

Esperienze di impiego in pieno campo di piante transgeniche per la resistenza a virus

INTRODUZIONE

Le malattie da virus hanno un rilevante impatto agronomico sulle colture. Il loro controllo si attua attraverso l'individuazione e introduzione di geni di resistenza mediante programmi di miglioramento genetico classico o biotecnologico, l'impiego di strategie preventive basate sull'utilizzo di materiale di propagazione virus esente e l'eliminazione di vettori di virus dalle colture agrarie. A fronte di considerevoli progressi nella gestione preventiva delle malattie virali attraverso lo sviluppo di protocolli di certificazione e sempre più sensibili strumenti diagnostici, le fonti di resistenza naturale ai virus e le conoscenze sulla funzione dei geni correlati, sono ancora limitate se non assenti per numerose specie (Maule et al., 2007; Palukaitis e Carr, 2008). A ciò si aggiunge che molte specie agrarie hanno lunghi periodi vegetativi e talvolta genomi poliploidi scarsamente conosciuti a livello genetico. Allo stato attuale, tra i genomi sequenziati si annoverano solo cinque specie, *Arabidopsis thaliana*, riso, pioppo, vite e papaya, sebbene nel corso dei prossimi anni queste conoscenze si arricchiranno di una notevole mole di informazioni.

Su un fronte parallelo, l'enorme quantità di dati sulla genomica dei patogeni virali, ha consentito l'introduzione di fenotipi di resistenza utilizzando metodiche di trasformazione genetica, fondate sulla strategia indotta da geni del patogeno (PDR: Pathogen derived resistance; Sanford e Johnston, 1985). Questo approccio si sviluppa attraverso l'espressione di proteine del virus, per esempio proteine di movimento (MP: movement protein) o strutturali (CP: coat pro-

* *Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione di Bari e Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari*

tein) che interferiscono con il ciclo replicativo virale (Beachy, 1999), oppure la sintesi di acido ribonucleico sempre di origine virale, che induce fenomeni di silenziamento genico specifici per il genoma del virus (RNA mediated resistance o RNA silencing; Baulcombe, 2004; Lindbo e Dougherty, 2005). I vantaggi dell'adozione della PDR nell'induzione di resistenza a virus risiedono: (i) nella possibilità di inserimento di transgeni in cultivar di pregio senza alterarne il fenotipo; (ii) nella possibilità di utilizzare lo stesso transgene per l'induzione di resistenza in specie correlate tutte suscettibili allo stesso virus; (iii) nell'introduzione di geni in specie a propagazione vegetativa, difficilmente modificabili con tecniche di miglioramento genetico classico.

Sono state documentate sperimentazioni di piante resistenti a malattie da virus appartenenti a numerose specie, limitatamente a condizioni controllate di laboratorio, mentre pochi studi riportano di prove condotte in pieno campo, e un numero ancor più limitato di piante è stato ammesso alla coltivazione e commercializzazione (Fuchs e Gonsalves, 2007). Il presente lavoro si riferirà solo a queste ultime esperienze, dalle quali si può delineare un quadro realistico dei rischi e dell'impatto derivanti dall'impiego di questi strumenti biotecnologici in agricoltura. Le informazioni raccolte, derivanti da osservazioni svoltesi per un periodo superiore al decennio, permettono di trarre conclusioni relativamente all'entità del rischio reale rispetto a quello percepito, e forniscono nuovi dati che possono essere di aiuto al legislatore e informazione per l'opinione pubblica.

COLTURE IN PRODUZIONE COMMERCIALE NEGLI STATI UNITI D'AMERICA

Papaya resistente a Papaya Ringspot virus

È questo il meglio documentato esempio di resistenza transgenica a virus che ha avuto un'efficace applicazione nelle isole Hawaii (Gonsalves D., 1998) dove la pianta è ammessa alla coltivazione commerciale, e in altri paesi del continente asiatico, in cui sono state condotte prove di campo (Gonsalves et al. 2007; Sriwatanapongse et al., 2007). In queste ultime regioni a clima tropicale, la papaya ha un ruolo importante nella dieta per il suo alto contenuto in vitamina C e pro vitamina A, ambedue facilitanti l'assunzione di ferro (Duxbury, 2003).

Negli anni '90 l'industria della papaya (*Carica papaya*) nelle isole Hawaii, subì considerevoli riduzioni di produzione a causa di epidemie del virus della maculatura anulare della papaya, *Papaya ringspot virus* (PRSV; Gonsalves et

al., 2007). Questo potyvirus, identificato in queste stesse isole (Jensen, 1949), è trasmesso in modalità non-persistente da diverse specie di afidi e, come tale, le sue infezioni assumono un andamento epidemico. PRSV è considerato tra i più dannosi agenti di malattia per le coltivazioni di papaya poiché le sue infezioni compromettono la capacità fotosintetica della pianta, inducendone un progressivo declino che può condurla alla morte, e rendendo i frutti non commerciabili (Gonsalves, 1998).

I tentativi di identificazione di geni di resistenza o tolleranza al virus in papaya sono stati infruttuosi (Gonsalves et al., 2006) e, nel passato, sono state condotte diverse esperienze di pre-immunizzazione (*cross protection*) mediante infezione con ceppi attenuati (*mild*) di PRSV (Gonsalves, 1998). Nessuna di queste strategie si è rivelata efficace nel controllo delle epidemie da PRSV.

Piante di papaya resistenti al virus (SunUp e Rainbow) furono ottenute mediante trasformazione genetica con il gene del capsido virale (CP: coat protein) di PRSV. Le piante furono poi ammesse alla coltivazione commerciale nelle Hawaii nel 1998, dopo studi e prove di campo e in condizioni controllate, durati 13 anni (1985-1998). I semi della papaya transgenica, distribuiti nel 1998 agli agricoltori di queste isole secondo un principio di estrazione a sorte, determinarono una pronta ripresa delle produzioni nei successivi quattro anni, arrecando beneficio anche alle colture tradizionali che si avvantaggiarono dell'abbattimento delle fonti di inoculo di PRSV determinato dalle piante transgeniche resistenti. Si assistette inoltre, all'arresto di fenomeni di deforestazione, causati, durante gli anni di elevata epidemia, dalla ricerca di nuove aree non contaminate dal virus. Il transgene adoperato in incroci classici, ha portato allo sviluppo di un'altra varietà, Laie Gold, che, insieme a SunUp e Rainbow, è attualmente coltivata in queste isole (Gonsalves et al., 2007).

