nei Paesi industrializzati, ma ha costi troppo elevati per i Paesi poveri. Per far fronte a questo problema il gene è stato inserito in piante di tabacco e di patata (Eshani *et al.*, 1997) e le piante trasformate sono risultate in grado di produrre l'antigene che è riconosciuto *in vitro* dagli anticorpi umani. I primi esperimenti di immunizzazione condotti sull'uomo hanno dato risultati positivi, ma rimane il problema legato alla difficoltà di utilizzare i tuberi di patata crudi, dato che le proteine vaccinali sono termolabili. Su questo aspetto sono attualmente impegnati molti gruppi di ricerca per la produzione di futuri vaccini in piante commestibili senza cottura. In quest'ottica sono in fase di sperimentazione avanzata varietà transgeniche di banano che contengono antigeni virali o batterici per produrre vaccini edibili a basso costo contro il colera, l'epatite o la diarrea nei Paesi delle aree tropicali o subtropicali.

Da piante transgeniche sia di tabacco che di patata è stato inoltre ottenuto un altro tipo di vaccino costituito da una sub-unità dell'enterotossina termolabile di *E. coli*, responsabile della diarrea, che si è dimostrato attivo nell'indurre l'immunizzazione delle mucose orali e intestinali in animali di laboratorio (Mason *et al.*, 1998). Le prove sull'uomo sono tuttora in corso (Walmsley e Arntzen, 2000).

La maggior parte dei risultati relativi alla produzione di vaccini sono stati ottenuti trasformando piante di tabacco, patata e pomodoro. Le specie più interessanti per esprimere componenti di sub-unità vaccinali sono tuttavia rappresentate dai cereali, che hanno buoni livelli di proteine solubili, in grado di mantenersi stabili durante la conservazione. È evidente che la scel-

ta della specie da trasformare condiziona il tipo di materiale che dovrà essere ingerito: molti tessuti vegetali possono essere ingeriti direttamente, altri necessitano di essere lavorati o trasformati. In quest'ultimo caso è possibile ottenere un prodotto omogeneo, con dosaggio ben definito, ma è indispensabile che trattamenti sotto pressione o termici non alterino le proprietà dell'antigene. Va inoltre sottolineato che la quantità di tessuto vegetale che costituisce un vaccino deve avere dimensioni accettabili per poter essere consumato e questo richiede che le piante transgeniche presentino alti livelli di espressione della proteina di interesse. Infine, i composti biofarmaceutici di origine vegetale devono garantire gli stessi standard di efficacia e di sicurezza dei prodotti di origine diversa.
Come noto, un argomento di grosso interesse e oggetto di dibattito internazionale riguarda la possibilità di diffusione dei transgeni, via polline, a specie selvatiche o coltivate interfertili. L'espressione di proteine farmaceutiche dannose in specie vegetali non desiderate, in conseguenza di incroci spontanei, può infatti generare nell'opinione pubblica preoccupazione e una percezione negativa. È per questo motivo che sono allo studio diversi modi per il contenimento del flusso genico che vanno dall'apomissia all'impiego di genomi incompatibili, al controllo della dormienza e della dispersione dei semi, ai geni suicidi, alle barriere di infertilità, alla maschiosterilità e all'eredità materna. L'inserimento dei geni esogeni nel genoma cloroplastico ha dimostrato di essere un modo efficace per il contenimento dei transgeni, salvo le poche eccezioni nelle quali esso presenta un'ereditarietà biparentale (Daniell *et al.*, 1998).

Applicazioni dell'ingegneria genetica alla tutela dell'ambiente

Il fitorimedio, cioè l'uso delle piante per il risanamento ambientale, rappresenta un approccio di forte attrazione per risanare acque e suoli contaminati da inquinanti organici (ad es., pesticidi) o da metalli pesanti. L'uso di piante che accumulano metalli per rimuoverli in modo selettivo e che riciclano i metalli in eccesso nel terreno rappresenta una tecnologia potenzialmente praticabile e a costi accettabili (Chaney *et al.*, 1997).
Da tempo gli scienziati perseguono l'idea di sfruttare le capacità naturali degli organismi viventi per il risanamento ambientale, ma sfortunatamente le piante che in natura presentano queste capacità sono troppo piccole e a crescita lenta. Un gruppo di ricercatori dell'Università della Georgia ha inserito in *Arabidopsis thaliana* i geni batterici *merA* e *merB* che codificano per

enzimi mercurio-reduttasi (Bizily *et al.*, 1999; 2000). Precedenti ricerche avevano dimostrato che piante trasformate con il gene *merB* erano in grado di trasformare il metil-mercurio nella forma ionica del mercurio. L'inserimento nel DNA della pianta anche del gene *merA* ha consentito il passaggio dalla forma ionica a quella elementare, volatile e non tossica. Certamente questa pianta gm non sembra, al momento, risolvere i reali problemi d'inquinamento sia per l'estrema complessità dell'ambiente naturale rispetto a quello di laboratorio, sia per il fatto che gli agenti inquinanti contengono spesso una miscela di sostanze che dovrebbero essere trattate prima di poter sfruttare le capacità disinquinanti della pianta.
La senape indiana (*Brassica juncea*), una specie piuttosto interessante per la bonifica di terreni da metalli pesanti, è stata ingegnerizzata per migliorarne la capacità di accumulare cadmio nelle radici. Nella pianta sono stati inseriti i geni di *E. coli gshI* che codifica per l'enzima ECS (γ-glutamilcisteina sintasi) e *gshII* che codifica per GS (glutatione sintetasi). Questi enzimi presiedono alla sintesi del glutatione che è il precursore delle fitochelatine, delle proteine capaci di legare i metalli e che sono coinvolte nel loro sequestro e nella tolleranza agli stessi. La sovraespressione di tali geni ha permesso alle piante di senape, in esperimenti di laboratorio, di accumulare nelle radici una quantità di cadmio tripla rispetto alle piante controllo (Zhu *et al.*, 1999a; 1999b). I primi esperimenti condotti in condizioni naturali su terreno contaminato, sembrano confermare la potenzialità dell'utilizzo di piante transgeniche per la fitoestrazione (Bennett *et al.,* 2003).
Un approccio più recente prevede la possibilità di modificare geneticamente alcune specie arboree che, per la loro robustezza e la complessità del loro apparato radicale, potrebbero rappresentare un sistema più efficiente per estrarre agenti inquinanti anche da strati più profondi del terreno. L'attenzione si è concentrata su alcune specie del genere *Populus* e sui loro ibridi che presentano un accrescimento molto rapido e che possono essere propagati facilmente per via vegetativa. Gli ibridi, inoltre, sono generalmente più tolleranti a condizioni ambientali estreme rispetto alle specie parentali. Cloni di ibridi *P. tremula* x *P. alba,* trasformati per sovraesprimere il gene per l'enzima ECS, sono stati valutati per la capacità di detossificare erbicidi cloroacetanilidi, quali acetochlor e metolachlor, presenti nel terreno (Gullner *et al.*, 2001). I cloni transgenici, fenotipicamente del tutto simili ai controlli non trasformati, hanno mostrato un marcato incremento dell'attività dell'enzima nelle foglie della parte apicale delle piante. Questi primi risultati sembrano confermare la possibilità di impiegare pioppi trans-

genici nel fitorimedio, anche se occorre migliorarne ulteriormente la capacità di detossificazione.
Nel pioppo giallo (*Liriodendron tulipifera*) è stato inserito, analogamente a quanto fatto in *Arabidopsis*, il gene batterico *merA*: in laboratorio le piante transgeniche sono risultate dieci volte più resistenti al mercurio dei controlli ed hanno anche evidenziato la capacità di convertire la forma ionica del mercurio, altamente tossica, nella forma elementare, molto meno tossica (Rugh *et al.*, 1998).

Considerazioni e prospettive

Negli ultimi dieci anni si è registrato un rapido progresso nella produzione e commercializzazione di piante transgeniche. Il primo tipo di pianta transgenica ad essere immesso sul mercato è stato, nel 1994, il pomodoro a maturazione ritardata e attualmente sono disponibili piante con tolleranza agli erbicidi, agli insetti, ai virus e con nuove caratteristiche qualitative. La superficie coltivata con colture transgeniche è passata dagli 1,7 milioni di ettari del 1996 ai 67,7 milioni del 2003 e il numero di Paesi nei quali si colloca il 99% della superficie coltivata con piante gm è passato dai quattro del 2002 a sei nel 2003: a Stati Uniti, Argentina, Canada e Cina si sono infatti aggiunti Brasile e Sud Africa. Ci sono inoltre altri quattro Paesi (Australia, India, Romania e Uruguay) nei quali la superficie coltivata con colture gm supera i 50.000 ha (fonte ISAAA, 2004). In particolare, nel 2003 gli Stati Uniti hanno coltivato 42,8 milioni di ettari con sementi gm (+10% rispetto al 2002) che rappresentano il 63% della superficie totale mondiale, l'Argentina 13,9 milioni di ettari, pari al 21% del totale mondiale. In questo Paese il 100% della soia coltivata è soia gm, e le superfici coltivate con mais Bt sono in aumento. Il Brasile ha cominciato a coltivare soia gm nel 2003 con una superficie investita pari a 3 milioni di ettari. In Cina, come del resto in India, la superficie investita da colture gm è costituita prevalentemente da cotone Bt.
Stime condotte dal National Agricolture Statistical Service dell'USDA relative alle coltivazioni del 2004 negli Stati Uniti, prevedono che le colture gm costituiscano l'85% per la soia (varietà resistenti ad erbicidi, +4% rispetto al 2003), il 76% per il cotone e il 45% per il mais (+5% rispetto al 2003). In quest'ultimo caso si valuta che il 27% della superficie sia rappresentato da mais Bt, il 13% da mais resistente agli erbicidi e il 5% da ibridi che portano entrambi i tipi di resistenza.
Il rischio ecologico del possibile trasferimento di transgeni alle specie sel-

vatiche affini dovrà essere oggetto di norme legislative in ciascun Paese, in relazione alle peculiarità dei diversi sistemi agricoli e con particolare attenzione nelle aree di origine delle diverse specie. In accordo con Hails (2000), si ritiene che non possano esserci alternative ad una sperimentazione di campo su ampia scala, seria e rigorosa, che permetta di porre a confronto gli aspetti pregiudizievoli delle colture gm con quelli delle colture che si intende sostituire. L'inserimento dei transgeni nel genoma cloroplastico, anziché nei cromosomi nucleari, è risultato essere una valida strategia per incrementare la tolleranza agli erbicidi (Gray e Raybould, 1998) e agli insetti (McBride *et al.*, 1995) evitando il possibile flusso genico attraverso il polline. Una strategia alternativa, ritenuta tra le più affidabili (Ellstrand, 2003), potrebbe essere rappresentata dalla tecnologia TM (*Tandem Constructs for Transgenic Mitigation*) basata sull'inserimento di costrutti che contengono, fortemente associati al transgene, geni deleteri, in termini di *fitness*, per le specie infestanti o selvatiche (Gressel, 1999).

La produzione di nuove piante transgeniche è stata sinora condizionata, oltre che dalla disponibilità di efficienti metodi di trasformazione, dall'individuazione dei geni responsabili del controllo di singoli caratteri e dalla conoscenza della loro funzione. Quest'ultimo aspetto, in particolare, ha registrato significativi avanzamenti in campo vegetale derivanti dallo studio di fondamentali processi vitali, quali la fotosintesi, la risposta alla luce, lo sviluppo di fiori e semi. La disponibilità di mutanti per i diversi caratteri ha rappresentato un mezzo insostituibile nel decifrare la funzione di singoli geni ed ha aperto la strada ad una nuova strategia basata sul sequenziamento di interi genomi. La pianta modello individuata come punto di partenza per lo sviluppo della genomica vegetale è stata *Arabidopsis thaliana*, date le dimensioni ridotte del suo genoma nucleare (125 Mpb) e la caratterizzazione di molti geni già disponibile. Il sequenziamento del genoma di *Arabidopsis*, avviato nel 1996 e completato nel 2000, ha iniziato a fornire molte importanti informazioni. Ad esempio, sono stati individuati complessivamente 25.498 geni, il numero di geni per i fattori di trascrizione sono il doppio di quelli identificati in *Drosophila*, i geni implicati nella risposta ai patogeni e all'ambiente sono più di quanto ci si attendeva, il 58% del genoma è costituito da sequenze duplicate suggerendo una probabile origine tetraploide della specie (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Attualmente è in corso il sequenziamento dei genomi di mais e riso. Una volta completato il sequenziamento del genoma di un organismo, il passo successivo consiste nel decifrare la funzione di tutti i geni integrando cia-

scuna di esse nel genoma completo. Questa strategia è nota come Genomica funzionale (Goga e Tilghman, 2000). L'analisi comparativa dei genomi di *Arabidopsis*, mais, riso, ed in futuro altre specie, consentirà di ottenere informazioni funzionali anche di processi complessi.
Tradizionalmente l'espressione genica viene analizzata sulla base della determinazione quali- quantitativa degli mRNA, ma questo è possibile solamente per uno o pochi geni alla volta. Con la conoscenza almeno parziale della sequenza dei genomi, è possibile analizzare l'espressione di migliaia di geni o di interi genomi per volta, ad esempio ottenuti da piante allevate in condizioni ambientali diverse, determinando quali geni sono legati ai diversi processi o alle diverse condizioni ambientali e comprendere l'attività e il ruolo biologico svolto dalle proteine da essi codificati (Lockhart e Winzeler, 2000). Quest'ultimo risultato è reso possibile dall'introduzione di nuove tecniche che utilizzano micro-arrays con specifiche sequenze di DNA legate ad un supporto solido che possono ibridare con le sequenze allo studio (Case-Green *et al.*, 1998).
Con l'avvento della genomica funzionale si apre quindi la possibilità di produrre nuove piante transgeniche nelle quali sarà possibile l'inserimento anche di caratteri multigenici. Inoltre, la conoscenza del meccanismo di traduzione per la risposta ai patogeni, oggi non ancora completamente chiarito, consentirà di ottenere informazioni cruciali per il controllo dei patogeni mediante la tecnologia transgenica. Parimenti, sarà determinante la conoscenza dei meccanismi di resistenza al secco, alla salinità e ad altri fattori di stress. Di particolare interesse potrà risultare lo studio del profilo di espressione, mediante micro-arrays di DNA, delle varietà locali che si sono evolute in condizioni ambientali peculiari, al fine di identificare i geni coinvolti nei processi di risposta agli stress e di valutare il loro possibile utilizzo in piante transgeniche.

Bibliografia

Altanbach SB, Kuo CC, Staraci LC, *et al.*, 1992. Plant Molecular Biology, 18, 235-245.

Baldwin FL, Baldwin TL., 2002. In: Jacob HS, Dodd J, Moore JH (Eds.). Proc. 13th Austral. Weeds Conf. Of Plant Protection Soc. Of WA, 650-654.

Bennett LE, Burkhead JL, Hale KL, Terry N, Pilon M, Pilon-Smits EA, 2003. J Environ Qual, 32 (2), 432-440.

Bizily SP, Rugh CL, Summers AO, Meagher RB, 1999. Proc Natl Acad Sci USA, 96 (12), 6808-13.

Bizily SP, Rugh CL, Meagher RB, 2000. Nat Biothecn, 18 (2), 213-217.

Boothe JG, Parmenter DL, Saponja JA, 1997. Drug Develop Res, 42, 172-181.

Briggs SP, Koziel M, 1998. Curr Opin in Biotechnol, 9, 233-235.

Case-Green SC, Mir CU, Pritchard CE, Southern EM, 1998. Curr Opin in Chemical Biology, 2, 404-410.

Castle LA, Siehl DL, Gorton R, *et al.*, 2004. Science, 304 (5674), 1151-1154.

Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A, 2000. Proc Nat Acad Sci USA, 97, 3724-3729.

Chaney RL, Malik M, Li YM, *et al.*, 1997. Curr Opin in Biotechnology, 8, 279-284.

Daniell H, *et al.*, 1998. Nat. Biotechnol, 16, 345-348.

De la Fuente JM, Ramirez-Rodriguez B, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L, 1997. Science, 276, 1566-1568.

Di Serio F, L Rubino, M Russo, GP Martelli, 2002. J Pl Pathol, 84, 21-124.

Dillon TL, Baldwin FL, Talbert RE, Estroninos L, Gealy DR, 2002. Proc. Weed Science Soc. of America (WSSA), 42, 35.

Emani C, JM Garcia, E Lopata-Finc, *et al.*, 2003. Pl Biotech J, 1(5), 321.

Ehsani P, Khabiri A, Domansky NN, 1997. Gene, 190, 107-111.

Ellstrand NC, 2003. In: Dangerous liasons? When cultivated plants mate with their wild relatives. John Hopkins Univ Press.

Ermolayev V, Weschke W, Manteuffel R., 2003. J Exp Bot., 54(393), 2745-56.

Estruch JJ, Carrozzi NB, Desai N, *et al.*, 1997. Nat Biotechnol, 15, 137-141.

Falco SC, Guida T, Locke M, *et al.*, 1995. Bio/Technology, 13, 577-582.

Garg AK, Kim JK, Owens TJ, *et al.*, 2002. Proc Natl Acad Sci U S A., 10, 99(25):15898-903.

Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A, 2000. Nat Biotechnol, 18, 1151-1155.

Goddjin OJM, van Dun K, 1999. Trends Pl Sci, 4, 315-319.

Goga O, and Tilghman SM, 2000. Nature, 405, 820-822.

Gonsalves D, 1998. Ann Rev Pl Path, 36, 415-437.

Gray AJ, Raybould AF, 1998, Nature, 392, 653-654.

Gressel J, 1999. Trends in Biothecn, 17, 361-366.

Gullner G, Komives T, Rennenberg H., 2001. J Exp Bot, 52(358):971-9. Hails RS, 2000. Trends in Environmental Ecology, 15, 14-18.

Hain R, Reif HJ, Krausse E, *et al.*, 1993. *Nature*, 361:153-156.

Hammond J, H Lecoq, B Raccah, 1999. Advances in Virus Res, 54, 189-313.

Hayashi H, Alia, Mustardy L, Deshnium P, Ida M, Murata N, 1997. Plant J, 12, 133-142.

Holström KO, Mäntyla E, Wellin B, *et al.*, 1996. Nature, 379, 683-684.

Honèe G. 1999. *Eur. J. Plant Path.,* 105:319-326.

Jongedick E, Tigelaar H, Van Roekel JSC, *et al.*, 1995. *Euphytica*, 85:173-180.

