Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 447-462

GIOVANNI P. MARTELLI *

Resistenza transgenica alle virosi **

Riassunto – L'impossibilità di lottare chimicamente contro le infezioni virali, ha stimolato da anni le ricerche per la produzione di piante resistenti tramite incrocio, tecnica di successo ma che trova barriere insormontabili nella mancanza di fonti di resistenza naturali e nella incompatibilità genetica, che impedisce il trasferimento dei geni di interesse tra taxa filogeneticamente distanti. L'avvento delle tecnologie basate sull'uso del DNA ricombinante (ingegneria genetica), permette oggi di superare gli ostacoli, consentendo il trasferimento mirato di singoli geni di qualsivoglia altra origine ad una pianta da rendere resistente. La resistenza così ottenuta è detta «transgenica» o «non convenzionale» (in contrapposizione alla resistenza «convenzionale» da miglioramento genetico tradizionale) ed è classificabile in due categorie: (a) resistenza derivata dal patogeno (PDR), definibile come quel tipo di resistenza conferita ad una pianta da geni isolati dal genoma di un patogeno, clonati e trasferiti alla pianta stessa, che li incorpora nel proprio genoma; (b) resistenza indotta da sequenze di DNA esogeno, non necessariamente di origine microbica. La resistenza transgenica ai virus è caratterizzata in larga misura dall'uso della PDR, i cui meccanismi d'azione sono ancora non del tutto noti. Se da una parte rimangono in piedi i modelli che si rifanno a quanto ipotizzato per la «protezione incrociata» (interferenza diretta con la decapsidazione o blocco di recettori cellulari che danno inizio alla decapsidazione con conseguente inibizione del processo infettivo e della invasione dell'ospite), altri chiamano in causa il silenziamento genico post trascrizionale, un meccanismo adattativo con cui le piante si difendono dalle infezioni virali, che consiste nella inattivazione dell'RNA del patogeno attraverso un processo di degradazione sequenza-specifico. Colture commerciali transgeniche di papaia, zucchino, patata e tabacco resistenti a virus diversi sono già in produzione negli USA ed in Cina. Il loro uso ha fatto paventare l'insorgenza di pericoli per l'agricoltura (patogenicità del sistema vettore usato per la trasformazione, insorgenza di nuovi virus o virosi, modificazione del comportmento epidemiologico dei virus, modificazione del fenotipo vegetale conseguente all'inserzione di DNA esogeno), l'ambiente (dispersione incontrollata dei transgeni e dei geni marcatori di selezione, erosione genetica) e la salute (tossicità dei prodotti dei transgeni, tos-

* Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi e Centro di Studio del CNR sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee, Bari.

** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

sicità dei geni marcatori di selezione, effetti negativi sulla terapia antibiotica). La PDR, però, non comporta i rischi biologici ipotizzati se non in misura irrilevante, opinione condivisa internazionalmente da singoli studiosi, Accademie scientifiche ed Associazioni professionali.

Summary – Stumbling blocks to breeding for resistance to virus diseases of plants are the unavailability in nature of useful resistance genes and genetic incompatibility barriers. Both these obstacles can now be overcome with technologies based on recombinant DNA (genetic engineering). This type of resistance is referred to as «transgenic» or «non conventional» (as opposed to «conventional» resistance obtained by traditional breeding) and can be classified as: (i) parasite-derived resistance (PDR), which is conferred by genes isolated from a pathogen's genome, cloned, and transferred to a plant, which incorporates them in its own genome; (ii) resistance induced by foreign genes not necessarily of microbial origin. Transgenic resistance to plant viruses is largely characterized by PDR, whose mechanisms of action are still to be fully elucidated. Although models referring to that hypothesized to explain «cross protection» (i.e., direct interference with decapsidation and/or block of cell receptors that initiate decapsidation) have not been dismissed, new different models are being envisaged. A most attractive one is «post-transcriptional gene silencing» (PTGS) an elaborate system with which plants defend themselves from virus infections. PTGS is an adaptive, mobile and specific mechanism that results in the inactivation of the pathogen's RNA through a sequence-specific degradation process. Transgenic commercial crops of papaya, potato, squash and tobacco are already grown in the USA and China. Their use has generated widespread concern in the public, especially in Europe, because potential risks have been foreseen for: (i) agriculture (i.e., pathogenicity of the vector system used for transformation, modification of the epidemiological beahaviour of viruses, development of new viruses or new more aggressive virus strains, modification of the host phenotype consequent to the insertion of exogenous genes); (ii) the environment (i.e., uncontrolled dispersal of transgenes and of selectable marker genes; genetic erosion); (iii) human and animal health (i.e., toxicity of transgene expression products and of selectable marker genes; detrimental effects on antibioitic therapy). However, experimental evidence indicates that, in the case of PDR, the feared biological risks are minimal, an opinion internationally shared by single scientists, Scientific Academies, and Professional Associations.

Introduzione

Tra i patogeni delle piante, i virus sono secondi soltanto ai funghi come agenti di danno economico alle colture (Waterworth e Hadidi, 1998). Ma mentre dalle malattie fungine ci si può difendere con una vasta gamma di anticrittogamici, la lotta chimica contro i virus non è praticabile, e le tra le misure preventive che si utilizzano quali l'eliminazione delle sorgenti di inoculo, lotta contro i vettori, produzione di materiale virus-esente, la preimmunizzazione con ceppi virali attenuati (protezione incrociata) e produzione di varietà resistenti (miglioramento genetico), solo quest'ultima può dare una protezione durevole.

