



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 305-327

GIULIANO D'AGNOLO *

Legislazione e sicurezza dei consumatori **

INTRODUZIONE

La storia dell'umanità è stata sempre caratterizzata dalla contrapposizione tra coloro che sostengono i cambiamenti e coloro che restano attaccati ai vecchi metodi, perché convinti di conoscerne, almeno, i rischi. Per tale motivo, pur essendo stata l'alimentazione la principale preoccupazione dell'umanità, per tutta la storia non scritta, e buona parte della storia scritta, i cambiamenti nel modo di procacciarsi il cibo sono stati accettati con molta lentezza. Quando, circa 10.000 anni fa, è nata l'agricoltura, secondo le ultime teorie a causa della scarsità di selvaggina, i primi tentativi di coltivare piante commestibili sono stati, con molta probabilità, accolti dalla derisione dei cacciatori. Reazioni più violente hanno subito gli agricoltori italiani che, nel 1948, su indicazione del Ministero dell'Agricoltura e Foreste, avevano piantato i primi ibridi di mais. I giornali dell'epoca descrivono campi distrutti e cascate incendiate in nome della tradizione che considerava i nuovi mais innaturali.

La maggior parte delle persone e delle organizzazioni, che esprimono preoccupazioni sulle applicazioni delle nuove biotecnologie all'agricoltura, hanno poca o nessuna conoscenza dei processi che sono stati utilizzati in passato per modificare le piante coltivate, e delle conseguenze di tali modifiche. L'addomesticamento d'animali e piante selvatiche, avvenuto circa 10.000 anni fa, ha trasformato rapidamente la società umana, costituita da cacciatori e raccoglitori nomadi, in comunità libere dal compito quotidiano di trovare il cibo. Lo sviluppo della scrittura, della letteratura, della scienza e della tecnologia è una conseguenza diretta di tale trasformazione sociale.

L'intervento dell'uomo ha modificato molto rapidamente le piante coltivate.

* Istituto Superiore di Sanità, Roma.

** 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.

Ogni pianta, coltivata oggi, è imparentata con una specie selvatica, presente naturalmente nel luogo d'origine della pianta stessa. È probabile che la selezione delle piante coltivate sia avvenuta per tentativi ed errori. I primi uomini devono aver tentato di mangiare moltissime piante velenose, scelte tra le circa 250.000 fiorenti a disposizione, prima di selezionarne circa un migliaio per la coltivazione. Attualmente il numero di specie coltivate nel mondo è poco più di 100, con quattro specie (frumento, soia, mais e colza) che rappresentano l'80% della produzione agricola totale. I nostri antenati, attraverso un processo di selezione accurata, hanno modificato profondamente il fenotipo delle piante coltivate, come l'eliminazione della dispersione al suolo dei semi; la sincronizzazione della maturazione; la riduzione della lunghezza del tempo di maturazione; l'eliminazione o la riduzione della concentrazione di tossine e fattori antinutrizionali; la dormienza dei semi, nonché l'aumento della dimensione dei semi e dei frutti. Un risultato di tali modifiche è il caso del *Lycopersicon sp.*, le cui dimensioni aumentate di 1.000 volte rispetto al selvatico hanno dato origine al pomodoro attuale, o il caso della banana (*Musa paradisiaca*) nella quale l'eliminazione dei semi è stata totale. All'intervento dell'uomo si sono aggiunte le mutazioni e le ibridazioni spontanee. Il frumento moderno è relativamente recente, se paragonato alla scala temporale dell'evoluzione, essendosi originato, circa 4.000 anni fa, spontaneamente per ibridazione delle specie coltivate con il *Triticum tauschii*, specie selvatica non commestibile. Tutti questi cambiamenti hanno drasticamente ridotto la capacità delle piante coltivate di sopravvivere da sole in natura, tanto da essere, oggi, totalmente dipendenti dalle cure costanti dell'uomo.

L'avvento della navigazione transoceanica ha fatto muovere, rapidamente, le piante coltivate, dal luogo della loro prima coltivazione, ad altri continenti nei quali hanno assunto importanza preminente. Ad esempio, il caffè, originario dell'Etiopia, è oggi coltivato prevalentemente in Sud America ed in Asia; alimenti, che sono parte integrante della cultura alimentare italiana, come pomodoro, melanzana, zuccina e patata provengono dalle Americhe, aranci e limoni dall'Asia. Alcuni alimenti sono d'acquisizione ancora più recente, come il kiwi, selezionato, all'inizio del '900, in Nuova Zelanda da una pianta, non commestibile, che cresce selvatica in Cina. La fragola moderna è il risultato di un incrocio accidentale, avvenuto in Francia, a metà del XVIII secolo, tra due varietà selvatiche, una originaria del Cile e l'altra della Virginia (USA). All'inizio degli anni '60, il colza è stato sottoposto ad un attento programma di selezione per eliminare l'acido erucico, che si era rivelato essere tossico. Una pianta totalmente nuova, oggi coltivata su circa un milione d'ettari, il *triticale*, è stata ottenuta dalla combinazione dei genomi del frumento e della segale (due generi distinti che non si interfecondano in natura). Alle tecniche tradizionali di trasformazione delle piante coltivate si affiancano, oggi, nuovi strumenti di modificazione come le radiazioni ionizzanti (raggi gamma, raggi X, neutroni) ed i mutageni chimici (fosgene). L'applicazione di queste tecniche ha accelerato artificialmente ciò che può avvenire in natura per mutazioni spontanee dovute a raggi cosmici o a raggi ultravioletti. Il FAO/IAEA Mutant Varieties Data-

base (<http://www-INFOCRIS.iaea.org/MVD/>) elenca più di 2.000 varietà di piante coltivate, modificate geneticamente con queste tecniche.

Queste tecniche grossolane di trasformazione possono coinvolgere decine di geni con il rischio che alcuni di questi possano codificare per sostanze tossiche o nocive. Tuttavia le piante così ottenute non sono mai state sottoposte a valutazioni di rischio per la salute o per l'ambiente, come avviene di routine per gli OGM. Ad esempio una varietà di sedano, ottenuta per resistere agli insetti, che provocava irritazioni cutanee nei lavoratori addetti, conteneva 6.200 ppb di psolarene, una sostanza cancerogena contro gli 800 ppb del sedano di controllo. Il sedano in questione è stato immediatamente rimosso dalla coltivazione, come la patata Lenape che conteneva livelli molto alti di una sostanza neurotossica, la solanina. Le piante nel corso dell'evoluzione hanno sviluppato migliaia di sostanze chimiche per proteggersi dalle malattie, dagli insetti e dagli erbivori e molte di queste sostanze sono tossiche o cancerogene. Non vi è, non vi è mai stato un alimento perfettamente innocuo. Con ciò non si vuole affermare che gli alimenti siano pericolosi, perché, come ha riconosciuto per primo Paracelso, circa 400 anni fa: «Ogni sostanza è un veleno, ma è il dosaggio che la rende velenosa». Noi assorbiamo, ogni giorno, a livelli molto bassi, ed in dipendenza dalla dieta, da 5.000 a 10.000 sostanze tossiche naturali. Per esempio il caffè tostato contiene circa 1.000 sostanze chimiche diverse. L'esame di 27 di queste ha dimostrato che 16 sono cancerogene nel topo. Alcune di queste sostanze possono produrre effetti a lungo termine, come la *Cassava*, largamente consumata in Africa che, se non è adeguatamente trattata, può causare la paralisi degli arti, contenendo dei glucosidi cianogenici, o come una varietà di piselli, coltivata in India, che contiene livelli molto alti di una potente neurotossina. Abbiamo dei sistemi naturali per difenderci dalle tossine assunte con gli alimenti, tuttavia non ci siamo evoluti per raggiungere una condizione bilanciata di «armonia tossica» con tutto ciò che mangiamo, perché la selezione naturale è lenta, e perché ciò che mangiamo oggi non faceva parte dell'alimentazione dei nostri antenati cacciatori-raccoglitori.

L'uso dell'ingegneria genetica per produrre OGM dovrebbe essere considerato come un miglioramento delle tecniche grossolane impiegate fino ad oggi. L'introduzione diretta di uno od alcuni geni, scelti per le loro caratteristiche, dà origine a modifiche meno violente e più prevedibili di quelle ottenute ibridando specie diverse o di quelle ottenute per mutagenesi, ciò nonostante gli OGM generano una serie di reazioni negative in quasi tutto il mondo. Nella storia umana questa paura esagerata delle innovazioni e la percezione che prodotti più vecchi o «naturali» sono, in ogni caso, più sicuri è una costante [1, 2]. Questo doppio standard di severità nei confronti dei nuovi rischi e di rimozione nei confronti di rischi più grandi già noti, ha, sicuramente, influenzato anche la regolamentazione sugli OGM.

IL RILASCIO AMBIENTALE E LA SICUREZZA D'USO DEGLI OGM SONO REGOLAMENTATI?

