

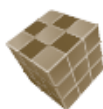


# RAPPORTI ISTISAN 16|34

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## **Piante geneticamente modificate: queste sconosciute?**

L. Nicolini, R. Onori, N. Pogna, E. Sturchio, G. D'Agnolo



AMBIENTE  
E SALUTE



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

## Piante geneticamente modificate: queste sconosciute?

Laura Nicolini (a), Roberta Onori (b), Norberto Pogna (c),  
Elena Sturchio (d), Giuliano D'Agnolo (e)\*

*(a) Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(c) Esperto dell'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Roma*

*(d) Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti,  
Prodotti ed Insedamenti Antropici, Istituto Nazionale per l'Assicurazione  
contro gli Infortuni sul Lavoro, Roma*

*(e) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*\* in quiescenza dal 2007*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**16/34**

Istituto Superiore di Sanità

**Piante geneticamente modificate: queste sconosciute?**

Laura Nicolini, Roberta Onori, Norberto Pogna, Elena Sturchio, Giuliano D'Agnolo  
2016, v, 283 p. Rapporti ISTISAN 16/34

Il presente rapporto analizza lo stato delle conoscenze scientifiche relativamente al rilascio ambientale ed alla sicurezza d'uso delle Piante Geneticamente Modificate (PGM), esaminando sia i potenziali benefici sia i rischi documentati dalle ricerche scientifiche. L'analisi effettuata rileva come tutte le PGM vadano valutate caso per caso confrontando tra loro le stesse cultivar prodotte con l'ingegneria genetica, con quelle usate nell'agricoltura convenzionale e nell'agricoltura biologica. Ad oggi è possibile affermare che l'aumento della superficie coltivata a PGM ha esposto un numero crescente di persone al consumo di alimenti GM senza che siano stati descritti effetti negativi per la salute. Invece, dal punto di vista dell'impatto ambientale, l'uso di PGM resistenti all'erbicida ha favorito l'insorgenza di piante infestanti resistenti all'erbicida stesso. A fronte di queste osservazioni, l'analisi scientifica dimostra però che la convinzione che esista incompatibilità tra la produzione di alimenti tipici di qualità e la coltivazione di PGM, non è del tutto corretta; infatti, grazie all'impiego di tecnologie sempre più sofisticate unite alle modalità di coltivazione, l'uso delle biotecnologie potrebbe dare un contributo decisivo per recuperare varietà vegetali a rischio di estinzione e produrre nuove varietà interessanti dal punto di vista nutrizionale o ambientale.

*Parole chiave:* Piante geneticamente modificate; Effetti sulla salute umana ed animale delle PGM; Impatto ambientale

Istituto Superiore di Sanità

**Genetically modified plants: are they really unknown?**

Laura Nicolini, Roberta Onori, Norberto Pogna, Elena Sturchio, and Giuliano D'Agnolo  
2016, v, 283 p. Rapporti ISTISAN 16/34 (in Italian)

This report analyzes the state of scientific knowledge relating to the environmental release and the safe use of Genetically Modified Plants (GMPs), examining both the potential benefits and the risks documented by scientific research. The analytical approach states that all GMPs should be assessed on a case by case basis comparing the same cultivars which have been produced by genetic engineering, with those used in conventional agriculture and in organic farming. The exponential increase of the area planted with GM has exposed a growing number of people to the consumption of GM foods without any adverse effect to health having been described; the same cannot be said for the environment with regard to GMP herbicide-resistant. In fact, this latter application, has favoured the emergence of weeds resistant to the herbicide itself. However, in view of these observations, scientific analysis shows that the belief that there is incompatibility between the production of typical quality food and the cultivation of GMPs is not completely correct because thanks to the use of new sophisticated technology and appropriate cultivation methods, biotechnology could contribute decisively to recover plant varieties under threat of extinction and produce novel varieties interesting from a nutritional or environmental point of view.

*Key words:* Genetically modified plants; Effects on human and animal health of GMP; Environmental impact

Si ringrazia Antonella Torrice per il prezioso lavoro di *editing* nella preparazione del presente rapporto.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [laura.nicolini@iss.it](mailto:laura.nicolini@iss.it), [giuliano.dagnolo@guest.iss.it](mailto:giuliano.dagnolo@guest.iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Nicolini L, Onori R, Pogna N, Sturchio E, D'Agnolo G. *Piante geneticamente modificate: queste sconosciute?* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/34).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



*Genetically modified crops are presented as an essential straightforward development that will increase yields through techniques which merely extend traditional methods of plant breeding. I am afraid I cannot accept this... I believe that this kind of modification takes mankind into realms that belong to God, and God alone.*

Carlo, Principe di Galles  
in "Seeds of disaster", Daily Telegraph, 1998

*Spetta ai prelati, ai nobili, ai grandi funzionari dello Stato essere depositari e custodi delle verità conservatrici; insegnare alle nazioni quel che è bene; quel che è vero e quel che è falso nell'ordine morale e spirituale. Gli altri non hanno il diritto di ragionare su questo genere di argomenti. Hanno le scienze naturali per divertirsi. Di che cosa potrebbero lagnarsi.*

di Joseph De Maistre in "Soirées de Saint-Petersbourg", 1821

*Il Re di Brobdingnag... diceva di essere persuaso che chi riusciva a far crescere due pannocchie, o due fili d'erba in una zolla in cui prima ne cresceva uno solo era più benemerito dell'umanità e rendeva maggior servizio al proprio Paese che non tutta la razza dei politicanti messa insieme.*

Jonathan Swift in "I viaggi di Gulliver", 1726



# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	1
Bibliografia .....	6
<b>1. Aspetti generali della valutazione della sicurezza d'uso delle PGM nell'alimentazione umana e animale</b> .....	9
1.1. Equivalenza sostanziale.....	12
1.2. Mais Bt e micotossine .....	14
1.3. Conclusioni .....	15
Bibliografia .....	15
<b>2. Ricombinazione naturale nelle piante e inserimento del DNA transgenico</b> ....	23
Bibliografia .....	25
<b>3. Effetti non previsti dovuti all'inserzione del transgene</b> .....	28
Bibliografia .....	30
<b>4. Alimentazione animale con PGM</b> .....	34
4.1. Destino del DNA transgenico .....	34
4.1.1. Degradazione del DNA dopo il raccolto .....	35
4.1.2. Valutazione dell'assunzione di DNA transgenico.....	36
4.1.3. Sperimentazioni animali sul destino del DNA transgenico ingerito .....	36
4.2. Destino delle proteine transgeniche .....	38
4.3. Conclusioni .....	39
Bibliografia .....	39
<b>5. Tossicità delle proteine transgeniche espresse dalle PGM</b> .....	50
5.1. Tossicità del DNA e delle proteine transgeniche .....	52
5.1.1. Tossicità delle proteine Cry sugli organismi non target.....	54
5.1.2. Controversie riguardanti gli studi tossicologici di Seralini .....	55
5.1.3. Il caso degli effetti del mais GM sulla fertilità.....	56
5.2. Conclusioni .....	57
Bibliografia .....	57
<b>6. Allergenicità delle PGM</b> .....	61
6.1. Storia dell'uso sicuro della pianta come alimento .....	63
6.2. Origine del gene inserito.....	64
6.3. Proprietà chimico-fisiche delle proteine espresse .....	65
6.4. Omologia di sequenza.....	67
6.5. Saggi <i>in vitro</i> .....	69
6.6. Saggi <i>in vivo</i> .....	70
6.7. Modelli animali.....	70
6.8. Il caso del mais Starlink.....	71
6.9. Il caso della papaia resistente al virus .....	72
6.10. Il caso del pisello resistente agli insetti.....	72