Keeler SJ, Maloney CL, Webber PY, *et al.* 1997. Plant Molecular Biology, 34, 15-29.

Lee JA, 1998. Adv Bot Res, 29, 2-30.

Lilllius G, Bülow L, 1996. Bio/Technology, 14, 177-180.

Lockhart DJ, Winzeler E, 2000. Nature, 405, 827-836.

Lorito M, SL Woo, I Garcia Fernandez *et al.*, 1998. Proc Natl Acad Sci USA, 95 (14), 7860-7865.

Mason HS, Haq TA, Clements JD, 1998. Vaccine, 16, 1336-1343.

Mazier M, C Pannetier, J Tourneur, *et al.*, 1997. Biotech Annual Rev. 3: 313-346.

McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, *et al.*, 1995. Bio/Technology, 13, 362-365.

Molving L, Tabe LM, Eggum BO, *et al.*, 1997. Proc Natl Acad Sci USA, 94, 8393-8398.

Monti L, A Barone, GP Martelli, 2003. In: Evoluzione dei metodi di difesa fitosanitaria. Atti Accad. Georgofili, Firenze. Soc. Ed. Fiorentina, 271-304.

Murphy DJ, 1999. Curr Opin in Biotecnology, 10, 175-180.

Padgette SR, Taylor NB, Nida DL, *et al.*, 1996. J Nutr, 126, 702-716.

Pogna N, 2002. L'Informatore Agrario, 30, 35-38.

Rieger MA, Potter TD, Preston C, Powls SB, 2002. Proc. Weed Science Soc. of America (WSSA), 42, 39.

Romero C, JM. Bellés, JL. Vayá, *et al.*, 1997. Planta, 201, 293-297.

Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA., 1998. Nat Biothecnol, 16 (10), 925-928.

Sanford CJ, SA Johnston, 1985. J Theor Biol, 11, 395-405.

Staub JM, Garcia B, Graves J, 2000. Nature Biotechnology, 18, 333-338.

Stoger E, Vaquero C, Torres E, *et al.*, 2000. Plant Molecular Biology, 42, 583-590.

Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA, 2001. Plant Physiol., 127(4):1836-1844.

Walmsley AM, Arntzen CJ, 2000. Curr Opin Biotechnol., 11(2),126-129.

Ye X, Al-Babili S, Klöti A, *et al.*, 2000. Science, 287, 303-305.

Yie Y, P Tien, 1998. In: Plant Virus Disease Control. Hadidi A, Khetarpal RH, Koganezawa H, Eds. Am Phytopathol Soc Press, St Paul, 129-141.

Zanin G, P Catizone, 2003. In: Evoluzione dei metodi di difesa fitosanitaria. Atti Accad. Georgofili, Firenze. Soc. Ed. Fiorentina, 195-269.

Zhang HX, Hodson J, Williams JP, Blumwald E, 2001. PNAS, 98, 12832-12836.

Zhu YL, Pilon-Smits EA, Jouanin L, Terry N., 1999a. Plant Physiol, 119 (1), 73-80.

Zhu YL, Pilon-Smits EA, Tarun AS, *et al.*, 1999b. Plant Physiol, 121 (4), 1169-78.

4 - Le nuove biotecnologie "accettabili" nel settore zootecnico

Martino Cassandro, Chiara Dalvit, Chiara Targhetta
(Dipartimento di Scienze Zootecniche - Università degli Studi di Padova)

Valerio Bondesan
(Veneto Agricoltura, Settore Ricerca e Sperimentazione Agraria ed Ittica)

Introduzione

Il settore delle produzioni animali contribuisce a circa il 50% delle produzioni agricole nei paesi sviluppati e poco più del 25% nei paesi in via di sviluppo (Cunningham, 1999). In risposta all'aumento della popolazione e all'incremento dei consumi si è stimato che nei paesi sviluppati siano in atto incrementi pari al +3,4% per anno delle produzioni animali ed al +2,3% delle produzioni vegetali (FAO, 1996).

I fattori in grado di consentire tali incrementi produttivi risultano i più diversi e controversi, a partire dai miglioramenti ambientali, gestionali e genetici. Tra questi ultimi ricordiamo l'uso di tecniche di natura biologica, le cosiddette biotecnologie, che risultano oggigiorno ampiamente utilizzate nel settore delle produzioni animali con numerose e discutibili applicazioni secondo l'opinione pubblica.

L'applicazione di biotecnologie nel settore zootecnico offre una serie di opportunità legate non solo al miglioramento della produttività animale attraverso l'incremento delle prestazioni produttive, della qualità dei prodotti, dell'efficienza riproduttiva e del miglioramento dell'utilizzazione nutrizionale degli alimenti, ma anche al controllo dello stato di salute e benessere degli animali e, più recentemente, anche nel campo della sicurezza alimentare con biotecnologie legate a strumenti e metodi innovativi per la (rin)tracciabilità dei prodotti alimentari.

A tale proposito, è da sottolineare come l'uso delle biotecnologie applicate nel controllo e miglioramento della salute e del benessere animale e nel campo della sicurezza alimentare, sembrano riscuotere oggigiorno un favorevole impatto sulla pubblica opinione sia per la loro facilità di comprensione rispetto alle biotecnologie riproduttive (ad es., clonaggio, fertilizzazione e maturazione in vitro e transgenesi), sia per i minori problemi etici che queste comportano. È comunque importante ribadire che lo studio sugli effetti collaterali, l'educazione pubblica e l'informazione corretta sulle

biotecnologie, qualunque esse siano e in qualunque campo esse vengano applicate, devono essere continuamente perseguite al fine di evitare facili ed irresponsabili utilizzi e/o prese di posizione a priori che rischiano di vanificare utili strumenti per migliorare la qualità della vita e l'ambiente di tutti gli organismi viventi.
È con questa raccomandazione che la presente nota divulgativa desidera porre l'attenzione su alcune biotecnologie applicate alle risorse genetiche animali, quali la genomica strutturale e funzionale, il sessaggio del seme e la tracciabilità genetica, attualmente oggetto di studi e ricerche presso il Dipartimento di Scienze Zootecniche dell'Università degli Studi di Padova in collaborazione con Veneto Agricoltura e la Regione Veneto.

Genomica strutturale e funzionale

Una delle più significative scoperte scientifiche degli ultimi anni è stata senz'altro lo sviluppo e la diffusione su larga scala della genomica o meglio dell'analisi ed identificazione dei geni e della loro espressione (fig. 1). A questo proposito la genomica si può suddividere in due tipologie: a) la *genomica strutturale,* ovvero la caratterizzazione della natura fisica dell'intero genoma come ad esempio la localizzazione cromosomica di un gene, e b) la *genomica funzionale,* ossia la caratterizzazione dell'espressione genica a livello proteico, chiamata per l'appunto anche proteomica. Entrambi gli approcci, strutturale e funzionale, risultano essere molto rilevanti per il mappaggio di un genoma al fine di caratterizzare loci di caratteri economicamente importanti e per identificare geni che presiedono al controllo di caratteri di interesse. La combinazione dei due approcci, strutturale e funzionale, permette di definire una moderna forma di tecnica biologica o biotecnologia che si potrebbe chiamare "genomica integrativa". Nel settore della produzione della carne la genomica può aiutare a migliorarne la qualità identificando nuovi predittori di caratteri qualitativi quali la tenerezza, parametro sempre più ricercato dai consumatori, il quale risulta condizionato dall'area e dal tipo di fibre muscolari, dalle caratteristiche del collagene e dal grasso intramuscolare, ovvero da fattori controllati oltre che a livello ambientale e nutrizionale anche a livello genico. L'analisi genomica permette infatti di poter identificare specifiche regioni cromosomiche chiamate QTL (loci di caratteri quantitativi) o ETL (loci di caratteri economici) preposte o associate all'espressione nei tessuti muscolari di tali carat-

teristiche qualitatitive ed economiche che consentirebbero di migliorare i metodi selettivi mediante una selezione assistita da marcatori (*marker assisted selection:* MAS) o dal gene regolatore direttamente (*gene assisted selection:* GAS). Altri utilizzi dell'applicazione della genomica si possono trovare nei controlli di paternità mediante l'applicazione di marcatori genetici. Il principio si basa sulla ricerca di incoerenze tra il genotipo di un individuo e i genotipi dei suoi genitori tramite l'analisi di diversi loci marcatori. Inizialmente tale controllo era effettuato con tecniche immunologiche basate sull'analisi degli antigeni presenti nel sangue mentre ora sono stati messi a punto protocolli per l'uso di marcatori del tipo microsatelliti particolarmente indicati per il loro forte polimorfismo e la loro abbondanza nel genoma (Boichard D. *et al.,* 1998). Anche i marcatori AFLP si stanno rivelando particolarmente adatti per questo tipo di studi e per il DNA fingerprinting in generale (Ajmone-Marsan *et al.,* 1997). Infatti, in uno studio condotto su 47 bovini di razza Frisona (Ajmone-Marsan, *et al.,* 1997), gli AFLP sono stati in grado di evidenziare 248 polimofismi mettendo dunque in rilievo il loro alto grado di informatività.

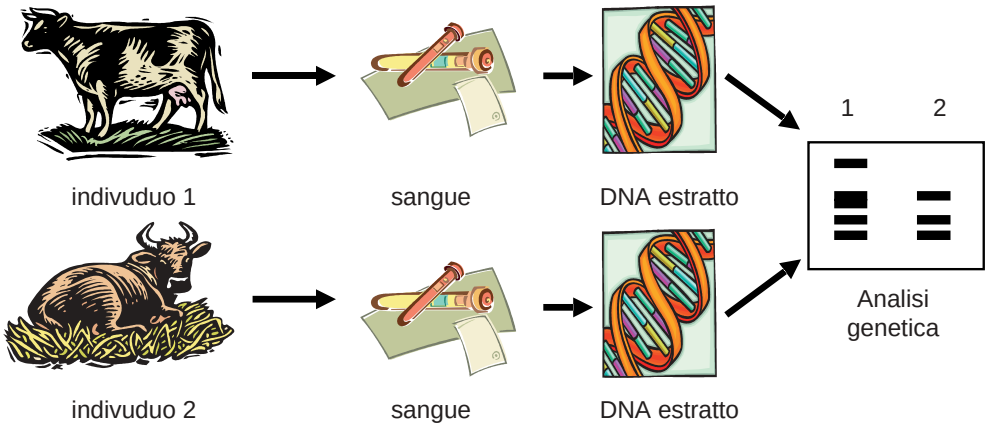


Figura 1. Esempio di analisi genetica. L'analisi dei frammenti di DNA estratti da due individui diversi mette in evidenza delle differenze nel profilo di bande ottenuto e rappresentante l'impronta genetica del soggetto analizzato.

Un'ulteriore applicazione della genomica nel campo animale è quella legata allo studio della diversità genetica tra razze. Lo studio delle distanze genetiche ha come scopo quello di capire le loro origini e il loro percorso evolutivo in modo da trovare eventuali somiglianze; inoltre, tali studi offrono la possibilità di valutare la variabilità genetica all'interno di una stessa

razza o popolazione, permettendo di attuare programmi di conservazione delle piccole popolazioni o di razze locali. Grazie a questi programmi è possibile evitare la perdita di geni che potrebbero risultare utili nel futuro in caso di un cambiamento delle condizioni economiche o ambientali (Boichard *et al.,* 1998).

Riguardo alla conservazione di razze locali sono stati condotti numerosi studi in diverse specie e razze di interesse zootecnico. Recentemente è stato condotto uno studio su cinque razze caprine allevate nella zona delle Alpi Lombarde (Crepaldi *et al.,* 2001); lo scopo era quello di stabilirne le distanze genetiche ai fini di studi evolutivi riguardanti le loro origini. Il lavoro è stato condotto paragonando l'uso di marcatori morfometrici con l'uso di marcatori molecolari AFLP. È interessante osservare come i due approcci abbiano fornito risultati differenti dovuti alla diversa natura dei marcatori considerati. I marcatori morfometrici infatti, essendo influenzati da fattori ambientali e dalla pressione selettiva, non sono in grado di fornire una descrizione fedele della storia evolutiva di una specie, ma ne descrivono solamente un aspetto parziale, legato alla storia dei diversi luoghi che sono stati colonizzati dai diversi gruppi durante la loro differenziazione (Cavalli Sforza, 1996); i marcatori molecolari invece, non essendo influenzati dall'ambiente e, nella maggior parte dei casi, non essendo soggetti alla pressione selettiva, sono in grado di descrivere meglio la storia evolutiva di una specie dal punto di vista genetico. Questo studio evidenzia quindi come le informazioni ottenute tramite l'utilizzo dei marcatori molecolari potrebbero identificare razze con una storia evolutiva originale e che conservano alleli che finora non hanno subito una forte selezione ma che potrebbero risultare utili in futuro (Crepaldi *et al.,* 2001).

Riguardo alla possibilità di attuare programmi di conservazione all'interno di razze con bassa variabilità genetica tramite l'uso di marcatori molecolari, è importante citare l'analisi effettuata sul suino iberico utilizzando, anche in questo caso, gli AFLP (Ovilo *et al.,* 2000). Tale studio ha permesso di caratterizzare due ceppi altamente incrociati di suino iberico individuando marcatori AFLP ceppo-specifici. Inoltre, per quanto riguarda tali ceppi è stato possibile identificare la presenza di marcatori maschio-specifici che potrebbero risultare particolarmente interessanti, se identificati anche in altre specie; in particolare nei bovini per conoscere il sesso dell'embrione e nelle anatre e nelle oche, per la certificazione di prodotti di alta qualità a base di carne derivata esclusivamente da individui di sesso maschile (Ovilo *et al.,* 2000).

Studi sulla diversità genetica risultano oggi di particolare importanza anche

nell'ambito bovino, infatti la moderna zootecnia si sta sempre più focalizzando sull'allevamento di alcune razze molto produttive, portando alla riduzione delle popolazioni di razze meno competitive (Ajmone-Marsan *et al.,* 2002). Sono stati svolti diversi studi per investigare la variabilità genetica a livello molecolare, in particolare attraverso l'uso dei marcatori microsatelliti, i quali hanno dimostrato che le frequenze alleliche messe in evidenza sono dipendenti dalla razza (Martìn-Burriel *et al.,* 1999, Maudet *et al.,* 2002, Ciampolini *et al.,* 1995, Ciampolini *et al.,* 2003, Blott *et al.,* 1999). Questi studi sono improntati oltre che sulla conoscenza dell'evoluzione delle varie razze, sulla possibilità di attuare piani di conservazione della variabilità genetica (Martìn-Burriel *et al.,* 1999, Maudet *et al.,* 2002).
Sono stati condotti infatti lavori per determinare la distanza genetica tra sei diverse razze bovine locali spagnole (Martìn-Burriel *et al.,* 1999) e tra sette diverse razze locali francesi (Maudet *et al.,* 2002). Entrambi gli studi si sono avvalsi dei marcatori microsatelliti, che sono considerati dalla FAO i marcatori che dovrebbero essere universalmente usati per gli studi investigativi sulla diversità genetica delle razze domestiche (Ajmone-Marsan *et al.,* 2002), grazie al loro alto grado di informatività (dovuto all'elevato grado di polimorfismo) e alla loro natura codominante.
Paragonando l'efficienza dei microsatelliti con quella di altri marcatori diallelici nella discriminazione di sette razze bovine europee (Blott *et al.,* 1999), i microsatelliti sono risultati i più efficienti, evidenziando, anche in questo caso, come i marcatori più potenti nella discriminazione siano quelli che presentano un cospicuo numero di alleli osservati (Blott *et al.,* 1999).
In Italia, come in Francia e in Spagna, è stato condotto uno studio per definire la distanza genetica tra tre razze locali, la Frisona Italiana, la Bruna Italiana e la Maremmana (Ajmone-Marsan *et al.*, 1997). In questo caso sono stati usati invece i marcatori AFLP, già considerati come promettenti per tali studi grazie al basso sforzo richiesto per la messa a punto e ai bassi costi da sostenere rispetto ai microsatelliti (Toro *et al.,* 1998). Questo studio ha messo dunque in evidenza l'importanza dei marcatori AFLP per analisi riguardanti la diversità genetica; essi in particolare potrebbero fungere da importante complemento alle informazioni fornite dai microsatelliti. Questi ultimi infatti a causa delle loro rapide evoluzioni, dovute all'incremento o al decremento delle ripetizioni, potrebbero portare a una sottostima della diversità genetica. Gli AFLP invece, a causa delle mutazioni che stanno alla loro origine, evolvono meno rapidamente e possono quindi risultare più utili in studi riguardanti specie differenti o popolazioni molto divergenti

(Ajmone-Marsan *et al.,* 2002).
Nell' ambito della ricerca biotecnologica riguardante le produzioni animali, è necessario ricordare anche gli sforzi compiuti nella diagnostica molecolare, nella produzione di vaccini innovativi e nella creazione e selezione di linee genetiche resistenti alle malattie. In particolare le sonde molecolari hanno trovato applicazione nel campo della diagnostica permettendo di identificare la presenza di patogeni quali salmonella, *E. coli*, carbonchio ematico (antrace), micoplasmi tra cui gli agenti responsabili della pleuropolmonite contagiosa bovina e virus come quelli dell'afta epizootica e della rinotracheite infettiva del bovino (IBR). Le sonde sono inoltre utilizzate per l'individuazione di geni desiderati o indesiderati come quelli responsabili della fecondità nella pecora (*Boorola*), dei difetti della carne suina (*alotano*), e tutti quei geni che possono costituire un valido aiuto per l'identificazione di varie malattie responsabili di danni economici negli allevamenti zootecnici (BLAD, Weaver) permettendo quindi di individuare i soggetti portatori e escludendoli dunque dalla selezione.
Negli ultimi anni si è inoltre diffuso l'uso, a scopo preventivo, di vaccini ricombinanti virali e batterici caratterizzati da una maggiore sicurezza rispetto a quelli tradizionali; tra questi quello per l'afta epizootica e la leucemia felina (Bonsembiante *et al.,* 2002).