Regolamentazione del rilascio ambientale

Il decreto legislativo n. 92 del 3 marzo 1993, pubblicato nel supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale n. 78 del 3 aprile 1993, ha recepito in Italia la direttiva 90/220/CEE del Consiglio della Comunità Europea in materia di rilascio deliberato di OGM nell'ambiente sia a scopo di ricerca (parte B della direttiva) che a scopo di commercializzazione (parte C della direttiva). La legislazione europea è basata sull'assunto che il rilascio, nell'ambiente, di un organismo, con caratteristiche che la natura potrebbe non aver mai prodotto, aumenta l'incertezza sul comportamento di tale organismo e sui suoi possibili effetti. Per tale motivo la legislazione richiede che una valutazione preventiva di rischio venga effettuata prima di ogni rilascio ambientale di OGM, e che nessun rilascio possa essere effettuato senza l'assenso preventivo di un'autorità competente. Questo approccio *orizzontale* della regolamentazione è basato su una valutazione *passo dopo passo* dei singoli rilasci in modo da garantire che rischi sconosciuti siano identificati molto precocemente. Questo significa che la scala del rilascio viene aumentata gradualmente, a partire da poche decine di piante, ma solo quando la valutazione dei primi esperimenti in termini di protezione della salute umana e dell'ambiente consente di passare alle fasi successive.

Il decreto legislativo n. 92 definisce gli OGM come organismi il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto si verifica in natura, mediante incrocio o con la ricombinazione genetica naturale; regola il rilascio deliberato a fini sperimentali e l'immissione sul mercato di prodotti contenenti o costituiti da OGM; identifica il Ministero della salute come l'autorità competente chiamata a valutare i rischi prevedibili, immediati o futuri, che gli OGM possono presentare per la salute umana, animale o per l'ambiente. A tale scopo l'autorità competente si avvale della Commissione interministeriale di valutazione delle biotecnologie (CIVB), composta da esperti designati dai Ministeri ambiente e tutela del territorio, politiche agricole e forestali, attività produttive, istruzione università e ricerca scientifica, lavoro e politiche sociali, dall'Agenzia nazionale per la protezione ambientale, dalla Protezione civile e dagli Istituti superiori di sanità e di prevenzione e sicurezza del lavoro. La CIVB può, a sua volta, richiedere specifici pareri al Consiglio superiore di sanità ed al Comitato nazionale per la biosicurezza e le biotecnologie, istituito dalla legge comunitaria, che ha recepito la direttiva 90/220/CEE, presso il Segretariato generale della Presidenza del Consiglio dei Ministri. Quest'ultimo Comitato ha come compito l'elaborazione di linee guida atte a valutare la sicurezza delle applicazioni biotecnologiche.

La Commissione interministeriale di coordinamento per le biotecnologie adotta un approccio caso per caso basato sull'analisi di:

- la funzione del gene nell'organismo donatore;
- le modifiche della pianta a causa del gene inserito;

- gli eventuali effetti sugli organismi presenti nell'ambiente;
- la probabilità di trasferimento genico, per impollinazione, ad altre piante coltivate o selvatiche;
- l'eventuale tossicità od allergenicità;
- i piani di sorveglianza;
- i piani di smaltimento dei rifiuti;
- i dati bibliografici.

Chiunque intenda effettuare un'emissione deliberata di OGM deve fornire al Ministero della salute ed al Ministero dell'ambiente e tutela del territorio, informando, nel contempo, gli altri Ministeri rappresentati nella CIVB, tutte le informazioni sopra indicate presentate sotto forma di notifica secondo criteri definiti dalla direttiva. Il notificante può chiedere che alcune informazioni vengano considerate confidenziali, a tutela del segreto industriale; tra queste non vi possono essere la descrizione della modifica genetica, il nome e l'indirizzo del notificante, lo scopo dell'emissione deliberata, la località dell'emissione, i metodi di controllo ed i piani di emergenza. Il Ministero della salute invia comunicazione di tutte le autorizzazioni concesse alle autorità regionali competenti per territorio. Insieme alla notifica viene presentato il *Summary Notification Information Format* (SNIF), che deve essere inviato alle autorità competenti degli altri Stati dell'UE. L'autorità competente ha 90 giorni di tempo per esaminare la notifica, valutare la sicurezza del rilascio, esprimere un parere scritto, rispondere alle richieste degli altri Stati dell'UE. Durante la fase del rilascio deliberato la Commissione interministeriale esegue ispezioni allo scopo di verificare la conformità degli esperimenti a quanto notificato ed alle prescrizioni formulate nell'autorizzazione al rilascio. Le ispezioni vengono effettuate da esperti designati dai Ministeri facenti parte della Commissione, iscritti in un apposito albo, ai sensi dell'art. 19 del decreto legislativo 92/93, formati con un corso specifico organizzato dalla CIVB e dal Ministero delle politiche agricole. Il Ministero delle politiche agricole ha recentemente affidato particolari compiti di controllo, in materia, ai servizi fitosanitari regionali (Decreto legislativo 18 maggio 2001, n. 228). Infine, il notificante al termine della fase sperimentale deve presentare una relazione all'autorità competente, preparata secondo linee guida predisposte dalla CIVB (<http://www.sanita.it/biotech>).

Una volta che l'OGM è stato sottoposto in modo soddisfacente alle prove di campo negli ecosistemi che potrebbero essere influenzati dal suo impiego, il fabbricante, che intenda immetterlo sul mercato per la prima volta, deve dimostrare, sulla base dei risultati dei precedenti rilasci, e di una documentazione scientifica appropriata, che la commercializzazione e l'uso dell'OGM o dei prodotti che lo contengono non presentano rischi per la salute umana, animale o per l'ambiente. Il fabbricante deve presentare una notifica all'autorità competente dello Stato Membro in cui l'OGM sarà commercializzato per la prima volta; notifica contenente tutte le informazioni richieste negli allegati II e III della direttiva ed in particolare

una valutazione del rischio per la salute umana, animale e per l'ambiente; le condizioni di immissione sul mercato, comprese le condizioni d'uso e di manipolazione; una proposta di etichettatura ed imballaggio. L'autorità competente che riceve per prima la notifica ha la responsabilità di effettuare la principale valutazione di impatto ambientale, entro 90 giorni dal ricevimento della notifica. Effettuata tale valutazione l'autorità competente può: 1) trasmettere il fascicolo alla Commissione della UE con parere favorevole; 2) richiedere ulteriori informazioni al notificante, interrompendo i termini; 3) respingere la notifica. In caso di parere favorevole, gli altri Stati Membri dispongono di un periodo di 60 giorni per valutare la notifica ed il parere emesso dal primo Stato Membro.

Se non vi sono obiezioni di fondo, la Commissione propone un modello di decisione favorevole con le indicazioni delle modalità d'uso e della etichettatura, sul quale gli Stati Membri si esprimono con una votazione scritta. Al termine del procedimento favorevole, la decisione viene pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale della UE ed il prodotto può circolare liberamente, ma non può essere ancora coltivato.

Il decreto legislativo 92/93 contiene una *clausola di salvaguardia*, stabilendo all'art. 16 che: *Qualora sussistono motivi per ritenere che un prodotto immesso sul mercato in conformità del presente decreto costituisce un rischio per la salute umana e per l'ambiente, il Ministro della sanità o il Ministro dell'ambiente, in base ai poteri loro rispettivamente attribuiti dalle vigenti disposizioni, dispone con ordinanza di limitarne o di proibirne provvisoriamente l'uso e/o la vendita sul territorio nazionale.* Tale decisione, che deve avere solide basi scientifiche, deve essere comunicata alla commissione dell'UE ed agli altri Stati membri. Questa clausola è stata adottata dal Ministro della sanità italiano nel caso del mais (Bt 176 della Novartis) resistente ai lepidotteri per la presenza della tossina del *Bacillus thuringiensis*, perché mancavano le evidenze sperimentali necessarie a valutare la possibilità di insorgenza di resistenza da parte degli insetti alla tossina Bt. Questo approccio è stato condiviso a livello comunitario, tanto che un gruppo di esperti è stato incaricato di sviluppare un protocollo per il monitoraggio delle resistenze a Bt e che specifici piani di monitoraggio sono previsti per tutti gli OGM nella nuova direttiva 2001/18/CE (G.U.CE n. L106 del 17 aprile 2001) che modifica la direttiva 90/220/CE recentemente approvata. A seguito dell'adozione del piano di monitoraggio da parte della Novartis, il Ministro della sanità ha revocato tale divieto d'uso.

La presenza di una legislazione orizzontale, basata sul principio del passo dopo passo al fine di individuare precocemente eventuali rischi derivanti dall'uso di OGM, lungi dall'aver tranquillizzato l'opinione pubblica, come forse avevano sperato i legislatori europei, ha visto l'intero settore rimesso in discussione da forze politiche e da varie organizzazioni ambientaliste e di consumatori.