Il successo di quest'approccio richiamò l'interesse di ricercatori della Thailandia, Taiwan, Vietnam, Filippine e Malesia, paesi nei quali furono sviluppate piante transgeniche utilizzando sequenze della CP di isolati locali e sono state condotte o sono in corso prove di campo (Bau H.J. et al., 2004). Le sperimentazioni in atto in Thailandia, documentate in un recente lavoro da Sarah Nell-Davidson (2008) sono state interrotte per l'avversione dell'opinione pubblica alla tecnologia.

Sebbene la resistenza a PRSV della papaya transgenica Rainbow non sia risultata efficace verso isolati virali provenienti da Thailandia, Australia e Brasile (Tennant et al., 1994), a tutt'oggi non sono stati descritti casi di superamento del fenotipo resistente nelle isole Hawaii. In queste isole le colture transgeniche coesistono con quelle convenzionali grazie allo sviluppo di filiere produttive

differenziali e tracciabili, che consentono la commercializzazione dei frutti in paesi che non permettono l'introduzione del prodotto transgenico.

Zucca resistente a Zucchini yellow mosaic, Watermelon mosaic virus e Cucumber mosaic virus

Zucche transgeniche (ZW-20) resistenti a *Zucchini yellow mosaic* (ZYMV) e *Watermelon mosaic virus* (WMV), sono state ammesse alla coltivazione commerciale nel 1995. Ad esse seguì la linea CZW-3 (Acord, 1996) che presenta, in aggiunta, resistenza anche a *Cucumber mosaic virus* (CMV). Per ambedue le varietà transgeniche il fenotipo resistente si manifesta attraverso l'espressione delle proteine del capsido virale del virus (Tricoli et al., 1995).

I due potyvirus ZYMV e WMV e il cucumovirus CMV, sono trasmessi in natura da diverse specie di afidi in maniera non circolativa e non persistente. Il controllo delle loro infezioni si fonda su pratiche colturali quali il trapianto differito rispetto ai tempi di volo degli afidi, l'uso di pacciamature repellenti e ripetute applicazioni di miscele di oli minerali e insetticidi. Si calcola che nello stato americano della Georgia il controllo delle popolazioni di afidi su zucca richieda almeno dieci applicazioni di insetticida (Gianessi et al., 2002). Una strategia efficace per il contenimento di queste malattie risiederebbe unicamente nell'uso di piante resistenti, ottenute mediante tecniche tradizionali di miglioramento genetico, ma che non hanno fornito adeguati livelli di protezione.

Dati recenti (Shankula, 2006, Johnson et al., 2008) dimostrano che l'adozione di queste varietà transgeniche ha permesso agli agricoltori degli Stati Uniti, di ottenere un beneficio netto di 22 milioni di dollari nel 2005, determinando maggiori rese di prodotto commercializzabile e un minor numero di interventi con insetticidi (M. Fuchs, comunicazione personale). A riprova dei vantaggi ottenuti, si calcola che nel 2006, la percentuale di adozione di zucca transgenica ammonta al 12% della superficie coltivata negli Stati Uniti seguendo una tendenza che si è mantenuta stabile nell'arco di 5 anni (Johnson et al., 2008).

Studi comparativi hanno inoltre dimostrato che, analogamente a quanto si verifica per la papaya resistente a PRSV, l'impiego della linea ZW-20 limita la diffusione secondaria di ZYMV e WMV in pieno campo, poiché le piante infette, inibendo la replicazione e la diffusione sistemica dei due virus, determinano bassi titoli virali peraltro limitati ai tessuti inoculati. Minori titoli virali nei tessuti delle piante transgeniche infette riducono la frequenza

di acquisizione del virus da parte degli afidi e la sua successiva trasmissione in campo, determinando una sostanziale limitazione delle epidemie sia nelle colture transgeniche che in quelle convenzionali.

COLTURE DEREGOLAMENTATE¹ MA NON ANCORA AMMESSE
 ALLA COMMERCIALIZZAZIONE NEGLI STATI UNITI D'AMERICA

Susino resistente a Plum Pox Virus

Plum pox virus (PPV) è l'agente eziologico della Sharka o vaiolatura del susino, una delle più devastanti malattie della specie *Prunus* (Cambra et al., 2006), che provoca maggiori danni su albicocco, susino e pesco. Questo potyvirus è trasmesso da afidi in maniera non circolativa e non persistente e per propagazione vegetativa. Sono stati descritti fino a sei gruppi di isolati virali aventi caratteristiche biologiche distintive (Candresse e Cambra, 2006).

A ragione dell'importanza di PPV per l'industria delle drupacee, numerosi studi sono stati condotti e sono tuttora in corso, miranti all'ottenimento di cultivar di *Prunus* resistenti al virus secondo tecniche di miglioramento genetico classico (Badenes et al., 2006).

In Europa è stata sviluppata la prima varietà resistente a PPV mediante trasformazione genetica di *Prunus domestica* con il gene della CP di un isolato di tipo D del virus (Scorza et al., 1994). Gli studi di campo, condotti per un periodo di 7 anni in Spagna, Polonia e Romania, hanno provato che la linea di susino C5 esprime un fenotipo resistente che è basato sul silenziamento genico e sulla produzione di piccoli RNA interferenti (Scorza et al., 2001). La pianta pertanto non sintetizza alcuna proteina transgenica e trascrive bassissimi livelli del corrispondente RNA messaggero.