Il miglioramento genetico per l'induzione di resistenza ai virus o ai loro vettori (Jones, 1998) è in atto fin dall'inizio del secolo scorso ed ha fornito risultati assai bril-

lanti pur se per un numero limitato di colture e di virus. I geni utilizzati per introdurre resistenza monogenica o poligenica in piante coltivate sono meno di 180 ed i casi di resistenza effettiva e di lunga durata (superiore ai 40 anni) sono una dozzina ed interessano non più di una diecina di virus (Fraser, 1990; Khetarpal *et al.*, 1998).

La produzione di varietà resistenti ai virus è una forma di lotta biologica che richiede la manipolazione genetica dell'ospite indipendentemente dal fatto che il risultato sia ottenuto col miglioramento genetico tradizionale (incrocio e reincrocio) o con moderne applicazioni biotecnologiche.

Barriere che limitano il miglioramento genetico tradizionale sono infatti rappresentate o dalla mancanza di fonti di resistenza naturali, ovvero dalla loro presenza in taxa filogeneticamente distanti, la cui incompatibilità genetica impedisce il trasferimento dei geni di interesse da una specie all'altra. Tuttavia, l'avvento di nuove tecnologie basate sull'uso del DNA ricombinante (ingegneria genetica o tecnologia GM), permette il superamento di queste barriere con il trasferimento mirato di singoli geni di qualsivoglia altra origine (vegetale, animale, microbica) ad una pianta da rendere resistente. La resistenza così ottenuta è detta «transgenica» o «non convenzionale», in contrapposizione alla resistenza «convenzionale» da miglioramento genetico tradizionale, ed è classificabile in due categorie: (a) resistenza derivata dal patogeno; (b) resistenza indotta da sequenze di DNA esogeno, non necessariamente di origine microbica.

Resistenza transgenica ai fitovirus: principi e meccanismi

La resistenza transgenica ai virus è caratterizzata in larga misura dall'uso della succitata «resistenza derivata dal patogeno» (parasite-derived resistance, PDR), definibile come quel tipo di resistenza conferita ad una pianta da sequenze codificanti o non, isolate dal genoma del patogeno, clonate e trasferite con metodiche di ingegneria genetica nel genoma dell'ospite, che le incorpora (Sanford e Johnston, 1985). Si ritiene che questa forma di resistenza si manifesti quando il prodotto di un gene virale viene espresso nelle cellule dell'ospite in un momento inopportuno del «ciclo biologico» del virus, o in forma o quantità inappropriata, così da perturbare il processo infettivo. Ciò risulta dalle ormai quindicennali ricerche sulla resistenza transgenica le quali sembrano indicare che un qualsivoglia frammento di genoma virale possa conferire un qualche livello di protezione alla pianta trasformata.

I metodi correnti per trasferire geni esogeni nelle piante sono biologici (trasformazione mediata dal plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*) e fisici (bombadamento con microproiettili o metodo biolistico) (Gelvin, 1998). Poco ci si è rivolti all'elettroporazione e microiniezione di protoplasti per la scarsa propensione di questi a rigenerare piante intere. Le agrotrasformazioni sono stabili, molto efficienti, trasferiscono transgeni intatti e presenti in numero ridotto di copie, ma trovano limitazioni nella difficile applicazione su alcuni tipi di piante ospiti (gramina-

cee, ad esempio). Il metodo biolistico è meno efficiente (le cellule trasformate sono poche e disperse) ma ha il vantaggio di operare con successo su qualunque tipo di pianta. Ulteriori sviluppi hanno combinato i due metodi nel sitema «agrolistico» che unisce i vantaggi del bombardamento all'uso di plasmidi complessi che migliorano l'integrazione del transgene nel genoma dell'ospite (Hansen e Chilton, 1996).

Per l'induzione di resistenza transgenica ai virus sono state adoperate: (a) sequenze virali che codificano proteine strutturali (proteine che entrano nella costituzione della particella virale) non strutturali (proteine che risultano dalla traduzione di specifici geni e si accumulano nelle cellule infette); (b) sequenze virali non codificanti, che non esprimono proteine; (c) geni esogeni di varia natura (Tab. 1).

Esempi di proteine strutturali sono la proteina capsidica (CP), nucleocapsidica (N) e genomica (VPg), mentre proteine non strutturali sono quelle di movimento (MP), le replicasi (POL), le proteasi (NIa potyvirali), il componente coadiutore della trasmissione per afidi dei caulimovirus (HC), ed i fattori di virulenza che sopprimono il silenziamento genico virale post-trascrizionale operato dall'ospite (proteina 2b dei cucumovirus; HC-Pro dei potyvirus, proteina 25K dei potexvirus).

Tabella 1 - *Alcuni dei geni virali e non utilizzati per conferire resistenza transgenica a virus.*

A. GENI VIRALI

Sequenze codificanti

Proteina capsidica (CP), Proteina nucleocapsidica (N), Proteina di movimento (MP), Replicasi (POL), Proteasi (PRO), Proteina genomica (VPg), Proteina 2b (cucumovirus), HC-Pro (potyvirus), HC (caulimovirus), Proteasi (NIa potyvirale).

Sequenze non codificanti

Sequenze virali rese deliberatamente non codificanti, RNA antisenso (-RNA), RNA satelliti (satRNA), RNA difettivi interferenti (DI RNA).

B. GENI NON VIRALI

Sequenze codificanti

RNasi dsRNA-specifica (*pac 1*), sistema 2'-5' oligoadenilato di mammiferi, «plantibodies» (anticorpi espressi in pianta), proteine inibitrici dei ribosomi (RIP), RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp) di origine vegetale.

Sequenze non codificanti

Ribozimi, tRNA soppressori dei codoni di terminazione «ambra».

Ancorché l'uso di alcune delle proteine di cui sopra (MP, POL) nella loro forma attiva possa indurre resistenza, il richio di complementazione o di un incremento della loro funzionalità nelle piante trasformate ne fa preferire l'utilizzazione sotto forma difettiva non funzionale. Esempi di sequenze non codificanti sono i ribozimi, gli RNA antisenso [(-)RNA] e gli RNA satelliti (satRNA).