Regolamentazione della sicurezza d'uso

Il regolamento 258/97 (G.U.CE n. L433 del 14 febbraio 1997), indicato come *novel food*, concernente la commercializzazione di nuovi alimenti, ed in particolare

di quelli derivanti da OGM, ha separato la valutazione della sicurezza d'uso in alimentazione umana ed animale dalla valutazione d'impatto ambientale. Il regolamento è stato completato dalla raccomandazione 618/97/CE, che ha stabilito quali informazioni scientifiche debbano essere presentate a sostegno della domanda di autorizzazione all'immissione sul mercato di nuovi prodotti o nuovi ingredienti alimentari. Presso il Ministero della salute (Direzione generale della sanità pubblica veterinaria, degli alimenti e della nutrizione) è stata istituita un'apposita Commissione interministeriale di coordinamento per la valutazione delle notifiche ai fini della commercializzazione dei nuovi prodotti e nuovi ingredienti alimentari, alla quale sono demandate le valutazioni di sicurezza d'uso degli OGM in alimentazione umana o animale.

Chiunque intenda ottenere l'immissione sul mercato di un OGM, o dei suoi prodotti presenta una domanda di autorizzazione allo Stato membro, sul cui territorio, vuole immettere, per la prima volta, il prodotto, inviando contemporaneamente copia di tale richiesta alla Commissione europea. Per la preparazione della documentazione scientifica necessaria a sostenere la domanda di autorizzazione di un nuovo alimento, il richiedente ha a disposizione una serie di linee guida, contenute nella Raccomandazione 618/97/CE e rielaborate, con maggior dettaglio (<http://europa.eu.int/comm/food>), dal Comitato scientifico per l'alimentazione umana (SCF), composto da esperti selezionati, mediante avviso pubblico aperto, solamente in base alla competenza tecnico-scientifica. La documentazione presentata deve contenere, oltre ai dati scientifici, necessari per verificare la sicurezza d'uso del prodotto anche, nel caso di prodotti ottenuti tramite l'applicazione delle tecniche del DNA ricombinante, che contengano o siano costituiti da OGM, la relativa valutazione dei rischi per l'ambiente prevista dalla Direttiva 90/220/CEE.

Le informazioni tecnico-scientifiche, richieste, devono poter consentire all'autorità competente, dello Stato destinatario della domanda, una valutazione sulla sicurezza d'uso del prodotto. Il risultato di tale valutazione iniziale, che deve essere formulata entro tre mesi dalla ricezione della domanda, viene, successivamente, trasmesso dalla Commissione Europea a tutti gli altri Stati membri, i quali, a loro volta, debbono formulare le proprie osservazioni o presentare obiezioni motivate all'immissione sul mercato del prodotto in esame, entro 60 giorni dal ricevimento della valutazione iniziale. Le eventuali osservazioni od obiezioni vengono fatte circolare dalla Commissione tra tutti gli Stati membri. Al termine del procedimento descritto, la Commissione formula una proposta di autorizzazione o diniego all'immissione in commercio del nuovo prodotto, che viene sottoposta al parere del Comitato permanente per i prodotti alimentari, nel quale siedono i rappresentanti degli Stati membri. Inoltre, la Commissione, per preparare il proprio progetto di decisione, si può avvalere dello SCF. Se in sede di Comitato permanente non viene espresso alcun parere, o la Commissione europea vuole adottare un parere difforme da quello espresso dal Comitato, l'intera materia viene sottoposta al Consiglio dei ministri UE, che delibera a maggioranza qualificata. A partire dall'entrata in vigore

del Regolamento, nessun alimento, contenente OGM, è stato autorizzato per l'alimentazione umana od animale nel territorio dell'UE. L'unica eccezione è rappresentata da quei prodotti ed ingredienti alimentari immessi sul mercato secondo le norme riportate nell'art. 5 del Regolamento citato. Secondo tale articolo infatti: quei prodotti «*che, sulla base dei dati scientifici disponibili ed universalmente riconosciuti o di un parere emesso da una delle autorità competenti, sono sostanzialmente equivalenti a prodotti alimentari esistenti per quanto riguarda la composizione, il valore nutritivo, il metabolismo, l'uso cui sono destinati ed il tenore di sostanze indesiderabili*» possono essere immessi direttamente sul mercato dal richiedente (previa autorizzazione dell'Autorità competente di uno Stato membro) con semplice comunicazione alla Commissione. Sono stati, così, autorizzati una serie di prodotti derivati dalla trasformazione industriale degli OGM come l'olio ottenuto dalla colza transgenica, o come la farina, l'amido, l'olio e lo sciroppo di glucosio ottenuto dal mais transgenico. La differenza tra le due procedure consiste nel fatto che, nel primo caso tutti gli Stati membri hanno accesso all'intera documentazione, mentre nel secondo solo gli esperti dello Stato membro interpellato garantiscono, per tutti gli altri, che l'alimento transgenico sia sostanzialmente equivalente alla sua controparte di riferimento. Il Governo italiano, tuttavia, ha vietato l'uso degli OGM negli alimenti destinati ai lattanti e bambini e, più recentemente, la commercializzazione dei prodotti dei quattro mais autorizzati in Europa perché considerati sostanzialmente equivalenti dall'autorità competente della Gran Bretagna.

L'etichettatura degli alimenti contenenti OGM

Il Regolamento 258/97 dell'UE prevede che il consumatore sia informato sulla presenza di organismi geneticamente modificati, ma la base giuridica per l'etichettatura è stata stabilita con il Regolamento 1139/98/CE che fissava come requisito, per i prodotti derivati da mais e soia transgenici, la presenza di DNA derivato dalle modificazioni genetiche. La larga diffusione delle colture transgeniche (55 milioni di ettari nel 2001) ha messo in luce il problema della contaminazione accidentale della filiera alimentare. Per tale motivo è stato stabilito, con il Regolamento 49/2000/CE, che la presenza di OGM negli alimenti debba essere indicata solo nei casi nei quali tale presenza sia superiore all'1%. La diffusione crescente delle coltivazioni OGM rende sempre più probabile la contaminazione accidentale dei semi, non OGM, utilizzati dagli agricoltori. Per tale motivo la Commissione UE e gli Stati membri stanno discutendo se fissare una soglia accettabile di contaminazione. Il Comitato Scientifico Piante (SCP) dell'UE ritiene, tuttavia, poco realistica la proposta della Commissione di fissare una soglia dello 0.3% per le piante autogame, come soia, riso e pomodoro ed una soglia dello 0.5% per le piante anemofile e/o entomofile, come mais e barbabietola (http://europa.eu.int/comm/food/index_en.html). Le maggiori difficoltà nello stabilire livelli di tolleranza derivano da: 1) il limite di sensibilità dei metodi analitici disponibili nelle analisi di routine è dello 0.1%; 2) i falsi

positivi rappresentano ancora circa il 25% dei campioni esaminati; 3) la variabilità delle proporzioni tra DNA OGM e DNA non-OGM, in campioni di laboratorio omogenei e ripetuti (*Nat. Biotech.* 2001, 19, 405); 4) la presenza nei campioni analizzati del virus del mosaico del cavolfiore, ubiquitario potendo infettare circa mille specie di piante diverse, che darebbe un risultato positivo nelle analisi che si limitano alla determinazione del solo promotore 35 S. A questo proposito la bozza della nuova direttiva sulla tracciabilità propone sia nuovi metodi di campionatura sia nuovi metodi analitici.

Regolamentazione per la coltivazione degli OGM autorizzati

La coltivazione di una qualunque semente diventa libera solo dopo specifiche prove agronomiche, propedeutiche per l'iscrizione della varietà in questione al Registro nazionale delle varietà, secondo le modalità stabilite dalla legge n. 1096/1971 che disciplina l'attività sementiera. Il Ministero per le politiche agricole e forestali, con circolare 36659 del 15 dicembre 1997, ha definito le prove agronomiche e di verifica della qualità per mais, soia e colture ortive OGM; prove che sono terminate con successo senza che questo comportasse, per decisione politica, l'iscrizione al Registro.

Il Governo italiano, recentemente, con il decreto legislativo 24 aprile 2001, N. 212, invocando il principio di precauzione, ha introdotto ulteriori vincoli alla coltivazione a fini commerciali degli OGM. Un agricoltore che voglia coltivare, nel nostro Paese, una pianta OGM, già autorizzata alla commercializzazione in Europa, secondo le modalità sopra descritte, deve avere il consenso del Ministro delle politiche agricole e forestali, di concerto con il Ministro dell'ambiente e tutela del territorio e del Ministro della salute, previo parere di una nuova Commissione per i prodotti sementieri di varietà geneticamente modificate. Tale Commissione esprime anche pareri vincolanti ai fini dell'iscrizione degli OGM al Registro nazionale delle varietà. Il D.P.R. n. 322 del 9 maggio 2001 ha istituito, successivamente un'apposita sezione del registro per le varietà geneticamente modificate. Lo stesso provvedimento stabilisce che i prodotti transgenici devono essere contenuti in imballaggi chiusi e sistemati in modo da essere separati dagli altri prodotti sementieri in aree identificate con «cartelli di dimensioni non inferiori a centimetri 15 per centimetri 30 recanti la dicitura «Prodotti Geneticamente Modificati».

VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA D'USO DEGLI OGM

La comparazione tra alimenti contenenti OGM ed alimenti esistenti

Il concetto di equivalenza sostanziale (ES), enunciato, nel 1991, dall'OCSE stabiliva che un alimento transgenico, che si potesse dimostrare essere essenzial-

mente equivalente, come composizione, ad un alimento esistente, era da considerarsi sicuro. Il concetto fu rielaborato, nel 1996, congiuntamente dalla FAO e dall'OMS che identificarono l'ES: *essere stabilita da una dimostrazione che le caratteristiche analizzate per l'organismo geneticamente modificato, o per lo specifico alimento da esso derivato, sono equivalenti alle stesse caratteristiche dell'organismo di paragone. I livelli e le variazioni delle caratteristiche dell'organismo transgenico devono essere all'interno delle variazioni delle stesse caratteristiche nell'organismo di paragone.* L'ES è quindi, piuttosto che un concetto o una formulazione scientifica, uno strumento analitico, flessibile, da utilizzare caso per caso, paragonando le caratteristiche dell'organismo progenitore con quelle dell'organismo geneticamente modificato. Al fine di facilitare le valutazioni delle autorità preposte, la Raccomandazione *novel food* fornisce un approccio strutturato in una serie di alberi decisionali concatenati. Seguendo quest'approccio strutturato si arriva a tre possibili scenari per il nuovo alimento.

— *L'equivalenza sostanziale è dimostrabile.* Questo caso occorre quando i geni inseriti non sono espressi nella parte commestibile della pianta, perciò non vi è differenza tra i prodotti alimentari derivati dalla pianta transgenica e quelli derivati da una pianta equivalente convenzionale.

— *Non vi è equivalenza sostanziale.* Questo caso occorre quando il gene inserito codifica per un carattere che modifica la pianta in modo significativo rispetto alla pianta progenitrice non modificata. Tale modifica potrebbe riguardare, ad esempio, una diversa composizione della pianta in proteine, oli o carboidrati, per i quali sono necessari test appropriati, basati sulle proprietà del nuovo alimento.

— *L'equivalenza sostanziale è dimostrata, eccetto che per la presenza di differenze ben definite.* In questo caso la composizione del nuovo alimento deve essere determinata con cura in relazione alla funzione ed ai prodotti d'espressione dei geni inseriti.

Occorre sottolineare il fatto che tutti i prodotti OGM attualmente in commercio ricadono in questa categoria. Sebbene i prodotti OGM siano presenti nel mercato USA dal 1995 e nel mercato europeo, limitatamente a colza, soia e mais, dal 1997, e siano stati consumati da milioni di persone, non è stato, finora, descritto un singolo caso di effetti sulla salute umana derivante dal consumo di tali prodotti. Le considerazioni sulla sicurezza d'uso in alimentazione umana ed animale di un OGM sono fondamentalmente le stesse che si possono fare per un organismo il cui genoma sia stato modificato con tecniche convenzionali come la selezione e l'incrocio, tuttavia il dibattito sugli OGM ha sensibilizzato l'opinione pubblica su alcuni temi come l'allergenicità, la resistenza agli antibiotici e il flusso genico. Le valutazioni di sicurezza dipendono in prima istanza dal gene inserito e dall'origine dello stesso. Alcuni dei geni più utilizzati, sono:

<i>Elemento(i) genico</i>	<i>Caratteristica ottenuta</i>	<i>Origine</i>
Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3A, Cry9C, Cry1F	Resistenza agli insetti	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Fosfinotricina N-acetiltransferasi	Resistenza all'erbicida glufosinato (Liberty)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> o <i>S. viridochromogenes</i>
5-Enolpiruvilscichimato-3-fosfato sintetasi (EPSPS)	Resistenza all'erbicida glifosato (Roundup Ready)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ceppo CP4; o enzima modificato endogeno del mais
Ribonucleasi barnase	Maschio sterilità	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Forma modificata della acetolattato sintetasi	Resistenza all'erbicida sulfonilurea	<i>Nicotiana tabacum</i>
δ -12 desaturasi	Modifica del profilo degli acidi grassi	<i>Glycine max</i> soppressione coordinata del gene endogeno
Nitrilasi	Tolleranza all'erbicida imidazolinone	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Ozanae</i>
Proteina del capsido	Resistenza al virus	Virus Y della patata

Tossicità

Le considerazioni che si possono fare per valutare la sicurezza d'uso di un OGM riguardano le proteine espresse, essendo il DNA identico a quello degli altri organismi viventi. La prima domanda da porsi è se la proteina ha una storia precedente d'uso sicuro. Ad esempio le δ -endotossine (Bt), codificate dal gene *cry*, che è stato inserito in una varietà di piante per proteggerle da lepidotteri e coleotteri, sono le stesse proteine, presenti nei ceppi di *Bacillus thuringiensis*, che sono state registrate come insetticidi microbici a partire dai primi anni '60. La specificità di queste tossine è tale che negli Stati Uniti gli spray a base di Bt sono, dal 1971, esenti da limiti di tolleranza. Quest'esenzione vuol dire che non vi sono limiti alla quantità di Bt che uomini ed animali possono consumare. Un'altra storia d'uso sicuro è rappresentata dall'enzima 5-enoilpiruvil-scichimato-3-fosfato sintetasi (EPSPS), che, nelle piante, nei funghi e nei batteri, è parte del *pathway* della biosintesi degli amminoacidi aromatici fenilalanina, tirosina e triptofano. Tale enzima è assente nell'uomo e negli animali [3], ma è presente negli alimenti di origine vegetale o microbica. L'enzima è stato utilizzato per conferire alle piante una tolleranza all'erbicida glifosato, capace di inibire selettivamente EPSPS.

La storia naturale delle infezioni virali nelle piante ha esposto l'uomo alle proteine dei virus vegetali, senza che siano stati mai associati, a tale esposizione, fenomeni di tossicità od allergenicità.

Tutti gli OGM, oggi in commercio, sono stati esaminati in numerosi studi d'alimentazione animale, che ne hanno confermato la sicurezza (una lista di referenze è disponibile nel sito <http://www.fass.org/REFERENC.htm>). Infine le proteine, espresse nelle piante transgeniche, sono state, una volta purificate, somministrate, per via orale, ad alta dose, ad animali di laboratorio, in studi di tossicità acuta, i cui risultati (rielaborati da <http://64.26.172.90/agbios/gmfeeds/php#>), espressi come NOEL (*no observed effect level*) sono riportati di seguito:

<i>Proteina</i>	<i>Pianta</i>	NOEL (mg/Kg peso corporeo)
Cry 1A	cotone, pomodoro	4200
Cry1Ab	mais	4000
Cry2Aa	cotone	3000
Cry2Ab	mais, cotone	3700
Cry3A	patata	5200
CP4 EPSPS	soia, cotone, colza, barbabietola, mais	572
mz EPSPS	mais	350
<i>npt II</i>	cotone, patata, pomodoro	5000
GOX	colza	100
ACC deaminasi	pomodoro	602
GUS	colza	100

(Abbreviazioni: Cry, sigle convenzionali delle tossine del *Bacillus thuringiensis*; EPSPS, 5-enolpiruvilschichimato-3-fosfato sintetasi; mz EPSPS, forma modificata dell'enzima presente nel mais; *npt II*, neomicina fosfotransferasi; GOX, glifosato ossidasi; ACC, acido 1-ammino-ciclopropan-1-carbossilico deaminasi; GUS, β -D-glucuronidasi).

In questi studi non sono stati osservati effetti dannosi negli animali ed i NOEL, riportati, ci consentono di calcolare che gli esperimenti sono stati condotti ad una concentrazione da mille ad un milione di volte superiore a quella che sarebbe l'assunzione da parte dell'uomo; assunzione basata sul consumo medio dell'alimento in questione. Infine, le proteine espresse non hanno potenziali effetti mutageni, teratogeni o cancerogeni [4].