Gli studi di valutazione del rischio, condotti in campo in diverse regioni europee nell'ambito del Progetto Europeo TRANSVIR (Fuchs et al., 2007), hanno dimostrato che la diversità molecolare di popolazioni di PPV non cambia in piante transgeniche resistenti al virus. Inoltre, il susino transgenico

¹ Secondo la legislazione americana una varietà geneticamente modificata, dopo essere stata coltivata in condizioni controllate per diversi anni, può assumere lo status di "varietà deregolamentata". Questa condizione viene rilasciato dall'USDA (United States Department of Agriculture) dopo l'analisi dei dati ottenuti durante le prove di campo e le osservazioni che possono emergere da un pubblico dibattito. Questa condizione rappresenta il primo passo verso l'eventuale utilizzo commerciale che richiede inoltre l'approvazione da parte dell' FDA (Food and Drug Administration) e dell'EPA (Environmental Protection Agency).

non ha alcun impatto sulla dinamica delle popolazioni di afidi che visitano le piante. La linea C5 “HoneySweet” è stata recentemente deregolamentata negli Stati Uniti (<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=529>.) per essere in futuro resa disponibile ad agricoltori e miglioratori genetici.

I RISCHI PER L'AMBIENTE E LA SALUTE UMANA: PERCEZIONE E REALTÀ

Diversi studi, alcuni promossi dalla Unione Europea (TRANSVIR; Fuchs et al., 2007), sono stati condotti in condizioni di campo, per la valutazione del rischio di impiego di piante transgeniche resistenti a virus. In nessuna di queste esperienze, svoltesi nell'arco di due decenni, sono stati descritti eventi dannosi per l'ambiente e/o l'uomo. Si è invece evidenziata la notevole differenza che esiste tra ciò che è percepito come rischio e l'entità reale di tale rischio (Fuchs e Gonsalves, 2007). Pertanto, piuttosto che concentrare le attenzioni sui possibili rischi che le piante transgeniche resistenti a virus possono determinare sull'ambiente e l'uomo, è più importante valutarne le reali conseguenze in esperienze di campo.

Potenziati rischi di impiego di piante transgeniche per la resistenza a virus e loro reali conseguenze

Eteroincapsidazione

La possibilità che un acido nucleico virale si rivesta di una proteina capsidica eterologa (di un altro virus), detta eteroincapsidazione, è un evento noto che si verifica naturalmente in piante con infezioni multiple. In piante transgeniche, la presenza intracellulare e costitutiva di subunità di CP potrebbe dar luogo a particelle virali ibride, con nuove caratteristiche di trasmissibilità da parte di insetti vettori. Potrebbe pertanto accadere che un virus naturalmente non trasmesso da un determinato vettore lo diventerebbe, se il suo acido nucleico si dovesse rivestire di una CP transgenica. Il virus transcapsidante potrebbe così esplorare nuove specie e areali o dar luogo a nuove epidemie. In condizioni di laboratorio l'evento di eteroincapsidazione è stato frequentemente descritto in piante transgeniche infettate (Lecoq et al., 1993; Fuchs e Gonsalves, 2007).

Gli studi di pieno campo hanno dimostrato che un isolato di ZYMV non trasmissibile da afidi, viene trasferito con scarsa efficienza (2%), se introdotto

in colture di piante transgeniche esprimenti la CP di un ceppo trasmissibile di WMV. Al contrario, la diffusione di un isolato trasmissibile dello stesso virus, nelle stesse condizioni e sulle stesse piante transgeniche, risulta in un'efficienza di trasmissione del 99% (Fuchs et al., 1999).

Ulteriori studi condotti su piante di zucca e melone esprimenti la CP di CMV (Fuchs et al., 1998), patate e papaya esprimenti rispettivamente le CP di PLRV (Thomas et al., 1998) e PRSV (Fuchs e Gonsalves, 2007), non hanno mostrato nessuna variazione del livello base di eventi contro cui l'impatto delle piante transgeniche è comparato, suggerendo pertanto che la eteroincapsidazione, laddove avvenga, non induce alterazioni delle proprietà sierologiche, biologiche ed epidemiologiche del virus infettante (Fuchs et al., 1999).

L'evento di eteroincapsidazione si riassume comunque in un singola generazione virale, poiché il virus transcapsidante (i.e. incapsidatosi con la CP codificata dal transgene), se trasferito in un nuovo ospite in cui è in grado di replicarsi, riprende le sue caratteristiche originarie, che gli derivano dall'RNA virale rimasto inalterato nella sequenza. La possibilità che eventi successivi determinino il trasferimento del virus transcapsidante di pianta in pianta è risultata esistere solo a livello teorico e non avvenire nella realtà.

Ricombinazione e alterazioni della dinamica delle popolazioni virali

L'espressione costitutiva di un gene virale non avviene in piante non transgeniche. Esiste pertanto il rischio, documentato in diversi studi, condotti in condizioni controllate (Greene e Allison, 1994; Jakab et al., 1997; Fuchs e Gonsalves, 2007), di creazione di molecole chimeriche tra il trascritto transgenico e il genoma di un virus che infetta successivamente la pianta. Il risultante virus ricombinante potrebbe possedere caratteristiche di maggiore aggressività e diffusività nell'ambiente, comportandosi pertanto come un "supervirus", non altrimenti generantesi in natura (Tepfer, 2002).

Una tale visione rispecchia un errato concetto di fissità delle specie virali che, al contrario, fondano sulla ricombinazione gran parte dei loro meccanismi evolutivi (Garcia Arenal et al., 2001). La ricombinazione non è pertanto un fatto nuovo e sconosciuto in natura poiché nelle condizioni di infezione virale mista, comuni nelle piante, RNA eterologhi possono venire frequentemente in contatto. Essa avviene per i virus a RNA, tra una molecola donatrice e una accettrice secondo un meccanismo di "template switching" operato dalla RNA polimerasi RNA dipendente virale che, nel corso del sua attività polimerasica, slitta da una molecola,

l'RNA genomico virale, a un'altra, l'RNA del transgene, incorporando quest'ultimo nella nascente molecola chimerica. L'evento può avvenire tra molecole che hanno o no omologia di sequenza tra loro. In quest'ultimo caso si tratterebbe di una ricombinazione interspecifica che coinvolgerebbe un virus e un transgene non correlato. Studi recenti (Chung et al., 2007) e molteplici esperienze di manipolazione in laboratorio di virus ibridi, contenenti sequenze di altre specie virali, dimostrano chiaramente che questi virus ricombinanti sono selettivamente svantaggiati, oggetto di degradazione da parte del sistema di silenziamento genico cellulare e non competitivi nella replicazione rispetto ai virus parentali.