Sessaggio del seme

Il sessaggio del seme rappresenta una biotecnologia riproduttiva in grado di preselezionare il sesso del nascituro; i benefici apportati si riscontrano soprattutto nella programmazione delle nascite di soggetti da destinare alla rimonta aziendale e di riproduttori da introdurre nei centri genetici. L'Inghilterra è stato il paese in cui per la prima volta sono state effettuate ricerche sulla metodologia di sessaggio del seme in bovini e dove si è colto l'effettivo valore dell'utilizzo di tale tecnica nell'ambito delle biotecnologie riproduttive.
Le sperimentazioni sono continuate negli USA dove nel 1980, per migliorare l'efficienza della tecnologia del sessaggio e per sfruttarne a pieno le potenzialità, si è fatto per la prima volta uso del citofluorimetro a flusso che ha garantito percentuali di purezza molto più elevate rispetto alle tecniche precedenti basate sulla sedimentazione, centrifugazione, elettroforesi e utilizzo di antigeni. La citofluorimetria a flusso si basa sull'ordinamento (*sorting*) degli spermatozoi in base alla differente quantità di DNA presente nello spermatozoo X (femminile) rispetto a quello Y (maschile). Tale diffe-

renza di quantità di DNA si attesta nei bovini sul 2,8% in più per quello femminile, mentre per quello umano risulta dell' 1,0%.
Intorno alla metà degli anni '90 il seme sessato ha trovato applicazione anche nelle consuete biotecnologie di riproduzione con l'ottenimento dei primi vitelli nati da fecondazione artificiale con seme sessato. Gli ottimi risultati che hanno prodotto tali sperimentazioni hanno indotto numerose ditte di produzione di seme ad investire sul seme sessato tanto che tale biotecnologia si è diffusa anche in Italia attraverso la Cogent la quale, nel luglio del 2000, ha iniziato la commercializzazione di seme bovino sessato in pieno campo. Tre anni fa la fertilità garantita dal seme sessato era leggermente inferiore a quella del seme convenzionale ma i vantaggi economici ed applicativi derivanti dal suo utilizzo erano tali che il suo mercato fu comunque avviato in numerosi paesi europei.
Il seme sessato permette di programmare le strategie riproduttive in modo più efficace ed economico. Tale prerogativa è confermata da cinque importanti aspetti:

1) Con il seme sessato vi è un più rapido miglioramento genetico. Infatti l'utilizzo del seme sessato aumenta notevolmente il numero di vitelle che si possono ottenere dall'allevamento ed in tal senso consente che la rimonta possa essere fatta con le vacche e con le manze migliori; aumentando così notevolmente il progresso genetico atteso con la selezione.
2) Riduce il numero di vitelli di scarso valore commerciale negli allevamenti di vacche da latte. Il seme sessato minimizza infatti il numero di vitelli maschi di razze da latte, che risultano economicamente svantaggiosi per la produzione della carne.
3) Maggior guadagno dalla vendita dei vitelli meticci. Ciò è garantito dal fatto che tutte le vacche non destinate a produrre rimonta possono essere fecondate con tori da carne per ottenere vitelli meticci il cui valore risulta superiore a quello dei vitelli di razza pura da latte.
4) Rende i parti più facili negli allevamenti da latte. Infatti il 90% dei nati risultando femmine riducono notevolmente i parti difficili ed i problemi connessi, come la conseguente diminuzione della fertilità e la minor produzione di latte, generati da parti distocici.

Il seme sessato esplica un'azione positiva nell'aumentare la produzione di carne e di latte in svariati modi (Cassandro, 2004; De Luca, 2002). Esso può essere utilizzato per produrre prole di un desiderato sesso da un particolare accoppiamento sfruttando il dimorfismo sessuale, ovvero le differenze esistenti nella forma, nella funzione e nel valore tra il maschio e la femmi-

na entro specie. Tale fenomeno è onnipresente per tratti importanti della produzione di latte e della carne. In entrambe le tipologie produttive, in certe situazioni per un particolare accoppiamento può essere richiesto un maschio, per la produzione di carne, in altre situazioni una femmina, per la produzione di latte.

Tracciabilità Genetica

La tracciabilità, secondo la definizione citata dalla norma internazionale ISO 8420, è l'attitudine a ritrovare la storia, l'utilizzazione o la localizzazione di un prodotto per mezzo d'identificazioni registrate. Questa definizione si applica dunque a tutti i tipi di prodotto cioè a tutti i risultati di un'attività o di un processo (Portetelle *et al.,* 2000).
La tracciabilità però, nonostante si possa applicare a qualsiasi tipo di produzione, è soprattutto legata al settore alimentare, a questo scopo si può dunque giungere ad una definizione più attinente a tale ambito: la tracciabilità può essere dunque definita come l'insieme delle informazioni sull'origine dei prodotti alimentari, sul luogo di produzione, sull'origine delle materie prime utilizzate e sulle tecniche di produzione seguite (Sabatini, 2002).
Entrando maggiormente nello specifico, nel settore zootecnico, per tracciabilità si intende la capacità di mantenere il controllo dell'origine dei prodotti e dell'identità degli animali lungo i diversi passaggi della catena alimentare, dall'allevatore alla vendita al dettaglio (Mckean, 2001).
La tracciabilità è divenuta in questi ultimi anni una caratteristica sempre più ricercata dal consumatore nel campo alimentare, infatti oggi appare molto più attento alla sua alimentazione e alla sua salute rispetto al passato. Il comportamento vigile del consumatore nei riguardi degli alimenti è dovuto a cambiamenti socio-economici ma soprattutto a una serie di fatti recenti che lo hanno portato a perdere fiducia soprattutto nei confronti dei prodotti di origine animale.
La B.S.E. (Encefalopatia Spongiforme Bovina), è forse il più grave di questi avvenimenti, che ha condotto a una forte diminuzione dei consumi di carne bovina in Italia ma anche nel resto del mondo (Ciampolini *et al.,* 2000); si è poi verificato lo scandalo dei polli alla diossina, ed è inoltre aumentata l'incidenza di patologie dovute al consumo di alimenti e legate a casi di contaminazione microbica durante i processi di trasformazione dei prodotti (Linus *et al.,* 2001).
Riguardo ai cambiamenti sociali è importante rilevare come per il consu-

matore abbiano assunto importanza le tematiche ambientali, l'interesse per il territorio è dunque legato all'aumento di consumo di prodotti biologici e alla domanda da parte del consumatore di prodotti provenienti da un tipo di agricoltura sostenibile ed eco-compatibile (Linus *et al.,* 2001). Esistono poi numerose altre tematiche come la preoccupazione per il benessere animale, l'introduzione dei prodotti ogm (Organismi Geneticamente Modificati) nel mercato, l'interesse per prodotti equi e solidali (Linus *et al.,* 2001) che contribuiscono ad orientare il consumatore nella scelta di un alimento e lo conducono all'acquisto di prodotti che siano in qualche modo garantiti sotto questi punti di vista e riconducibili ad un territorio.
Inoltre la globalizzazione del commercio e l'industrializzazione dei processi produttivi hanno reso impossibile il controllo diretto della produzione alimentare da parte dei consumatori, motivazione che ha portato alla necessità di trovare sistemi validi per tracciare i prodotti animali (Milanesi *et al.,* 2002). La tracciabilità diventa dunque un'esigenza del produttore per garantire il consumatore che ha bisogno di acquisire nuovamente sicurezza nei confronti dei prodotti alimentari. Essa rappresenta una garanzia di controllo del prodotto in tutte le fasi della lavorazione e fornisce al consumatore tutte le informazioni necessarie per compiere una scelta al momento dell'acquisto. In questo contesto è chiaro come il termine "tracciabilità" stia diventando per i consumatori sinonimo di qualità e sicurezza, mentre per il produttore una garanzia di tutela ed identificazione dei propri prodotti.
La tracciabilità offre inoltre la possibilità di legare un prodotto alimentare ad un territorio, ad una cultura ed a una tradizione (Sabatini, 2002).
Nei convenzionali processi di tracciabilità delle carni bovine, è stato messo in evidenza come l'identificazione dell'animale tramite marche auricolari, sia ovviamente un passaggio basilare del sistema. Nonostante siano state prese tutte le possibili precauzioni per evitare eventuali frodi (ad esempio le doppie marche auricolari e il passaporto), si potrebbero presentare ancora errori di identificazione dovuti allo scambio delle marche tra animali, inoltre rimane ancora aperto il problema degli animali rubati che a loro volta potrebbero interferire con il sistema di identificazione (Cunningham *et al.,* 2001).
Un altro serio problema commerciale per i produttori di carne italiani è la difficoltà di riconoscere e proteggere la loro carne, proveniente da razze nazionali, dalla competizione con la carne di altre razze magari non specializzate per questa produzione. Questo conduce a perdite economiche sia per gli allevatori che i per i consumatori, infatti questi ultimi potrebbero non conoscere la razza dell'animale in vendita il cui prezzo potrebbe essere trop-

po elevato considerata la qualità del prodotto (Ciampolini *et al.,* 2000).
Se l'etichettatura delle carni ha dunque come obiettivo quello di informare il consumatore sull'origine della carne che sta per acquistare, è indispensabile trovare un sistema che garantisca l'affidabilità delle informazioni poste sull'etichetta (Sancristobal-Gaudy *et al.,* 2000).
La tracciabilità genetica è una soluzione ai problemi sopra elencati; essa è infatti basata su tecnologie di identificazione del DNA, in quanto il codice genetico è inalterabile e presente in ciascuna parte dell'animale, fornendo dunque un potente mezzo di autenticazione e controllo del convenzionale sistema di identificazione (Cunningham *et al.,* 2001).
La Figura 2 illustra come potrebbe lavorare un sistema d'identificazione basato sull'uso di marcatori molecolari, prelevando campioni di carne il cui profilo genetico verrà confrontato con quello di ciascun animale presente in un determinato paese e archiviato in un apposito database.

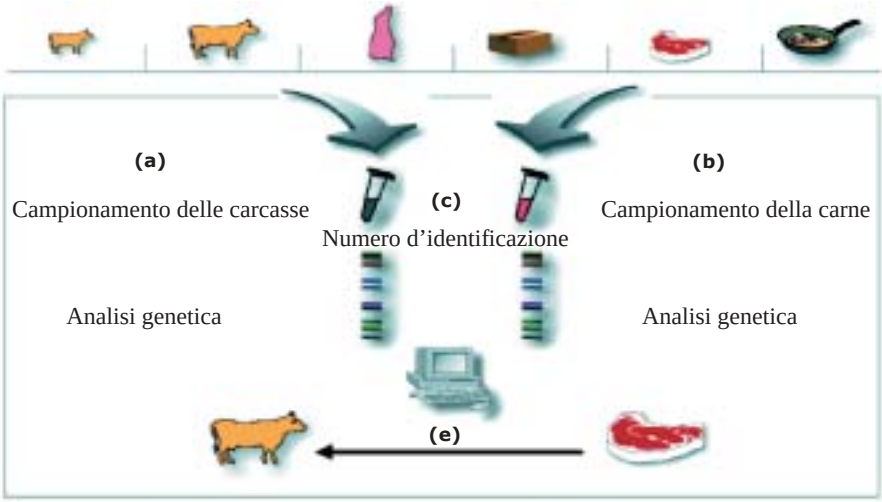


Figura 2. Principi della tracciabilità genetica. Campionamento delle carcasse (a) e della carne (b), legate dal numero di identificazione (c); generazione di un profilo genetico (d) e identificazione dell' origine dell'animale tramite comparazione del profilo ottenuto dalla carne con un database contenete i profili di tutti gli animali

Esistono numerosi studi il cui scopo è stato quello di attribuire una razza o un singolo individuo tramite analisi del DNA di campioni di carne o sangue (Sancristobal-Gaudy *et al.,* 2000, De Marchi *et al.,* 2003, Ciampolini *et al.,* 2000, Blott *et al.,* 1999, Martin-Burriel *et al.,* 1999 Ovilo *et al.,* 2000).

Gli studi citati si sono occupati dunque sia di tracciabilità individuale (Sancristobal-Gaudy *et al.,* 2000) che di tracciabilità a livello di razza (De Marchi *et al.,* 2003, Ciampolini *et al.,* 2000, Blott *et al.,* 1999, Martin-Burriel *et al.,* 1999 Ovilo *et al.,* 2000); evidentemente entrambi i campi di applicazione sono interessanti e la scelta si baserà sul risultato che si desidera ottenere.
La tracciabilità genetica dunque è uno strumento di estrema importanza per la sicurezza del consumatore, essa è stata infatti in grado di risollevare il settore della carne bovina dopo la crisi della B.S.E.; negli esempi citati fino ad ora essa è stata applicata alle carni bovine e non, ma ciò non esclude un suo possibile utilizzo in altri settori alimentari, in particolare per quanto riguarda tutti i prodotti di origine animale.
Un aspetto interessante che potrebbe rappresentare una futura applicazione di tali tecnologie è quello legato alle produzioni tipiche. I consumatori infatti, in questi ultimi anni, hanno riscoperto le produzioni tipiche sentendo il bisogno di legare un prodotto alimentare ad un territorio, ad una cultura e ad una tradizione (Bittante, 1994); probabilmente tale tendenza è una conseguenza dei processi di industrializzazione e di globalizzazione che hanno svincolato la produzione dal suo luogo d'origine. I prodotti tipici infatti, proprio perché caratterizzati da una produzione artigianale e localizzata rispondono perfettamente alle aspettative del consumatore in termini di sicurezza e genuinità.
Le tecniche d'identificazione basate sul DNA sono in grado, come è stato citato in precedenza, di individuare la razza di un animale prelevando campioni di tessuto, di sangue o di un suo prodotto, previa estrazione del DNA animale in essi contenuto. Tale proprietà potrebbe quindi aumentare il valore di alcune produzioni che fondano la loro tipicità proprio nello stretto legame con una determinata razza; in questo modo si potrebbero sviluppare aree economiche marginali attraverso la rivalutazione di razze locali e tipiche e dei loro prodotti (De Marchi *et al.,* 2003).
I prodotti lattiero-caseari e i formaggi in particolare potrebbero rappresentare un importante campo di applicazione della tracciabilità genetica legata ai prodotti tipici.
Nell'ambito della produzione tipica italiana, ad esempio, una larga parte del mercato è rappresentata dai formaggi. In Italia infatti sono stati censiti finora 500 formaggi, 469 dei quali inseriti nell'elenco nazionale dei prodotti tradizionali (DD.MM MiPAF 20 luglio 2000 n. 130 e 8 maggio 2001 n. 147). Il nostro non è il solo paese in cui vi è una cospicua produzione di formaggi tipici, basti infatti pensare ai formaggi francesi. Nonostante questo, non sono

ancora stati svolti studi riguardanti la tracciabilità genetica di tali prodotti.
Alcuni esempi in cui tale tecnologia potrebbe rivelarsi di estrema importanza ai fini di garanzia di certificazione riguardano un formaggio francese, il Beaufort, prodotto solamente con latte delle razze Tarantaise e Abondance, uno italiano, la Fontina prodotto con latte proveniente dalla razza Valdostana, e alcuni formaggi italiani tipici aderenti al progetto dell'ANARB (Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna) "disolabruna".
Nei tre casi citati, attraverso le tecnologie di identificazione del DNA descritte in precedenza, si potrebbe verificare se il latte caseificato proviene effettivamente dalla razza dichiarata.
In tal modo sarà possibile fornire una garanzia della certificazione al consumatore che desideri acquistare un prodotto di qualità; inoltre questa potrebbe essere un'ulteriore forma di controllo per evitare eventuali frodi a danno dei consumatori e degli stessi produttori.

Conclusioni

Il settore zootecnico si sta avvalendo sempre più delle biotecnologie; biotecnologie "accettabili" dall'opinione pubblica che grazie al loro impiego consentono di studiare e caratterizzare popolazioni appartenenti a diverse specie e razze e che consentono di impostare programmi di conservazione e miglioramento genetico di popolazioni animali locali e cosmopolite. Biotecnologie "accettabili" anche perché consentono di individuare ed escludere se necessario, dai programmi genetici soggetti portatori di gravi malattie ereditarie o di consentire l'impiego di vaccini più efficaci per garantire animali e prodotti sani e commestibili. Biotecnologie "accettabili", quali il sessaggio del seme, in grado di migliorare il benessere degli animali e la gestione riproduttiva degli allevamenti.
Biotecnologie "accettabili" dall'opinione pubblica in grado di fornire garanzie di tutela e sicurezza alimentare che mediante la tracciabilità genetica può tra l'altro consentire di proteggere prodotti tipici e locali fornendo una garanzia di autenticità.

Bibliografia

Ajmone-Marsan P., Negrini R., Milanesi E., Bozzi R., Nijman I. J., Buntjer J. B., Valentini A., Lenstra J. A. (2002). Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers, Animal Genetics, 33, 280-286.

Ajmone-Marsan P., Valentini A., Cassandro M., Vecchiotti-Antaldi G., Bretoni G., Kuiper M. (1997). AFLP TM markers for DNA fingerprinting in cattle, Animal Genetics, 28, 418-126.

Bittante G. (1994). Zootecnia di montagna: ruolo ed obiettivi. Atti delle giornate di studio sui problemi delle razze bovine autoctone dell'arco alpino: "Zootecnia di montagna: l'ambiente, l'animale, il prodotto". Caderzone (TN), 29-30 aprile – 1 maggio.

Blott S. C., Williams J. L., Haley C. S. (1999). Discriminating among cattle breeds using genetic markers, Heredity 82, 613-619.

Boichard D., Le Roy P., Leveziel H., Elsen J. M. (1998). Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale, INRA Prod. Anim. 11 (1), 67-80.

Bonsembiante M., Tagliapietra F. (2002). Biotech e amici dell'uomo, Conferenza tenuta in occasione dell'inaugurazione dell'Anno Accademico dell'Università degli Anziani. Vittorio Veneto, 30 settembre 2002.

Cassandro M. (2004). Il seme sessato nell'allevamento da latte: quando usarlo e quando farne a meno?. Informatore Zootecnico (in corso di stampa).

Cavalli-Sforza L. (1996). Geni, popoli e lingue, Adelphi Edizioni Spa, Milano.

Ciampolini R., Ciani E., Cetica V., Mozzanti E., Sebastiani C., Biagetti M., Presciuttini S., Cianci D. (20003). Tracciabilità molecolare delle razze bovine: un approccio di likelihood ratio basato sull'impiego di marcatori microsatelliti, Taurus 5, 9-11.

Ciampolini R., Leveziel H., Mozzanti E., Grohs C., Cianci D. (2000). Genomic identification of the breed of an individual or its tissue, Meat Science 54, 35-40.

Ciampolini R., Moazami-Goudarzi K., Vaiman D., Dillman C., Mozzanti E., Foulley J., Leveziel H., Cianci D. (1995). Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphism to permit the analysis of the genetic

variability within and between Italian beef cattle breeds, J. Anim. Sci. 73, 3259-3268.