Allergenicità

La maggior parte degli alimenti può causare reazioni avverse che sulla base del meccanismo possono essere classificate come allergiche, cioè risultanti da un evento immune (IgE mediato) e tutte le altre classificate come intolleranze alimentari [5]. Gli alimenti che più comunemente provocano allergie sono la frutta, il grano, i crostacei, le noccioline americane, le noci ed i vegetali della famiglia delle *Ombelliferae* [6]. Questi alimenti danno origine al 90% delle allergie alimentari, sebbene

siano noti almeno 160 alimenti associati a manifestazioni allergiche. Le reazioni allergiche sono solo il 20% di tutte le reazioni avverse agli alimenti [7]. La distribuzione delle allergie alimentari varia da paese a paese, essendo correlata strettamente alle abitudini alimentari. Nell'America del Nord le allergie alimentari colpiscono circa il 7% della popolazione adulta ed il 13% dei bambini, mentre in Europa i valori sono del 7% per i bambini e del 2% per gli adulti. Questi dati sono in netto contrasto con quella che è la percezione della popolazione sulle allergie alimentari. In molte indagini epidemiologiche, più del 30% della popolazione intervistata, ha dichiarato di essere allergico [8, 9]. Tuttavia quando gli intervistati erano sottoposti ad analisi cliniche appropriate questa percentuale diminuiva a meno del 2% negli adulti [10, 11] ed al 7% nei bambini [12]. Questi dati dimostrano che, fortunatamente, i sintomi nei bambini si attenuano o scompaiono del tutto durante la crescita. La percezione pubblica sulle allergie, oltre ad essere errata rispetto ai dati scientifici, è, tuttavia, trascinata nella direzione sbagliata dalla percezione, largamente amplificata dalla stampa, che le allergie siano in aumento. Non vi sono al momento, dati concreti per sostenere questa tesi per quanto concerne le allergie alimentari. Il miglioramento delle tecniche diagnostiche potrebbe spiegare un certo numero di allergie alimentari, che prima non erano individuate [13]. Inoltre nella dieta degli europei sono stati introdotti frutti esotici, come il kiwi che, nel nostro Paese, è diventato un allergizzante significativo [14].

Le variazioni nelle abitudini alimentari c'espongono a nuovi allergeni che consumiamo liberamente senza porci alcun interrogativo. Perché, allora dobbiamo avere il timore che l'introduzione di una nuova proteina, di cui conosciamo il ruolo biologico e le caratteristiche biochimiche dovrebbe avere un impatto significativo sull'allergenicità dei transgeni? A questa domanda sono state date delle risposte sperimentali [6, 15, 16]. Tali risposte riguardano:

- l'origine del gene inserito;
- le proprietà chimico-fisiche della nuova proteina;
- l'omologia di sequenza della nuova proteina con allergeni noti;
- la reattività della nuova proteina con le IgE prelevate dal siero di individui allergici alla sorgente del gene inserito;
- l'analisi *in vivo* (skin prick e double-blind placebo-controlled food challenge (DBPCFC)).

Per quanto riguarda l'origine del gene inserito non sono mai state descritte allergie dovute a: 1) *Bacillus amyloliquefaciens* da cui deriva l'enzima barnase che conferisce il carattere della maschio-sterilità; 2) *Streptomyces hygroscopicus* da cui deriva l'enzima fosfinotricina-acetil-transferasi che conferisce la resistenza all'erbicida glufosinato (Liberty); 3) *Agrobacterium sp.* ceppo CP4, origine dell'enzima 5-enolpiruvilsichimato-3-fostato sintetasi (EPSPS) che conferisce la resistenza all'erbicida glifosato (è da notare che tal enzima è presente in piccole quantità nella soia non trasformata, enzima che non rientra nei sei allergeni maggiori ed i quattro

minori propri della soia); 4) *Bacillus thuringiensis*, la cui tossina (Bt) conferisce la resistenza agli insetti. In più di cinque decenni d'uso di Bt nell'agricoltura biologica e nella lotta alla malaria non sono mai state descritte allergie alimentari dovute a questa tossina. Sebbene l'origine del gene clonato nelle piante possa essere classificato come non allergenico, è sempre necessaria una valutazione sperimentale rigorosa di quest'aspetto. Recentemente, ad esempio, sono state descritte forme di allergie respiratorie in lavoratori che utilizzavano Bt sotto forma di spray [17]. La reazione crociata fra allergie respiratorie ed alimentari suggerisce, perciò, di tenere sotto osservazione gli alimenti contenenti Bt, sebbene non siano stati indicate reazioni avverse in quei paesi dove il mais Bt è coltivato in modo estensivo.

Un altro elemento significativo da considerare è la concentrazione della nuova proteina, dato che, generalmente, è necessaria una concentrazione tra lo 0.1 e l'1% delle proteine totali per sensibilizzare un individuo [18], anche se alcuni reagiscono a quantità piccolissime di un particolare alimento [6]. La stabilità della proteina alle manipolazioni alimentari ed alle condizioni proteolitiche ed acide dello stomaco umano sono un altro requisito per l'allergenicità alimentare [19]. La stabilità ai succhi gastrici, per più di due minuti, consente alle proteine allergeniche di raggiungere la mucosa intestinale, dove può avvenire l'interazione con le IgE, presenti sulla superficie dei linfociti. Tutte le proteine transgeniche sottoposte all'esame del succo gastrico sono digerite in meno di 30 secondi, nelle prove effettuate in fluido gastrico simulato, a pH 2, secondo la *United States Pharmacopoeia*. Ad esempio, la concentrazione è inferiore allo 0.01% per quasi tutte le proteine espresse, solo mZEPSPS raggiunge lo 0.05%, e tutte sono digerite in meno di 15 secondi. Unica eccezione descritta è rappresentata dalla proteina Cry9C, espressa nel mais Starlink, che è stabile per più di 4 ore nelle stesse condizioni sperimentali. Per questa ragione la *Food and Drug Administration*, ne aveva limitato il consumo ai soli animali.

Altre caratteristiche comuni delle proteine allergeniche sono la solubilità, la glicosilazione, un peso molecolare compreso tra 10 e 40 kD e la sequenza amminoacidica [8, 9]. Oggi, si conoscono le sequenze di più di 200 proteine allergeniche e si ritiene che l'allergenicità sia legata a somiglianze di sequenza che coinvolgono almeno otto amminoacidi contigui [20]. Tali sequenze minime (epitopi), capaci di legare due molecole di IgE sulla superficie della membrana del linfocita, evento che dà origine alla reazione allergica, sono state identificate sia nei linfociti B sia nei linfociti T [21]. L'omologia degli epitopi è probabilmente la causa delle allergie incrociate [22].

In presenza di una somiglianza di sequenza amminoacidica tra proteina transgenica e allergeni noti, si può procedere ad ulteriori esami *in vitro* ed *in vivo*, come quelli previsti dalla raccomandazione 97/618/CE sui nuovi alimenti, la quale stabilisce che: *occorre valutare la possibilità di potenziali reazioni allergiche a nuove proteine od ad altri costituenti del nuovo alimento. Come norma generale si deve testare la reattività immunologica d'individui che reagiscono all'omologo alimentare tradizionale mediante esperimenti in vitro e in vivo con il nuovo alimento. Questi ultimi potreb-*

bero sollevare problemi di natura etica dei quali si deve tener conto. Se la nuova proteina è espressa da geni derivanti da una fonte risaputamente associata ad un'allergia alimentare, si può sottoporre il siero di individui allergici ad una serie di test immunologici specifici, ad esempio il Western blotting o il test di radioallergoassorbimento (RAST). Se l'esito del test *in vitro* è negativo si possono effettuare *in vivo* su queste persone test di sensibilizzazione cutanea o di stimolazione in doppio cieco con placebo, sotto controllo clinico. Tutti questi test debbono rispettare le regole di buona pratica clinica e di buona pratica di laboratorio. Vi sono alcuni fattori che possono fungere da indicatori di potenziale allergenico delle nuove proteine: una sequenza epitopa omologa a quella di allergeni noti, la stabilità termica, la sensibilità al pH, la digeribilità alle proteasi gastrointestinali, quantità individuabili nel plasma e peso molecolare; ulteriori indicazioni possono provenire dalle prove precedenti la commercializzazione e dal verificarsi di casi di sensibilizzazione tra gli addetti alla trasformazione.

Le prove richieste forniscono tutti gli elementi necessari a valutare gli effetti allergici o di ipersensibilizzazione dovuti al consumo di organismi transgenici. È chiaro che in presenza di risultati positivi ai test sopra indicati il prodotto non sarebbe autorizzato alla commercializzazione.

Resistenza agli antibiotici

La seconda valutazione di sicurezza riguarda il passaggio della resistenza agli antibiotici dall'OGM agli animali da allevamento ed all'uomo. I geni degli antibiotici sono stati utilizzati negli stadi iniziali dello sviluppo delle biotecnologie agricole per fornire un marcatore atto ad identificare *in vitro* le cellule trasformate geneticamente. I parametri da considerare per valutare il passaggio della resistenza agli antibiotici dalle piante geneticamente modificate alla flora batterica intestinale dell'uomo e degli animali sono:

- l'importanza dell'antibiotico in terapia umana e l'eventuale unicità;
- la frequenza d'uso;
- la somministrazione per via orale;
- la presenza di una pressione selettiva per la trasformazione;
- il livello di resistenza all'antibiotico nella popolazione batterica.