Altre ricerche hanno mostrato che la ricombinazione tra RNA virali e trascritti transgenici è frequente nelle condizioni di elevata pressione di selezione quali sono quelle che si verificano in serra (Greene e Allison, 1994; Borja et al., 1999). Al contrario in colture di pieno campo, laddove la pressione selettiva è minore, tali eventi non sono stati osservati. In prove di campo di susino transgenico per la CP di PPV (Capote et al., 2008), coltivate per un decennio, e portinnesti di viti transgeniche esprimenti la CP di GFLV (Vigne et al., 2004), non si sono generati virus ricombinanti e neppure si sono avute evidenze di alterazioni della dinamica delle popolazioni virali nei suoi aspetti di diversità molecolare e caratteristiche eco-epidemiologiche. Al contrario, negli studi sulla resistenza a GFLV, si è osservato che la frequenza di ricombinazione e la diversità genetica delle popolazioni di GFLV, sono risultati maggiori nelle piante non transgeniche adoperate come controllo, rispetto a quanto osservato nei portinnesti transgenici (Moury et al., 2006). Gli autori di questo recente studio ipotizzano che le viti transgeniche resistenti a GFLV, impedendo la replicazione di varianti virali potenzialmente più aggressive, determinano una diminuzione della diversità della popolazione virale. Un fatto questo che denota una situazione di campo esattamente opposta al rischio teorico paventato, che attribuirebbe alle piante transgeniche un aumento degli eventi di ricombinazione e della diversità molecolare rispetto al livello di base osservato in eventi naturali. La ricombinazione tra RNA transgenico e virale non ha pertanto determinato effetti ambientali dannosi in prove di pieno campo condotte per virus (CMV, PPV, PRSV, ZYMV e WMV) e specie diverse (papaya, zucca, vite e susino), alcune di esse osservate per periodi maggiori di un decennio.

Gene flow

Il potenziale impatto che un transgene potrebbe avere sulla dinamica e competitività di popolazioni naturali di piante nelle quali traslochi accidentalmente,

riveste una notevole importanza ecologica. L'evento potrebbe verificarsi tra un transgene virale che venga a essere trasferito da una specie coltivata a una selvatica tassonomicamente correlata e interfertile, conferendo a quest'ultima il fenotipo di resistenza. È importante però sottolineare che, solo in caso di introgressione, che consiste nell'integrazione permanente di un gene in una specie selvatica, si determinerebbe l'insediamento di un transgene nell'ambiente, con un potenziale impatto ecologico dannoso (Stewart et al., 2003).

In esperienze di campo, è stata documentata la dispersione del transgene da zucca (*Cucurbita pepo* ssp. *ovifera* var. *ovifera*) resistente a CMV, ZYMV e WMV (piante CZW-3), alla specie selvatica imparentata *Cucurbita pepo* ssp. *ovifera* var. *texana* (Fuchs et al., 2004a; Fuchs et al., 2004b). Le prove condotte hanno dimostrato che: (i) la frequenza degli eventi di ibridazione aumenta con l'aumentare del rapporto tra piante donatrici del polline e accettrici del transgene e in funzione della sincronia dei tempi di fioritura; (ii) è sufficiente un sola generazione di ibridazione e reincrocio per ottenere ibridi che abbiano ereditato il transgene e mostrino resistenza ai tre virus; (iii) ibridi di *C. texana* che hanno acquisito la resistenza ai tre virus presentano un chiaro vantaggio in situazioni di elevata pressione di inoculo virale. Questi studi pertanto documentano il movimento di un transgene che conferisce resistenza a virus, dalla varietà di zucca commerciale CZW-3 a quella selvatica *C. texana* in condizioni naturali. Si è osservato però che la fitness degli ibridi generatisi è determinata dalla pressione virale cui essi sono sottoposti: se questa è bassa la invasività (*weediness*) di tali ibridi risulta non diversa da quella della specie selvatica. Studi recenti (Quemada et al., 2008) hanno mostrato che la frequenza di alcune infezioni virali (CMV, ZYMV, WMV2, PRSV e altri potyvirus) in popolazioni di zucche selvatiche che crescono in prossimità di colture di zucche transgeniche, è relativamente bassa, indicando perciò che la vicinanza delle colture transgeniche non induce cambiamenti significativi nella dinamica e struttura delle popolazioni selvatiche. La specie selvatica è peraltro soggetta a infezioni da altri virus che contribuiscono a controllarne la popolazione. Gli autori dello studio concludono che, poiché le zucche transgeniche risultano fornire maggior resa e qualità di prodotto per via del fenotipo resistente, e non hanno determinato insorgenza di eventi ecologicamente infausti, la loro coltura continua ad essere ammessa negli Stati Uniti.

C'è infine da ricordare che geni di resistenza ai virus sono stati introdotti in zucca anche attraverso tecniche di miglioramento genetico convenzionale (Munger, 1993). Poiché il rischio di dispersione nell'ambiente (*escape*) di transgeni o geni di piante risulta essere identico, nel caso di tratti monogenici,

analoghe preoccupazioni di *gene flow* potrebbero essere sollevate per queste varietà ottenute con tecniche classiche.

La letteratura documenta un altro esempio di movimento di transgene da barbabietola da zucchero esprimente la CP del virus della rizomania, *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) alla specie selvatica *Beta vulgaris* var. *maritima*, dimostrando, anche in questo caso, una assenza di incremento di invasività in ambienti naturali, in seguito a ibridazione e introgressione del transgene (Bartsch et al., 1996).

Effetti su organismi non bersaglio

Questo rischio potenziale attiene alla eventualità che l'introduzione in un areale agricolo di una coltura transgenica possa alterare la diversità e dinamica di organismi non bersaglio, quali possono essere insetti vettori di virus, oppure microorganismi del suolo, batteri e funghi. Lavori svolti nel Progetto TRANSVIR (Fuchs et al., 2007; Capote et al., 2008), evidenziano che non si sono rilevate differenze nelle popolazioni di afidi, siano essi viruliferi e non, che hanno visitato piante di susino convenzionali e transgeniche per la resistenza a PPV. Gli studi, condotti in condizioni di campo per un periodo di 8 anni, non hanno mostrato alcun effetto deleterio. Simili ricerche riferite ad attinomiceti raccolti nella rizosfera di piante di papaya transgeniche per la resistenza a PRSV, hanno sortito analoghi risultati (Hsieh e Pan, 2006).