Alla presenza o meno di produzione di proteine da parte del gene trasferito (transgene) sono stati attribuiti due diversi meccanismi di resistenza denominati: «resistenza indotta da proteine» (protein-mediated resistance, P-MR), che sottintende la conclamata espressione del transgene (trascrizione, traduzione e sintesi proteica) e «resistenza indotta da acidi nucleici» (RNA-mediated resistance, RNA-MR), che invece richiede la sola trascrizione del transgene nel suo mRNA. Come si è accennato, tuttavia, poiché resistenze (o tolleranze) vengono promosse da un qualsivoglia frammento di un genoma virale e poiché le stesse sequenze geniche ritenute autrici di P-MR (inclusi i geni CP) inducono resistenza anche in apparente assenza di traduzione (le proteine che esse codificano non vengono apparentemente sintetizzate o lo sono in quantità impercettibile), la primitiva netta distinzione tra i due tipi di resistenza appare oggi meno drastica di un tempo, ed i meccanismi che sottendono alla PDR appaiono più complessi di quanto non si ritenesse.

Se vi sono infatti esempi, quali quelli del virus del mosaico del tabacco (TMV) o del mosaico dell'erba medica (AMV), in cui la resistenza mediata dalla CP virale sembra esprimersi attraverso modalità assimilabili a quelle ipotizzate per la protezione incrociata (interferenza diretta con la decapsidazione o blocco di recettori cellulari che danno inizio alla decapsidazione con conseguente inibizione del processo infettivo e della invasione dell'ospite) (Lecoq, 1998), vi sono altri esempi (virus Y e dell'accartocciamento fogliare della patata, virus etch del tabacco) in cui le piante transgeniche, pur non accumulando CP virale, mostrano egualmente alti livelli di resistenza (Kaniewski e Lawson, 1988; Hammond *et al.*, 1999). Ciò ha fatto ritenere che, in questi ultimi casi, la resistenza sia dovuta più all'RNA trascritto dal transgene che non al suo prodotto di espressione (CP) e, quindi, ipotizzare che uno stesso tipo costrutto possa attivare più di un meccanismo di resistenza. Si è avuta poi conferma non solo della diversità del tipo di resistenza indotta da singoli costrutti CP, ma anche della possibilità di una loro attivazione differenziale in ospiti o linee transgeniche diverse. E vi sono indicazioni che la resistenza indotta da proteine virali non CP possa avere anch'essa più di una origine (P-MR e RNA-MR, ad esempio) o, come nel caso di polimerasi tronche non funzionali, azione assimilabile a quella delle mutazioni negative dominanti (Palukaitis e Zaitlin, 1997).

In conclusione, le diverse vie attraverso cui l'espressione *in planta* dei geni CP può interferire con le fasi iniziali dell'infezione virale, o con la sua diffusione locale o sistemica, ovvero con la replicazione del patogeno, rende plausibile l'ipotesi che un qualsivoglia costrutto CP possa esercitare effetti plurimi di resistenza e che i meccanismi innescati da uno stesso gene si esprimano differenzialmente nelle

piante, forse anche in funzione della collocazione del transgene nei cromosomi o delle differenze nell' interazione virus-ospite (Hammond *et al.*, 1999).

Circa la resistenza mediata da RNA, è sempre più evidente che essa si esplica attraverso il silenziamento genico post trascrizionale (post-transcriptional gene silencing, PTGS), un meccanismo adattativo con cui le piante si difendono dalle infezioni virali (Covey *et al.*, 1997), che consiste nella inattivazione dell'RNA del patogeno attraverso un processo di degradazione sequenza-specifico (Ratcliff *et al.*, 1997; Smyth, 1999; Meins, 2000; Voinnet, 2001). Il PTGS si diffonde nella pianta attraverso un segnale mobile forse costituito da acidi nucleici di piccole dimensioni con sequenze omologhe a quelle dell'RNA bersaglio del silenziamento. Un esempio classico di PTGS è la ripresa vegetativa con assenza di sintomi e ridotta concentrazione virale (recovery) che si verifica naturalmente in ospiti infetti da virus ad RNA (nepovirus) o a DNA (caulimovirus) dopo una fase acuta di malattia che segue l'infezione iniziale.

È di estremo interesse la recente scoperta che alcuni fitovirus superano la resistenza delle piante sopprimendo con un contro silenziamento il PTGS operato dagli ospiti verso di loro (Kasschau e Carrington, 1998). Non si sa se questo rappresenti un sistema universale di patogenicità, ma è un fatto che le proteine HC-Pro dei potyvirus, 2b dei cucumovirus, P1 dei sobemovirus, p25 dei potexvirus, p19 dei tombusvirus e Ac2 dei geminivirus siano state identificate come fattori di soppressione del silenziamento genico delle piante (Carrington *et al.*, 2001; Voinnet, 2001) e che, pertanto, è verosimile che virus di altri taxa posseggano analoghi sistemi di aggressione.

Per spiegare il meccanismo di PTGS responsabile della resistenza transgenica mediata da RNA sono stati proposti due modelli. Il primo di essi, «modello quantitativo o di soglia», è basato sull'osservazione che i geni silenziati hanno spesso un livello di trascrizione assai più alto di quelli non silenziati. Nelle piante trasformate, un aumento al di là di una data concentrazione degli RNA citoplasmatici dovuto alla contemporanea presenza dei trascritti del transgene (mRNA) e dell'RNA del virus sopravvenuto dal quale si vogliono proteggere le piante, scatenerebbe il meccanismo di degradazione dell'RNA dovuto alla sintesi di corte molecole di (-)RNA con sequenza altamente omologa all'RNA bersaglio (mRNA transgenico ed RNA virale) da parte di una RNA polimerasi RNA dipendente (RpRd) della pianta. Ne consegue la formazione di molecole bicatenarie (dsRNA) che divengono a loro volta bersaglio di RNasi vegetali dsRNA-specifiche che le degradano (Baulcombe, 1996).