Il gene nptII. Il marcatore utilizzato con maggior frequenza nelle piante transgeniche è il gene *nptII*, che codifica per l'enzima amminoglicoside-3-fosotransferasi II (APH(3')II), che inattiva gli antibiotici amminoglicosidici, kanamicina, neomicina, gentamicina A e B [23, 24]. Questi antibiotici, tuttavia, sono usati poco frequentemente (sono utilizzati per la preparazione di pazienti prima della chirurgia addominale o nelle encefalopatie epatiche) non sono unici e non sono somministrati oralmente. Esperimenti condotti sia *in vivo* sia *in vitro* hanno dimostrato che l'enzima APH(3')II è sicuro, privo di tossicità o allergenicità [23]. È stato possibile calcolare che in una persona, che consumasse, al 90° percentile (mangiasse cioè più

alimento transgenico dello 89% del resto della popolazione), un alimento transgenico fresco, contenente *nptII*, la frequenza di trasformazione dei batteri intestinali sarebbe 3×10^{-15} trasformanti il giorno, cinque ordini di grandezza inferiore alla frequenza di mutazione per la resistenza alla kanamicina, dovuta alla replicazione cellulare [24]. Il consumo del transgenico, in altre parole, aggiungerebbe un batterio resistente il giorno ai 300.000 resistenti prodotti naturalmente durante un singolo ciclo di replicazione cellulare. Infine, non va sottovalutato il contributo di una dieta normale all'assunzione di batteri kanamicina resistenti. È stato dimostrato che con un'insalata ben lavata assumiamo almeno 1.2 milioni di batteri kanamicina resistenti [25] e che l'ingestione di altri batteri antibiotico-resistenti deriva dal consumo di alcuni formaggi [26].

Il gene bla. In Europa, il dibattito sui geni che conferiscono la resistenza agli antibiotici si è acceso quando è stata chiesta l'approvazione della commercializzazione del mais Ciba-Geigy (ora Novartis) Bt 176 contenente il gene *bla* Tem1, che codifica per un enzima, la β -lattamasi, che degrada gli antibiotici beta-lattamici, cui appartiene l'ampicillina. Tale gene, molto diffuso in natura (si conoscono almeno 30 microrganismi del terreno che lo contengono), non è espresso nella pianta. Tuttavia la β -lattamasi conferisce la resistenza non solo agli antibiotici β -lattamici, ma anche, ad una serie di inibitori dell'enzima stesso, che sono stati usati in terapia per riciclare l'ampicillina. A causa del valore dell'ampicillina in terapia, il problema del passaggio della resistenza agli antibiotici da alimento transgenico ai batteri intestinali è stato oggetto di un'analisi approfondita da parte di esperti dell'UE, il comitato scientifico per l'alimentazione umana (SCF) e quell'animale (SCAN) ed un *panel* di esperti nel trasferimento di materiale genetico da organismo ad organismo. Le conclusioni dei tre gruppi è stata che la probabilità di trasferimento del gene *bla* funzionale nei batteri gastrointestinali è praticamente eguale a zero. Ipotizzando lo scenario più favorevole al passaggio della resistenza agli antibiotici da una pianta transgenica ad un microrganismo si avrebbe un incremento, rispetto al passaggio che avviene naturalmente tra un microrganismo e l'altro, di 1/10 000 [27]. Tutte queste considerazioni valgono ovviamente per gli animali che consumano l'OGM crudo e non per l'uomo che con la cottura provoca la denaturazione delle macromolecole.

Il caso del mais Bt 176 è un buon modello per esaminare i possibili meccanismi di trasferimento della resistenza all'ampicillina. Il gene *bla* Tem1 è clonato nel vettore pUC18, ed il risultante costruito è integrato nel genoma del mais. In assenza di ulteriori informazioni, dobbiamo assumere che il vettore ed il gene *bla* siano intatti ed inalterati, anche se le piante inattivano i geni estranei, con meccanismi come la metilazione, una volta che la pressione selettiva per mantenere tali geni sia rimossa [28].

Il trasferimento della resistenza all'antibiotico da pianta a batterio richiede almeno quattro passaggi: 1) il DNA rilasciato dal mais deve sopravvivere all'attacco delle nucleasi della pianta e dei batteri; 2) il DNA deve essere assorbito dal batte-

rio; 3) il DNA deve essere integrato nel genoma dell'ospite od essere inserito in un plasmide; 4) il gene deve essere espresso e la proteina risultante deve essere funzionale. I meccanismi possibili sono due, la ricombinazione omologa, tra due copie di pUC18 integrate in tandem nel genoma del mais, e la ricombinazione illegittima, che non richiede regioni fiancheggiatrici omologhe. La ricombinazione omologa è un evento piuttosto raro, riguardando solo una cellula su 10.000 od anche meno [29]. La ricombinazione illegittima è stata osservata solamente nello *Haemophilus influenzae* con un'efficienza che è 100 volte inferiore a quella della ricombinazione omologa [30]. Questi possibili meccanismi richiedono che pUC18 sopravviva alla digestione da parte delle nucleasi del mais, molto attive all'atto della rottura della cellula, e a quelle dei batteri del ruminante o dell'intestino. La digestione produrrà del DNA in frammenti piccoli e lineari, dove pUC18 rappresenterà una piccolissima frazione, essendo un milionesimo del DNA totale della cellula del mais. Esperimenti con DNA modello in animali hanno dimostrato che la maggior parte del DNA recuperato nelle feci ha dimensioni intorno a 400 paia di basi ed una minuscola frazione con dimensioni intorno a 1.7 Kb [31]. Mentre questi esperimenti possono causare ulteriori dubbi sul destino ecologico del DNA, è interessante notare che gli autori li considerano invece capaci di mitigarli. A questo proposito, è interessante notare che la lunghezza minima di replicazione del gene *bla* insieme all'*orf* di pUC18 è 1.7 Kb. Assumendo che pUC18 non subisca modificazioni nel genoma della pianta e che sia assorbito intatto, bisogna ricordare che lo stesso ha un numero di ospiti molto ristretto e che si replica solo in *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, ma non negli anaerobi [32], che nel tratto gastroenterico sono da 100 a 1.000 volte più numerosi di *E. coli*. In questa situazione dobbiamo, altresì, considerare che i batteri enterici sono incapaci di trasformazione naturale, tant'è vero che sono stati sviluppati metodi fisici e chimici per costringere *E. coli* ad inglobare il DNA. Infine, il cattivo uso degli antibiotici in medicina ha portato allo sviluppo a forme di β -lattamasi più resistenti [33] di quelle codificate dal gene *bla* TEM1, che codifica per una forma più antica di β -lattamasi.

L'amplificazione mediatica sull'uso di geni per la resistenza agli antibiotici, come geni marcatori nelle piante, ha dirottato l'attenzione da quello che è il vero problema e cioè il cattivo uso degli antibiotici stessi in terapia e nell'alimentazione animale.

AMBIENTE E OGM

Flusso genico

Una delle prime preoccupazioni sollevate alla comparsa delle piante geneticamente modificate è stata la possibilità che queste potessero diventare (o dare origine) a delle infestanti negli *habitat* agricoli o naturali [34]. Nell'ambito di questa presentazione considereremo come infestante una pianta capace di persistere in ambienti coltivati o disturbati dall'uomo, e con caratteristiche strutturali e fisiologi-

che tali da avere un vantaggio competitivo sulle altre piante presenti nello stesso ambiente. Perché possa verificarsi un incrocio tra pianta geneticamente modificata ed un'infestante, occorre che le due piante siano sessualmente compatibili e che il nuovo materiale genetico sia integrato stabilmente. Fenomeno poco frequente, perché sappiamo esistere un meccanismo di incompatibilità, che funziona come una barriera, tra piante coltivate e parenti selvatiche [35]. Tale meccanismo è stato osservato anche con piante transgeniche. Trasferendo meccanicamente il polline da *Brassica napus* L, contenente il gene *bar*, che conferisce la resistenza all'erbicida Basta, nel ravanello selvatico (*Raphanus raphanistrum*) il numero di ibridi interspecifici diminuiva ad ogni generazione successiva, dimostrando, così, che la probabilità di trasferimento genico stabile è molto bassa [36].

Un altro elemento da considerare è il modo con cui la pianta è fecondata. Il pomodoro, la soia ed il riso si riproducono per auto-impollinazione, perciò nel loro caso la probabilità che trasferiscano geni ad infestanti o parenti selvatiche è irrilevante. Per piante come il mais, per il quale il principale impollinatore è il vento, studi anche recenti, hanno dimostrato come a distanza di 5 metri dal bordo del campo la quantità di polline di mais rilevabile sia in pratica vicino allo zero [37].

<i>Pianta</i>	<i>Produzione del polline</i>	<i>Vitalità del polline</i>	<i>Impollinazione</i>
Mais	6-10 giorni	10-30 min	95% anemofila
Pomodoro	2-3 giorni	24-48 ore	Autogama
Riso	2.5 ore	3-5 min	Autogama
Melanzana	2-3 giorni	24-38 ore	60% autogama
Soia	24-48 ore	nd	Autogama
Colza	4-10 giorni	nd	70% autogama

Il terzo elemento da considerare è la presenza o meno di piante parenti selvatiche della specie coltivata. In Italia, ad esempio, non hanno parenti selvatiche il mais, la soia, la fragola, l'uva, il frumento, mentre le hanno il riso, il lino, la barbabietola, la cicoria, la melanzana.