6.11. Il caso della fragola al pesce artico .....	73
6.12. Conclusioni .....	73
Bibliografia .....	74
<b>7. Geni marcatori per la resistenza agli antibiotici .....</b>	<b>84</b>
7.1. Geni per la resistenza agli antibiotici del Gruppo I .....	86
7.2. Geni per la resistenza agli antibiotici del Gruppo II .....	87
7.3. Geni per la resistenza agli antibiotici del Gruppo III .....	90
7.4. Conclusioni .....	90
Bibliografia .....	91
<b>8. Ambiente e PGM .....</b>	<b>95</b>
Bibliografia .....	97
<b>9. Flusso genico nelle piante .....</b>	<b>101</b>
9.1. Vigore degli ibridi .....	105
9.2. Autoimpollinazione e impollinazione incrociata .....	108
9.3. Flusso da piante transgeniche .....	113
9.3.1. Specie erbacee .....	114
9.3.2. Frumento .....	115
9.3.3. Mais .....	116
9.3.4. Colza .....	116
9.3.5. Barbabietola .....	118
9.3.6. Riso .....	118
9.3.7. Cotone .....	119
9.3.8. Patata .....	120
9.3.9. Girasole .....	120
9.3.10. Soia .....	121
9.3.11. Alberi .....	121
9.3.12. Vite .....	121
9.3.13. Altre piante .....	122
9.3.14. Un caso particolare di flusso genico: transgeni nella varietà tradizionali di mais in Messico .....	123
9.4. Conclusioni .....	124
Bibliografia .....	125
<b>10. Tossina Bt e resistenza agli insetti .....</b>	<b>144</b>
10.1. Destino della tossina Bt .....	146
10.1.1. Effetti della tossina Bt sugli organismi del suolo .....	148
10.1.2. Effetti della tossina Bt sugli invertebrati acquatici .....	149
10.2. Organismi bersaglio .....	151
10.3. Organismi non bersaglio .....	152
10.3.1. Insetti erbivori .....	152
10.3.2. Artropodi entomofagi-parassitoidi e predatori .....	153
10.3.3. Api e impollinatori .....	158
10.4. Resistenza agli insetti e zone rifugio .....	160
10.4.1. Il caso della farfalla monarca .....	163
10.4.2. Il caso del cotone indiano .....	166
10.5. Conclusioni .....	167
Bibliografia .....	169



<b>11. Resistenza agli erbicidi</b> .....	204
11.1. Resistenza all'erbicida glifosato.....	204
11.2. Resistenza all'erbicida glufosinato.....	207
11.3. Resistenze multiple .....	208
11.4. Resistenza agli erbicidi: il caso del Brasile .....	208
11.5. Conclusioni .....	209
Bibliografia .....	210
<b>12. Effetti sulla comunità batterica del suolo</b> .....	216
12.1. Flusso genico orizzontale .....	216
12.2. Conclusioni .....	218
Bibliografia .....	219
<b>13. Piante resistenti ai virus</b> .....	225
13.1. Sperimentazione italiana con il CARNA-5 .....	226
13.2. Vaccinazione con le proteine del capsido virale.....	228
13.3. Eteroincapsidamento .....	231
13.4. Ricombinazione.....	232
13.5. Resistenza RNA mediata.....	233
13.6. Flusso genico.....	234
13.7. Il caso del promotore 35S.....	235
13.8. Conclusioni .....	236
Bibliografia .....	236
<b>14. Coesistenza tra colture transgeniche, convenzionali e biologiche</b> .....	248
14.1. Pratiche nell'agricoltura tradizionale .....	248
14.2. Aspetti regolatori.....	249
14.3. Aspetti economici.....	251
14.4. Aspetti tecnico-scientifici.....	254
14.4.1. Colza .....	256
14.4.2. Barbabietola da zucchero/foraggio .....	257
14.4.3. Cereali .....	258
14.4.4. Patata.....	258
14.4.5. Mais .....	259
14.4.6. Altre piante .....	261
14.4.7. Piante impollinate dagli insetti.....	262
14.5. Conclusioni .....	263
Bibliografia .....	264
<b>15. Conclusioni</b> .....	272
Bibliografia .....	273
<b>APPENDICE A</b>	
Nomi delle piante citate in bibliografia.....	275
<b>APPENDICE B</b>	
Funzioni della Commissione Interministeriale di Valutazione delle Biotecnologie (1993-2003) .....	279



## INTRODUZIONE

Questa rassegna prende in considerazione le Piante Geneticamente Modificate che nel testo, per comodità, saranno abbreviate in PGM (i nomi comuni delle piante citate nel testo sono riportati in Appendice A).

La storia dell'umanità è stata molto spesso caratterizzata dalla contrapposizione tra coloro che sostengono i cambiamenti e coloro che non vogliono attuarli, perché certi costi di non incorrere in rischi sconosciuti. Per questa ragione, anche se l'alimentazione è stata sempre una delle maggiori preoccupazioni dell'umanità, i cambiamenti nel modo di procurarsi il cibo sono stati accettati molto lentamente.

I primi tentativi di coltivare piante commestibili (avvenuti circa 10.000 anni fa con la nascita dell'agricoltura) dovuti – secondo le ultime teorie – alla scarsità di selvaggina, furono, probabilmente, derisi dai cacciatori e reazioni più violente subirono 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 cascine incendiate in nome della tradizione che considerava i nuovi mais “innaturali” (1).

La maggior parte delle persone e delle organizzazioni, che mostra forti preoccupazioni di fronte all'applicazione delle biotecnologie in agricoltura, ha poca o nessuna conoscenza dei processi che sono stati utilizzati in passato per modificare le piante coltivate e delle conseguenze che tali modifiche hanno determinato sulle odierne piante di interesse agricolo. L'addomesticamento degli animali e delle piante selvatiche ha trasformato rapidamente la società umana, costituita da cacciatori e nomadi, in comunità libere dal compito quotidiano di trovare il cibo e per le quali, lo sviluppo della scrittura, della letteratura, della scienza e della tecnologia, è stata una conseguenza diretta di tale trasformazione sociale.

L'intervento dell'uomo ha modificato, nel corso del tempo, le piante coltivate: ogni pianta coltivata, oggi, è una lontana discendente di una o più specie selvatiche. È probabile che la selezione delle piante coltivate, cioè l'azione dell'uomo mirata a scegliere per la riproduzione e coltivazione solo i genotipi migliori, sia avvenuta per tentativi ed errori: i primi uomini devono aver provato a mangiare moltissime piante delle quali alcune velenose, scelte tra le circa 250.000 a disposizione, prima di selezionarne circa un migliaio adatte alla coltivazione.

Attualmente, il numero di specie coltivate nel mondo è di circa un migliaio, ma le più importanti sotto il profilo economico/alimentare sono poco più di 100, di cui solamente quattro specie (frumento, mais, riso e patata) costituiscono il 50% della produzione agricola totale. I nostri antenati, attraverso un processo di selezione accurata, hanno, infatti, modificato significativamente il fenotipo/genotipo delle piante coltivate, agendo selettivamente su alcuni caratteri 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 di semi e frutti.

Un esempio di tali modifiche è visibile nell'evoluzione del *Lycopersicon* sp., le cui dimensioni, aumentate di 1.000 volte rispetto alla controparte selvatica, hanno dato origine al pomodoro attuale e della banana (*Musa paradisiaca*) nella quale, a seguito di eliminazione dei semi, la riproduzione delle varietà consumate in Occidente avviene esclusivamente tramite gli stoloni. La selezione e la modifica degli habitat naturali finalizzate alla creazione di spazi ad uso agricolo hanno causato, nel corso del tempo, una consistente perdita della biodiversità.

Molti altri esempi possono essere portati per dimostrare che l'agricoltura stessa ha ribaltato la direzione della selezione naturale rendendo vitali e adatte alle esigenze dell'uomo mutazioni

sfavorevoli per le piante selvatiche (2, 3). Alcuni archeologi, ad esempio, hanno osservato in reperti di frumento risalenti a circa 10.000 anni fa e rinvenuti nella città di Gerico, che la rigidità della spiga di questo cereale è derivata dalla mutazione di un singolo gene. A causa di tale rigidità, la spiga matura non si disarticola e non rilascia i suoi semi nel terreno. Questa mutazione sarebbe letale per una pianta selvatica che avendo invece una spiga fragile può diffondere i semi maturi e garantire così la propria sopravvivenza negli anni e la colonizzazione di nuovi territori (3).

All'intervento dell'uomo si sono poi aggiunte le mutazioni e le ibridazioni spontanee. Il frumento tenero odierno, originatosi spontaneamente circa 10.000 anni fa grazie all'ibridazione crociata di specie coltivate di grano con *Triticum tauschii* (specie selvatica non commestibile), nella scala temporale dell'evoluzione, è da considerarsi relativamente recente. Tutti i cambiamenti apportati dall'uomo hanno drasticamente ridotto la capacità delle piante da raccolto di sopravvivere da sole in natura, rendendole totalmente dipendenti dalle cure costanti dell'uomo.