Il secondo meccanismo, «modello qualitativo o degli mRNA aberranti» viene ricondotto alla presenza nelle piante transgeniche di mRNA aberranti perché tronchi a causa di metilazione o conversione di residui di adenosine in inosina che ne farebbero terminare prematuramente la trascrizione. Questi diventerebbero stampi preferenziali per la produzione di (-)RNA da parte della RdRp dell'ospite, le quali dando origine a piccoli dsRNA, stimolerebbero la produzione e l'attività degradativa delle dsRNasi della pianta (Baulcombe e English, 1996).

La resistenza mediata da CP, la prima ad essere sperimentata oltre 15 anni orsono, è stata impiegata sperimentalmenrte con successo contro circa 50 virus appartenenti a non meno di 15 diversi taxa (Kaniewski e Lawson, 1998). Tuttavia, poiché la CP tende a conferire resistenza solo a ceppi virali prossimi a quello da cui la CP stessa proviene, sono state messe a punto strategie alternative per produrre piante in grado di contenere le infezioni di una gamma più ampia di virus. Allo scopo è stata usata una batteria di geni non virali tra i quali, quelli codificanti anticorpi ricombinanti a singola catena (plantibodies), RNasi dsRNA-specifica (*Pac1* da *Saccharomyces pombe*, ad esempio), sistema 2'-5' oligoadenilato di mammiferi, geni suicidi (proteine inibitrici dei ribosomi, RIB), tRNA soppressori che inibiscono i codoni di terminazione ambra e, più di recente, una RNA dipendente RNA polimerasi (RdRp) di origine vegetale (Tab. 1).

I meccanismi d'azione delle sequenza non virali usate nella trasformazione delle piante sono anch'essi diversificati e variano dalla induzione di ipersensibilità con confinamento del virus (sistema 2'-5' adenilato di mammiferi), alla degradazione degli RNA virali a singola elica (ribozimi) o a doppia elica (agenti che scatenano il silenziamento genico, RdRp di origine fungina o vegetale), alla inibizione delle sintesi delle proteine o alla depurinazione dell'RNA ribosomale (RIB), alla interferanza con i primi stadi della infezione virale (anticorpi ricombinanti) (Benvenuto e Tavladoraki, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Ogawa *et al.* 1996; Martin, 1998, Wang e Tumer, 2000).

Resistenza transgenica ai fitovirus nella pratica

Può apparire singolare che ad una sperimentazione di laboratorio e di campo molto intensa sulla resistenza transgenica ai parassiti vegetali (si vedano al proposito le rassegne di Kaniewski e Lawson, 1998; Jacquemond e Tepfer, 1998; Martin, 1998; Tabler *et al.*, 1998; Dempsey *et al.*, 1998; Mourgues *et al.*, 1998; Lorito e Scala, 1999; Hammond *et al.* 1999; Wang e Tumer, 2000; Martelli, 2001) corrisponda, a tutt'oggi, un assai ridotto sfruttamento commerciale dei prodotti finiti. Le colture commerciali di piante geneticamente modificate (GMP) per la resistenza ai virus sono infatti pochissime (nessuna resistente a funghi o batteri) e presenti su di una frazione quasi insignificante degli oltre 40 milioni di ettari coltivati nel 2000 con GMP. La prima specie transgenica giunta in campo in un Paese occidentale è stata la papaia trasformata con la CP del virus della maculatura anulare (PRSV), la cui coltivazione è iniziata nel 1998 (Gonsalves, 1998). Ad essa sono seguiti zucchini resistenti ai virus del mosaico del cetriolo (CMV), del mosaico dell'anguria (WMV) e del mosaico giallo dello zucchino (ZYMV), e patate resistenti ai virus dell'accartocciamento fogliare (PLRV) e Y della patata (PVY). In tutti questi casi la resistenza è mediata dalla CP, meno che nella patata, in cui la resistenza a PLRV è mediata dalla replicasi virale (POL). Per le GMP di tabacco resistenti a CMV,

TMV, PVY, coltivate in Cina da anni, è stata utilizzata invece la strategia delle resistenze multiple mediate contemporaneamente da CP (CMV e PVY), satRNA (CMV) e POL (TMV) (Ye e Tien, 1998).

L'uso commerciale di GMP con resistenza transgenica ai virus è stato ritardato dalla necessità di valutare alcuni aspetti chiave per il successo dell'operazione, quali ad esempio la stabilità del carattere introdotto col transgene, il rischio che la loro coltivazione comporta per l'agricoltura, l'ambiente e la salute (rischio biologico), il rapporto costo-benefici e l'effettiva potenzialità commerciale determinata dall'accettazione pubblica delle applicazioni biotecnologiche.

Benché questi fattori abbiano avuto un ruolo importante, ed alcuni lo abbiano ancora, nel far decidere sull'uso e quale della «resistenza non convenzionale», da quanto detto si può concludere che l'era transgenica di campo per la resistenza ai fitovirus è ancora di là da venire. Inoltre, poiché i geni adoperati per la trasformazione sono tutti derivati dai virus stessi, la resistenza oggi dispiegata in campo è strettamente di tipo PDR, strategia caratterizzata, come si cercherà di illustrare più avanti, da rischi modestissimi, praticamente insignificanti. Tutto ciò dovrebbe rassicurare il grande pubblico (nazionale ed europeo) sia sulla non incombenza dell'arrivo di questo tipo di prodotti sul mercato sia sulla loro non pericolosità.