Tossicità alimentare e allergenicità

Al momento tre colture transgeniche resistenti a virus sono ammesse alla produzione commerciale negli Stati Uniti, papaya, zucca e patata, quest'ultima ritirata dal mercato per motivi diversi dall'impatto sull'ambiente e la salute umana, e derivanti da pressioni esercitate dalla opinione pubblica contraria (Kaniewski e Thomas, 2004).

L'analisi delle proteine transgeniche espresse da queste piante, in tutti i casi descritti CP, mostra che nessuna di esse possiede sufficiente omologia con sequenze di allergeni noti. Inoltre, studi di digestione in succo gastrico simulato, condizioni in cui le proteine allergeniche sono resistenti, mostrano che la CP di PRSV viene degradata in seguito a una esposizione di 5 secondi.

Simili considerazioni possono essere condotte per le altre proteine transgeniche oggetto di questa rassegna, con l'osservazione addizionale che gran-

di quantità di proteine virali sono state ripetutamente e continuamente ingerite dall'uomo con il cibo nel corso del tempo, senza che ciò abbia mai indotto allergie o fenomeni di tossicità alimentare. È certamente prudente valutare gli aspetti di sanità del cibo derivato da piante transgeniche resistenti a virus ma, allo stato delle conoscenze, il rischio che queste possano risultare dannose è molto limitato poiché, almeno per le varietà ammesse alla coltivazione commerciale, queste si sono dimostrate sostanzialmente equivalenti alla corrispondente coltura convenzionale, eccezion fatta per il fenotipo di resistenza.

ALTRE PROBLEMATICHE CONNESSE ALL'IMPIEGO DI PIANTE TRANSGENICHE

Coesistenza di colture transgeniche e convenzionali

Tale rischio rientra nella problematica della dispersione genica o *gene flow* da colture transgeniche a tradizionali, coltivate in prossimità spazio-temporale. Esso viene sollevato soprattutto in relazione alla vicinanza di colture biologiche e agli scambi con paesi che non accettano sui loro mercati la commercializzazione di prodotti transgenici.

Nell'esempio della papaya prodotta nelle isole Hawaii, una sua ragguardevole quota di mercato è rappresentata dalle esportazioni in Giappone, paese che non consente il commercio di prodotti transgenici. L'introduzione di piante transgeniche per la resistenza a PRSV ha chiaramente rischiato di limitarne l'esportazione. Per ovviare a questo limite, si è creata una filiera di produzione (Camp, 2003), sotto il controllo dell'Hawaiian Department of Agriculture (HDOA), che garantisce la fornitura di prodotto non transgenico. Gli agricoltori che aderiscono a questa filiera sottopongono a controlli tutte le loro piante e campioni della loro produzione, per la presenza del gene reporter della beta-glucoronidasi (*gus*), associato al transgene per la resistenza a PRSV. Dopo questi controlli di laboratorio, l'HDOA rilascia una certificazione che consente un immediato sdoganamento in Giappone dei frutti di papaya.

Il rischio di contaminazione del prodotto ottenuto da agricoltura biologica è stato valutato in studi di coesistenza tra papaya transgenica e convenzionale (Manshardt R., 2002). Una prima considerazione, riferita alla natura della parte edibile del frutto della papaya (ma che si estende anche al susino transgenico per la CP di PPV, per esempio), riguarda il fatto che esso ha la stessa costituzione genetica della pianta che lo produce. Ciò significa che la

parte edibile di una papaya non transgenica non viene a essere alterata nella composizione in seguito a impollinazione incrociata, qualunque possa essere la fonte di polline. L'impollinazione incrociata è peraltro limitata per le seguenti ragioni: (i) le varietà di papaya coltivate nelle isole Hawaii sono prevalentemente ermafrodite e autofertili; (ii) studi di movimento del transgene hanno dimostrato che esso avviene in percentuali maggiori in piante con fiori femminili che contornano le piante transgeniche; (iii) una distanza di 400 metri assicura che il polline transgenico non sia in grado di contaminare colture di varietà tradizionali.

La coesistenza di colture transgeniche e convenzionali è pertanto compatibile, a patto che alcuni pregiudizi vengano superati con il consenso delle parti coinvolte. Laddove trattasi di virus ad andamento epidemico, le colture biologiche, e le tradizionali in genere, trarrebbero vantaggio dalla introduzione di piante resistenti. Infatti, tra le motivazioni a supporto della richiesta di deregolamentazione del susino transgenico resistente al virus della Sharka (PPV) negli Stati Uniti (<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=529>), si fa notare che esso abbatterebbe le fonti di inoculo virale con beneficio di tutte le colture, siano esse transgeniche e non. Le esperienze maturate dimostrano infatti l'impossibilità, nel tempo, di controllare la diffusione del virus con tecniche tradizionali di eradicazione e utilizzo di materiale sano che, in altri areali frutticoli, Italia compresa, è divenuto endemico.

Integrazione e stabilità del transgene

Un recente lavoro, originato dallo studio della sequenza del genoma della papaya transgenica "Sun Up" (Ming et al., 2008), ha fatto luce sulle modalità di integrazione e la stabilità del transgene. Questo studio fornisce la prima evidenza, sostanziata a livello molecolare, di integrazione di un transgene senza che abbia subito fenomeni di riarrangiamento, e della sua fissazione stabile nel genoma. L'analisi mostra che il DNA inserito non interrompe nessuna sequenza genica endogena, così che le piante transgeniche risultano funzionalmente simili a quelle non trasformate, eccezion fatta per il transgene che apporta la resistenza a PRSV. Il lavoro fornisce nuove informazioni sulle modalità di integrazione dei transgeni nel genoma di piante, e spinge verso lo sviluppo di tecnologie di trasformazione sempre meno lasciate alla casualità delle tecnologie attuali. Inoltre, l'identificazione di sequenze troncate corrispondenti a regioni provenienti dal plasmide adoperato per la trasformazione (geni *tetA* e *nptII*), integrate indipendentemente dal transgene, suggerisce

che, sebbene questi eventi di trasferimento di sequenze aberranti siano possibili e già descritti, esistono, sin d'ora, tutti gli strumenti per poterne evidenziare la presenza.