L'inizio della navigazione transoceanica ha favorito la dispersione delle piante coltivate dal luogo della loro prima coltivazione ad altri continenti nei quali hanno assunto, successivamente, importanza preminente. Ad esempio, il caffè, originario dell'Etiopia, è oggi coltivato prevalentemente in America centrale, meridionale e in Asia mentre altri alimenti, considerati parte integrante della cultura alimentare italiana, quali il pomodoro, le zucchine, i fagioli e la patata, provengono dalle Americhe o, come la melanzana, l'arancia e il limone dall'Asia.

Anche altri alimenti sono stati introdotti recentemente nell'alimentazione umana: il kiwi, ad esempio, è stato selezionato ai primi del '900 in Nuova Zelanda da una pianta selvatica non commestibile, originaria della Cina; la fragola (*Fragaria x ananassa*) è un ibrido risultante da un incrocio accidentale, avvenuto in Francia nel 1776 tra due varietà selvatiche, raccolte per collezione, una nota per il suo sapore (*Fragaria chiloensis*), originaria del Cile, e una originaria della Virginia (*Fragaria virginiana*) nota per le sue grandi dimensioni. All'inizio degli anni '60, il colza è stato sottoposto ad un attento programma di selezione per eliminare dalle varietà coltivate un composto tossico, l'acido erucico, e un'altra pianta, oggi coltivata su circa un milione d'ettari, il tritcale, è stata ottenuta artificialmente tramite la combinazione dei genomi del frumento e della segale (due generi distinti che non si interfecondano in natura).

Alle tecniche tradizionali di trasformazione delle piante da raccolto si affiancano oggi nuovi strumenti di modificazione genetica come le radiazioni ionizzanti (raggi gamma, raggi X, neutroni) e i mutageni chimici. Negli anni '50 esistevano in vari Paesi del mondo dei veri e propri "giardini atomici" dove le piante erano coltivate in circolo intorno ad una sorgente radioattiva, di solito costituita da  $Co^{60}$ ; le piante più vicine alla sorgente generalmente morivano, quelle a distanza intermedia sviluppavano tumori o avevano problemi di sviluppo, in quelle più lontane, talvolta, comparivano mutazioni favorevoli.

È con l'uso delle radiazioni ionizzanti che nel 1974 nei laboratori del Comitato Nazionale per l'Energia Nucleare (CNEN oggi ENEA), si ottenne una mutazione nella varietà di frumento duro "Senatore Cappelli" (dal nome del senatore che nei primi anni dello scorso secolo finanzia le ricerche del genetista Nazareno Strampelli). La variante radio-indotta così ottenuta, fu incrociata con una varietà di grano tenero a bassa taglia del *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz & Trigo* (CIMMYT, Messico) per dare origine alla varietà denominata "Creso"; il fusto di questa varietà è più corto di quello originario, per evitare o ridurre "l'allettamento" cioè l'abbattimento della pianta sul terreno in caso di temporali o forti raffiche di vento, con conseguente calo produttivo.

Per oltre 20 anni, Creso è stata la varietà più coltivata in Italia ed è entrata nella genologia di decine di varietà di grano duro tuttora coltivate nel nostro Paese su centinaia di migliaia di

ettari. Altre varianti derivate dal Creso sono state poi sviluppate in Paesi come Cina, Australia, Argentina, Stati Uniti Canada e India.

Nel 1994, l'India ha riconosciuto al Prof. Scarascia Mugnozza il merito di aver contribuito con questa varietà a ridurre i rischi di carestia nel mondo e a garantire ai coltivatori l'accesso alle migliori risorse, intitolando a suo nome lo "Scarascia Mugnozza Community Genetic Resource Centre and Gene Bank" creato dalla *M. S. Swaminathan Research Foundation* nella costa est dell'India.

L'uso di queste tecniche ha accelerato artificialmente ciò che può avvenire in natura a causa di mutazioni spontanee dovute ai raggi ultravioletti o ai raggi cosmici: il FAO/IAEA Mutant Varieties Database (<http://mvgs.iaea.org/>, ultima consultazione 19/12/2016) elenca più di 2.000 varietà di piante coltivate, modificate geneticamente con queste tecniche. Purtroppo, queste tecniche grossolane di trasformazione possono coinvolgere decine di geni con il rischio che alcuni di questi possano codificare per sostanze tossiche o nocive. Nonostante questo rischio potenziale, non ci sono normative che obblighino a sottoporre le varietà vegetali mutagenizzate a valutazioni scientifiche su eventuali pericoli per la salute o per l'ambiente derivanti dalla loro coltivazione e consumo alimentare, come invece avviene per gli PGM.

È stato, infatti, osservato che una varietà di sedano, selezionata per la resistenza agli insetti, provocava irritazioni cutanee nei lavoratori; sottoposta ad analisi è stato visto che conteneva 6.200 ppb di psolarene, una sostanza urticante, che diventa attiva alla luce del sole, contro gli 800 ppb della varietà di sedano di controllo (4). Naturalmente questa varietà non è stata più coltivata; stessa sorte è toccata alla patata Lenape, ritirata dal commercio perché, a causa dell'alto contenuto in solanina (un glicoalcaloide), superiore a quello consentito dalla *Food and Drug Administration* (FDA) (5), provocava la nausea nei consumatori. In California e Alabama, nel 1982, una varietà di zuccina è stata ritirata dal commercio perché conteneva una concentrazione molto alta di cucurbitacina, un glucoside citotossico già noto per avere causato nel Queensland in Australia l'avvelenamento di 22 persone che avevano mangiato un'altra varietà di zuccina con le stesse caratteristiche (6).

Questi episodi non devono sorprendere perché le piante, nel corso dell'evoluzione, hanno sviluppato la produzione di diverse sostanze chimiche per proteggersi da malattie fungine, insetti fitofagi, nematodi o animali erbivori e molte di queste sostanze sono tossiche o cancerogene. Non vi è dunque e non vi è mai stato un alimento di origine vegetale del tutto innocuo. Con questo non si vuole affermare che gli alimenti siano pericolosi, ma, come ha riconosciuto per primo Paracelso, circa 400 anni fa: "Ogni sostanza è veleno e nessuna è perfettamente innocua; soltanto la dose ne determina la velenosità".

Noi assorbiamo ogni giorno a livelli molto bassi, e a causa della nostra dieta, da 5.000 a 10.000 sostanze tossiche naturali. Il caffè tostato, per esempio, contiene circa 1.000 sostanze chimiche diverse. L'analisi di 27 tra queste ha dimostrato che 16 possono essere cancerogene per il topo. Alcune piante possono produrre effetti a lungo termine, come nel caso della cassava, molto consumata in Africa, che contenendo glucosidi cianogenici, se non viene trattata, può causare la paralisi degli arti, o come una varietà di piselli, coltivata in India, che contiene livelli molto alti di una potente neurotossina.

In realtà, l'uso dell'ingegneria genetica nella produzione di PGM (7) dovrebbe essere considerato come un miglioramento rispetto alle grossolane tecniche di selezione utilizzate fino ad oggi: l'introduzione diretta di uno o più geni, scelti per le loro caratteristiche, permette, infatti, modifiche meno grossolane e più prevedibili di quelle ottenute ibridando tra loro specie diverse o utilizzando metodiche di mutagenesi. Nonostante questo, ancora oggi, parlare di PGM genera in molte persone reazioni del tutto negative; d'altra parte questa paura esagerata delle innovazioni e la percezione che prodotti più conosciuti o "naturali" siano, in ogni caso, più sicuri è una costante (8-12) che si ritrova spesso nel corso della storia.