<i>Flusso genico previsto</i>	<i>Pianta</i>
Nessuno	Mais, frumento, fragola, vite, soia
Limitato e localizzato	Melanzana*, patata, pomodoro, zucchini
Significativo ma localizzato	Girasole, orzo
Significativo e diffuso	Barbabietole, colza, riso, lattuga, lino, cicoria

*Anche la presenza di parenti selvatiche non consente di concludere, in assenza di prove sperimentali, che vi sia trasferimento genico. Ad esempio i tentativi di trasferimento del transgene da una melanzana modificata ad una non modificata hanno ottenuto risultati positivi in meno dello 0.1% dei casi (A. Spena, Università di Verona, comunicazione personale).

L'ultima caratteristica da valutare è la natura del gene inserito. Il gene della maschio-sterilità non conferirà alcun vantaggio competitivo ad un'infestante, altri geni come la resistenza agli erbicidi daranno vantaggi solo nelle condizioni di pressione selettiva delle aree coltivate, mentre il gruppo di geni che danno resistenza a malattie o parassiti possono essere vantaggiosi anche per le infestanti. Combinando tutte le caratteristiche sopra delineate, è possibile calcolare la probabilità di flusso genico verticale tra organismi sessualmente compatibili, durante un esperimento di rilascio deliberato di piante transgeniche. Tale studio, che ha riguardato i rilasci effettuati in Europa, conclude che il 91% dei rilasci non comporta alcun flusso genico e che il 9% dei rilasci potrebbe avere un limitato impatto ambientale [38]. In questi casi possono essere adottate misure, come la distanza o l'emascolazione per ridurre ulteriormente la probabilità di flusso genico.

L'introduzione delle piante transgeniche in agricoltura ha suggerito l'ipotesi della possibile esistenza di un flusso genico orizzontale, con un meccanismo non sessuale, tra pianta e microrganismi del suolo. Tale flusso è molto ben documentato tra batteri, ed ha come caratteristica principale quella di richiedere un'omologia di sequenza tra il genoma del batterio ricevente ed il DNA inserito [39, 40]. La divergenza nelle sequenze, il differente *pattern* di metilazione e la preferenza per una terza base nei codoni, sono i meccanismi molecolari, che hanno evitato, nel corso dell'evoluzione, il flusso genico tra piante e batteri. L'introduzione nelle piante transgeniche di sequenze batteriche, come quelle che codificano per la resistenza agli antibiotici, ha stimolato una serie di ricerche per verificare se l'ipotesi di un flusso genico orizzontale fosse plausibile nel caso delle piante transgeniche. Il DNA transgenico, derivante dalla lisi cellulare, o per rottura meccanica o per attacco di microrganismi patogeni, persiste, infatti, libero nel terreno per lunghi periodi, anche dopo che la pianta transgenica è stata rimossa [40]. Tuttavia, gli esperimenti, finora condotti, non hanno dimostrato una trasformazione stabile nei batteri co-incubati con le piante transgeniche [41, 42].

La resistenza alla tossina del Bacillus thuringiensis (Bt)

Le tossine Bt sono una famiglia di proteine tossiche prodotte, in natura, sotto forma d'inclusioni cristalline, durante la sporulazione, dal *Bacillus thuringiensis*. Quando una larva di un insetto suscettibile (Lepidotteri, Ditteri, e Coleotteri) mangia una spora, questa è degradata nei suoi componenti proteici che, legandosi a recettori specifici dello stomaco, ne distruggono l'epitelio. Miscele di batteri, spore e cristalli parasporali sono state usate, per più di 50 anni, per controllare gli insetti bersaglio. Le tossine Bt sono innocue per le altre specie d'insetti e per i vertebrati e la loro azione è stata, per molti anni, ritenuta transeunte, perché degradate rapidamente nell'ambiente. Stotzky, invece, ha dimostrato che la tossina si lega rapidamente alle particelle del suolo, legame che la protegge dall'attacco degli organismi del suolo, conservando le proprietà larvicide [43]. Con preparati commerciali

di tossina ha potuto osservare che il legame della tossina con le particelle del suolo, probabilmente a causa dell'alto peso molecolare, è limitato, l'accumulo nel terreno più lento e la degradazione più veloce. In alcuni terreni, sia con metodi immunologici sia larvicidi, ha potuto dimostrare la presenza di tossina, cinque anni dopo il trattamento con preparati commerciali di Bt.

Stotzky ha studiato, anche, gli essudati radicali di molte piante transgeniche contenenti Bt. I suoi risultati dimostrano che solo il mais è in grado di rilasciare nel suolo la forma attiva di Bt, che ha un peso molecolare di 66 kDa [44]; tutte le altre piante studiate, come riso, cotone, patata, zucchini rilasciano solo amminoacidi liberi e piccoli peptidi (al massimo tetrapeptidi). Il mais differisce dalle altre piante per una particolare proteina *signal* coinvolta nel rilascio. La proteina Bt, rilasciata dalle radici del mais, è legata molto rapidamente dalle particelle del suolo conservando le proprietà larvicide. La stabilità è più elevata in terreni acidi perché questi hanno un'attività microbica minore. In questi esperimenti, tuttavia, non sono stati trovati effetti degli essudati su batteri, actinomiceti, funghi, protozoi, nematodi, vermi (*Lumbricus terrestris*) del suolo. Inoltre la tossina non è assorbita da piante coltivate in terreni nei quali, in precedenza, era stato coltivato mais Bt.

La persistenza così breve nell'ambiente fa della tossina Bt il pesticida d'elezione in agricoltura biologica, dove tempi d'applicazione, concentrazioni ecc., devono essere strettamente supervisionati. La supervisione propria dell'agricoltura biologica ha fatto sì che non siano, fino a questo momento, comparse forme di resistenza a Bt, analoghe a quelle osservate con alcuni pesticidi chimici. Una supervisione stretta non è possibile nell'agricoltura industriale, la quale, perciò, non ha mai fatto uso di Bt. L'introduzione diretta di Bt nelle piante ha cambiato questo scenario, esponendo la popolazione d'insetti bersaglio a Bt, non più per un periodo limitato, ma durante l'intera vita della pianta. Tal esposizione può provocare la selezione d'individui resistenti, il cui numero può aumentare con le generazioni successive, diminuendo, così, l'efficacia di Bt come pesticida. Per questo motivo, nel 1997, il *Comitato interministeriale di coordinamento per le biotecnologie*, raccomandò la sospensione dell'utilizzo, in Italia, del mais Novartis Bt176, fino a quando non fosse adottato un appropriato piano di sorveglianza. Il piano, adottato in seguito anche dall'Unione Europea, è stato attuato dall'«*Istituto di Entomologia Agraria dell'Università di Milano*». Il piano ha come scopo di misurare la suscettibilità di base a Bt della piralide (*Ostrinia nubilalis* Hb), determinare se vi siano cambiamenti nella suscettibilità con il tempo e predire l'eventuale insorgenza di resistenza. La sorveglianza, finora, non ha rilevato differenze tra insetto bersaglio ed altri insetti, che si trovano nei campi di mais [45, 46].

Allo scopo di mantenere la situazione attuale di bassa o nulla resistenza degli insetti bersaglio a Bt, sono necessari sia i piani di sorveglianza sia adeguate misure di supervisione. Queste ultime derivano da modelli matematici, che ritengono necessaria la presenza di almeno 500 individui suscettibili per ogni individuo resistente, al fine di diluire gli alleli resistenti ad un livello tale da mantenere intatta la

suscettibilità [44]. Il modello matematico ha originato la strategia dell'*alta dose/rifugio strutturato*. Un'alta dose, come quella espressa nelle piante transgeniche, pari a 25 volte la dose necessaria ad uccidere gli insetti suscettibili, rende improbabile la comparsa di resistenze, che sono, quasi sempre, dovute ad esposizioni, ripetute, a basse dosi. Il rifugio strutturato è un'area contenente piante parenti alle transgeniche, co-coltivate con quest'ultime. Dimensioni e posizione dei rifugi strutturati dipenderanno, caso per caso, dal tipo di insetto bersaglio, dai suoi movimenti, dalle modalità di ovideposizione, dai comportamenti riproduttivi, dalla sua distribuzione a livello locale. Solo una piccola parte dell'entomofauna è stata finora esposta a Bt, e per questa ragione abbiamo bisogno di molti studi per valutare a pieno gli effetti delle piante Bt nei nostri habitat.