L'IMPATTO AMBIENTALE DI PIANTE TRANSGENICHE RESISTENTI A VIRUS: OSSERVAZIONI NELL'ARCO DI DUE DECENNI

Le esperienze descritte dimostrano che il controllo di alcune malattie virali attraverso la PDR e utilizzando la CP virale come transgene, si è rivelato efficace in prove di campo, consentendo agli agricoltori di ricavarne benefici in termini di qualità e quantità di prodotto. Recenti studi sull'impatto che le piante transgeniche hanno avuto sulla agricoltura degli Stati Uniti (Shankula, 2006; Johnson et al., 2008), riportano un incremento di adozione di papaya e zucca resistente a virus, nel 2006, con percentuali rispettivamente del 90% e 13%. Nel caso della papaya le alte percentuali di utilizzo sono spiegate dalla impossibilità di proseguire nella coltura in assenza di piante resistenti.

Gli studi di impatto ambientale, condotti prevalentemente negli Stati Uniti e in Europa, hanno mostrato che esso è ininfluenza nel caso di piante transgeniche per geni della CP virale, se riferito agli aspetti di eteroincapsidazione e ricombinazione (Fuchs e Gonsalves, 2007; Turturo et al., 2008). Limitatamente a questi due generi di rischio, ritenuti privi di conseguenze dannose, alcuni autori suggeriscono di estendere questa valutazione a tutte le piante transgeniche per il gene della CP di un virus (Fuchs e Gonsalves, 2007). Anche ininfluenza risulta essere il rischio di allergenicità e tossicità indotto da queste piante. Rischio che peraltro può essere valutato a priori grazie alle aumentate conoscenze in campo bioinformatico e molecolare riguardanti la struttura degli allergeni.

Al contrario nel considerare gli eventi di *gene flow* e le sue possibili conseguenze, deve essere seguita un approccio più cauto, cosiddetto "caso per caso", così come dimostrato nelle sperimentazioni condotte su zucca transgenica.

Tutti questi studi durati ormai quasi 20 anni, provano che, a prescindere dai rischi teorici paventati, le esperienze di campo possono fornire dati realistici sulle conseguenze di utilizzo di queste biotecnologie in agricoltura. Numerosi dati, ottenuti in condizioni di laboratorio, si concentrano sulle interazioni tra pianta ospite e virus, avulsa dall'ambiente in cui la coltura è abitualmente condotta, e traggono conclusioni che vengono arbitrariamente traslate alla realtà di campo. Questa è diversa e soggetta a un maggior numero

di variabili, come dimostrano gli esperimenti disegnati in modo da simulare condizioni di colture commerciali. È infatti sulle conseguenze, piuttosto che sull'eventualità di potenziali rischi che bisogna concentrare gli studi, da condursi in condizioni quanto più possibili realistiche. Un'attività quest'ultima, sempre più difficile da realizzarsi in Europa e nel nostro paese, a causa di avverse condizioni socio-politiche.

Inoltre, per i virus, l'approccio transgenico basato sull'RNA silencing costituisce una rilevante opportunità che sarebbe poco saggio ignorare per una difesa di lungo termine delle colture. Alla luce delle aumentate conoscenze molecolari sull'interazione pianta-virus, un approccio che combini resistenza naturale e transgenica risulterebbe efficace, specifico e duraturo. L'auspicio è che queste informazioni possano essere di supporto al legislatore nell'implementazione di protocolli di regolamentazione, e a governi e opinione pubblica, nel sostenere le ricerche nel settore.

RIASSUNTO

Il rilascio nell'ambiente di piante transgeniche per la resistenza ai virus ha posto una serie di interrogativi sui potenziali rischi ecologici e per la salute umana. Fenomeni come la ricombinazione, le alterazioni della dinamica delle popolazioni virali e degli insetti, l'eteroincapsidazione, il flusso genico, l'impatto su organismi non bersaglio e la tossicità alimentare, sono analizzati e discussi nella presente review. L'argomento è trattato in riferimento alle colture ammesse alla commercializzazione o estensivamente saggiate in campo, quali zucca, papaya, susino e vite, per le quali esistono dati risalenti a più di una decade. Queste osservazioni, effettuate in condizioni reali di campo, offrono nuovi spunti per la valutazione dell'impatto ambientale di piante transgeniche per la resistenza a virus, e possono essere di aiuto al legislatore e di informazione per il pubblico.

ABSTRACT

The environmental release of transgenic plants for virus resistance raised several potential concerns about risks related to the environment and human health. The present review encompasses recombination, modification of the dynamic of viral and insects populations, heteroencapsidation, gene flow, impact on non target organisms and food safety. Data originated from field-released crops, extensively tested and/or commercialized for more than ten years: squash; papaya, plum and grapevine. These observations, obtained in realistic field conditions, could be useful for regulatory authorities in evaluating the environmental impact, and for the public to scientifically approach transgenic virus resistant plants.