Crepaldi P., Negrini R., Milanesi E., Gorni C., Cicogna M., Ajmone-Marsan P. (2001). Diversity in five goat populations of the Lombardy Alps: comparison of estimetes obtained from morphormetric traits and molecular markers, J. Anim. Breed. Genet. 118, 173-80.

Cunningham E.P. (1999). The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems. Livest. Prod. Sci. 58: 1-24.

Cunningham E. P., Meghen C. M. (2001). Biological identification systems: genetic markers, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (2), 491-499.

FAO (1996). World Agriculture: Towards 2010, (Ed. Alexandratos, N.) FAO/Wiley.

De Luca G. (2002). Il seme sessato al banco di prova del mercato. Informatore Zootecnico, n. 21, 30-35.

De Marchi M., Targhetta C., Contiero B., Cassandro M (2003). Genetic traceability of Chicken breeds, Agriculturae Conspectus Scientificus, Vol 68 No 4, 225-255.

Linus U. O., Mazaud F. (2001). Food traceability from field to plate, Outlook on agricolture 30, 239-247.

Martìn-Burriel I., Garcìa-Muro E., Zaragoza P. (1999). Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites, Animal Genetics 30, 177-182.

Maudet C., Luikart G., Taberlet P. (2002). Genetic diversity and assignement tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis, J. Anim. Sci. 80 942-950.

Milanesi E., Negrini R. (2003). Tracciabilità delle razze con diverse strategie di ricerca genetica, con particolare riferimento alla razza Romagnola, Atti del seminario: “La razza bovina Romagnola, Bologna 31 gennaio.

Mckean J. D. (2001). The importance of traceability for public health and consumer protection, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (2), 363-371.

Ovilo C., Cervera M. T., Castellanos C., Martinez-Zapater J. M. (2000). Characterisation of Iberian pig genotypes using AFLP markers, Animal Genetics 31, 117-122.

Portetelle D., Haezebroeck V., Mortiaux F., Renaville R. (2000). Traçabilité

dans la filière animale, Biotechnol. Agronom. Soc. Environ 4 (4), 233-240.

Sabatini P. (2002). Tracciabilità e rintracciabilità agroalimentare, Atti del seminario: "Semplificazione delle procedure per lo scambio e la tracciabilità dei prodotti agroalimentari nelle regioni dell'Alpe Adria, Bergamo, 4 dicembre.

Sancristobal-Gaudy M., Renand G., Amigues Y., Boscher M. Y., Leveziel H., Bibè B. (2000). Traçabilité individuelle des viandes bovines à l'aide de marqueurs génétiques, INRA Prod. Anim. 13 (4), 269-276.

Toro M., Siliò L., Rodriganez J., Rodriguez C. (1998). The use of molecular markers in conservation programmes of live animals, Genet. Sel. Evol. 30, 585-600.

5 - Disciplina europea sulla sicurezza alimentare e gli organismi geneticamente modificati

Arianna Greco
(Studio legale, Genova)

La nascita di norme collegate alle applicazioni biotecnologiche si può far risalire all'incirca agli anni '80 quando, con l'espandersi delle ricerche e delle applicazioni dell'ingegneria genetica, sono state delineate le prime linee guida, base di partenza per stilare una legislazione in grado di assicurare, in questo settore innovativo, un'adeguata protezione della salute umana e dell'ambiente nella sua totalità: animali, piante ed ecosistemi.
Oggi, chi opera nel settore agro-alimentare è abituato al fatto che la Comunità Europea sia protagonista di una intensa produzione legislativa che, solo a seguito del Libro Bianco del 2000, si è sostanziata in quasi un centinaio tra proposte di regolamenti e direttive presentate dalla Commissione, che si aggiungono ad una ancor più sostanziosa mole di atti di cosiddetta ordinaria amministrazione.
Grazie già a due pronunce molto chiare e innovative della Corte di Giustizia UE del 1963 e del 1964, e nonostante il parere contrario di alcuni Stati membri, il diritto comunitario non solo è direttamente applicabile nel nostro ordinamento, imponendo direttamente obblighi e sancendo diritti per gli Stati e per i singoli cittadini dell'UE, ma - in caso di contrasto con il diritto nazionale - prevale anche su quest'ultimo.
Di conseguenza abbiamo ormai imparato a familiarizzare con le fonti del diritto comunitario: le cosiddette fonti primarie (come i Trattati istitutivi e le loro modifiche) ma anche le "fonti derivate" cioè Regolamenti (vincolanti per lo Stato membro e altresì direttamente applicabili senza necessità di provvedimenti nazionali di attuazione), Direttive (vincolanti con riguardo ai risultati da raggiungere, ma non impositive per quanto riguarda la scelta della forma e dei mezzi per raggiungerli, benché poi in realtà secondo i principi generali del diritto comunitario non è mai sufficiente un atto amministrativo, ma serve una legge, un atto giuridico vincolante che modifichi la situazione giuridica preesistente), Decisioni (obbligatorie in tutti i loro elementi, ma solo per il destinatario diretto dell'atto), Raccomandazioni e Pareri (che non sono vincolanti ed hanno solo un'importanza politica e morale).
La consistente presenza comunitaria nel settore è peraltro più che com-

prensibile se si pensa al fatto che in ambito alimentare coesistono due degli obiettivi fondamentali dell'azione comunitaria: il mantenimento dell'integrità del mercato interno e, a partire dal Trattato di Maastricht, la tutela della salute dei consumatori, ambito di competenza concorrente regolato dal principio di sussidiarietà, in forza del quale la Comunità interviene soltanto se e nella misura in cui gli obiettivi dell'azione prevista possano essere realizzati più efficacemente a livello comunitario che a livello nazionale.
Detto questo e considerato che la materia come vedremo è stata disciplinata attraverso Regolamenti e Direttive – quindi atti vincolanti -, risulta evidente che, nella situazione giuridica italiana, potremo eventualmente trovare dei ritardi dell'uniformarsi ai principi europei, ma non una legislazione in contrasto con essi.
Nel settore degli alimenti, le biotecnologie innovative stanno acquisendo un'importanza crescente anche con i nuovi processi applicati all'industria alimentare: molte categorie di prodotti essenziali infatti (additivi, aromi, enzimi, addensanti e stabilizzanti, dolcificanti) vengono già ottenuti in laboratorio per via biotecnologica, in alternativa alle produzioni mediante sintesi chimica.
Secondo i dati forniti dal Servizio Internazionale per l'Acquisizione delle Applicazioni Biotecnologiche, la superficie delle colture gm (soia in testa, mais, colza e cotone) è cresciuta nel mondo del 12% (di cui il 25% nei cd PVS) dal 2001 al 2002 e che gli agricoltori che utilizzano sementi gm siano 6 milioni, distribuiti in 16 Paesi.
Si stima che oggi circa tre miliardi di persone nel mondo, appartenenti a Paesi con sistemi politici differenti (USA, Canada, Argentina, Cina, India e Sud Africa per citarne alcuni) utilizzino piante geneticamente modificate. Gli altri 2,5 milioni o non ci sono ancora arrivati o (come accade nel caso della Comunità Europea e, all'interno di questa, dell'Italia) le avversano, restando eventualmente disponibili ad una graduale e controllata apertura se confortati dai dati che emergono dalle ricerche sulle piante ogm.
Se è vero che l'applicazione industriale di biotecnologie innovative, comprese le tecniche del DNA ricombinante, può consentire la razionalizzazione dei processi produttivi in termini economici, aumentando la resa e riducendo gli scarti, con un costante miglioramento e riproduzione delle caratteristiche positive desiderate per lo specifico alimento, è altrettanto vero che la produzione di piante transgeniche fa nascere preoccupazioni con riguardo a tre principali categorie di eventi: a) la possibile, incontrollabile propagazione dei nuovi caratteri genetici ad altri organismi, con alterazione degli equilibri relativi all'ambiente e alla biodiversità; b) l'eventuale pericolosità per la salute di

vegetali e loro derivati ottenuti da piante transgeniche; c) le implicazioni economiche e politiche derivanti dalla brevettazione delle invenzioni genetiche e, in particolare, gli effetti che potranno prodursi sui modelli di sviluppo agricolo e sulle possibilità che il controllo di un settore di indubbia rilevanza strategica quale è l'agricoltura si trasferisca dagli Stati e dai governi e, quindi dai popoli che vi risiedono, ai soggetti privati detentori dei brevetti.
Se poi si affronta il tema delle sementi geneticamente modificate il quadro è particolarmente spinoso e complesso, in quanto si tratta di un settore che tocca sia il comparto alimentare, con riflessi diretti sulla salute umana, che il comparto agricolo nei confronti del quale solleva in modo prepotente una problematica che sta a monte della produzione alimentare, quella relativa ai rischi di contaminazione all'origine, cioè nei campi.
La Commissione Europea si è espressa sottolineando che "nessuna forma di agricoltura dovrebbe essere esclusa nell'Unione Europea"; il rischio però che sementi e piante tradizionali e biologiche possano essere contaminate con varietà transgeniche e la conseguente urgenza di adottare quanto prima prese misure per garantire la coesistenza di questi tre sistemi sono stati anche di recente al centro di un acceso dibattito in sede europea e di una presa di posizione molto netta da parte del nostro Ministro per le Politiche Agricole che, unitamente ai ministri di Svezia, Danimarca, Lussemburgo, Francia, Belgio, Germania, Austria e Grecia, ha chiesto non soltanto l'adozione di norme sicure ma altresì che, in attesa di queste, vengano bloccate le autorizzazioni ad iscrivere sementi gm nel registro comune delle sementi.
In realtà, alcuni strumenti già esistono: la produzione e la vendita di sementi è infatti regolata da norme comunitarie e nazionali che garantiscono la qualità, l'identità e la purezza delle varietà, nonché prevedono che nessun tipo di semente possa essere commercializzato se non sia prima stato iscritto nel Registro nazionale di uno dei Paesi membri. In Italia, l'introduzione in commercio di varietà di sementi ogm, nessuna delle quali è iscritta al Catalogo Varietale, costituirebbe una aperta violazione della Legge 1096/71 come modificata dal D. Lgs. 212/2001 che norma l'attività del settore sementiero nel nostro Paese, poiché espressamente detta normativa prevede la possibilità di importare e commercializzare solo sementi regolarmente iscritte al Catalogo Varietale del Ministero delle Politiche Agricole.
La soglia di tolleranza zero per le sementi rappresenta l'obiettivo dichiarato per le coltivazioni agricole nel nostro Paese; è peraltro vero, come riconosciuto nel 2001 anche dal Comitato Scientifico delle Piante presso la Commissione Europea, che a causa dell'impollinazione incrociata all'inter-

no delle specie, la purezza assoluta è praticamente irraggiungibile nei sistemi biologici e ciò può determinare la presenza accidentale di ogm.
Conformemente al principio di sussidiarietà, la Commissione ritiene che la prima tappa possa consistere proprio nel determinare quale livello di tutela garantiscano le leggi nazionali esistenti (nel nostro caso per esempio azioni di monitoraggio e controllo dei campi, delle sementi importate e delle sementi in fase di lavorazione e/o commercializzazione), strada che, secondo diversi Stati Membri, non deve in alcun modo ritardare l'adozione in materia di una legislazione quadro europea vincolante e adeguata.
Siamo ancora ad una fase di studio ma, in linea generale, sul principio teorico della coesistenza si potrebbe anche concordare, qualunque sia la posizione nei confronti degli ogm, se esso dimostrerà di essere realmente applicabile e, soprattutto, efficace; peraltro, da un punto di vista economico e giuridico, il problema è sicuramente sfaccettato e non semplice.
Quali misure possono essere prese? A quale livello devono essere adottate: comunitario, nazionale, locale? Secondo quali principi devono essere adottate le misure? Chi dovrà applicare tali misure e chi dovrà sopportarne il costo? L'industria produttrice, coloro che li coltivano oppure il costo dovrà ricadere su coloro che temono il rischio della possibile contaminazione, cioè gli agricoltori biologici e tradizionali?
Per non parlare di come comportarsi e chi ritenere responsabile dei danni economici che dovessero derivare agli agricoltori biologici e tradizionali nel caso in cui, nonostante tutto, la contaminazione dovesse comunque verificarsi, costringendoli a perdere il loro status e a dover etichettare i loro prodotti come ogm.
Per ora gli unici dati certi sono, in quanto applicabili al settore delle sementi, quelli che riguardano la tracciabilità degli ogm in generale, come emerge dalla normativa emanata in materia.
Con riguardo agli aspetti connessi con la sicurezza alimentare e la salute dei consumatori, è indispensabile soffermarsi innanzitutto su alcuni dei principi contenuti nel Regolamento 178/2002 (che fissa le nuove regole per la sicurezza alimentare e la strutturazione del diritto comunitario dell'alimentazione, immediatamente applicabili in via interpretativa e dotati di efficacia diretta a partire dal 2005) e sui provvedimenti che lo hanno preceduto e che con esso si integrano.
Nel 1996, grazie alla maggiore sensibilità verso i problemi di sicurezza alimentare conseguente in parte al fenomeno BSE e diossina, esplode il dibattito europeo sulla tracciabilità degli ogm e sulla necessità di trasparenza

nell'etichettatura. Fino ad allora, in Europa per i prodotti gm si riteneva comunque vigente il principio di equivalenza sostanziale: due alimenti (uno tradizionale, l'altro di derivazione biotecnologia) sono considerati sostanzialmente equivalenti quando non presentano differenze dal punto di vista nutrizionale, organolettico e della sicurezza.
La nozione di equivalenza sostanziale costituiva l'elemento discriminante adottato anche dal Regolamento Comunitario 258/97, in tema di nuovi cibi e nuovi ingredienti, che disciplina il commercio di ogm, stabilendo che prodotti e ingredienti alimentari derivati da ogm non devono presentare rischi per il consumatore, non lo devono indurre in errore e, nel caso vadano a sostituire prodotti o ingredienti tradizionali, non devono creare svantaggi nutrizionali, e prevede l'etichettatura degli alimenti transgenici qualora presentino sostanziali differenze nella composizione rispetto a quelli tradizionali.
Il definitivo cambiamento e l'introduzione dell'etichettatura obbligatoria si hanno a partire dal 1998, quando il Regolamento 1138, riferito a soia e mais transgenici, impone di etichettare tutti i prodotti che contengano tali ingredienti con la dicitura "prodotto da soia/mais geneticamente modificata". Vengono esentati da tale obbligo i prodotti che, in virtù dei trattamenti subiti, non contengano più tracce di DNA o proteine transgeniche.
L'obbligo di etichettatura per tutti i prodotti alimentari contenenti in qualsiasi forma ogm o loro parti o derivati in percentuale superiore all'1%, in osservanza al principio della trasparenza e del diritto di scelta del consumatore, è stato imposto in Italia con la Legge 128 del 1998.
Nel 2000 i Regolamenti n° 49 (sugli ingredienti) e n° 50 (sugli additivi e aromi) impongono l'etichettatura qualora la percentuale di ogm superi l'1%, l'esenzione sotto quella soglia è peraltro vincolata ai casi di comprovata contaminazione accidentale.
Nel quadro di un percorso che sta faticosamente tentando di trovare un modo per coniugare democrazia e temi ad alta specializzazione scientifica, il tema della tracciabilità ed etichettatura dei prodotti è stato al centro di grande attenzione e di importanti discussioni, non tanto in quanto requisito di sicurezza (in sé non lo è affatto in quanto si limita in fondo a rendere edotto il consumatore circa le sostanze contenute nel prodotto), ma piuttosto proprio in ragione del diverso rilievo e ruolo che essa sembra riconoscere ai consumatori, attribuendo loro la possibilità - attraverso la scelta di mercato – di far valere la loro attitudine nei confronti delle biotecnologie agroalimentari.
La presenza sul mercato di sementi gm, peraltro, rendeva necessaria una

revisione anche di due Direttive risalenti al 1990, e in particolare della Direttiva 90/220/CE sull'emissione deliberata nell'ambiente di ogm, che disciplinava l'autorizzazione in ambito nazionale delle operazioni di ricerca e sviluppo in ambiente non confinato nonché la procedura comunitaria per la commercializzazione di organismi - in particolare piante - gm.
Per questo motivo, la Commissione ha emesso la nuova Direttiva 2001/18/CE, in vigore dal 17 Ottobre 2002, che dispone procedure chiare e ben definite per le modalità di immissione deliberata di ogm nell'ambiente, sia a fini di commercializzazione che di ricerca.
La Direttiva introduce alcune definizioni, che assumono così significato e validità legale all'interno dell'UE, che è utile ricordare:
Viene definito "organismo" "*qualsiasi entità biologica capace di riprodursi e di trasferire materiale genetico*" e "ogm" "*un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura, con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale*", distinguendo poi tra tecniche che hanno per effetto una modificazione genetica e tecniche che non si ritiene producano modificazioni, distinzione che non trova unanime approvazione da parte del mondo scientifico.
In ambito internazionale (si pensi, ad esempio, al Protocollo di Cartagena sulla Biosicurezza) si preferisce parlare di LMO, Living Modified Organisms, intendendo così ricomprendere qualunque entità biologica vivente modificata (e quindi potenzialmente estranea in termini ecologici ad abitudini radicate) rispetto alla sua controparte tradizionale, quale che siano le tecniche utilizzate per ottenere tali modifiche.
La norma si applica comunque alle sementi transgeniche che rappresentano la principale categoria commerciale destinata al rilascio.
Tornando alle procedure di autorizzazione, se negli USA esistono solide strutture tecniche di verifica, per cui non viene prestata particolare attenzione alle tecnologie usate per ottenere il prodotto, ma è prevalso il criterio di valutare l'efficacia e la sicurezza d'uso dei nuovi vegetali (il cui controllo e autorizzazione sono infatti affidati al United States Department of Agricolture, alla Food and Drug Administration, responsabile del controllo di alimenti e farmaci e all'Environment Protection Agency, l'agenzia federale per la protezione dell'ambiente), in Europa è prevalsa invece l'opzione di imporre per legge "regolamentazioni di tecnologia" collegate a meccanismi di notifica e autorizzazione sia nelle fasi di ricerca che in quelle produttive.
Secondo molti la principale differenza che ne emerge non riguarderebbe

comunque la validità o efficacia dei controlli ma sarebbe piuttosto di natura burocratica e amministrativa, manifestandosi nei tempi più lunghi delle procedure UE per l'autorizzazione di ogm ad uso agricolo o alimentare.
L'emissione deliberata di ogm, cioè l'introduzione intenzionale per la quale non vengano usate specifiche misure di confinamento deve essere sempre oggetto di notifica alle competenti autorità designate dallo Stato membro.
Se l'emissione avviene a fini sperimentali la notifica deve contenere un fascicolo tecnico per la valutazione del rischio ambientale per quello specifico ogm, un piano di monitoraggio, le informazioni sui piani di controllo, i metodi di inattivazione e trattamento dei reflui e i piani di emergenza.
Le conoscenze devono essere accessibili al grande pubblico ed è prevista sia la consultazione di gruppi specifici che la possibilità che la popolazione esprima un parere.
Per quanto riguarda la commercializzazione la procedura prevede la notifica all'Autorità competente, la valutazione e la risposta di quest'ultima. Le linee guida per l'autorizzazione prevedono l'etichettatura, le restrizioni all'impiego e le specifiche condizioni di impiego.
Con l'approvazione dei nuovi Regolamenti (Regolamenti del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, n. 1829/2003, relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati, e n. 1830/2003, concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE) esistevano due tipologie di procedura.
Accanto alla procedura cd. "ordinaria" (che prevede una fase istruttoria in cui tutti gli Stati possono aver accesso alla documentazione ed è possibile che la Commissione Europea o gli Stati Membri presentare obiezioni) esisteva una procedura "semplificata", riguardante alimenti che *non contengono ogm* – benché ottenuti a partire da un ogm - e che *sono sostanzialmente equivalenti ad alimenti di origine naturale*.
In questo secondo caso, ottenuta la valutazione di sostanziale equivalenza da uno degli organismi preposti sul territorio nazionale, il prodotto poteva essere immesso direttamente sul mercato con una semplice comunicazione alla Commissione ed erano, quindi, gli esperti dello Stato membro a garantire sulla sostanziale equivalenza del nuovo alimento.
L'esito positivo della procedura di autorizzazione abilitava all'utilizzazione di un prodotto in tutta la Comunità, senza ulteriori notifiche, tranne nel caso di operatività della "clausola di salvaguardia" di cui all'art. 23 della Direttiva