Benefici della resistenza transgenica ai fitovirus

L'uso della tecnologia GM per la resistenza ai virus permette di: (a) selezionare il gene da introdurre in funzione del patogeno che si vuol combattere e del tipo di resistenza che si vuole ottenere; (b) superare le barriere della incompatibilità genetica, sì da rendere disponibili per l'utilizzazione un numero teoricamente infinito di geni di origine microbica e non; (c) assommare nella stessa pianta singole resistenze a diversi virus (ed altri parassiti) ed eventualmente combinarle con caratteristiche qualitative e commerciali superiori; (d) coltivare in condizioni di alto potenziale di inoculo, sì da recuperare all'agricoltura terreni vocati ma non più destinati a certe produzioni a causa di ricorrenti e devastanti epifizie virali; (e) aumentare il rendimenti e la qualità del prodotto pur coltivando in condizioni di pressione di malattia medio-alte.

A quanto sopra si può aggiungere che, poiché i geni trasferiti biotecnologicamente nelle piante sono noti, così come è nota la composizione dei costrutti usati per la trasformazione, è possibile eseguirne il monitoraggio nel tempo e nello spazio. Ciò che al momento è assai meno possibile per i geni trasferiti per incrocio.

Rischi della resistenza transgenica di tipo PDR ai fitovirus

Malgrado la tecnologia GM applicata alla resistenza abbia ovvii benefici e sia una delle strategie che in prospettiva dovrebbero consentire la rapida e, si spera,

efficace adozione di misure limitative dei danni causati da attacchi parassitari non altrimenti contenibili, il suo uso, ancorché ancora agli inizi, ha sollevato una serie di interrogativi sul «rischio biologico», cioè sul possibile impatto che un variegato mondo di critici (gruppi di attivisti ideologicamente impegnati, ambientalisti irriducibili, associazioni di consumatori, estimatori dell'agricoltura biologica ed alcuni ricercatori) ha ipotizzato che le GMP possano esercitare sull'agricoltura, l'ambiente e la salute.

Il problema della valutazione e dell'esistenza stessa del richio biologico è stato ampiamente dibattuto in recenti articoli redatti da singoli ricercatori (Allison *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1997; Dröge *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1998; Jacquemond e Tepfer, 1998; Timmerman-Vaughan, 1998; Hammond *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 1999; Martelli, 2001; Gallitelli e Accotto, 2001), Accademie scientifiche (Anonimo, 2000) e Associazioni professionali (Anonimo, 2001). A questi scritti si rimanda per gli approfondimenti e per l'abbondante bibliografia documentativa che contengono, la quale è servita in larga misura a sostegno dell'analisi critica del presunto rischio biologico innescato dalle piante trasformate per la resistenza con tecnologia PDR, che viene qui di seguito presentata in forma schematica.

A) Tecnologia PDR: rischi potenziali per l'agricoltura

1. *Patogenicità del vettore*

Rischio ipotizzato: l'uso degli agrobatteri come vettori per il trasferimento di geni può rivelarsi dannoso a causa della conclamata patogenicità dei vettori stessi.

Situazione: I plasmidi batterici sono disarmati (privati dei geni tumorigeni) e non sono stati riscontrati eventi patogenetici nell'enorme numero di esperimenti di trasformazione effettuati nel mondo, nelle migliaia di prove di campo e nelle estensive coltivazioni commerciali di piante transgeniche.

Contromisure: nessuna (le preoccupazioni sono totalmente ingiustificate). L'innocuità dei vettori costituiti da plasmidi agrobatterici è ormai ampiamente accettata

2. *Insorgenza di nuovi virus o virosi*

Rischio ipotizzato: la ricombinazione o il riassortimento degli acidi nucleici transgenici con quelli di virus sopravvenuti può dare origine a nuovi ceppi virali o a nuovi virus (supervirus) in grado di provocare nuove, distruttive malattie.

Situazione: la ricombinazione intraspecifica ed interspecifica di acidi nucleici virali (RNA e DNA) ed il riassortimento genico sono fenomeni comuni ed assai diffusi in natura. Essi rappresentano, insieme alle mutazioni, i principali meccanismi che sottendono alla evoluzione dei virus ed alla insorgenza di nuove specie e taxa virali e si verificano sia nelle piante normali che in quelle trasformate. È da considerare, tuttavia, che le nuove entità ricombinanti sono soggette a pressione di selezione, dapprima all'interno dell'ospite in cui si sono generate e poi, se hanno avuto

successo e si sono diffuse, all'interno della coltura o della comunità vegetale naturale, per cui solo una minima parte di esse riesce ad imporsi. Le più recenti vedute sulla dinamica delle popolazioni virali, fa ritenere che l'uso di piante con resistenza transgenica tenderà a ridurre piuttosto che ad esaltare l'evoluzione di nuovi patogeni per il depauperamento del serbatoio di sequenze virali oggi presenti nelle varietà suscettibili e potenzialmente disponibili per eventi di ricombinazione. È unanime la conclusione che l'utilizzazione, anche su larga scala, di piante trasformate non spingerà l'evoluzione virale in una direzione tale da far sì che nuove, più aggressive entità appaiono più frequentemente di quanto non avvenga oggi negli ambienti non transgenici.

Contromisure: è possibile minimizzare il rischio di riassortimento genico non adoperando nella loro interezza frammenti genomici per la trasformazione, minimizzare il pericolo di ricombinazioni attraverso l'esclusione dai transgeni dei siti di inizio della replicazione degli acidi nucleici o, in alternativa, trasformare con geni non virali.

3. *Modificazione del comportamento epidemiologico a seguito di incapsidazione eterologa*

Rischio ipotizzato: la copertura totale (transcapsidazione) or parziale (micelazione fenotipica) di un acido nucleico di un virus sopravvenuto da parte di una proteina capsidica di un altro virus espressa transgenicamente può alterare il comportamento epidemiologico del virus superinfettante.