La storia dell'inizio della coltivazione della patata può essere un buon esempio di quanto tempo possa essere necessario per "accettare" un nuovo alimento. La patata (*Solanum tuberosum*) è originaria delle Ande dove viene coltivata oltre i 3.000 metri di altitudine. Questa pianta è quindi adatta a suoli leggeri, giornate corte con basse temperature notturne e scarsa umidità. A seguito della sua importazione in Europa, intorno al 1580, essa fu coltivata solo come pianta ornamentale perché si riteneva che la sua parte edibile fosse costituita dai semi, che oggi sappiamo provocare problemi digestivi (13). Intorno al 1660, questa pianta, che ormai si era anche adattata a crescere in climi con elevata umidità, basse temperature, giornate relativamente lunghe e notti calde, diventava l'alimento base degli irlandesi mentre in Francia si riteneva ancora che causasse la lebbra, il colera, la rickettsia e la tubercolosi. Per avviare la coltivazione estensiva di questo tubero, bisogna infatti aspettare il 1786, anno in cui Parmentier ottenne il permesso dal Re Luigi XVI di Francia di sperimentare la coltivazione della patata su una ventina di ettari, convinto che essa potesse sostituire il grano negli anni di carestia, cosa che avvenne dopo la rivoluzione francese.

Si potrebbero fare molti altri esempi come per la coltivazione del caffè, di cui, nel 1674, alcuni gentiluomini inglesi chiesero la messa al bando o del pomodoro che all'inizio veniva coltivato solo per l'uso nell'alimentazione dei maiali e quindi poco considerato fino alla fine del '700 (14).

Quando si valutano i rischi associati all'uso di PGM, bisogna ricordare che tutte le piante possiedono sequenze geniche (i retrotrasposoni) capaci di muoversi da una localizzazione del genoma ad un'altra; questi spostamenti possono modificare l'espressione genica, agendo come sito di rottura cromosomica e di riarrangiamento – così come potrebbe fare un transgene (15).

La selezione delle piante coltivate, a causa di questa plasticità cromosomica, ha avuto, tra gli altri, anche l'effetto che varietà differenti della stessa pianta possano avere un diverso contenuto di DNA o una diversa localizzazione cromosomica dei geni codificanti. Queste variazioni, probabilmente, hanno contribuito all'adattamento evolutivo delle piante coltivate, come si osserva dalle differenze nelle dimensioni del genoma di molte piante (16, 17). Ad esempio, varietà diverse di mais possono differire tra loro del 42% (16) nel contenuto in DNA, varietà di peperoncino del 25% (19) e varietà di soia del 12% (20). Anche l'eterosi (aumentato vigore o lussureggiamento) degli ibridi F1 di mais è in parte dovuta alla diversa localizzazione dei geni nelle varietà parentali usate per produrre gli ibridi stessi.

In altre parole, questa variabilità nel contenuto di DNA indica che le diverse *cultivar* possono differire tra loro anche per più di 100 milioni di coppie di basi nel DNA. Considerando che la mobilità dei geni nelle piante coltivate è stata dimostrata e che non tutti i geni si trovano nella localizzazione originaria della varietà selvatica (21) è possibile affermare che le piante oggi coltivate possono tollerare, senza problemi di sicurezza, forti variazioni nel loro contenuto di DNA.

I geni delle piante possono anche spostarsi dai genomi degli organelli ai genomi del nucleo e viceversa (22, 23) e anche tra mitocondri di specie, non correlate tra loro e sessualmente incompatibili (24). Gli effetti di tali trasferimenti sono dimostrabili nel differente numero di trasposoni e di retrotrasposoni presenti in individui diversi della stessa specie, che possono, pertanto, non avere lo stesso numero di geni (25, 26). Questi risultati non sono sorprendenti considerando che nuovi geni possono avere origine nei mitocondri (27) e che, alcune piante, possono creare nuovi geni con funzioni totalmente nuove mescolando e unendo parti di altri geni (28).

L'approccio alla valutazione della sicurezza d'uso delle PGM è quindi distorto dal fatto che prodotti simili con impatti ambientali e flussi genici confrontabili sono regolamentati con modalità differenti. Infatti, se un selezionatore produce con metodi tradizionali o con metodi biotecnologici, un mais tollerante l'erbicida, i due eventi risultanti saranno esaminati, per quanto

riguarda i possibili rischi, in modo diverso. L'evento GM prevede una valutazione approfondita del rischio con costi molto elevati, mentre l'evento non GM, con impatto ambientale, compreso il flusso genico, simile alla PGM, sarà sottoposto a verifiche minime. Al contrario, non è regolamentata la produzione di nuove *cultivars* ottenute con l'uso di radiazioni o con la mutagenesi chimica, due metodiche che coinvolgono migliaia di geni, nonostante che lo studio tramite *microarrays* dell'espressione di queste migliaia di geni abbia dimostrato che le radiazioni causano un riarrangiamento "perturbazione genica" molto maggiore di quella causata dall'inserimento di un transgene (29).

Questo diverso sistema di valutazione, molto più severo nei confronti di ipotetici rischi legati esclusivamente all'uso della biotecnologia quale metodo di produzione di una nuova varietà, ha profondamente influenzato sia la regolamentazione delle PGM -generando un eccesso regolatorio- sia la percezione dell'opinione pubblica rispetto a questi argomenti (30, 31).

Molti sono i riferimenti bibliografici utili ad approfondire lo sviluppo delle biotecnologie nel corso del tempo; Lurquin (7), ad esempio, descrive il percorso delle idee che ha portato allo sviluppo delle PGM, Charles (32) ha analizzato il confronto economico e sociale che ha accompagnato tale sviluppo mentre, in Italia, Meldolesi (8) ha analizzato il dibattito politico italiano in questo settore. Un'analisi documentata sui benefici delle PGM è presentata nel libro "Perchè gli OGM?", curato da Cadelo (33).

La trasformazione di una pianta si ottiene tramite l'inserimento, in modo stabile, di un gene estraneo, selezionato da un differente organismo o dalla stessa pianta e successivamente modificato in laboratorio prima dell'inserimento. Per l'Unione Europea una PGM è un organismo il cui materiale genetico (DNA) è stato alterato in un modo che non avviene naturalmente per fecondazione o ricombinazione.

Tale trasformazione è stata resa possibile grazie all'utilizzo delle tecniche di coltura *in vitro* delle cellule vegetali. Queste cellule, in presenza di opportune concentrazioni di ormoni vegetali, sono capaci di formare un tessuto indifferenziato, detto callo, dal quale è possibile, variando l'apporto di nutrienti, ottenere la pianta completa.

Trattando con cellulasi e pectinasi le stesse cellule vegetali in coltura si ottengono i protoplasti, cellule vegetali prive della parete cellulare (34). I protoplasti appartenenti a specie diverse possono fondere tra loro, superando le barriere d'incompatibilità sessuale, dando poi origine agli ibridi somatici. All'inizio degli studi si era ipotizzato che questa tecnica avrebbe permesso di ottenere nuovi ibridi provenienti dalla fusione di protoplasti di piante diverse, ma i risultati furono deludenti e anche la microiniezione o l'elettroporazione di DNA esogeno nei protoplasti diede frequenze di trasformazione molto basse.

Nel corso del tempo l'utilizzazione di *Agrobacterium tumefaciens*, un batterio presente nel suolo, nel processo di trasformazione (35) ha permesso di mettere a punto metodi più efficienti.

Questo microorganismo, che non colonizza i tessuti integri, è un parassita delle piante dicotiledoni e alla presenza di ferite nelle radici, induce la formazione di tumori del colletto (*crown gall*), trasformando le cellule vegetali mediante l'iniezione di un plasmide, denominato Ti (*Tumor inducing*). Il plasmide Ti contiene una regione, denominata T-DNA (*Transferred DNA*), che viene inserita nel genoma della cellula vegetale infettata (35-38) e una regione, denominata *vir*, che contiene i geni per la virulenza. All'interno della regione T-DNA sono presenti degli oncogeni che, attraverso la produzione di ormoni vegetali (39), determinano la crescita tumorale e la formazione del tumore del colletto.

Per effettuare la trasformazione delle piante, il plasmide Ti viene disarmato con l'eliminazione degli oncogeni dalla regione T-DNA. Introducendo il gene di interesse nella regione T-DNA del plasmide disarmato è quindi possibile il suo inserimento nel genoma della pianta, le cui cellule vengono poste ad incubare in un terreno di coltura idoneo sia per la crescita del batterio che delle cellule vegetali.

I meccanismi biologici e fisici di trasformazione sono stati pubblicati in numerose rassegne (39-46), alle quali si rimanda per una descrizione dettagliata delle metodologie di trasformazione.