BIBLIOGRAFIA

- ACORD B.D. (1996): *Availability of determination of nonregulated status for a squash line genetically engineered for virus resistance*, «Federal Register», 61, 33484-85.
- BADENES M.L., MOUSTAFA T.A., MARTINEZ-CALVO J., LLACER G. (2006): *Resistance to sharka trait in a family from selfpollination of 'Lito' apricot cultivar*, «Acta Horticulturae», 701, pp. 381-384.
- BARTSCH D., SCHMIDT M., POHL-ORF M., HAAG C., SCHUPHAN I. (1996): *Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations*, «Molecular Ecology», 5, pp. 199-205.
- BAU H.J., CHENG Y.H., YU T.A., YANG J.S., LIU P.C., HSIAO C.H., LIN C.Y. e YEH S.H. (2004): *Field Evaluation of Transgenic Papaya Lines Carrying the Coat Protein Gene of Papaya ringspot virus in Taiwan*, «Plant Disease», 88, pp. 594-599.
- BAULCOMBE D. (2004): *RNA silencing in plants*, «Nature», 431, pp. 356-363.
- BEACHY R.N. (1999): *Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation*, «Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.», 354, pp. 659-664.
- BORJA M., RUBIO T., SCHOLTHOF H.B., JACKSON A.O. (1999): *Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene*, «Molecular Plant-Microbe Interaction», 12, pp. 153-162.
- CAMBRA M., CAPOTE N., MYRTA A., LLACER G. (2006): *Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease*, «Bull OEPP/EPPPO», 36, pp. 202-204.
- CAMP SG III. (2003): *Identity preservation protocol for non-GMO papayas*, in *Virus Resistant Transgenic Papaya in Hawaii: A Case for Technology Transfer to Lesser Developed Countries*, Proceedings of an OECD/USAID/ARS Conference, Oct. 22-24, Hilo, HI, pp. 95-100.
- CANDRESSE T. e CAMBRA M. (2006): *Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of Plum pox virus strains*, «Bulletin OEPP/EPPPO», 36, pp. 239-246.
- CAPOTE N., PEREZ-PANADES J., MONZO C., CARBONELL E., URBANEJA A., SCORZA R., RAVELONANDRO M., CAMBRA M. (2008): *Assessment of the diversity and dynamics of Plum pox virus and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions*, «Transgenic Research», 17, pp. 367-377.
- CHUNG B.N., CANTO T., PALUKAITIS P. (2007): *Stability of recombinant plant viruses containing genes of unrelated plant viruses*, «Journal General Virology», 88, pp. 1347-1355.
- DUXBURY J.M. (2003): *Food systems approaches to nutrition and health: the role of transgenic papaya*, in *Virus Resistant Transgenic Papaya in Hawaii: A Case Study for Technology Transfer to Lesser Developed Countries*, Proceedings of an OECD/USAID/ARS Conference, October 22-24, 2003, Hilo, Hawaii. Organisation for Economic Cooperation and Development/U.S. Agency for International Development/Agricultural Research Service, Washington, DC, pp. 133-138.
- FUCHS M., CAMBRA M., CAPOTE N., JELKMANN W., KUNDU J., LAVAL V., MARTELLI G.P., MINAFRA A., PETROVIC N., PFEIFFER P., POMPE-NOVAK M., RAVELONANDRO M., SILDARELLI P., STUSSI-GARAUD C., VIGNE E. and ZAGRAI I. (2007): *Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance*, «Journal of Plant Pathology», 89, pp. 5-12.
- FUCHS M., CHIRCO E.M., GONSALVES D. (2004a): *Movement of coat protein genes from*

- a virus resistant transgenic squash into a free-living relative*, «Environmental Biosafety Research», 3, pp. 5-16.
- FUCHS M., CHIRCO E.M., McFERNON J., GONSALVES D. (2004b): *Comparative fitness of a freelifving squash species and free-living x virus-resistant transgenic squash hybrids*, «Environmental Biosafety Research», 3, pp. 17-28.
- FUCHS M., GAL-ON A., RACCAH B. e GONSALVES D. (1999): *Epidemiology of an aphid nontransmissible potyvirus in fields of nontransgenic and coat protein transgenic squash*, «Transgenic Research», 8, pp. 429-439.
- FUCHS M., KLAS F.E., McFERNON J.R., GONSALVES D. (1998): *Transgenic melon and squash expressing coat protein genes of aphid-borne viruses do not assist the spread of an aphid non-transmissible strain of cucumber mosaic virus in the field*, «Transgenic Research», 7, pp. 1-14.
- FUCHS M., e GONSALVES D. (2007): *Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies*, «Annual Review Phytopathology», 45, pp. 173-202.
- GARCIA-ARENAL F., FRAILE A., MALPICA J.M. (2001): *Variability and genetic structure of plant virus populations*, «Annual Review Phytopathology», 39, pp. 157-186.
- GIANESSI L.P., SILVERS C.S., SANKULA S., CARPENTER J.E. (2002): *Virus resistant squash*, in *Plant Biotechnology: Current and Potential Impact for Improving Pest Management in U.S. Agriculture. An Analysis of 40 Case Studies*, Washington, DC: Natl. Cent. Food Agric. Policy, 75 pp.
- GONSALVES C., LEE D.R. e GONSALVES D. (2007): *The adoption of genetically modified papaya in Hawaii and its implications for developing countries*, «Journal Developmental Studies», 43, pp. 177-191.
- GONSALVES D. (1998): *Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study*, «Annual Review Phytopathology», 36, pp. 415-437.
- GONSALVES D., VEGAS A., PRASARTSEE V., DREW R., SUZUKI J, ET AL. (2006): *Developing papaya to control papaya ringspot virus by transgenic resistance, intergeneric hybridization, and tolerance breeding*, «Plant Breeding Review», 26, pp. 35-78.
- GREENE A.E., ALLISON R.F. (1994): *Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts*, «Science», 263, pp. 1423-1425.
- HSIEH Y.T. e PAN T.M. (2006): *Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity*, «Journal of Agricultural Food Chemistry», 54, pp. 130-137.
- JAKAB G., VAISTIJ F.E., DROZ E., MANOE P. (1997): *Transgenic plants expressing viral sequences create a favourable environment for recombination between viral sequences*, in *Virus-Resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*, ed. M Tepfer, E Balazs, Heidelberg: INRA Ed.-Springer, pp. 45-51.
- JENSEN D.D. (1949): *Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot*, «Phytopathology», 39, pp. 191-211.
- JOHNSON S.R., STROM S., GRILLO K. (2008): *Quantification of the Impacts on US Agriculture of Biotechnology-Derived Crops Planted in 2006*, <http://www.ncfap.org>.
- KANIEWSKI W.K. e THOMAS P.E. (2004): *The potato story*, «AgBioForum», 7, pp. 41-46.
- LECOQ H., RAVELONANDRO M., WIPF-SCHEIBEL C., MANSION M., RACCAH B., DUNEZ J. (1993): *Aphid transmission of a non-aphid transmissible strain of zucchini yellow mosaic virus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus*, «Molecular Plant- Microbe Interaction», 6, pp. 403-406.
- LINDBO J.A. and DOUGHERTY W.G. (2005): *Plant pathology and RNAi: a brief history*, «Annual Review of Phytopathology», 43, pp. 191-204.