Situazione: l'incapsidazione eterologa è un fenomeno naturale che si determina sia in piante normali con infezioni multiple che in quelle transgeniche superinfettate. Se in una di queste si verificasse un evento di transcapsidazione a seguito del quale insorgesse un virus chimerico con un differente comportamento epidemiologico rispetto al virus donatore dell'acido nucleico transcapsidato, e se il nuovo virus fosse trasportato da un vettore su nuovi ospiti suscettibili, non è da escludere che in questi possa svilupparsi una nuova malattia. Questo peraltro sarebbe il capolinea dell'avventura ecologica del virus chimerico perché la sua replicazione nel nuovo ospite sortirà una progenie identica al ceppo virale originale, non più chimerica né trasmissibile dal vettore, che non riuscirà più ad acquisirla.

Contromisure: l'incapsidazione eterologa è evitabile utilizzando per la trasformazione sequenze di proteine capsidiche tronche, prive del segnale di incapsidazione.

4. *Modificazione del fenotipo della pianta a seguito dell'inserzione di DNA esogeno*

Rischio ipotizzato: Fenotipi anormali possono insorgere perché: (a) l'inserzione di DNA esogeno può attivare o disattivare uno o più geni dell'ospite nelle immediate vicinanze dell'inserto (effetto pleiotropico); (b) il transgene di per se può indurre alterazioni morfologiche; (c) variazioni somaclonali possono verificarsi durante la coltura *in vitro* e la rigenerazione.

Situazione: evento possibile.

Contromisure: eliminazione selettiva dei fenotipi anomali prima delle prove di campo o del rilascio commerciale, verifica delle possibili variazioni nella composizione proteica delle piante trasformate, anche al fine di stabilire la sussistenza della «sostanziale equivalenza» con le piante dello stesso tipo non trasformate.

B) TECNOLOGIA PDR: RISCHI POTENZIALI PER L'AMBIENTE

1. *Trasferimento orizzontale di geni: transgeni*

Rischio ipotizzato: trasferimento tramite polline del gene inserito può avvenire dalle piante transgeniche ad altre colture o a piante selvatiche geneticamente imparentate con la specie trasformata, contaminando l'ambiente in maniera incontrollata.

Situazione: il polline può trasportare e diffondere geni esogeni indipendentemente dal fatto che essi derivino dal miglioramento genetico tradizionale o da applicazioni biotecnologiche. Tuttavia non ci si attende dispersione di geni tra specie geneticamente incompatibili e tra piante autofertili, se non in misura modestissima. Inoltre, la possibile fuga di transgeni non ha conseguenze per le specie coltivate o selvatiche che siano già resistenti al virus considerato e non è detto che sia un male se diffonde la resistenza ad altre colture. Inoltre non è sicuro che la dispersione in natura del transgene debba necessariamente avvenire anche nel caso di incrocio riuscito, se l'ibrido è sterile.

Contromisure: ricorrere alla maschio sterilità, ovvero puntare sull'eredità materna ottenibile con la trasformazione dei cloroplasti. Ciò appare particolarmente desiderabile in caso di rilascio di piante trasformate negli areali di origine o diversificazione delle specie, ove abbondano le possibilità di incrocio interspecifico, dovunque sia importante salvaguardare l'integrità del germoplasma naturale.

2. *Trasferimento orizzontale di geni: geni marcatori di selezione*

Rischio ipotizzato: i geni marcatori di selezione (il gene *nptII* della resistenza alla kanamicina, ad esempio) possono trasferirsi dalle piante trasformate a microrganismi, specialmente funghi e batteri del terreno.

Situazione: esperimenti di laboratorio hanno dimostrato la possibilità di trasferimento dei geni marcatori di selezione dalle piante trasformate a batteri e funghi. Inoltre, il DNA rilasciato dalle radici o residui vegetali delle piante transgeniche può passare nel terreno. Tuttavia, il DNA deve trovarsi nel luogo in cui risiedono microganismi competenti in grado di incorporarlo e nel momento propizio per l'assunzione, condizione questa facile da creare in laboratorio ma assai meno frequente in natura. In ogni caso, il problema esiste già poiché resistenza alla kanamicina non di origne transgenica è stata riscontrata in popolazioni naturali di batteri tellurici.

Contromisure: anche se il trasferimento di geni da piante a microganismi del terreno è evento rarissimo, è bene evitarlo eliminando i geni di resistezna agli antibiotici dai costrutti trasformanti. L'uso di questi geni sarà comunque vietato dal 2004 nelle GMP commerciali e dal 2008 nelle GMP sperimentali.

3. *Erosione genetica*

Rischio ipotizzato: la coltivazione su scala sempre più ampia delle GMP comporterà perdita di biodivesità.

Situazione: fino dai suoi albori l'agricoltura ha costituito la principale causa di erosione genetica. Delle circa 30.000 piante potenzialmente eduli, solo circa 300 sono coltivate su larga scala e non più di 30 di esse garantiscono il 95% delle risorse nutrizionali del mondo. Inoltre, molte cultivar autoctone di fruttiferi e piante ortive sono già scomparse, scacciate dalle commercialmente più competitive cultivar migliorate geneticamente con metodi tradizionali. Il danno esiste già, ed è improbabile che l'avvento dell'era transgenica lo peggiori. Anzi, in prospettiva, è prevedibile il recupero di risorse genetiche costituite da quelle cultivar la cui estrema suscettibilita alle infezioni virali ha in pratica tolto dal mercato.

Contromisure: rafforzare le misure per la conservazione del germoplasma. ed utilizzare la tecnologia GM per il recupero delle cultivar fortemente suscettibili alle fitopatie.