2001/18/CE, secondo la quale lo Stato Membro che sulla base di nuove informazioni scientifiche avesse motivo di ritenere che un ogm potesse costituire un rischio poteva temporaneamente limitarne o vietarne l'uso o la vendita nel proprio territorio.
Tutto questo in linea teorica, perchè in realtà la commercializzazione di sementi e altri prodotti gm in Italia e in Europa è stata di fatto bloccata dal 1998 per effetto moratoria *de facto* sull'introduzione di nuovi ogm sul mercato che sette Paesi dell'UE (Italia, Francia, Grecia, Lussemburgo, Danimarca, Belgio e Austria) hanno imposto, congelando le procedura di autorizzazione alla commercializzazione di 13 nuovi ogm.
Il superamento della moratoria per le nuove autorizzazioni (rinviato dalla maggioranza nel Consiglio fino alla conclusione dell'iter legislativo dei due Regolamenti di cui sopra, con i quali si è stabilito un sistema comunitario di tracciabilità ed etichettatura degli ogm e dei prodotti ottenuti a partire da ogm per ogni singola fase del processo di immissione sul mercato di tali organismi) è avvenuto di fatto l'11 maggio 2004, con il via libera definitivo da parte della Commissione Europea all'importazione in Europa del mais dolce transgenico BT11 (La decisione di Bruxelles riguarda in realtà esclusivamente un nuovo uso di questo tipo di mais, in scatola o fresco non sgranato, i cui grani però erano già liberamente importati nell'UE).
Come detto, per il via libera al mais dolce BT11 è stata fondamentale l'entrata in vigore (il 18 Aprile 2004) della nuova legislazione sulla tracciabilità e sull'etichettatura di cibi e mangimi qualora la presenza di materiale transgenico, per ciascun ingrediente dell'alimento, superi la soglia di tolleranza dello 0,9%.
Le altre regole della nuova legislazione riguardano, principalmente, rintracciabilità e autorizzazioni.
Quanto alla rintracciabilità, gli ogm saranno infatti identificati con un codice alfanumerico di 9 cifre, che permette di conoscere con precisione la modificazione genetica subita, e sono inseriti in un registro tenuto dalla Commissione al fine di ritrovare le informazioni in caso di problemi.
Per la procedura di autorizzazione è previsto un ruolo centrale svolto dalla nuova Agenzia Europea per la sicurezza alimentare e, nei casi in cui nei prodotti da autorizzare vi siano "Ogm vivi" (come patate o sementi), una supplementare valutazione di rischio ambientale obbligatoria da richiedere alle Autorità competenti degli Stati membri.
Proprio l'Authority istituita dal reg. 178/2002, pur non avendo alcun potere normativo o decisionale diretto nei confronti dei singoli, si pone al centro

del sistema di elaborazione scientifica da cui la nuova normativa alimentare comunitaria trae origine; organismo autonomo connotato da caratteri di assoluta indipendenza ed eccellenza scientifica, l'Autority è, infatti, il soggetto cui sono affidati compiti cruciali nell'ambito dell'analisi dei rischi e della consulenza scientifica, della comunicazione con i consumatori, della cooperazione nel sistema di allarme per le crisi alimentari.
Tornando alle soglie di etichettatura e di tolleranza, esse non riguardano le sementi, per le quali è prevista l'adozione di soglie sensibilmente più basse (probabilmente comprese tra lo 0,3 e lo 0,7 a seconda delle varietà) in una direttiva UE separata. Le sementi Ogm potranno tuttavia essere autorizzate attraverso la procedura prevista per cibi e mangimi, ma con l'aggiunta della valutazione di rischio ambientale da parte della autorità nazionali prevista per gli Ogm vivi.
Peraltro, va ricordato che la tracciabilità di filiera estesa a tutte le fasi della produzione e commercializzazione degli alimenti, sottesa all'automatica etichettatura cd tecnica (o di processo) di qualunque ingrediente alimentare prodotto a partire da un ogm, è una delle novità già introdotte dal Regolamento 178/2002, normativa di portata molto ampia che va a costituire un quadro generale di natura orizzontale, di armonizzazione delle legislazioni alimentari degli Stati Membri e di riferimento per l'adozione delle misure future, nazionali ed europee.
Per quanto riguarda la "rintracciabilità di filiera", ossia la documentazione dei passaggi e dei processi che hanno interessato l'alimento lungo tutto il percorso produttivo, "dal campo alla tavola", viene previsto (art. 18) che sia "disposta in tutte le fasi della produzione, trasformazione, e distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime".
L'estensione degli obblighi a tutti i prodotti alimentari, per tutte le fasi della produzione e commercializzazione, comporta ovviamente anche un allargamento delle responsabilità dell'imprenditore, secondo un approccio integrato e solidale con gli altri soggetti operanti all'interno della catena alimentare.
Tra gli adempimenti obbligatori posti a carico di tutti gli imprenditori alimentari spiccano l'obbligo di saper identificare i fornitori e i destinatari dei prodotti (alimenti, mangimi, animali o qualsiasi sostanza destinata ad entrare a far parte della catena alimentare) a monte e valle del proprio "segmento" (e di conservare tali informazioni in modo da poterle eventualmente fornire alle autorità richiedenti) e l'obbligo di predisporre una ido-

nea etichettatura dell'alimento che, a partire dalla distribuzione finale, evidenzi tutti i passaggi precedenti.
Ultima novità di rilievo, introdotta con il Regolamento 178/2002, che è necessario ricordare, riguarda l'imposizione del principio di precauzione quale strumento normativo di interpretazione delle situazioni di incertezza scientifica.
A fondamento dell'attività normativa in campo alimentare l'art. 6 pone "l'analisi del rischio", definito "Funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo". Affrontare la tematica del "Rischio" in ambito biologico risulta estremamente difficile, in quanto ci si muove all'interno di un sistema molto complesso. Innanzitutto, individuare il rischio in un dato caso non è sempre semplice; non è facile individuare in modo corretto la plausibilità, la concretezza e l'entità reale di un rischio, bisogna compiere un'analisi costi/benefici che tenga in debito conto da chi vengono acquisiti i benefici e chi viene esposto ai rischi relativi (soggetti che non sempre coincidono), così come non è facile valutare quali altri rischi si prevengano con un dato intervento o la presenza di ulteriori rischi non presi in considerazione.
Anche per questo motivo, talvolta, astenersi dall'agire (che viene spesso considerata un'opzione di contenimento del rischio) invece di prevenire l'esposizione ad eventuali rischi non considerati, può addirittura amplificarla; se l'auspicata esposizione a situazioni di cosiddetto "rischio zero" è una chimera, ciò che dobbiamo imparare a gestire è in sostanza il confronto tra alternative di rischio.
Peraltro, a differenza di quanto i dizionari ci suggeriscono, il fatto che vi sia un rischio non significa che vi sia anche un pericolo, né significa per forza un evento sinistroso, anzi è vero il fatto che, in un sistema complesso, non vi è una correlazione diretta tra la presenza di aree di rischio (quindi la vulnerabilità) e la sua sicurezza: una tecnologia avanzata presenta molti più rischi e, ciò nonostante, è molto più sicura.
La legislazione alimentare, basandosi sull'analisi del rischio, si fonda sul processo costituito da tre componenti interconnesse:

1. della *valutazione,* cioè il processo su base scientifica che deve essere svolto in modo indipendente, obiettivo e trasparente;
2. della *gestione,* (cioè il processo consistente nell'esaminare alternative d'intervento consultando le parti interessate, tenendo conto dei pareri dell'Authority, di altri fattori pertinenti e, se sussistenti le condizioni, del principio di precauzione) che corrisponde alla presa di decisione, ed è,

quindi, momento in cui vengono adottate scelte normative concrete, di carattere più strettamente "politico";

3. della "comunicazione".

Quanto al ricorso al principio di precauzione, la Commissione lo ritiene giustificato solo quando riunisce tre condizioni: l'identificazione degli effetti potenzialmente negativi di un fenomeno/prodotto/processo, la valutazione obiettiva dei dati scientifici disponibili e l'ampiezza dell'incertezza scientifica.

"Precauzione" è infatti l'atteggiamento assunto di fronte ad un rischio la cui esistenza sembra plausibile ma ancora non è scientificamente dimostrata, e in relazione alla quale si ritiene comunque opportuna un'anticipazione di tutela per prevenire un danno prima che la certezza scientifica sul rischio sia stata raggiunta.

Un punto particolarmente delicato concerne la possibile ambiguità cui il principio di precauzione dà luogo: le misure risultanti dal ricorso al principio di precauzione, infatti, possono prendere la forma di una decisione di agire o di non agire. La risposta scelta dipende da una decisione politica, che è funzione del livello di rischio considerato come "accettabile" dalla società che deve sostenere il rischio stesso.

Quando, in virtù dell'applicazione del principio di precauzione, agire sembra essere la risposta appropriata, bisogna ancora determinare quale forma debba prendere questa azione. Oltre all'adozione di atti volti a produrre effetti giuridici suscettibili in quanto tali di controllo giurisdizionale, a disposizione dei responsabili politici vi è una vasta gamma di azioni, quali il finanziamento di un programma di ricerca o la decisione di informare il pubblico sui possibili effetti negativi di un prodotto o di un processo. In tutti i casi, però, la scelta di una misura non può basarsi su una decisione arbitraria.

Oltre a questi principi specifici, restano applicabili i principi generali di una buona gestione dei rischi:

1. la proporzionalità tra le misure prese e il livello di protezione ricercato;
2. la non discriminazione nell'applicazione delle misure in situazioni comparabili;
3. la coerenza delle misure con quelle già prese in situazioni analoghe o che fanno uso di approcci analoghi;
4. l'esame dei vantaggi e degli oneri risultanti dall'azione o dall'assenza di azione;
5. il riesame delle misure alla luce dell'evoluzione scientifica.

6. l'inversione dell'onere della prova (cioè il fatto che, mentre nella maggior parte dei casi spetta al consumatore dimostrare la pericolosità di un prodotto/processo dopo la sua immissione sul mercato, alcune sostanze valutate caso per caso possano essere considerate pericolose fino a prova contraria e si possa, quindi, addossare al produttore/fabbricante/importatore l'onere di dimostrare la non pericolosità di un processo o di un prodotto – un po' come avviene per i farmaci).

Il regolamento richiama poi il principio della tutela degli interessi dei consumatori nei confronti delle pratiche fraudolente o ingannevoli, dall'adulterazione degli alimenti a ogni altro tipo di pratica in grado di indurre in errore il consumatore.

Il Regolamento dispone altresì gli obblighi di trasparenza nell'adozione di tutti gli atti futuri in materia alimentare e sollecita una maggiore consultazione dei cittadini nel corso dell'elaborazione, valutazione e revisione della legislazione alimentare, attraverso sia l'adozione di adeguate campagne informative che la consultazione diretta o tramite associazioni ed enti di tutela.

Merita, infine, di essere segnalato l'affiancamento della disciplina dei mangimi a quella degli alimenti che rispecchia l'estensione delle garanzie finalizzate alla sicurezza alimentare già indicata in apertura dove la definizione di "alimento" ricomprende anche le produzioni primarie.

Bibliografia

Marchesini R. "*Bioetica e Biotecnologie. Questioni morali nell'era biotech*" Apèiron Editoria e Comunicazione, Bologna, 2002.

Poli G. "*Biotecnologie: conoscere per scegliere*", UTET Periodici, Milano, 2001 (con particolare riguardo al contributo di M.C. Tallacchini, ivi, pp. 258 e ss).

Rubino V. "*I principi generali della legislazione alimentare comunitaria secondo il reg. 178/2002: le nuove regole per la sicurezza alimentare e la strutturazione del diritto comunitario dell'alimentazione*", inserito in "Diritto & Diritti - Electronic Law Review" nel maggio 2002 http://www.diritto.it.

Ventura S. "*Principi di Diritto dell'Alimentazione*" Milano, Franco Angeli, 2001.

Regolamento (CE) n. 65/2004 della Commissione, del 14 gennaio 2004, che stabilisce un sistema per la determinazione e l'assegnazione di identificatori unici per gli organismi geneticamente modificati (Gazzetta ufficiale n. L 010 del 16/01/2004 pag. 0005 – 0010).

Regolamento (CE) n. 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati (Gazzetta ufficiale n. L 268 del 18/10/2003 pag. 0001 – 0023).

Regolamento (CE) n. 1830/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE (Gazzetta ufficiale n. L 268 del 18/10/2003 pag. 0024 – 0028).

Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety (in Official Journal L 031, 01/02/2002 P. 0001 – 0024).

Direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 marzo 2001, sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamen-

te modificati e che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio (Gazzetta Ufficiale n. L 106 del 17/04/2001 pag. 0001 – 0039).

Commission Regulation (EC) No 49/2000 of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) No 1139/98 concerning the compulsory indication on the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC (in Official Journal L 006, 11/01/2000 P. 0013 – 0014).

Commission Regulation (EC) No 50/2000 of 10 January 2000 on the labelling of foodstuffs and food ingredients containing additives and flavourings that have been genetically modified or have been produced from genetically modified organisms (in Official Journal L 006 , 11/01/2000 P. 0015 – 0017).

Council Regulation (EC) No 1139/98 of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC (in Official Journal L 159, 03/06/1998 P. 0004 – 0007).

Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients (in Official Journal L 043, 14/02/1997 P. 0001 – 0006).

Council Directive 90/219/EEC of 23 April 1990 on the contained use of genetically modified micro-organisms (in Official Journal L 117, 08/05/1990 P. 0001 – 0014).

Council Directive 90/220/EEC of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms (in Official Journal L 117, 08/05/1990 P. 0015 – 0027).

6 - Legislazione e problematiche analitiche per la rilevazione di ogm nei prodotti alimentari

Angiolella Lombardi, Giorgio Marcazzan
(Veneto Agricoltura – Istituto per la Qualità e le Tecnologie Alimentari, Thiene - Vi)

Da diversi anni le istituzioni europee e nazionali stanno elaborando un sistema normativo che, da un lato consenta di verificare, mediante la definizione e l'applicazione di procedure di autorizzazione per il rilascio al commercio, la non pericolosità degli ogm, dall'altro, mediante l'introduzione di obblighi di etichettatura, garantisca al consumatore trasparenza e quindi libertà di scelta.
Data la complessità della materia da regolamentare e le enormi potenzialità di sviluppo del settore, il quadro normativo è in continua evoluzione, anche in considerazione del fatto che il legislatore, nel fissare obblighi e limiti, ha dovuto e deve considerare gli strumenti analitici disponibili per effettuare i controlli necessari.
A questo proposito è importante evidenziare come in questo ambito si sia verificata una continua rincorsa tra tecnologia da controllare, ossia gli organismi geneticamente modificati, e tecnologia che effettua il controllo, ossia i metodi d'analisi applicabili; in altre parole, i divieti e i valori limite risulterebbero inutili se non si fosse in grado di controllarne il rispetto.
Quindi, lo sviluppo di metodi di campionamento e di analisi affidabili è necessario sia per il legislatore e gli organismi di controllo che richiedono disponibilità di strumenti tecnici di supporto, sia per il consumatore, che richiede garanzie e rassicurazioni. È altresì importante per l'industria alimentare nel momento in cui deve scegliere se produrre con o senza ogm.
Le principali tecniche analitiche attualmente disponibili per la ricerca degli ogm nei prodotti alimentari si basano sulla ricerca del segmento di DNA ricombinante (transgene) o della proteina codificata dal gene stesso. Per la ricerca della proteina codificata dal transgene si usano metodi immunologici che utilizzano anticorpi specifici diretti verso la proteina transgenica (ad es. anticorpi in grado di riconoscere la proteina responsabile della resistenza al glifosate nel caso della soia RoundUp Ready). A questo proposito va segnalata la disponibilità di kit rapidi e semplici che permettono la determinazione della presenza di ogm anche direttamente "in campo". Tuttavia,

questi metodi risultano generalmente poco efficaci nel caso di prodotti alimentari processati, in quanto alcuni procedimenti di lavorazione, come ad esempio la cottura, possono determinare degradazione o cambiamento conformazionale della proteina transgenica. È inoltre interessante osservare che in alcuni OGM, come ad esempio il mais Bt 176, il transgene non è ugualmente espresso in tutti i tessuti della pianta, quindi si può rilevare la proteina transgenica nei semi ma non nel fusto, nelle foglie o nelle radici.
Al momento il metodo più comunemente adottato per la ricerca di ogm negli alimenti è il metodo che si basa sulla rilevazione del DNA geneticamente modificato utilizzando la tecnica molecolare PCR (reazione a catena della polimerasi). Mediante la tecnica PCR è possibile amplificare (cioè moltiplicare un altissimo numero di volte) una porzione della sequenza di DNA transgenico presente in tutte le cellule da cui si ricava la materia prima o il prodotto alimentare in esame. La metodologia PCR può essere utilizzata sia per rilevare la presenza/assenza di ogm (PCR qualitativa) sia per determinare la percentuale di ogm nel campione stesso (PCR quantitativa o Real-Time PCR).
In generale, i requisiti richiesti ad un metodo analitico sono molteplici: deve essere specifico, ossia in grado di rilevare con precisione solo l'analita ricercato senza dare falsi positivi, deve essere sensibile, ossia in grado di rilevare l'analita anche se presente a concentrazioni molto basse. Altra caratteristica importante è l'applicabilità del metodo, strettamente connessa con la semplicità d'uso, il costo ed il numero di campioni analizzabili contemporaneamente. Un'attenzione particolare merita la possibilità di sottoporre un metodo d'analisi ad un processo di validazione, inteso come conferma attraverso l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti. La validazione di un metodo analitico è ottenibile attraverso l'applicazione di una o di una combinazione delle tecniche seguenti: tecniche di taratura (utilizzando campioni o materiali di riferimento certificati), tecniche di confronto dei risultati ottenuti con altri metodi, di confronto interlaboratorio, di valutazione sistematica dei fattori che influenzano il risultato, di stima dell'incertezza dei risultati.
Numerosi gruppi di lavoro (come ad esempio il gruppo dell'International Organisation for Standardization ISO/TC 34/WG7 "GMO" che opera dal 2000 e raggruppa esperti degli enti di normazione europei ed extraeuropei, il gruppo dell'European Committee for Standardization CEN/TC 275/WG11 "GMO", il quale opera dal 1999 e raggruppa esperti degli organismi nazionali di normazione europei, o il gruppo dell'UNI, Ente Italiano di