- MANSHARDT R. (2002): *Is Organic Papaya Production in Hawaii Threatened by Cross-Pollination with Genetically Engineered Varieties?*, www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/BIO-1.pdf.
- MAULE A.J., CARANTA C. and BOULTON M.I. (2007): *Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects*, «Molecular Plant Pathology», 8, pp. 223-231.
- MING R., HOU S., FENG Y., YU Q., DIONNE-LAPORTE A., SAW J.H., SENIN P., WANG W., LY B.V., LEWIS K.L.T., SALZBERG S.L., FENG L., JONES M.R., SKELTON R. L., MURRAY J.E., CHEN C., QIAN W., SHEN J., DU P., EUSTICE M., TONG E., TANG H., LYONS E., PAULL R.E., MICHAEL T.P., WALL K., RICE D.W., ALBERT H., WANG M.L., ZHU Y.J., SCHATZ M., NAGARAJAN N., ACOB R.A., GUAN P., BLAS A., WAI C.M., ACKERMAN C.M., REN Y., LIU C., WANG J., WANG J., NA J.K., SHAKIROV E.V., HAAS B., THIMMAPURAM J., NELSON D., WANG X., BOWERS J.E., GSCHWEND A.R., DELCHER A.L., SINGH R., SUZUKI J.Y., TRIPATHI S., NEUPANE K., WEI H., IRIKURA B., PAIDI M., JIANG N., ZHANG W., PRESTING G., WINDSOR W., NAVAJAS-PEREZ R., TORRES M.J., FELTUS F.A., PORTER B., LI Y., BURROUGHS A.M., LUO M., LIU L., CHRISTOPHER D.A., MOUNT S.M., MOORE P.H., SUGIMURA T., JIANG J., SCHULER M.A., FRIEDMAN V., MITCHELL-OLD T., SHIPPEN D.E., DEPAMPHILIS C.W., PALMER J.D., FREELING M., PATERSON A.H., GONSALVES D., WANG L., e ALAM M. (2008): *The draft genome of the transgenic tropical fruit treepapaya (Carica papaya Linnaeus)*, «Nature», 452, pp. 991-997.
- MOURY B., DESBIEZ C., JACQUEMOND M. e LECOQ, H. (2006): *Genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molecular epidemiology*, «Advances in Virus Research», 67, pp. 49-87.
- MUNGER H.M. (1993): *Breeding for viral resistance in cucurbits*, in *Resistance to viral diseases of vegetables: Genetics and breeding*, Timber Press, Portland, OR, pp. 8-43.
- NELL-DAVIDSON, SN. (2008): *Forbidden Fruit: Transgenic Papaya in Thailand*, «Plant Physiology», 147, pp. 487-493.
- PALUKAITIS P. and CARR J.P. (2008): *Plant resistance responses to viruses*, «Journal of Plant Pathology», 90, pp. 153-171.
- QUEMADA H., STREHLOW L., WALTERS D., STAUB J. (2008): *Population Structure and Incidence of Virus Infection in Free-Living Populations of Cucurbita Pepo*, Environmental Biosafety Research (submitted), <http://www.ars.usda.gov>.
- SANFORD J.C. AND JOHNSTON S.A. (1985): *The concept of pathogen-derived resistance*, «Journal of Theoretical Biology», 113, pp. 395-405.
- SCORZA R., CALLAHAN A., LEVY L., DAMSTEEGT V., WEBB K., RAVELONANDRO M. (2001): *Post-transcriptional gene silencing in Plum pox virus resistant transgenic European plum containing the Plum pox potyvirus coat protein gene*, «Transgenic Research», 10, pp. 201-209.
- SCORZA R., RAVELONANDRO M., CALLAHAN A.M., CORDTS J.M., FUCHS M., DUNEZ J., GONSALVES D. (1994): *Transgenic plums (Prunus domestica L.) express the Plum pox virus coat protein gene*, «Plant Cell Reports», 14, pp. 18-22.
- SHANKULA S. (2006): *Quantification of the impacts on US agriculture of biotechnology-derived crops planted in 2005*, <http://www.ncfap.org>.
- SRIWATANAPONGSE S., IAMSUPASIT N., ATTATHOM S., NAPASINTUWONG O. e TRAXLER G. (2007): *The Study of Agricultural Benefits in Thailand*, Biotechnology Alliance Association, Bangkok, Thailand.
- STEWART Jr C.N., HALFHILL M.D. e WARWICK S.I. (2003): *Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives*, «Nature Genetics», 4, pp. 806-817.
- TENNANT P.F., GONSALVES C., LING K.S., FITCH M., MANSHARDT R. ET AL. (1994):

- Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya*, «Phytopathology», 84, pp. 1359-66.
- TEPPER M. (2002): *Risk assessment of virus-resistant transgenic plants*, «Annual Review Phytopathology», 40, pp. 467-491.
- THOMAS P.E., HASSAN S., KANIEWSKI W.K., LAWSON E.C., ZALEWSKI J.C. (1998): *A search for evidence of virus/transgene interactions in potatoes transformed with the potato leafroll virus replicase and coat protein genes*, «Molecular Breeding», 4, pp. 407-417.
- TRICOLI D.M., CARNEY K.J., RUSSELL P.F., McMASTER J.R., GROFF D.W., ET AL. (1995): *Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to Cucumber mosaic virus, Watermelon mosaic virus 2, and Zucchini yellow mosaic virus*, «Bio/Technology», 13, pp. 1458-65.
- TURTURO C., FRISCINA A., GAUBERT S., JACQUEMOND M., THOMPSON J.R., TEPPER M. (2008): *Evaluation of potential risks associated with recombination in transgenic plants expressing viral sequences*, «Journal of General Virology», 89, pp. 327-335.
- VIGNE E., BERGDOLL M., GUYADER S., FUCHS M. (2004): *Population structure and genetic diversity within Grapevine fanleaf virus isolates from a naturally infected vineyard: evidence for mixed infection and recombination*, «Journal General Virology», 85, pp. 2435-2445.