C) Tecnologia PDR: rischi potenziale per la salute

1. *Tossicità dei prodotti dei geni virali*

Rischio ipotizzato: i prodotti dei transgeni virali (proteine ed acidi nucleici) possono rivelarsi tossici o allergenici per l'uomo o gli animali.

Situazione: i virus ed i prodotti della loro replicazione sono componenti frequentissimi delle verdure e frutta presenti sul mercato. Le cellule delle piante infette contengono milioni di particelle virali e grandi quantità di prodotti del loro «metabolismo», per cui da sempre uomini ed animali ingeriscono grammi di queste sostanze su base annua. E ciò non ha mai causato problemi.

Contromisure: nessuna: Continuare allegramente il consumo di ortaggi e frutti freschi sia da piante normali che trasformate.

2. *Tossicità dei geni marcatori di selezione e loro effetti sulla terapia antibiotica*

Rischio ipotizzato: i prodotti di espression dei geni marcatori di selezione per la resistenza agli antibiotici possono essere tossici o trasferire la resistenza a batteri patogeni sì da interferire con la terapia antibiotica.

Situazione: alcuni degli antibiotici (kanamicina, ad esempio) usati per la selezione delle GMP sono anche utilizzati per la terapia umana. Perché avvenga il trasferimento del gene in questione o di altro gene consimile (DNA) dai tessuti vegetali ingeriti alla microflora intestinale o alle cellule del tratto gastrointestinale dovrebbero verificarsi i seguenti eventi: il gene dovrebbe essere rilasciato dalle cellule vegetali come frammento lineare, sopravvivere alle nucleasi della pianta e del tratto gastrointestinale, competere con successo con altri DNA ingeriti con il cibo, sopravvivere agli enzimi di restrizione dei batteri che lo assumono, essere in grado

di inserirsi stabilmente nel genoma microbico. Gli studi effettuati per la verifica di quanto sopra hanno concluso che il gene *ntpII* non è tossico per l'uomo o gli animali, non interferisce con la terapia antibiotica ed è improbabile che il suo rilascio nell'ambiente possa causare danni. Ne è derivato che il gene *nptII* sia considerato un marcatore a basso rischio senza restrizioni di uso. Tuttavia, come si è accennato, l'utilizzazione di questo tipo di marcatori è di prossimo bando.

Contromisure: usare marcatori di selezione diversi dagli antibiotici (fosfato-6-mannosio isomerasi, ad esempio); rimuovere i geni marcatori dalle GMP prima del loro rilascio commerciale.

L'uso di GMP resistenti ai virus non è totalmente privo di possibili inconvenienti, che però differiscono da quelli sopraelencati e non sembrano creare allarme nel grande pubblico. Ci sono infatti virus che posseggono fattori di patogenicità che sopprimono le difese dell'ospite basate sul silenziamento genico. Come si è accennato, alcuni di questi fattori sono stati identificati (proteine HC-Pro dei potyvirus, 2b dei cucumovirus, p25 dei potexvirus e p19 dei tombusvirus; AC2 dei geminivirus; P1 dei sobemovirus) ed altri è assai probabile che esistano. Orbene, l'infezione da parte di un qualsivoglia virus dei generi in questione (poty-, cucumo-, potex-, sobermo-, gemini- e tombusvirus) di una pianta transgenica resistente ad un virus appartenente un taxon diverso potrebbe scatenare il silenziamento genico e rompere la resistenza. Conferma sperimentale di ciò è stata recentemente ottenuta anche nel laboratorio di chi scrive, utilizzando come modello sperimentale piante di tabacco rese immuni alla infezione di un tombusvirus a seguito di trasformazione con la polimerasi virale (Rubino *et al.*, 1993), la cui comprovata, estrema resistenza è stata superata dalla infezione con virus induttori di PSGS (Di Serio *et al.*, 2002).

Considerazioni finali

Poiché non vi è attività umana che sia a «rischio zero», così come in natura non esistono rischi generalizzati ed indiscriminati, i potenziali «pericoli» connessi all'uso delle biotecnologie fitopatologiche meriterebbero di essere analizzati e valutati caso per caso.

Anche se il tipo e l'importanza dei rischi per l'uomo e per l'ambiente potenzialmente innescati dall'agricoltura transgenica non saranno noti appieno se non a seguito della coltivazione pluriennale GMP nelle più disparate condizioni ambientali, climatiche e sociali, sì da chiarire se le preoccupazioni che attanagliano gli ambientalisti e buona parte del pubblico hanno davvero motivo di esistere, rimane il fatto che larghe superfici sono già investite a colture transgeniche e che, a quanto pare, nessuno dei paventati disastri si è verificato.

Inoltre, l'acceso dibattito in corso sulle applicazioni biotecnologiche in agricoltura, ben di rado (forse mai fino ad ora) ha tenuto in conto che non tutte le

manipolazioni genetiche sulle piante sono identiche ed egualmente rischiose. Una discriminazione al riguardo sarebbe doverosa e, se fosse fatta, si potrebbe giungere alla conclusione che nel caso delle trasformazioni di tipo PDR, i rischi biologici ipotizzati sono minimi, se non assolutamente insignificanti. Quanto detto sopra è in larga misura confortato da una tale massa di osservazioni e di dati sperimentali che dovrebbero indurre quanto meno a sostenere e potenziare le ricerche nel settore ed a favorire le sperimentazioni di campo.

BIBLIOGRAFIA

Allison R.F., Schneider W.L. & Greene A.E. (1996). Recombination in plants expressing viral transgenes. *Seminars in Virology*, *7*, 417-422.

Anonimo (2000). *Transgenic plants and world agriculture*. National Academy Press. Washington DC, USA [http://www.nap.edu.html/transgenic]

Anonimo (2001). *Genetically modified crops and foods*. Featured CSA report of the American Medical Association, 18 pp. [htpp://ww.ama-assn.org/ama/pub/article2036-4030.html#currently_marketed_transgenic_crops]

Baulcombe D.C. (1996). Mechanisms of pathogen derived-resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, *8*, 1833-1844.