Unificazione – GL 4 "Organismi Geneticamente Modificati negli Alimenti"), stanno lavorando alla definizione di protocolli operativi da applicare nelle analisi per la ricerca e la quantificazione di ogm in alimenti e mangimi. Tali lavori dovrebbero portare alla stesura di norme specifiche, intese come documenti, prodotti mediante consenso e approvati da un organismo riconosciuto, che forniscono, per usi comuni e ripetuti, regole, linee guida o caratteristiche, relative a determinate attività o ai loro risultati.
Anche altri organismi possono emettere dei documenti normativi, come ad esempio il Min. della Sanità, che ha emesso la circolare 600.5/40.4/3921 del 25 novembre 1998: "Metodo di screening per il riconoscimento di organismi geneticamente modificati negli alimenti mediante reazione a catena della polimerasi". È importante ricordare che un metodo analitico può essere considerato validato finché non si verifichino variazioni significative dei parametri di qualità, della matrice o dell'intervallo indagato di concentrazione dell'analita.
Dalla Direttiva 90/220/CEE sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati, derivano una serie di Regolamenti Europei esaminando i quali si percepisce il continuo confronto, già accennato sopra, verificatosi tra legislatore e potenzialità analitiche disponibili. Infatti, il Regolamento (CE) N. 1139/98 indica che i prodotti e gli ingredienti alimentari, da fornire in quanto tali al consumatore finale, derivanti interamente o parzialmente da soia geneticamente modificata RoundUp Ready o da mais geneticamente modificato Bt176, e nei quali è possibile rintracciare la presenza di DNA transgenico o di proteine derivanti da DNA transgenico, devono indicare chiaramente in etichetta la presenza di ogm. L'applicazione di questo regolamento comporta quindi la necessità di predisporre adeguate procedure di campionamento e adeguati metodi di analisi per effettuare un'indagine di tipo qualitativo, in grado di fornire quindi una risposta del tipo presenza/assenza di ogm. Ma, non essendo indicato nel regolamento quale metodo analitico applicare, e poiché al variare del metodo varia anche la sensibilità, ossia la più piccola quantità di analita rilevabile in un determinato campione, risultano evidenti le difficoltà riscontrate dagli organismi di controllo nel verificare il rispetto o meno del regolamento in questione: uno stesso campione poteva risultare positivo o negativo, e quindi soggetto o non soggetto ad obbligo di etichettatura, a seconda del metodo d'analisi utilizzato. Inoltre, dall'analisi dei dati derivanti dal crescente numero di analisi effettuate, è emerso che, soprattutto per materie prime come la soia, in Europa quasi tutta d'importazione da

paesi in cui è possibile coltivare piante transgeniche, una elevata percentuale dei campioni risultava positiva, con conseguente difficoltà nel gestire e controllare fenomeni di contaminazione crociata e nel garantire le esigenze di segregazione dei materiali nel caso di produzioni non ogm.
Considerando che gli ogm possono essere commercializzati legalmente in Europa solo dopo aver superato una serie di test a dimostrazione della loro innocuità per l'ambiente e per la salute dei consumatori, il "Regolamento (CE) N. 49/2000 della Commissione del 10 gennaio 2000" fissa il valore soglia di 1%, riferito ai singoli ingredienti, come limite al di sopra del quale diventa obbligatorio riportare in etichetta la presenza degli ogm autorizzati per l'alimentazione. Al di sotto del valore soglia di 1% l'obbligo di etichettatura viene meno nel caso la presenza di ogm risulti accidentale. Per stabilire che la presenza di ogm è accidentale, gli operatori devono essere in grado di comprovare alle autorità competenti di aver preso opportune misure per evitare di utilizzare come base di partenza materie prime ogm (o prodotti da essi derivati).
L'introduzione di questo limite soglia è stato possibile grazie al progresso delle metodiche analitiche, che con tecniche particolari di reazione di polimerizzazione a catena denominate PCR-Real Time, permettono la stima percentuale di alimenti transgenici.
Come già precedentemente affermato, il quadro normativo relativo agli ogm è in continua evoluzione, cosicché la Direttiva ed i Regolamenti sopra citati risultano attualmente sostituiti dalla "Direttiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 12 marzo 2001 sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati", dal "Regolamento (CE) N. 1829/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati" e dal "Regolamento (CE) N. 1830/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE".
Il contenuto della Direttiva 2001/18/CE che più direttamente riguarda le problematiche analitiche è l'obbligo, per gli Stati membri, di adottare misure per garantire la rintracciabilità e l'etichettatura degli ogm autorizzati in tutte le fasi della loro immissione in commercio, intendendo per "rintracciabilità" la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare, o di una sostanza desti-

nata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime, attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione *(Art. 3 - Reg. CE 178/2002).* In questo modo il controllo, che il Regolamento 1139/98 scaricava sul produttore finale, viene esteso a tutta la filiera produttiva, con un effettivo monitoraggio delle materie prime che, in quanto tali, potrebbero non avere subito spinti processi di trasformazione che spesso provocano difficoltà analitiche di individuazione della presenza di ogm.
Il Regolamento 1829/2003 all'art. 12 introduce, per gli alimenti, il nuovo limite soglia dello 0,9%, al di sopra del quale è obbligatoria l'etichettatura per gli ogm autorizzati e, per la prima volta, proprio per garantire la rintracciabilità degli ogm anche nelle filiere della produzione animale, estende lo stesso obbligo anche ai mangimi (art. 24). All'art. 47 stabilisce anche che l'obbligo di etichettatura non si applica per alimenti e mangimi che contengano una percentuale non superiore allo 0,5% di ogm "non ancora autorizzati" ma che siano stati oggetto di una valutazione dei rischi con esito favorevole.
I nuovi regolamenti portano, ancora una volta, ad una serie di considerazioni sulle potenzialità analitiche necessarie per far fronte alle indagini richieste da essi. Innanzitutto l'abbassamento del limite soglia allo 0,9%, per essere significativo, implica la disponibilità di metodi di campionamento e di metodiche analitiche quantitative in grado di distinguere con attendibilità sufficiente tra percentuali dell'1% e dello 0,9%. Inoltre, ai laboratori specializzati in questo tipo di indagini sarà richiesta una sempre maggiore velocità nella messa a punto di nuove analisi alla comparsa di nuovi ogm che, sebbene non ancora autorizzati ma in fase di approvazione, possono circolare senza obbligo di etichettatura, purché in percentuale non superiore allo 0,5%. Oltre che dalla capacità di reazione dei laboratori, ciò dipenderà anche dalla buona comunicazione degli elementi necessari per l'individuazione dei nuovi ogm, ed in particolare dal trasferimento di informazioni dalle strutture di preparazione di nuovi ogm alle autorità competenti per l'autorizzazione alla sperimentazione e al commercio, alle strutture di ricerca e di validazione di nuovi metodi analitici e ai laboratori che materialmente eseguono l'analisi.
Fondamentale sarà anche la disponibilità di materiali di riferimento certificati a concentrazione di ogm nota per costruire le rette di taratura indispensabili per le analisi di determinazione quantitativa.

Principali riferimenti normativi in tema di ogm

Regolamento (CE) n. 65/2004 della Commissione, del 14 gennaio 2004, che stabilisce un sistema per la determinazione e l'assegnazione di identificatori unici per gli organismi geneticamente modificati

Regolamento (CE) n. 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati.

Regolamento (CE) n. 1830/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE.

Decreto Legislativo dell'8 luglio 2003 n.224 Attuazione della Direttiva 2001/18/CE concernente l'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati.

Decreto del 31 maggio 2001 del Ministero della Sanità n. 371 Regolamento recante norme per l'attuazione della direttiva 91/321/CEE sugli alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento.

Direttiva 2001/18/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 marzo 2001 sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati e che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio.

Regolamento CE 50/2000 Regolamento CE 50/2000 della Commissione del 10 gennaio 2000 concernente l'etichettatura dei prodotti e ingredienti alimentari contenenti additivi e aromi geneticamente modificati o derivati da organismi geneticamente modificati.

Regolamento CE 49/2000 della Commissione del 10 gennaio 2000 che modifica il regolamento (CE) n. 1139/98 del Consiglio concernente l'obbligo di indicare nell'etichettatura di alcuni prodotti alimentari derivati da organismi geneticamente modificati caratteristiche diverse da quelle di cui alla direttiva 79/112/CEE.

Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 4 agosto 2000 Sospensione cautelativa della commercializzazione e dell'utilizzazione di taluni prodotti transgenici sul territorio nazionale, a norma dell'art. 12 del Reg CE n. 258/97.

Decreto del Presidente della Repubblica del 7 aprile 1999 n. 128 Regolamento recante norme per l'attuazione delle direttive 96/5/CE e 98/36/CE sugli alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati a lattanti e a bambini.

Regolamento CE 1139/1998 del Consiglio del 26 maggio 1998 concernente l'obbligo di indicare nell'etichettatura di alcuni prodotti alimentari derivati da organismi geneticamente modificati caratteristiche diverse da quelle di cui alla direttiva 79/112/CEE.

Regolamento CE 258/97 del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 gennaio 1997 sui nuovi prodotti e i nuovi ingredienti alimentari.

7 - Regime giuridico e problematiche della brevettabilità delle invenzioni biotecnologiche

Giampaolo Peccolo, Anna Mattighello
(Fondazione Lanza, Padova)

Il quadro di riferimento

Dopo che il XIX secolo ha guardato all'avvento della meccanizzazione ed il XX secolo ha dato dimora a spettacolari conquiste nel campo della chimica e della fisica, il passaggio verso il XXI secolo ha segnato lo storico evolversi dall'età industriale a quella biotecnologica.
A dare corpo a una vera e propria era bioindustriale stanno assiduamente operando gli sviluppi applicativi di tecnologie che dall'ultimo decennio del 2000 esplicano i propri effetti su territori molteplici e diversificati quali la medicina, la farmaceutica, l'ingegneria dei materiali, l'agricoltura, gli alimenti.
Se lo scenario di fondo fornisce i tratti essenziali dell'ambientazione in cui evolve la storia della brevettazione del vivente, il dato di origine può essere individuato nelle circostanze che permisero ad uno scienziato indiano di inventare e brevettare un microrganismo geneticamente modificato per eliminare dagli oceani le chiazze di petrolio. Ananda Chakrabarty, ricercatore presso la General Electric, aveva infatti sviluppato un tipo di olio particolare, per il quale era stata presentata richiesta di brevetto all'U.S. Patent and Trademark Office, che tuttavia, opponendo argomentazioni a sostegno della non condivisibilità della concessione di esclusive su organismi comunque vivi, nel 1978 aveva rifiutato. In seguito alle azioni legali intentate dall'azienda, la controversia pervenne alla Corte Suprema degli Stati Uniti, nella cui sede, agli esiti di un sofferto dibattito e di una votazione con il minimo margine di cinque voti (contro quattro), si agì a favore di Chakrabarty e della General Electric, decretando l'approvazione della prima tutela brevettuale su un microrganismo manipolato geneticamente. Le motivazioni addotte dai giudici di allora (1980) riconducevano alla considerazione che nella fattispecie non rilevasse tanto la distinzione tra inanimato e vivente, quanto, piuttosto, se nel microbo fosse possibile configurare o meno un'invenzione umana.
La sentenza della Suprema Corte statunitense, pionieristico presidio giuridico alla brevettabilità del vivente, fu inevitabilmente d'impulso ad una

concatenazione di eventi di portata planetaria. Oltre a far volare, nel volgere di soli venti minuti, da 35 a 89 dollari i titoli della prima società biotecnologica quotata a Wall Street, essa pose infatti i presupposti per l'avvio di una graduale e quindi massiccia opera di ricerca genetica e di conseguente brevettazione di invenzioni e di giacimenti genetici non ancora rivendicati. In una progressione che segna l'identificazione di quasi quarantamila sequenze geniche al mese, l'imperativo dei partecipanti rimane la conquista del primo posto, condizione imprescindibile per l'acquisizione di un diritto di sfruttamento esclusivo sul particolare frammento di DNA o sulla particolare cellula per cui è stato rilasciato il brevetto.

I lead-cases negli Stati Uniti

Mentre oltreoceano la brevettabilità del vivente incamerava un importante punto a favore per il tramite della decisione pilota della Corte Suprema, in Europa l'assegnazione dello status di invenzione industriale ad un modello transgenico poteva comunque trovare legittimazione in alcuni riferimenti normativi. Pur se in forma alquanto embrionale e non molto estensiva, infatti, la tutela brevettuale delle novità biotecnologiche risultava in qualche modo acquisita sulla base della Convenzione di Monaco (*European Patent Convention - EPC*) del 1973, entrata in vigore nel 1978, che a sua volta originava dalla precedente Convenzione di Strasburgo del 1963. Dalle disposizioni in essa contenute discendeva la possibilità di brevettare, in ambito comunitario, sia materia vivente comprendente microrganismi (batteri e virus) e linee cellulari, sia materia non vivente comprendente antibiotici, proteine ed enzimi, antigeni, anticorpi, sequenze di materiale genetico (DNA e RNA). Ed ancora, processi con impiego di microrganismi (fermentazione) e processi ad essi applicati (isolamento, moltiplicazione, conservazione, mutazione e ingegneria genetica).
La medesima fonte internazionale, il 13 maggio del 1992, aveva fornito il substrato legislativo al rilascio del brevetto EP 169672, secolarmente conosciuto come "topo di Harvard" ed avente ad oggetto un mammifero transgenico non umano nelle cui cellule germinali e somatiche era stata introdotta una sequenza oncogenica.
Se la Convenzione di Monaco, in mancanza di disposti più specifici, esplicava in ogni caso una funzione di riferimento normativo per la gestione brevettuale del vivente, in ciò supportando un Ufficio Europeo Brevetti (European Patent Office - EPO) che ormai da tempo - e con una certa dis-

involtura - ammetteva l'esclusiva sui risultati della manipolazione genetica, la natura stessa dell'atto, espressione di principi generali ma non cogente sotto il profilo dell'adeguamento agli stessi, non aveva operato in direzione dell'armonizzazione giuridica fra i Paesi contraenti. Tale circostanza si era posta a causa di legislazioni nazionali estremamente diversificate (per l'Italia il Regio Decreto 29 giugno 1939, n. 1127) e progressivamente costrette all'obsolescenza da un progresso scientifico latore di situazioni nuove e inaffrontate. Con questo schiudendo la breccia a pronunce giurisprudenziali discordanti da parte dei giudici e cedendo spazi sempre più ampi a possibili discrezionalità autorizzative prive di controllo.
Motivazioni che radicavano, da un lato, nella necessità di mettere ordine in una materia evoluta senza uniformità di indirizzi e, dall'altro, nel timore di rendere il Vecchio Continente territorio di conquista per quanti si riportassero a regimi autorizzativi più tolleranti ed estensivi, spinsero le autorità comunitarie ad intraprendere la strada di una direttiva che riducesse il gap maturato soprattutto rispetto agli Stati Uniti e aprisse una via europea eticamente consapevole alla brevettabilità della vita.

La vicenda europea

La trama di quella che si rivelerà una vicenda lunga e irta di difficoltà, cominciò a dipanarsi dal 1988, allorché la Commissione si accinse alla redazione di un testo che, nella sua versione definitiva e a conclusione di un impegno durato ben sette anni, il 1° marzo del 1995 sottopose al voto del Parlamento. L'esito registrò una bocciatura a larga maggioranza, determinata principalmente da una non chiara definizione, nell'ambito dello scritto legislativo, dei limiti di possibili interventi di terapia genica germinale sull'uomo.
Una considerazione del gruppo di consiglieri per l'etica della biotecnologia della Commissione, sostenuta dalle delegazioni austriaca, italiana e tedesca, aveva infatti rilevato come il carattere controverso di tali azioni, non mitigate da precedenti, le rendesse moralmente inaccettabili alla luce delle allora disponibili conoscenze scientifiche.
Due anni e qualche mese dopo, il 27 novembre 1997, una proposta ripresentata sostanzialmente nei medesimi termini al Consiglio dei Ministri ottenne parere favorevole, con il voto contrario dell'Olanda e l'astensione di Belgio e Italia.
La battaglia finale del decennale conflitto europeo sui biobrevetti si svolse al Parlamento di Strasburgo il 12 maggio 1998. Tra aspre contestazioni, la

direttiva sulla protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche conseguiva uno schiacciante ma non plebiscitario consenso. Nell'occasione – ebbe in seguito ad affermare Willy de Clerq, Presidente della Commissione Giuridica che presentava e sosteneva la direttiva – le industrie interessate intrapresero e sostennero la più vasta azione di lobby che sia mai stata vista nella storia del Parlamento europeo.
Se questo risultato aveva segnato la fine, in un modo o nell'altro, di un periodo di lungo scontro per l'Europa, per alcuni Paesi membri la questione era tutt'altro che chiusa. In particolare, per quanto riguarda l'Italia, già il 10 marzo 1998 il Senato impegnava il Governo ad attivarsi in direzione della sospensione della direttiva fino a una sua radicale rielaborazione. Successivamente, l'Italia si costituì insieme all'Olanda in un ricorso davanti alla Corte di Giustizia del Lussemburgo.
La causa si concluse il 9 ottobre del 2001, con una sentenza di rigetto. A parte l'esito negativo del ricorso, questo aveva comunque provocato lo slittamento nell'adozione delle norme di recepimento della direttiva comunitaria sulla brevettabilità, la cui scadenza era stata fissata al luglio del 2000. L'Italia vi sta provvedendo soltanto ora, a mezzo del disegno di legge delega A.S. 1745-B, che a metà maggio 2004 si trovava al secondo passaggio in Senato.