Le limitazioni principali di questa tecnica sono principalmente due: la prima deriva dal fatto che l'inserimento del gene esogeno avviene per ricombinazione in modo sostanzialmente casuale soprattutto nelle regioni più ricche di geni (47, 48); la seconda è dovuta al fatto che questa tecnica è meno efficace per la trasformazione delle monocotiledoni che non vengono infettate dal batterio.

Infatti la trasformazione di queste specie quali ad esempio frumento, riso, mais, orzo, segale, miglio, ecc., che costituiscono le piante da raccolto più importanti per l'alimentazione umana e animale, è stata resa possibile tramite bombardamento del callo embriogenico con microparticelle d'oro o tungsteno, ricoperte con il DNA transgenico che si vuole introdurre (44, 45, 49) nella pianta stessa.

Nel corso del tempo l'efficienza di trasformazione delle monocotiledoni è migliorata, tramite l'uso combinato del bombardamento con microproiettili e di *Agrobacterium tumefaciens*; recentemente, inoltre, sono state sviluppate due nuove metodologie, la prima basata sull'uso di *Rhizobium* sp., *Sinhorhizobium meliloti* e *Mesorhizobium loti* (50), la seconda sull'iniezione nell'apice dello stilo (51) di colture di *Agrobacterium* contenente il transgene.

Attualmente, sono in corso di sviluppo nuove tecniche di trasformazione delle piante. Queste tecniche sono state analizzate in dettaglio dal *Joint Research Center* della Commissione europea perché alcune di esse eludono la definizione legale di OGM della Direttiva 2001/18/EC (52). In un futuro prossimo potrebbero entrare in commercio, a meno di modifiche legislative *ad hoc*, PGM non sottoposte al vaglio rigoroso previsto per le PGM. La presente rassegna prende in esame solamente le PGM che rispondono alla definizione della suddetta Direttiva.

## Bibliografia

1. Fenaroli L. *Rassegna cronologica degli sviluppi della maiscoltura in Italia con particolare riguardo all'azione svolta dalla Stazione sperimentale di maiscoltura, alle ricerche collegiali, ai finanziamenti concessi all'uopo dal Ministero dell'agricoltura e delle foreste e ai risultati conseguiti. 1946-1968*. Bergamo: Fondazione Tito Vezio Zapparoli, Stazione sperimentale di maiscoltura; 1969.
2. Diamond J. *Guns, germs and steel*. New York: W.W. Norton; 1999.
3. Zohary D, Hopf M. *Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile*. 1984. Oxford: Clarendon Press; 1993.
4. Seligman PJ, Mathias CGT, O'Malley MA, Beier RC, Fehrs LJ, Serrill WS, Halperin WE. Phytodermatitis from celery among grocery store workers. *Arch Dermatol* 1987;123(11):1478-82.
5. Zitnak A, Jonhoston GR. Glycoalkaloid content of b5141-6 potatoes. *Am J Potato Res* 1970;47(7):256-60.
6. Rymal KS, Chambliss OL, Bond MD, Smith DA. Squash containing toxic cucurbitacin compounds occurring in California and Alabama. *J Food Protect* 1984;47(4):270-1.
7. Lurquin PA *The green Phoenix – a history of genetically modified plants*. New York: Columbia University Press; 2001.
8. Meldolesi A. *Organismi Geneticamente Modificati - Storia di un dibattito truccato*. Torino: Giulio Einaudi; 2001.
9. Huber PW. Exorcists vs. gatekeepers in risk regulation. *Regulation* 1983;7(Nov/Dec):23-32.
10. Huber PW. Little risks and big fears. *Regul Toxicol Pharmacol* 1987;7(2): 200-5.



11. Martinelli L. OGM e accettabilità: riflessioni sulla comunicazione. *Nuovo Diritto Agrario* 2004;3:69-76.
12. Pellegrini G. *Biotecnologie e cittadinanza. Processi di sviluppo della cittadinanza e innovazione tecno-scientifica*. Padova: Gregoriana Lib. Ed.; 2005.
13. Hobhouse H. *Seeds of change*. London: Pan Books; 2002.
14. Fedoroff N, Bown NM. *Mendel in the kitchen: a scientist view of genetically modified foods*. Washington: Joseph Henry Press; 2004.
15. Wessler SR. Plant transposable elements. A hard fact to follow. *Plant Physiol* 2001;125(1):149-51.
16. Ceccarelli T, Giordani T, Natali L, Cavallini A, Cionini PG. Genome plasticity during seed germination in *Festuca arundinacea*. *Theor Appl Genet* 1997;94(3-4):309-15.
17. Shirasu K, Schulman AH, Lahaye T, Shulze-Lefert P. A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Res* 2000;10(7):908-15.
18. Rayburn AL, Auger JA, Benzinger EA, Hepburn AG. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. *J Exp Bot* 1989;40(11):1179-83.
19. Mukherjee S, Sharma AK. Intraspecific variation of nuclear DNA in *Capsicum annum* L. *Proc Indian Acad Sci* 1990;100(1):1-6.
20. Graham MJ, Nickell CD, Rayburn AL. Relationship between genome size and maturity group in soybean. *Theor Appl Genet* 1994;88(3):429-32.
21. Lai J, Ma J, Swignonová Z, Ramakrishna W, Linton E, Llaca V, Tanyolc B, Park Y-J, Jeong O-Y, Bennetzen JL, Messing J. Gene loss and movement in the maize genome. *Genome Res* 2004;14(10a):1924-31.
22. Adamsa KL, Qiu YL, Stoutemyer M, Palmer JD. Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(15):9905-12.
23. Cummings MP, Nugent JM, Olmstead RG, Palmer JD. Phylogenetic analysis reveals five independent transfers of the chloroplast gene *rbcL* to the mitochondrial genome in angiosperms. *Current Genetics* 2003;43(2): 131-8.
24. Bergthorsson U, Adams KL, Thomason B, Palmer JD. Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* 2003; 424:197-201.
25. Fu HH, Dooner HK. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implication in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(14):9573-8.
26. Song R, Messing J. Gene expression of a gene family in maize based on non-collinear haplotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(15):9055-60.
27. Schnable PS, Wise RP. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci* 1998;3(5):175-80.
28. Jiang N, Bao Z, Zhang X, Eddy SR, Wessler SR. Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature* 2004;431:569-73.
29. Batista R, Saibo N, Lourenço T, Oliveira MM. Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(9):3640-5.
30. Bucchi M, Neresini F. *Cellule e cittadini. Biotecnologie nello spazio pubblico*. Milano: Sironi; 2001.
31. Pascale A. *Scienza e sentimento*. Torino; Giulio Einaudi; 2008.
32. Charles D. *Lords of the harvest. Biotech, big money and the future of food*. Cambridge: Perseus Publishing; 2001.
33. Cadelo E (Ed.) *Perché gli OGM?* Roma: Palombi Editore; 2011.

34. Cocking EC. Plant cell protoplasts-isolation and development. *Rev Plant Physiol* 1972;238(1):29-50.
35. Braun AC. Plant tumors. *Biochim Biophys Acta* 1978;516(2):167-91:
36. Willmitzer L, de Beuckeleer M, Lemmers M, van Montagu M, Schell J. Ti-plasmid derived T-DNA is present in the nucleus and absent from plastids of plant crown gall cells. *Nature* 1980;287:359-61.
37. Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, van Montagu M, Schell J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 1983;2(12):2143-50.
38. Wang K, Herrera- L, van Montagu M, Zambryski P. Right 25-bp terminus sequences of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 1984;38(1-2):455-62.
39. Inzè D, Follin A, van Lijsebettens M, Simoens C, Genetello C, van Montagu M, Schell J. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol Gen Genet* 1984;194(1-2):265-74.
40. Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann Rev Microb* 2000;51:223-56.
41. Tzfira T, Citovsky V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol* 2002; 12(3):121-9.
42. Tzfira T, Li J, Lacroix B, Citovsky V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet* 2004;20(8):375-83.
43. Tzfira T, Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opinion Biotech* 2006;17(2):147-54.
44. Klein, TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 1987;327:70-3.
45. Christou P, McCabe DE, Swain WF. Stable transformation of soybean by DNA coated gold particles. *Plant Physiol* 1988;87:671-4.
46. Garcia Olmedo F. *La terza rivoluzione verde. Piante transgeniche, biotecnologie e agricoltura moderna*. Milano: Il Sole 24 ore libri; 2000.
47. Tinland B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci* 1996;1(6):178-84.
48. Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P. Transgenes integration, organization and interaction with plants. *Plant Mol Biol* 2003;528(2):247-58.
49. Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 1987;327:70-3.
50. Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LMA, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 2005;433:629-33.
51. Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH, Granell A. Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol* 2006;140(1):3-11.
52. Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E. *New plant breeding techniques. State of the art and prospects for commercial development*. Luxembourg: Publication Office of the European Union; 2011. (EUR 24760EN).