Baulcombe D.C. & English J.J. (1996). Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinions in Biotechnlogy*, *7*, 173-180.

Benvenuto E. & Tavladoraki P. (1995). Immunotherapy of plant virus diseases. *Trends in Microbiology*, *3*, 272-275.

Carrington J.C., Kasschau K.D. & Johansen L. (2001). Activation and suppression of RNA silencing by plant viruses. *Virology*, *281*, 1-5.

Dempsey D.A., Silva H. & Klessig D.F. (1998). Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends in Microbiology*, *6*, 54-61.

Di Serio F., Rubino L., Russo M. & Martelli G.P. (2002). Homology-dependent resistance against *Cymbidium ringspot virus* is inhibited by post-transcriptional gene silencing suppressor viruses. *Journal of Plant Pathology* (in stampa).

Dröge M., Pühler A. & Selbtischka W. (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natyural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology*, *64*, 75-90.

Fraser R.S.S. (1990). The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, *28*, 179-200.

Gallitelli D. & Accotto G.P. (2001). Virus-resistant trangenic plants: potential impact on the fitness of plant viruses. *Journal of Plant Pathology*, *83*, 3-9.

Gelvin S.B. (1998). The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinions in Biotechnology*, *9*, 227-232.

Gonsalves D. (1998). Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology*, *36*, 415-437.

Hammond J., Lecoq H. & Raccah B. (1999). Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Advances in Virus Research*, *54*, 189-313.

Hansen G. & Chilton M.D. (1996). 'Agrolistic' transformation of plant cells: integration of T-strands generated *in planta. Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *93*, 14978-14983.

Jacquemond M. & Tepfer M. (1998). Satellite RNA-mediated resistance to plant viruses: are the ecological risks well assessed? In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 94-120.

Jones A.T. (1998). Control of virus infections in crops through breeding plants for vector resistance. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 41-55.

Kaniewski W.K. & Lawson E.C. (1998). Coat protein and replicase-mediated resistance to plant viruses. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 65-78.

Kasschau K.D. & Carrington J.C. (1998). A counter-defensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell*, *95*, 461-470.

Khetarpal R.K., Maisonneuve B., Maury Y., Chalhoub B., Dinant S., Lecoq H. & Varma A. (1998). Breeding for resistance to plant viruses. In: *Plant Virus Disease Control* (A. Hadidi A., Khetarpal R.H., Koganezawa H., eds.). American Phytopathological Society Press, St. Paul, 1-32.

Lecoq H. (1988). Control of plant virus diseases by cross protection. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 33-40.

Lorito M. & Scala F. (1999). Microbial genes expressed in transgenic plants to improve disease resistance. *Journal of Plant Pathology*, *81*, 73-88.

Martelli G.P. (2001). Transgenic resistance to plant pathogens: benefits and risks. *Journal of Plant Pathology*, *83*, 37-46.

Martin R.R. (1988). Alternative strategies for engineering virus resistance in plants. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 121-128.

Meins F. (2000). RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology*, *43*, 261-273.

Miller W.A., Koev G. & Mohan B.R. (1997). Are risks associated with transgenic resistance to luteoviruses? *Plant Disease*, *81*, 700-710.

Mourgues F., Brisset M.N. & Chevreau E. (1998). Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends in Biotechnology*, *16*, 303-310.

Nielsen K.M., Bones A.M., Smalla K. & van Elsaa J.D. (1998). Horizontal gene trasfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event? *FEMS Microbiology Reviews*, *22*, 79-103.

Ogawa T., Hori T. & Ishida I. (1996). Virus-induced cell death in plant expressing the mammalian 2'-5' oligoadenylate system. *Nature Biotechnology*, *14*, 1566-1569.

Palukaitis P. & Zaitlin M. (1997). Replicase-mediated resistance to plant virus diseases. *Advances in Virus Research*, *48*, 349-377.

Ratcliff F., Harrison B.D. & Baulcombe D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, *276*, 1558-1560.

Rubino L., Lupo R. & Russo M. (1993). Resistance to cymbidium ringspot tombusvirus infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing a full-lenght viral replicase gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *6*, 729-734.

Rubio T., Borja M., Scholthof H.B. & Jackson A.O. (1999). Recombination with host transgenes and effects on virus evolution: an overview and opinion. *Molecular Plant Microbe Interactions*, *12*, 87-92.

Sanford J.C. & Johnston S.A. (1985). The concept of parasite derived resistance, deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, *11*, 395-405.

Smyth D.R. (1999). Gene silencing: plants and viruses fight it out. *Current Biology*, *9*, R100-R102.

Tabler M., Tsagris M. & Hammond J. (1998). Antisense RNA and ribozymemediated resistance to plant viruses. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., coord.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 79-93.

Timmerman-Vaughan G.M. (1998). Releasing genetically engineered virus resitant crops - risk assessment. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 142-153.

Voinnet O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, *17*, 449-459.

Yie Y. & Tien P. (1998). Controlling mosaic virus diseases under field conditions using multiple gene strategies in transgenic plants. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. & Koganezawa H., coord.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 129-141.

Wang P. & Tumer N. (2000). Virus resistance mediated by ribosome-inactivating proteins. *Advances in Virus Research*, *55*, 325-355.

Watanabe Y., Ogawa T., Takahashi H., Ishida I., Takeuchi Y., Yamamoto M. & Okada Y. (1995). Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Letters*, *372*, 165-168.

Waterworth H.E. & Hadidi A. (1998). Economic losses due to plant viruses. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi A., Khetarpal R.H. e Koganezawa H., eds.), American Phytopathological Society Press, St. Paul., pp. 1-13.