La direttiva n. 98/44/CE in sintesi

Dopo un decennio di accalorati dibattiti e polemiche, la sofferta via europea alla brevettabilità del vivente veniva dunque ufficialmente inaugurata dalla direttiva 98/44/CE "sulla protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche" del 6 luglio 1998 (G.U.C.E. L 213 del 30 luglio 1998).
Sotto il profilo strutturale, la direttiva evolve attraverso una serie di ben 56 *considerata*, per poi raccogliersi attorno ad un nucleo di 18 articoli, dei quali quattro (artt. 3, 4, 5 e 6) ne sprigionano l'essenza.
Tralasciando quelle che richiamano sostanzialmente variazioni sul tema, gli obiettivi fondamentali riconducibili all'atto comunitario si esplicano in triplice direzione: ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri (finalità "positiva"); correzione dei malfunzionamenti del mercato interno e, conseguentemente, sostegno agli investimenti nella ricerca settoriale (finalità "economica"); tutela della salute umana e dell'ambiente (finalità "costituzionale").
Tutto ciò, si osserva, è derivazione diretta di un sistema di protezione concepito come armonizzato, condizione indispensabile per scambi commer-

ciali consistenti e per un funzionamento non distorto dell'economia europea, al fine di convogliare maggiori capitali verso lo sviluppo industriale dell'attività inventiva e di mettere la Comunità in grado di competere sui mercati mondiali, progressivamente più aperti a seguito dell'entrata in vigore, a partire dal gennaio 1995, dell'accordo TRIPS (*Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights*) nel contesto dell'Uruguay Round del GATT (*General Agreement on Tariffs and Trade*).

Sotto il profilo contenutistico, l'atto comunitario interviene a stabilire i confini etici ed i criteri procedurali nel rispetto dei quali è permesso lo sfruttamento industriale delle risorse biologiche derivanti dalla ricerca scientifica in campo biotecnologico.

Ai sensi di tale disposto normativo, la brevettabilità è ammessa per:

- invenzioni nuove che comportino un'attività inventiva e siano suscettibili di un'applicazione industriale, anche laddove esse abbiano ad oggetto un prodotto consistente in o contenente materiale biologico, oppure un procedimento per mezzo del quale il materiale biologico sia prodotto, lavorato o impiegato;
- materiale biologico isolato dal suo ambiente naturale o prodotto attraverso un procedimento tecnico, anche se preesistente allo stato naturale;
- invenzioni aventi ad oggetto piante od animali, purché l'eseguibilità tecnica delle stesse non sia limitata ad una sola varietà vegetale o razza animale;
- procedimenti microbiologici od altri procedimenti tecnici mirati alla produzione di vegetali o animali, ovvero prodotti ottenuti direttamente attraverso siffatti procedimenti;
- elementi isolati dal corpo umano o prodotti mediante un procedimento tecnico, comprese le sequenze o le sequenze parziali di geni, pur se la struttura di tali elementi è identica a quella di elementi naturali. In questa ipotesi l'applicazione industriale dell'invenzione deve essere concretamente indicata nella richiesta di brevetto;
- utilizzazioni di embrioni umani che perseguano finalità terapeutiche o diagnostiche utili od applicabili all'embrione stesso.

La brevettabilità è invece esclusa per:

- varietà vegetali e razze animali;
- procedimenti essenzialmente biologici di produzione di vegetali o di animali, da intendersi come tecniche che soltanto l'uomo è capace di mettere in atto e che la natura di per se stessa non è in grado di compiere;
- il corpo umano nelle varie fasi della sua costituzione e del suo sviluppo,

comprese le cellule germinali, nonché la semplice scoperta di uno dei suoi elementi o dei suoi prodotti, inclusa la sequenza o la sequenza parziale di un gene;

- invenzioni il cui sfruttamento industriale o commerciale sia contrario all'ordine pubblico o al buon costume (lo sfruttamento di un'invenzione non può di per sé essere giudicato come contrario all'ordine pubblico o al buon costume per la sola circostanza di essere proibito da disposizioni legislative o regolamentari). In particolare, sono considerati non brevettabili: i procedimenti di clonazione di soggetti umani; i procedimenti di modificazione dell'identità genetica germinale dell'essere umano; le utilizzazioni di embrioni umani a fini industriali o commerciali; i procedimenti di modificazione dell'identità genetica degli animali che siano atti a provocare su di essi sofferenze senza utilità medica sostanziale per l'uomo o l'animale, nonché gli animali risultanti da tali procedimenti.

La tutela brevettuale assegnata a materiale biologico che l'invenzione ha dotato di determinate proprietà si estende a tutti i materiali biologici da esso derivati e contraddistinti dalle medesime caratteristiche. Analogamente, la protezione concessa ad un procedimento copre sia il materiale biologico da esso direttamente ottenuto che qualsiasi altro materiale biologico similare derivato dal materiale biologico direttamente ottenuto. A seguire, il riconoscimento di una esclusiva su un prodotto contenente o consistente in una informazione genetica viene allargato ad ogni altro materiale nel quale il prodotto risulti incorporato e in cui l'informazione genetica sia contenuta e svolga la propria funzione.
L'estensione della copertura brevettuale non vige, tuttavia, qualora riproduzione o moltiplicazione del materiale discendano necessariamente dall'utilizzazione per cui quest'ultimo è stato commercializzato. Nella stessa direzione intervengono ad agire deroghe a favore degli agricoltori, autorizzati allo sfruttamento di materiale riproduttivo di origine vegetale od animale, nonché di bestiame di allevamento, nell'esclusivo ambito della propria azienda e ai soli fini della prosecuzione dell'attività agricola.

I tratti controversi

Pur se affidata ad elementi di sintesi, la lettura del dettato normativo dovrebbe rendere ragione dei motivi per cui, all'indomani del voto di Strasburgo, gli schieramenti si siano arroccati su sponde nettamente oppo-

ste. Gli operatori di settore vedono i vantaggi di una maggiore chiarezza contro eventuali abusi, presupposto per l'effettuazione di investimenti, e un grande impulso alla ricerca. Il fronte contrario lo ritiene un documento da bocciare senza possibilità d'appello nei contenuti fondamentali e suscettibile di legittimare, nel suo consentire lo stravolgimento del millenario e diuturno procedere evolutivo, forme di proprietà industriale in grado di alterare gli stessi meccanismi di bilanciamento biologici e naturali.
Trasversale al versante di appartenenza è invece l'auspicio rivolto ad un qualche miglioramento linguistico della direttiva e ad una maggiore limpidezza interpretativa e di significato per alcuni articoli. Non perfettamente individuabile, ad esempio, appare la linea di separazione oggettiva tra modificazione genetica e non genetica nel caso delle novità e varietà vegetali. Esperti della materia richiamano infatti all'attenzione come la distinzione fra variazioni genetiche conseguite tramite incroci od operazioni chimiche sulle piante e variazioni genetiche attualmente ottenibili con veri e propri interventi sulla struttura cellulare delle stesse, sia tecnicamente improponibile e basata solo sulla semantica.
Dove le distanze permangono incolmabili è sul terreno delle posizioni di principio. A scavare il solco più profondo fra le parti è l'articolo 5 dell'atto comunitario, che ne condensa il contenuto ed al contempo offre sofferta testimonianza degli sforzi e delle difficoltà con cui, a conclusione di un decennio di accesi dibattiti sulla brevettabilità del vivente, si è tentato il compromesso tra necessità e timori in larga misura contrapposti. Se il punto 1 stabilisce che il corpo umano, nei diversi stadi della sua costituzione e del suo sviluppo, nonché la mera scoperta di uno dei suoi elementi, compresa la sequenza o sequenza parziale di un gene, non possono costituire oggetto di diritti di esclusiva, subito dopo il punto 2 precisa che un elemento isolato dal corpo umano o prodotto mediante un procedimento tecnico, compresa la sequenza o sequenza parziale di un gene, può essere un'invenzione brevettabile, anche se la struttura di detto elemento è identica a quella di un elemento naturale.
Come è dato constatare, confini chiari e insieme labili, linee di demarcazione che talvolta paiono sfumare verso il paradosso nel riconoscere dapprima l'inviolabilità del diritto di proprietà del corpo umano, per porre subito dopo in discussione quello dei singoli componenti, istruzioni che giustificano la metafora di una privatizzazione negata alla fotocopiatrice ma non alle fotocopie conformi all'originale.
A scatenare reazioni comprensibilmente emotive interviene anche il suc-

cessivo articolo 6, che alla lettera *d*) accorda lo status di invenzione industriale, con la sostanziosa copertura giuridica discendente, a procedimenti di modificazione dell'identità genetica degli animali, purché questi non siano atti ad indurre sofferenze prive di utilità medica apprezzabile per l'uomo o l'animale.
L'improponibilità di una valutazione univoca di tale soglia, nonché la variabilità dimensionale della medesima, risultano efficacemente sottolineate dagli orientamenti decisionali dell'Ufficio Europeo Brevetti, che se per il topo oncogeno svolge con naturalezza la questione del trade-off, licenziando per esso la richiesta di brevetto, al cospetto di un mammifero transgenico volto allo studio della calvizie, spesso accompagnata a profondi disagi psicologici per il soggetto colpito, ritiene trascurabile il beneficio a vantaggio dell'umanità e respinge la domanda.
La definizione di un ambito di liceità così come configurato dal citato art. 6 finisce, quindi, per impegnare un giudizio etico non solo affatto insidiabile sotto il profilo dell'oggettività e poco connaturato al ruolo degli organismi che coinvolge, ma anche passibile di condizionare e sostituire il mero controllo giudiziario.
A sgomberare il campo da possibili confusioni logiche, va innanzitutto richiamato un concetto di fondamentale importanza, e cioè la necessità di tenere nettamente separati i due distinti piani della fattibilità e della brevettabilità. Mentre la prima questione attiene alla liceità delle pratiche biotecnologiche e degli sviluppi applicativi da esse derivati, infatti, è solo la seconda questione ad intervenire in un giudizio circa l'ammissibilità o meno, nei rispetti del risultato inventivo, di una copertura giuridica che ne consenta lo sfruttamento esclusivo. Tale linea divisoria orienterà pertanto la domanda non nel senso di valutare se sia moralmente accettabile un comportamento specista che, con un intervento di ingegneria genetica, predestina un roditore al cancro, sia pure per studiarne genesi ed evoluzione a fini scientifici, bensì, e più semplicemente, se sia eticamente da condividere una strategia industriale decisa sulla base della brevettabilità di questo risultato e sul suo sfruttamento. E il fatto che tale sfruttamento possa aver luogo nel modo più arbitrario.
Argomentazioni più circoscritte al terreno della direttiva 98/44/CE, ed aventi ad oggetto il profilo della tutela sanitaria, richiamano all'attenzione l'esistenza di possibili contrasti, individuati nel fatto che mentre il preambolo 35 dell'atto comunitario esplicita il principio dell'esclusione dalla protezione giuridica di metodi diagnostici, terapeutici e chirurgici, il disposto normati-

vo, nel suo consentire la brevettabilità di elementi genici coinvolti in fasi sostanziali degli stessi, lo comprime al punto tale da annullarlo.
Un inciso aperto dalla medesima chiave di lettura ed ispirato dal medesimo documento osserva infine come un punto di contraddizione possa essere riconosciuto nel divieto di privatizzazione per tutto ciò che risulti in contrasto con l'ordine pubblico ed il buon costume, neutralizzato però dalla ammissibilità dello status di invenzione industriale nei confronti di prodotti utilizzanti od aventi per oggetto elementi biologici di origine umana. Su un piano di maggior dettaglio, viene obiettato come anche nella presente circostanza il precetto secondo il quale alla persona debba essere garantita la possibilità di un consenso libero e informato al prelievo, venga ufficializzato solo in premessa ma non all'interno del testo legislativo, con ciò andando a ledere quelli che si costituiscono come diritti fondamentali volti a garanzia della dignità e dell'integrità dell'uomo.

Considerazioni specifiche per il settore agricolo

Come già delineato in precedenza, una delle finalità riconducibili alla normativa comunitaria in materia di protezione giuridica delle invenzioni biotecnologiche coinvolge la speranza di poter intervenire efficacemente nella lotta alla denutrizione e alla salvaguardia delle matrici naturali, a discendere dalla propulsione di una ricerca resa remunerativa dal mezzo brevettuale.
Entro il presente contesto, sembra opportuno evidenziare in primo luogo come il sentiero sperimentale seguito dalle principali linee di studio afferenti al comparto agrario si sia diretto essenzialmente verso la creazione di varietà a maggior rendimento ed associabili a metodi di controllo selettivo degli infestanti, mentre solo marginalmente e recentemente abbia valutato gli aspetti qualitativi degli alimenti derivati.
Alla luce di tale percorso evolutivo, i motivi di ottimismo generati dalla brevettabilità andrebbero individuati innanzitutto sotto il profilo della produzione di piante che, resistendo a parassiti e situazioni climatiche avverse, consentirebbero di ridurre i costi dovuti all'impiego di insetticidi e diserbanti, di contenere l'inquinamento dei terreni grazie ad un uso più moderato di prodotti chimici, di preludere ad un'attenuazione del problema della carenza di cibo, tramite l'aumento delle rese e la coltivazione di aree ambientalmente sfavorite.
Al beneficio di un ausilio imprescindibile nel contrasto alla fame mondiale, viene però contrapposto il pericolo di un aggravio della dipendenza eco-

nomica dai Paesi sviluppati, a particolare carico dei coltivatori dei Paesi poveri, costretti ad acquistare sul mercato fattori di produzione resi più onerosi proprio dalla pendenza di brevetti. Dal fronte contrario alla ammissione di privative su modelli transgenici giunge infatti una precisazione, mirata a sottolineare come nella prevalenza dei casi le modificazioni genetiche apportate ai vegetali intendano conferire agli stessi una tolleranza a presidi fitosanitari molto efficaci, ma altrettanto specifici, con la conseguenza di non eliminare affatto l'impiego di prodotti agrochimici, ma anzi di costituirli complemento indispensabile alle sementi manipolate. Uno dei precedenti più noti in tal senso viene fornito dal brevetto ottenuto dalla Monsanto sul cotone resistente al glifosate, esteso a coprire anche il processo di semina e di somministrazione dell'erbicida.
In questa prospettiva, dunque, i vantaggi più chiari sarebbero riservati alle compagnie produttrici di semi e diserbante, solitamente coincidenti. Desta inoltre perplessità il dato di fatto che le varietà esposte per tempi sufficientemente lunghi a fitofarmaci di sintesi tendano a sviluppare una resistenza, andando a creare le condizioni potenziali per un utilizzo più intenso degli stessi e sovvertendo così l'auspicato impatto sulla preservazione delle risorse ambientali.
Un ulteriore momento di forte contrasto fra gli schieramenti sorge in merito alle conseguenze indotte sulla diversità biologica, che gli uni considerano mantenuta (grazie alle opportunità di tutela delle specie a rischio di estinzione), gli altri posta a repentaglio, in quanto, vigendo il meccanismo della copertura brevettuale, le numerose varietà locali verrebbero a patire la concorrenza delle poche varietà ingegnerizzate ma economicamente più interessanti, con ciò provocando l'abbattimento di quella biodiversità planetaria che sempre la Convenzione di Rio de Janeiro eleva ad oggetto della propria protezione.