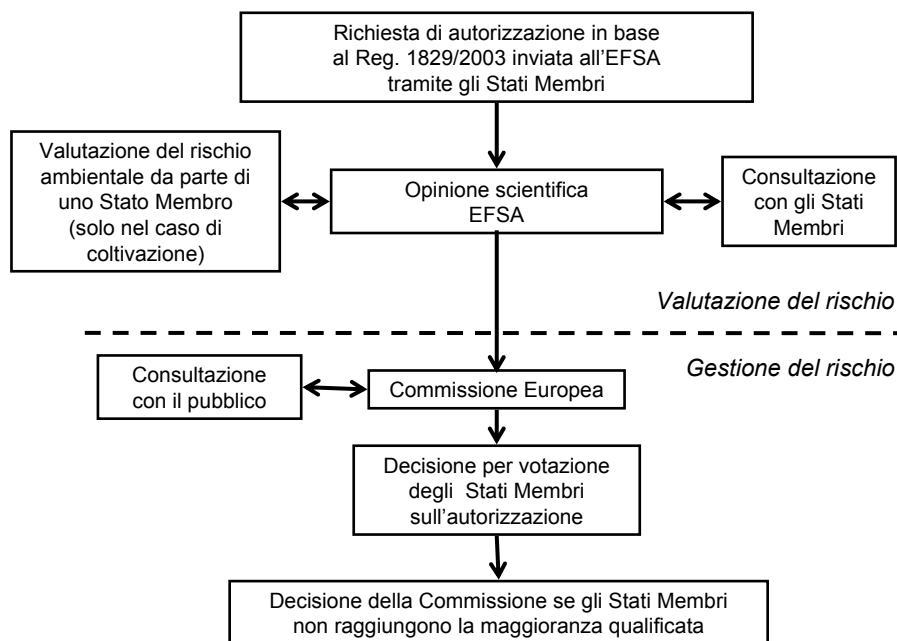
# 1. ASPETTI GENERALI DELLA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA D'USO DELLE PGM NELL'ALIMENTAZIONE UMANA E ANIMALE

Le considerazioni sulla sicurezza d'uso in alimentazione umana e animale di una PGM 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 (1, 2), tuttavia il dibattito sulle PGM ha sensibilizzato l'opinione pubblica su alcuni temi come l'allergenicità, la resistenza agli antibiotici e il flusso genico. Inoltre, studi effettuati sulla percezione dei consumatori verso gli alimenti derivanti o contenenti organismi geneticamente modificati hanno evidenziato una chiara segmentazione tra coloro che mostrano una certa apertura alle PGM in campo agroalimentare e coloro che si pongono in una posizione di chiusura verso questa innovazione (3-6).

La valutazione della sicurezza d'uso delle PGM si basa sui principi fondamentali e su metodologie che sono state individuate, sin dagli anni '90, a seguito di studi effettuati da organizzazioni internazionali e sopranazionali (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD; *Food and Agriculture Organization*, FAO; *World Health Organization*, WHO) e da istituzioni scientifiche di molti Paesi. La valutazione si basa essenzialmente sul principio dell'equivalenza sostanziale che viene stabilita mediante la valutazione delle caratteristiche morfologiche, molecolari, agronomiche e relative alla composizione chimica delle PGM. Queste valutazioni vengono effettuate mediante il confronto tra la PGM e la sua controparte tradizionale coltivate nelle stesse condizioni agronomiche e ambientali. L'analisi comparativa consente di evidenziare le eventuali differenze su cui basare le successive valutazioni nutrizionali e tossicologiche necessarie per dimostrare che la PGM e i suoi prodotti derivati sono sicuri come la controparte tradizionale. In Italia tale valutazione è stata effettuata negli anni 1993-2003 dalla Commissione Interministeriale di Valutazione delle Biotecnologie (Appendice B).

Questi principi sono stati recepiti dalla legislazione europea (7-9) dal Regolamento (CE) 258/1997 sui nuovi prodotti e i nuovi ingredienti alimentari e successivamente dalla Direttiva 18/2001/CE e dal Regolamento (CE) 1829/2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati. Questo Regolamento è stato modificato dal Regolamento di esecuzione (EU) 503/2013 che descrive nell'Allegato II la documentazione e i dati scientifici che il richiedente deve presentare per la valutazione del rischio delle PGM. Queste normative identificano gli aspetti da considerare nella valutazione delle PGM prima della loro commercializzazione.

La procedura per l'autorizzazione degli alimenti geneticamente modificati, effettuata inizialmente in base al Regolamento (CE) 258/1997, è stata modificata al fine di garantire chiarezza, trasparenza e un contesto armonizzato coerente con il nuovo quadro per la valutazione dei rischi in materia di sicurezza degli alimenti, fissato dal Regolamento (CE) 178/2002. Questo regolamento stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) e fissa le procedure necessarie per garantire la sicurezza nel campo alimentare. Quindi, gli alimenti e i mangimi geneticamente modificati vengono autorizzati ai fini dell'immissione sul mercato soltanto dopo una valutazione scientifica, effettuata dall'EFSA. Questa valutazione scientifica è seguita da una decisione relativa alla gestione del rischio adottata dalla Comunità Europea, mediante una procedura di regolamentazione che garantisce una stretta cooperazione tra la Commissione e gli Stati Membri (Figura 1).



**Figura 1. Procedura di autorizzazione per la commercializzazione di PGM in Europa secondo il Regolamento (CE) 1829/2003**

In base a questa normativa la richiesta di autorizzazione (notifica) viene inviata ad uno Stato Membro che l'inoltra all'EFSA, che deve, a sua volta, produrre un'opinione scientifica entro sei mesi; i sei mesi vengono interrotti in caso di richiesta al notificante di ulteriori dati. Gli Stati Membri, durante il periodo di valutazione, hanno accesso alla notifica di autorizzazione e a tutti i documenti presentati a supporto della stessa, attraverso la rete EXTRANET dell'EFSA.

Gli Stati Membri hanno, quindi, la possibilità di esprimere opinioni e commenti sulla notifica. Nel caso in cui la notifica richieda anche l'autorizzazione per la coltivazione, la valutazione del rischio ambientale viene effettuata da uno Stato Membro.

L'opinione scientifica dell'EFSA viene pubblicata sia sul proprio sito che su quello della Commissione europea, in modo da essere sottoposta, per 30 giorni, a consultazione pubblica. In base all'opinione scientifica dell'EFSA e delle osservazioni, derivanti dall'osservazione pubblica, il Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali, composto dagli Stati Membri, deve decidere se autorizzare o meno la PGM. La decisione deve essere presa a maggioranza qualificata. Nel caso in cui tale maggioranza non sia raggiunta, la Commissione europea inoltra la documentazione al Consiglio dei Ministri dove viene presa una decisione anche in assenza della maggioranza qualificata.

Uno degli aspetti della normativa è quello relativo all'obbligo di etichettatura degli OGM autorizzati all'immissione in commercio, sancito dal Regolamento (CE) 1829/2003, che è stato istituito per garantire una scelta consapevole da parte dell'utente finale. Tale obbligo non sussiste a percentuali di OGM < 0,9% (relativo al singolo ingrediente alimentare o al singolo componente di un mangime) purché la sua presenza sia accidentale e/o tecnicamente inevitabile.