La situazione italiana

In Italia, nel considerare i rischi ed i benefici derivanti dalle biotecnologie agrarie, è stato utilizzato in senso estensivo il cosiddetto principio di precauzione. Questo concetto, nato, nel 1992, nella Conferenza di Rio su Ambiente e Sviluppo, come *precautionary approach* (metodo per affrontare) è diventato per l'UE *precautionary principle*. Sebbene le basi giuridiche del principio di precauzione siano ancora fragili, l'applicazione dello stesso, a differenza del metodo per affrontare, può prescindere dalla valutazione scientifica del rischio. Nel principio, a differenza del metodo per affrontare, è implicito che ogni cambiamento (e quindi ogni danno) sia irreversibile e che la gravità del rischio sia un concetto soggettivo. La trasformazione, certamente non semantica, del metodo per affrontare in principio di precauzione, ha portato ad una separazione tra fatti e valori, tra tecnici e politici, che ignorando i metodi scientifici di misura e valutazione del rischio hanno attribuito un valore virtuoso al principio stesso.

Il Governo italiano, applicando il principio di precauzione, ha vietato l'uso degli OGM negli alimenti destinati ai lattanti e bambini e, più recentemente, la commercializzazione dei prodotti dei quattro mais autorizzati in Europa perché considerati sostanzialmente equivalenti dall'autorità competente della Gran Bretagna.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Meldolesi A. (2001). *Organismi Geneticamente Modificati Storia di un Dibattito Truccato*. Giulio Einaudi, Torino.
- [2] Hubner P. (1983). Exorcists vs. gatekeepers in risk regulation. *Regulation*, 7, 23-32.
- [3] Steinrucken H.C. & Amrhein N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimate-5-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 94, 1207-1212.
- [4] HAMMOND B.G. (1997). Assessment of potential protein toxicity, in: *Report of the OECD Workshop on the Toxicological and Nutritional testing of Novel foods*. Aussois, France 5-8 March 1997. OECD, Paris.

- [5] Bindsley-Jensen C., Skov P.S., Madsen F. & Poulsen L.K. (1994). Food allergy food intolerance-what is the difference? *Ann. Allergy*, 72, 317-320.
- [6] Anon. (1995). Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies. Rome.
- [7] Chandra R.K., Gill B. & Kumani S. (1995). Food allergy and atopic disease. Introduction and overview. *Clin. Rev. Allergy & Immunol.*, 13, 293-314.
- [8] Lehrer S.B., Horner W.E. & Reese G. (1996). Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, 553-564.
- [9] Bender A.E. & Matthews D.R. (1981). Adverse reactions to foods. *Br. J. Nutr.*, 49, 403-407.
- [10] Burr M.L. & Merret T.G. (1983). Food intolerance: a community survey. *Br. J. Nutr.*, 49, 217-219.
- [11] Jansen J.J., Kardinal A.F., Huijbers G., Vlieg-Boerstra B.J., Martens B.P. & Ockhuizen T. (1994). Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 93, 446-456.
- [12] Bock S.A. (1987). Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*, 79, 683-688.
- [13] Roitt I.M. (1994). *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications, London.
- [14] Pastorello A.E., Pravettoni N., Ispano M., Farioli L., Ansaloni R., Rotondo F., Incovaia C., Asman I., Bengtsson A. & Ortolani C. (1996). Identification of the allergenic component of kiwi fruit and evaluation of their cross-reactivity with timothy and birch pollens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 98, 601-610.
- [15] Anon. (2001). Second Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology – Allergenicity of Genetically Modified Foods. *FAO/WHO*, Rome.
- [16] Metcalfe D.D., Astwood J.D., Townsed R., Sampson H.A., Taylor S.L. & Fuchs R.L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit. Rev. Sci. Food Sci. Nutr.*, 36, S165-S186.
- [17] Bernstein I.L., Bernstein J.A., Miller M., Tierzeva S., Bernstein D.I., Lummus Z., Selgrade M.K., Doerfler D.L. & Seligy V.L. (1999). Immune Response in Farm Workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* Pesticides. *Environ. Health Perspect.*, 107, 575-582.
- [18] Fuchs R.L. & Astwood J.D. (1996). Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technol.*, 50, 83-88.
- [19] Astwood J.D., Leach J.N. & Fuchs R.L. (1996). Stability of food allergenes to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1269-1273.
- [20] Kaminogawa S. (1996). Food allergy, oral tolerance and immunomodulation. Their molecular and cellular mechanisms. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1749-1755.
- [21] Romagnani S. & Mohapatra S.S. (1996). Human T-cell responses to grass pollen allergenes, in: *Pollen biotechnology. Gene expression and characterisation* (Mohapatra S.S. & Knox R.B. Eds.), Chapman & Hall, New York, pp. 164-175.
- [22] Nielsen K.M., Gebhard F., Smalia K., Bones A.M. & van Elsas, J.D. (1997). Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 815-821.
- [23] Calgene Inc. CA USA (1990). Request for advisory opinion “Kan” gene safety and use in the production of genetically engineered plants. FDA Docket Number 90A-O416.
- [24] Davies J.E. (1986). Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. In: *Antibiotics in laboratory medicine 2nd ed.* (Lorian V., ed.) London, pp. 790-809.
- [25] Flavell R.B., Dart E., Fuchs R.L. & Fraley R.T. (1992). Selectable marker genes: safe for plants? *Biotechnol.*, 10, 141-144.
- [26] Teuber M., Perreten V. & Wirsching F. (1996). Antibiotikumresistente bakterien: eine neue dimension in der lebensmittel-mikrobiologie. *Lebensmittel-Teknologie*, 29, 182-189.
- [27] Anon. (1998). Antibiotic Resistance Transfer between Genetically modified Plants and Micro-organisms. EU XI/E.2 Chemical Substances and Biotechnology.

- [28] McElroy D. & Bretell R.I. (1994). Foreign gene expression in transgenic cereals. *Tibtech*, 12, 62-68.
- [29] Zawadzki P., Roberts M.S. & Cohen F.M. (1995). The long-linear relationship between sexual isolation and sequence divergence in *Bacillus* transformation is robust. *Genetics*, 140, 917-932.
- [30] Pifer M.L. (1986). Plasmid establishment in competent *Haemophilus influenzae* occurs by illegitimate transformation. *J. Bacteriol.*, 168, 683-687.
- [31] Schubbert R.C., Lettman R.C. & Doerfler W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.*, 242, 495-504.
- [32] Sakyers A.A. & Shoemaker N.B. (1987). Genetics of human colonic bacteria, in: *Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*, vol. 2 (Mackie R., White B.A. & Isaacson R., eds.), Chapman & Hall, pp. 299-320.
- [33] Medeiros A.A. (1977). Evolution and dissemination of beta-lactamase accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.*, 24, 519-545.
- [34] Rissler J. & Mellon M. (1993). Perils amidst the promise. Ecological risks of transgenic crops in a global market. *Union of Concerned Scientists*, Cambridge, MA, USA.
- [35] Ellstrand N.C., Prentice C. & Hancock J.F. (1999). Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 30, 539-563.
- [36] Chevre A.M., Eber F., Baranger A. & Renard M. (1995). Gene flow from transgenic crops. *Nature*, 389, 924.
- [37] Pleasant J.M., Hellmich R.L., Dively G.P., Sears M.K., Stanley-Horn D.E., Mattila H.R., Foster J.E., Clark T.L. & Jones G.D. (2001). Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11919-11924.
- [38] Goy P.A. & Duesing J.H. (1996). Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Biotechnology*, 14, 39-40.
- [39] Logan P. (1999). A Review of Gene Transfer from Genetically-modified Micro-organisms. *Health & Safety Executive Research Report*, Merseyside, UK.
- [40] Widmer F., Seidler R.J., Donegan K.K. & Reed G.L. (1997). Quantification of transgenic marker gene persistence in the field. *Mol. Ecol.*, 6, 1-7.
- [41] Nielsen K.M., Bones A.M., Smalla K. & van Elsas J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria- a rare event? *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 79-103.
- [42] Droge M., Puhler A. & Selbitscka W. (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *J. Biotechnol.*, 64, 75-90.
- [43] Tapp H. & Stotzky G. (1995). Insecticidal Activity of the Toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* Adsorbed and Bound to Pure and Soil Calyx. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1786-1790.
- [44] Saxena D., Flores S. & Stotzky G. (1999). Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 402, 480.
- [45] Lozzia G.C. & Rigamonti L.E. (1996). Behaviour of the European corn Borer, *Ostrinia nubilalis* Hb on transgenic corn. *Boll. Zool agr. Bachic.*, 25, 51-69.
- [46] Lozzia G.C., Furlanis C., Manachini B. & Rigamonti L.F. (1998). Effects of Bt corn on *Rhopalosiphum padi* L. (Rhyncota Aphidiae) and on its predator *Crysoperla carnea* (Neuroptera Chrysopidae). *Boll. Zool agr. Bachic.*, 30, 153-164.
- [47] EPA & USDA (1999). EPA & USDA Position Paper on Insect Resistance Management in Bt Crops. http://www.epa.gov/pesticides/bipesticides/otherdocuments/bt_position_paper_618.htm