8 – Conclusioni

Il presente lavoro, realizzato come detto in premessa grazie ad un progetto coordinato da Veneto Agricoltura e finanziato dalla Regione Veneto, costituisce un concreto contributo al risanamento del difficile rapporto che si è instaurato tra l'opinione pubblica e le agro-biotecnologie.
Innanzitutto questa trattazione non ha voluto ignorare il peso di alcune preoccupazioni la cui larga diffusione, soprattutto fra i consumatori, finisce per ostacolare l'impiego degli organismi geneticamente modificati nel settore produttivo. Tali timori riguardano tre grandi ordini di fattori. In primo luogo la possibilità di una involontaria e incontrollabile propagazione dei nuovi caratteri genetici a specie selvatiche affini, con conseguente modificazione della biodiversità e degli equilibri ambientali.
In secondo luogo la supposta pericolosità degli ogm per la salute umana, anche se questa non è certo ancora stata provata. Infine preoccupano le implicazioni economiche e politiche che derivano dalla brevettabilità delle invenzioni biotecnologiche; questo ultimo aspetto suscita interrogativi, come riportato nel capitolo 7, perché potrebbe influire sulle dinamiche di sviluppo agricolo e sulla possibilità che il settore possa andare incontro a un controllo di tipo monopolistico da parte dei soggetti privati detentori dei brevetti.
Tre tipi di questioni, dunque, la cui diffusione nell'opinione pubblica può rallentare la spinta allo sviluppo che invece le biotecnologie potrebbero consentire. E alle quali il presente lavoro si è proposto di dare risposta, riuscendoci con puntualità in ciascuno dei sette capitoli in cui si articola, pur lasciando ad ogni singolo autore larghi margini di autonomia e di originalità nei giudizi.
Sulla possibilità che si verifichi un flusso genico tra ogm ed altri organismi vegetali sono chiarificatori i capitoli 2 e 3. La ricerca si sta adoperando per la produzione di piante ingegnerizzate allo scopo di migliorare alcune caratteristiche qualitative, di ottenere resistenze agli stress abiotici, agli erbicidi e all'attacco di insetti e di virus. Il tutto ovviamente, per evitare il rischio ecologico, deve essere condotto sotto uno stretto controllo che, dal punto di vista scientifico, si traduce oltre che in una continua e rigorosa sperimentazione in campo su larga scala e con determinate misure di confinamento, anche nell'impiego di specifiche procedure di trasformazione genetica.
Una tra queste è la tecnica che prevede l'inserimento dei transgeni non più nei cromosomi nucleari, ma nel genoma dei cloroplasti contenuti nelle

foglie. Questa tecnica non solo evita l'espressione del prodotto del transgene nel polline, a vantaggio degli insetti che del polline si nutrono, ma impedisce anche il possibile flusso genico che invece potrebbe verificarsi proprio attraverso la diffusione del polline stesso.
Un'altra recente ed affidabile strategia alternativa che riduce il rischio di creazione di specie superinfestanti è l'inserimento di costrutti contenenti, oltre alle resistenze volute, anche geni dannosi per la sopravvivenza delle specie selvatiche affini.
Un'ulteriore strategia proposta nel presente lavoro è quella che previene la probabilità di comparsa di ceppi di insetti resistenti alle tossine prodotte dalla pianta in seguito alla inserzione dei geni per la tolleranza agli insetti. In questo caso la presenza di aree di rifugio coltivate con piante tradizionali manterrebbe un numero sufficiente di insetti suscettibili che, incrociandosi con gli eventuali individui resistenti sopravvissuti, provocherebbe una diluizione degli alleli che portano il carattere della resistenza.
Dal presente documento emerge inoltre che la sicurezza e il controllo delle biotecnologie in ogni campo di applicazione deve essere assicurata da un adeguato piano normativo.
Quest'ultimo, si legge nei capitoli 5 e 6, non solo deve verificare la non pericolosità degli organismi geneticamente modificati, ma deve anche garantire al consumatore la trasparenza e quindi la libertà di scelta degli alimenti. Esistono delle procedure chiare e ben definite per le modalità di immissione deliberata di ogm nell'ambiente, sia ai fini della commercializzazione che a quelli della ricerca. L'emissione nell'ambiente deve sempre essere oggetto di notifica alle autorità competenti. Nel caso di scopi sperimentali deve contenere un fascicolo tecnico per la valutazione del rischio ambientale, un piano di monitoraggio, gli eventuali metodi di inattivazione dell'ogm, il trattamento dei residui e i piani di emergenza. Per quanto riguarda la commercializzazione, a tutela della salute del consumatore, le linee guida per l'autorizzazione prevedono l'etichettatura e la rintracciabilità del materiale transgenico destinato alla produzione alimentare.
La tracciabilità e l'etichettatura di cibi e mangimi devono venire applicate quando la presenza di materiale transgenico, per ciascun ingrediente, supera una soglia di tolleranza molto bassa che corrisponde allo 0,9%. L'introduzione di questo valore limite è stata resa possibile dalla disponibilità di metodi di campionamento o di metodiche analitiche quantitative capaci di distinguere con attendibilità tra intervalli percentuali molto bassi. Nel caso delle sementi ogm è previsto inoltre un ulteriore abbassamento

delle soglie di tolleranza che, a seconda della specie e della varietà, potrà variare tra 0,3 e 0,7%.
Un'ultima novità di rilievo, presentata in ambito legislativo, è l'analisi del rischio. Questa comprende l'identificazione degli effetti nocivi per la salute umana, la valutazione dei dati scientifici e la comunicazione sulle possibili conseguenze negative che un determinato prodotto o processo possono determinare.
Per quanto riguarda il settore zootecnico, e da quanto viene riportato nel capitolo 4, è interessante rilevare come, nonostante la disciplina legislativa sulla sicurezza alimentare dei mangimi contenenti ogm sia equiparabile a quella degli alimenti, non esista alcun tipo di preoccupazione da parte dell'opinione pubblica. Le biotecnologie animali, anzi, sono considerate uno strumento accettabile quando vengono impiegate per il miglioramento delle popolazioni locali, per l'esclusione dai programmi genetici di soggetti portatori di malattie ereditarie, per l'ottenimento di vaccini e per il sessaggio del seme. È opinione diffusa, inoltre, che possano fornire delle garanzie per la tutela e la sicurezza alimentare grazie alla tracciabilità genetica. Questa consente la protezione dei prodotti tipici e locali e fornisce una garanzia di autenticità.
In merito agli aspetti economici e politici, il capitolo 1 evidenzia la necessità di sostenere in ambito nazionale ed europeo le applicazioni delle agro-biotecnologie allo scopo di evitare l'insorgere di conseguenze negative non solo a livello economico ed occupazionale, ma anche culturale. Nei Paesi in via di sviluppo, inoltre, per i quali è necessaria una politica che garantisca un'adeguata autonomia agro-alimentare, le biotecnologie rappresentano una risorsa auspicata ed importante. Grazie a queste, infatti, non solo è possibile aumentare la qualità e la quantità della produzione, ma anche intervenire, ad esempio, nel riutilizzo di aree agricole dismesse in seguito a fenomeni di desertificazione o di inquinamento chimico. Per evitare inoltre l'insorgenza di un comportamento monopolistico da parte delle multinazionali proprietarie dei brevetti, sarà necessario creare una politica di forti collaborazioni con le istituzioni che si occupano del trasferimento delle tecnologie e facilitarne il trasferimento gratuito.
In definitiva, dal presente studio emerge un quadro generale nel quale le agro-biotecnologie si segnalano come uno strumento in grado di garantire, almeno in teoria, una irripetibile occasione di sviluppo. Non ci si nasconde che rimane necessario, come è sempre avvenuto nella storia delle innovazioni tecniche e produttive, definire norme precise in grado di prevenire

eventuali rischi per la salute umana e per l'ambiente ed eventuali controindicazioni sociali ed economiche. Ma da questa trattazione emerge un messaggio molto chiaro: a patto che venga soddisfatta tale precondizione di tipo normativo, i tecnici e i produttori hanno tutte le possibilità di utilizzare queste nuove procedure per muoversi a vantaggio della società e quindi degli stessi consumatori.

Glossario

Angiosperme: Tra le piante con riproduzione tramite semi *(Spermatophyta)*, vi si riuniscono tutte quelle, legnose o erbacee, che abbiano fiori con un involucro chiuso (ovario) nel quale sono posti gli elementi riproduttori femminili (ovuli).

Anticorpo: Proteina prodotta da alcuni tipi di linfociti dei vertebrati, in risposta all'ingresso nell'organismo di un antigene. Ogni anticorpo si lega a un tipo specifico di antigene e aiuta a reagire ai suoi effetti.

Antigene: Molecola estranea che, se introdotta in un organismo, ne stimola una risposta immunitaria.

Autoimpollinazione: Impollinazione del pistillo di un fiore per mezzo del suo stesso polline

Batteriofago o **fago**: Virus che infetta cellule batteriche. In biologia molecolare i batteriofagi vengono utilizzati come vettori di clonaggio.

Biodepurazione: Processo di risanamento di un ambiente inquinato operato da microrganismi o piante in grado di rimuovere o ridurre sostanze inquinanti grazie a caratteristiche del loro metabolismo.

Biodiversità: L'insieme di tutte le possibili combinazioni di geni che si trovano in tutte le specie viventi. Essa rappresenta un indispensabile "serbatoio genetico" che consente il mantenimento della vita sulla terra.

Biofabbriche: Nel caso di insetti si intendono strutture atte alla riproduzione in massa da utilizzare nel controllo di organismi dannosi. Nel caso delle piante si intende la loro utilizzazione per la produzione di sostanze utili all'industria farmaceutica e agro-alimentare.

Blastocista: Embrione di quattro-cinque giorni composto da qualche decina di cellule delimitanti una cavità chiamata blastocele.

Cellule epiteliali: Cellule che formano un tessuto mancante di vasi sanguigni che ha funzione di rivestimento, di secrezione o di trasmissione di impulsi.

Cellule meristematiche: Cellule vegetali indifferenziate dotate di elevata capacità di dividere e differenziare.

Cellule somatiche: Tutte le cellule che formano un individuo ad esclusio-

ne delle cellule della linea germinale (gameti). In una popolazione di cellule somatiche è possibile indurre la formazione di un embrione somatico del tutto simile a quello zigotico. La sostanziale differenza in questo caso è che, mentre un embrione somatico, dal punto di vista genetico, è perfettamente identico alla popolazione di cellule somatiche di partenza, nel caso dell'embrione zigotico ogni individuo è geneticamente diverso per effetto della ricombinazione dei caratteri maschili e femminili che si ha attraverso la meiosi.

Clone: Insieme di cellule, o di individui identici ottenuti per propagazione asessuata. Nel caso delle piante la clonazione è una pratica abituale che permette la moltiplicazione degli individui, ad esempio la talea (porzione di ramo, radice o foglia a cui si fa emettere la parte mancante). Nel caso degli animali consiste nel sostituire il nucleo di un oocita di un individuo con quello di un altro individuo (donatore).

Colletto: Punto di raccordo fra radice e fusto.

Cosmide: Vettore di clonaggio simile ad un plasmide che include anche alcuni elementi del batteriofago.

Costrutto ricombinante o cassetta genica: molecola di DNA contenente geni provenienti da organismi diversi.

Cotiledone: La foglia dell'embrione. Le angiosperme sono suddivise in due raggruppamenti distinti in base la numero di cotiledoni posseduti dall'embrione in monocotiledoni (1 cotiledone) e dicotiledoni (2 cotiledoni).

Cromosoma: Rappresenta la molecola di DNA al massimo grado di condensazione. È costituito da DNA, proteine istoniche e proteine non-istoniche. È visibile durante la metafase della mitosi. Il numero di cromosomi è tipico per ogni specie.

Deiscenza: Nel caso del frutto è l'apertura che si verifica a maturità per la dispersione dei semi.

Elettroferogramma: Grafico a picchi ottenuto attraverso reazioni di sequenziamento con indicazioni delle basi azotate in relazione al fluoroforo usato per ogni nucleotide.

Embrione: Organismo alle prime fasi di sviluppo che deriva da divisioni dello zigote.

Emofilia: Malattia genetica recessiva legata al sesso (il gene competente è

localizzato sul cromosoma X). Determina una sindrome emorragica, dovuta ad assenza del fattore VIII coinvolto nella coagulazione del sangue.

Encefalopatia spongiforme: L'encefalopatia spongiforme bovina è una grave malattia cronico-degenerativa a carico del sistema nervoso centrale. È conosciuta anche come il morbo della mucca pazza o sindrome di Kreutzfeld Jacob.

Enzimi di restrizione: Nucleasi di origine batterica capaci di tagliare i legami fosfodiesterici del DNA in corrispondenza di specifiche sequenze nucleotidiche (siti di restrizione). Tali sequenze sono generalmente dei palindromi, contengono cioè sequenze di basi a simmetria binaria.

Eredità materna: Eredità citoplasmatica di un carattere genetico controllata dal genoma mitocondriale o cloroplastico**.**

Fingerprint: Insieme di marcatori del DNA che nel loro complesso determinano una sorta di "impronta molecolare" utile per caratterizzare ed identificare in maniera univoca il genoma di singoli individui.

Gene: Sequenza nucleotidica in grado di codificare per una proteina; i geni sono localizzati sui cromosomi.

Geni marcatori: Geni che codificano per un prodotto facilmente analizzabile. Ad es. i **geni reporter** (GUS e GFP) servono a determinare se un transgene sia stato introdotto con successo in una cellula.

Genoteca: Collezione di moltissimi vettori di clonaggio, ciascuno dei quali contiene un particolare frammento di DNA genomico (gDNA) o di DNA complementare (cDNA) derivato dal genoma o dal trascrittoma di un determinato organismo.

Germoplasma: La più completa raccolta che è possibile ottenere di materiale genetico di propagazione delle piante di cui si vuole conservare la variabilità; solitamente è conservata in una *banca dei geni* (cella frigorifera in cui sono depositati i campioni di seme da conservare, sigillati in apposite confezioni, ad un tasso di umidità prestabilito, per allungarne la vitalità e la capacità germinativa).

Genoma: La totalità dei geni di un organismo.

Impollinazione incrociata: Impollinazione del pistillo di un fiore per mezzo di polline proveniente da un'altra pianta della stessa specie.

Libreria genomica: Genoteca costituita da una collezione di vettori di clo-

naggio mantenuti in *E. coli* o in *S. cerevisiae* e contenenti frammenti di restrizione di DNA genomico che nel loro insieme sono rappresentativi dell'intero genoma di un organismo.

Libreria trascrittomica: Genoteca costituita da una collezione di vettori di clonaggio contenenti frammenti di cDNA ottenuti per retrotrascrizione degli mRNA che nel loro complesso sono rappresentativi del solo trascrittoma di un organismo o di un suo specifico organo o tessuto. In questo caso però le librerie di cDNA non contengono tutti i geni, ma unicamente le sequenze espresse nel tipo cellulare da cui sono stati isolati i messaggeri maturi.

Ligasi: Enzimi in grado di catalizzare la formazione di legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti unendo tra loro frammenti polinucleotidici.

Marcatore molecolare: Frammento di DNA rilevabile con sonde o primer che contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il locus genomico con il quale si identifica e le regioni cromosomiche che lo circondano.

Maschiosterilità: Incapacità da parte di un individuo di produrre gameti maschili fertili.

Mesofillo: Insieme di tessuti, principalmente composti di cellule ricche in cloroplasti, deputati alla fotosintesi interposti tra i tessuti epidermidici della foglia.

Metodo dideossi: Metodo di sequenziamento del DNA ideato a Sanger.

Microsatelliti: Sequenze di DNA con motivi nucleotidici semplici ripetuti. Tali sequenze costituiscono una classe di marcatori molecolari rilevabili mediante PCR chiamati SSR (sequenze ripetute semplici) il cui polimorfismo è molto usato per l'analisi del genotipo (genotyping) dei genomi vegetali.

Minisatelliti: Sequenze di DNA composte di ripetizioni di monomeri piuttosto complessi, cioè unità oligonucleotidiche lunghe da 10 a 60 pb. Tali sequenze sono rilevabili mediante procedimento di ibridazione di tipo Southern blot e costituiscono una classe di marcatori noti come VNTR (numero variabile di ripetizioni in tandem) molto usati per il fingerprinting del genoma umano.

Mutagenesi: Trattamento chimico o fisico che cambia i nucleotidi del DNA di un organismo**.**

Nucleasi: Enzimi in grado di rompere i legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti determinando la formazione di frammenti polinucleotidici di dimensioni variabili.

Oocita: Gamete femminile animale non ancora maturo.

Parete cellulare: Rivestimento esterno della cellula vegetale costituito prevalentemente di cellulosa in grado di determinarne forma e dimensione.

Plasmide: Molecola di DNA extracromosomica a doppio filamento capace di replicarsi autonomamente nella cellula batterica, fino a raggiungere qualche centinaio di copie. Ad esempio, il plasmide Ti che è presente nei ceppi di *Agrobacterium.*

Promotore: Segmento di DNA solitamente collocato a monte di un gene, indispensabile per la trascrizione del gene. Nel caso dei vegetali, il promotore che regola la trascrizione del gene codificante la subunità 35S del RNA ribosomale del virus del mosaico del cavolfiore viene utilizzato come promotore costitutivo. I promotori costitutivi inducono l'espressione del transgene in tutti i tessuti.

Pronucleo: Zona di condensazione dei cromosomi maschili o femminili, visualizzabile nella cellula uovo 12-18 ore dopo l'inseminazione della cellula femminile. La presenza di due pronuclei è indice di una avvenuta normale fecondazione.

Protoplasti: Cellule vegetali private della parete cellulare.

Quiescenza: Arresto temporaneo della crescita dei semi e delle gemme in assenza di condizioni ambientali favorevoli. È sotto controllo ormonale.

Reazione a catena della polimerasi (PCR): Tecnica che consente di sintetizzare ripetutamente (amplificare) per via enzimatica uno specifico segmento di DNA situato tra due regioni di sequenza nucleotidica nota, producendone un numero elevato di copie, attraverso una serie di reazioni di denaturazione del DNA, appaiamento degli inneschi oligonucleotidici o primer e polimerizzazione dei nuovi filamenti.

Regione codificante: Regione del DNA nella quale è localizzata la sequenza nucleotidica che specifica per la sequenza aminoacidica di una proteina.

Silenziamento genico: Processo a causa del quale la trascrizione di un gene o la traduzione del suo trascritto viene inibita.

Sistema immunitario: Insieme di organi e cellule deputate alla difesa del

corpo contro le infezioni ed altre malattie.

Somatotropo: Ormone prodotto dall'ipofisi che controlla la crescita.

Sonda: Sequenza nucleotidica, corrispondente ad una molecola di DNA genomico o ad una molecola di cDNA, che può essere impiegata per identificare geni a sequenza complementare mediante esperimenti di ibridazione.

Southern blot hybridization: Tecnica di ibridazione degli acidi deossiribonucleici. Prevede la digestione di DNA genomico con uno o più enzimi di restrizione, la loro separazione tramite elettroforesi in un gel di agarosio e il loro trasferimento (*blotting*) su una membrana che viene sottoposta ad ibridazione con sonde di sequenza nota opportunamente marcate.

Sovraespressione: Induzione di elevati livelli di trascrizione di un gene.

T-DNA: Segmento di un plasmide Ti che si trasferisce e si integra nel genoma delle cellule vegetali.

Terminatore: Sequenza di DNA posta a valle del gene che arresta la trascrizione.

Transgene: Gene di una data fonte che è stato incorporato in un organismo diverso.

Trascritto o **RNA messaggero**: Sequenza nucleotidica che è copiata a partire da un filamento stampo di DNA e che presenta una composizione nucleotidica ad esso complementare. Tali molecole veicolano l'informazione genetica dal nucleo al citoplasma, sui ribosomi, dove presiedono alla sintesi di catene polipeptidiche.

Vettore di clonaggio: Molecola di DNA a doppia elica costruita artificialmente in cui è possibile inserire un frammento di DNA esogeno e che può replicarsi autonomamente in una cellula ospite.

Virus: Parassita endocellulare infettivo che si riproduce solo all'interno di cellule vive.

Xenotrapianti: Trapianti di organi eseguiti tra specie differenti (per esempio, il cuore di un maiale trapiantato in un uomo).

Zigote: Prodotto della fusione del gamete femminile con quello maschile.

Finito di stampare nel mese di Settembre 2004
presso Grafiche Quattro
Santa Maria di Sala - Venezia