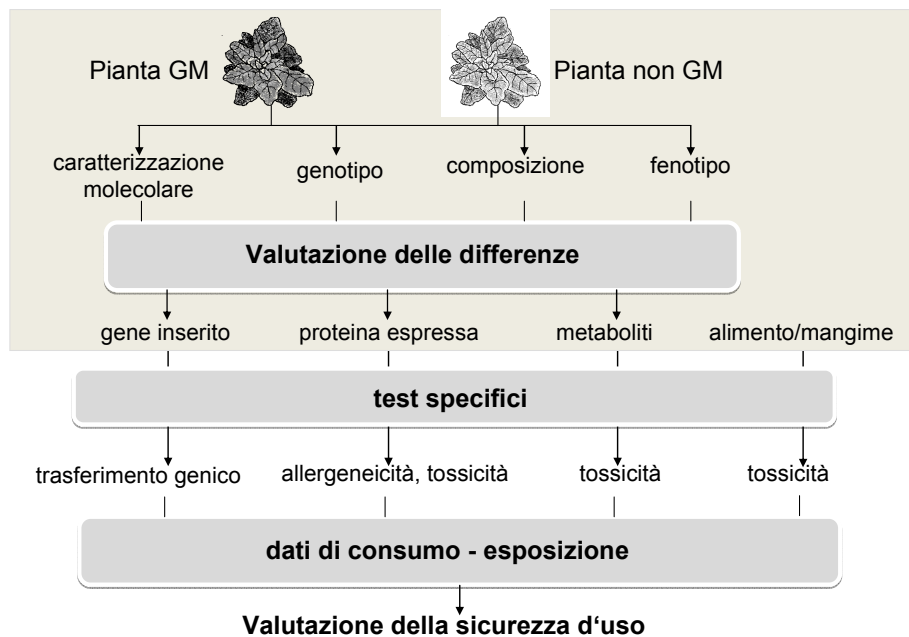
La valutazione della sicurezza d'uso viene attualmente effettuata in base al documento guida elaborato dall'EFSA, aggiornato al maggio del 2011 (10).

In generale, l'obiettivo della valutazione del rischio delle PGM è l'esame delle conseguenze intenzionali, o non intenzionali, della specifica modifica genetica sui componenti dell'alimento.

È ovvio, perciò, che una valutazione appropriata può essere fatta solo caso per caso, prendendo in esame una documentazione specifica che contenga:

- la descrizione dell'organismo che è stato modificato, comprendente la composizione dei nutrienti, degli antinutrienti noti, delle sostanze tossiche e degli allergeni, e qualunque variazione nella composizione di tali costituenti che avvenga nei processi di trasformazione dell'alimento;
- la descrizione dell'organismo donatore, comprese la tossicità e l'allergenicità conosciute del gene inserito;
- la descrizione molecolare della modifica genetica, comprendente il procedimento di trasformazione e la stabilità del carattere inserito;
- l'identificazione dei prodotti del gene inserito;
- la valutazione della sicurezza delle nuove sostanze presenti nella PGM;
- la valutazione del potenziale allergenico del nuovo alimento;
- la valutazione degli effetti non previsti sulla composizione dell'alimento, come la variazione di concentrazione degli antinutrienti e delle sostanze tossiche e di qualunque sostanza che mostri una variazione di concentrazione.

Nella Figura 2 è rappresentata in modo schematico la metodologia su cui si basa la valutazione della sicurezza d'uso delle PGM.



**Figura 2. Metodologia per la valutazione della sicurezza d'uso delle PGM**

Gli anni trascorsi dall'introduzione sul mercato delle prime PGM e l'esperienza accumulata nella valutazione della sicurezza d'uso, sia per gli alimenti sia per i mangimi, ci consentono di poter identificare i problemi scientifici per i quali vi sono metodi di valutazione consolidati e quelli per i quali vi sono ancora divergenze nell'applicazione (Tabella 1).

In futuro nuovi problemi nella valutazione del rischio deriveranno dalle possibilità scientifiche emergenti di utilizzare le PGM per la produzione di farmaci, di composti industriali, nella bonifica dei terreni inquinati, ecc. (1, 2, 11-55).

**Tabella 1. Problemi scientifici nella valutazione delle PGM**

<b>Problema</b>	<b>Accordo scientifico</b>	<b>Problemi aperti</b>	<b>Mancanza di conoscenze</b>
Sicurezza delle PGM sul mercato	Sono sicuri per l'uomo. Nessun effetto avverso descritto finora	Sorveglianza post-marketing quasi impossibile per gli effetti di confondimento dovuti alla diversità di diete e alla variabilità genetica delle popolazioni.	Effetti a lungo termine sconosciuti sia per le PGM sia per gli alimenti convenzionali.
Metodi per la valutazione della sicurezza	Analisi caso per caso	I metodi di valutazione attuali basati sulla comparazione di un numero limitato di composti potrebbero non essere sufficienti per le PGM che non sono sostanzialmente equivalenti agli alimenti attuali. Sono in fase di realizzazione tecniche alternative basate su analisi di metabolomica.	Quanta variazione nella composizione di un alimento è accettabile dal punto di vista della sicurezza?
Benefici per la salute	Molte PGM sono coltivate facendo un minor uso di pesticidi	Le PGM del futuro, e alcune in fase di autorizzazione hanno un contenuto nutrizionale migliorato	Il significato del miglioramento nutrizionale deve essere dimostrato.

Questa presentazione si limita ad analizzare le PGM ora sul mercato, impiegabili in alimentazione umana e animale, che sono state valutate secondo le linee guida elaborate da FAO e WHO (56) facendo uso del concetto di equivalenza sostanziale.

## 1.1. Equivalenza sostanziale

Il concetto di Equivalenza Sostanziale (ES), enunciato, nel 1991, dall'OECD stabiliva che un alimento transgenico, che si potesse dimostrare, essere essenzialmente equivalente, come composizione, ad un alimento esistente, era da considerarsi sicuro. Il concetto fu rielaborato, nel 1996 e ribadito nel 2000, congiuntamente dalla FAO e dalla WHO (56), che identificarono l'ES come una modalità per dimostrare 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.

Il concetto di equivalenza sostanziale è stato, tuttavia, considerato da alcuni "intrinsecamente antiscientifico" perché è stato creato per semplificare la valutazione omettendo analisi biochimiche e tossicologiche" (57). Secondo questi ultimi autori l'alternativa al concetto d'equivalenza sostanziale è fissarne i livelli accettabili di assunzione giornaliera (*Acceptable Daily Intakes*, ADI) calcolati sulla base di analisi simili a quelle effettuate, ad esempio, sugli additivi alimentari, sui pesticidi e sui farmaci. Questo approccio analitico, applicabile a sostanze chimiche isolate, non è direttamente utilizzabile per valutare la sicurezza di un alimento in toto, che contiene una nuova proteina, ben caratterizzata, ad una concentrazione inferiore allo 0,1% rispetto alle circa 5.000 proteine totali della pianta. Inoltre, i test tossicologici tradizionali, ben applicabili ad una sostanza isolata, servono a determinare il *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL), che è la dose più alta

esaminata, alla quale non si osservano effetti nocivi. Riducendo il NOAEL di un fattore di sicurezza, o d'incertezza, generalmente pari a 100, si stima (58) la dose accettabile giornaliera (ADI). Questo metodo non è direttamente applicabile agli alimenti, perché è impossibile alimentare l'animale con le quantità necessarie per ottenere una concentrazione sufficiente a causare effetti nocivi, senza sbilanciare irrimediabilmente la dieta. L'alterazione nutrizionale della dieta, ottenuta alimentando l'animale con un solo alimento, causerebbe da sola dei danni in grado di mascherare gli eventuali effetti nocivi dell'alimento in studio. In particolare, la valutazione dell'equivalenza sostanziale composizionale è stata applicata alla valutazione pre-marketing delle PGM di prima generazione (59-61). Le analisi effettuate hanno dimostrato che, senza considerare la presenza del prodotto del gene inserito, non vi erano differenze di composizione, al di là della variabilità naturale, tra PGM e la controparte non trasformata (Tabella 2).

**Tabella 2. Equivalenza sostanziale determinata con l'analisi dei costituenti delle PGM**

Pianta	Modifica genetica	Costituenti analizzati	Rif.
Pomodoro	Poligalatturonidasi antisenso	Proteine, tomatina, vitamine A, B e C, tiamina, riboflavina, minerali (Ca, Mg, P, Na)	62
	Resistente agli insetti Cry1Ab	Ceneri, umidità, materiali volatili, tomatina, vitamina C, minerali (Ca, P, Na, K, Mg, Fe, Cl)	63
	Gene <i>ro/D</i>	Acidi grassi, fenoli, polifenoli, carotenoidi, vitamina C, antiossidanti totali, minerali	64
Colza	Alto contenuto in acido laurico, resistente all'erbicida	Amminoacidi, acidi grassi, acido erucico, glucosinolati	62, 65
		Amminoacidi, acidi grassi, lectine, inibitore della tripsina, fitoestrogeni, fitati, ureasi, zuccheri, ceneri, umidità, materiali volatili, carbonio	66, 67
Mais	Resistente agli insetti	Amminoacidi, acidi grassi, ceneri, umidità, materiali volatili, carbonio, calcio, fosforo	68-70
	Tollerante il glifosato	Ceneri, umidità, materiali volatili, carbonio, fibre, amminoacidi, acidi grassi, minerali	71-73
	Resistente agli insetti	Acidi grassi, fenoli, polifenoli, carotenoidi, vitamina C, antiossidanti totali, minerali	64
Patata	Resistente agli insetti CryIIIa	Ceneri, umidità, materiali volatili, carbonio, glicoalcaloidi, vitamine B e C, acido folico, K	74
	Tollerante l'erbicida clorosulfone	Ceneri, umidità, carbonio, materiali volatili, amminoacidi	75
	Resistente al virus Y e agli insetti	Ceneri, umidità, carbonio, materiali volatili, amminoacidi, grassi, proteine, destrosio, saccarosio, glicoalcaloidi, niacina, vitamina B6, Cu, Mg, K	76
Cotone	Resistente al virus Y	Glicoalcaloidi	77
	Esprime la glicinina di soia	Ceneri, umidità, proteine, lipidi, carboidrati, glicoalcaloidi	78
	Tollerante il glifosato	Ceneri, umidità, materiali volatili, carbonio, amminoacidi, acidi grassi, gossipolo, $\alpha$ -tocoferolo, aflatoxine	79
Peperoncino	Resistente agli insetti e tollerante il glifosato	Proteine delle fibre	80
	Resistente ai CMV e TMV	Proteine, lipidi, umidità, ceneri, fibre	81
Arachide	Chitinasi del riso, resistente al fungo <i>Sclerotinia minor</i>	Ceneri, umidità, grassi, fibre, proteine, sali	82

Un'analisi degli antinutrienti e delle sostanze tossiche naturali presenti nelle piante è stata effettuata sulla documentazione presentata all'UE e agli USA per l'approvazione della commercializzazione delle PGM (83). I documenti presi in esame riguardavano la colza (glucosinolati, fitati), il mais (fitati), il pomodoro (tomatina, solanina, cianonina, lectine, ossalati), la patata (solanina, cianonina, inibitori delle proteasi, fenoli) e la soia (inibitori delle proteasi, lectine, fitati, isoflavoni). Le concentrazioni di questi composti nei prodotti modificati erano analoghe a quelle degli organismi di provenienza. Variazioni significative, ma dello stesso segno, si osservavano in entrambi gli organismi, in particolari condizioni ambientali, come la siccità. L'analisi di composizione deve, perciò, sempre essere valutata considerando anche la variabilità naturale della controparte non trasformata (85-89). In Tabella 3 è riportata, come esempio, la composizione di due mais transgenici e delle rispettive linee isogeniche.

**Tabella 3. Composizione del mais Bt, del mais tollerante l'erbicida Basta con le rispettive linee isogeniche\***

Costituenti	Mais isogenico	Mais Bt	Mais isogenico	Mais Bt
<b>Nutrienti in g/kg</b>				
Ceneri	15	16	19	18
Proteine	108	98	120	119
Estratto etereo	54	56	31	35
Fibre	23	25	34	30
Amido	710	708	692	701
Lisina	2,9	3,0	3,3	3,2
Metionina	2,2	2,1	2,6	2,5
<b>Acidi grassi %</b>				
Palmitico	12,4	12,5	11,5	11,8
Oleico	31,1	28,6	27,7	27,4
Linoleico	50,0	51,2	57,0	56,3

\*Rielaborato da Aulrich *et al.* (90).

## 1.2. Mais Bt e micotossine

Nell'analisi di composizione particolare attenzione è stata dedicata alla presenza di fumonisine nei mais sottoposti a sperimentazione animale, perché le piante indebolite dalla piralide sono più facilmente soggette alle infezioni da *Fusarium* sp., tanto da avere una concentrazione più alta in queste tossine rispetto alle piante non attaccate dal fungo (91, 92). Le specie di *Fusarium* che infettano il mais possono produrre circa 15 micotossine, capaci di causare la leucoencefalopatia fatale nei cavalli, l'edema polmonare nei maiali e il cancro nei ratti di laboratorio (93).

Nell'uomo va evitata l'esposizione (94) perché il cancro dell'esofago è stato associato al consumo di mais con un'alta concentrazione di fumonisine (95). Questi composti sono ora classificati 2B, come probabili carcinogeni per l'uomo (96). Per tale motivo sono stati condotti parecchi studi, in differenti località e su differenti linee transgeniche, sulle concentrazioni delle principali micotossine nel mais.

Vi sono consolidate evidenze sperimentali che dimostrano la minor concentrazione delle fumonisine nei mais transgenici resistenti alla piralide (90-117); la minore concentrazione può avere un impatto positivo sulla salute delle popolazioni esposte alle fumonisine, attraverso il



consumo di mais contaminato (117, 118). Il monitoraggio della contaminazione da micotossine, relativo alla campagna 2013, effettuato dall'Unità di Ricerca per la Maiscoltura di Bergamo sui centri di stoccaggio cooperativo in pianura padana, ha rilevato che il 62% dei campioni aveva un contenuto in fumonisine superiore a 4000 µg/kg, valore limite per l'uso alimentare umano (Regolamento (CE) n. 1126/2007 della Commissione UE del 28/9/2007) (119).

A titolo di esempio, l'adozione del mais Bt può apportare un beneficio alla popolazione del Friuli-Venezia Giulia che ha un'incidenza più alta della popolazione nazionale di tumori delle alte vie respiratorie (120); popolazione per la quale il consumo di mais è stato già riconosciuto come un fattore di rischio (121). Inoltre, è evidente che l'utilizzo di mais Bt nell'alimentazione animale, determinando una riduzione in fumonisine, rappresenta un vantaggio per la salute animale con un conseguente impatto positivo per gli allevatori.

Gli studi comparativi effettuati per valutare la riduzione dei livelli di contaminazione da altre micotossine (aflatossine, zearalenone e deossinivalenolo) hanno evidenziato risultati discordanti dipendenti dall'evento transgenico, dalle precipitazioni, dalla data della semina e dall'eventuale raccolto tardivo. Le PGM da sole non garantiscono un sistematico controllo di queste micotossine (92, 101, 103, 104, 106-108, 112, 113, 117); controllo che può essere facilitato dalla scelta dell'evento transgenico e da una buona gestione dei campi coltivati a PGM.

### 1.3. Conclusioni

La sicurezza d'uso delle PGM si basa sul principio dell'equivalenza sostanziale che viene stabilita mediante la valutazione delle caratteristiche molecolari, agronomiche morfologiche e relative alla composizione chimica delle PGM derivanti dal confronto tra PGM e la sua controparte tradizionale coltivate nelle stesse condizioni agronomiche e ambientali. Questa metodologia è stata individuata, sin dagli anni '90, a seguito di studi effettuati da organizzazioni internazionali e sopranazionali (OECD, FAO, WHO) e da istituzioni scientifiche di molti Paesi. Le metodologie classiche utilizzate per le sostanze chimiche, non sono direttamente applicabili alla valutazione della sicurezza di un alimento in toto, perché è impossibile alimentare l'animale con le quantità necessarie per ottenere una concentrazione sufficiente a causare degli effetti nocivi. Infatti l'alterazioni della dieta causerebbe dei danni all'animale in grado di mascherare gli eventuali effetti nocivi dell'alimento GM.

Le analisi pre-marketing delle PGM di prima generazione, effettuate per la valutazione dell'equivalenza sostanziale composizionale, hanno dimostrato che, senza considerare la presenza del prodotto del gene inserito, non vi sono differenze di composizione, tra la PGM e la sua controparte non trasformata, al di là della variabilità naturale.

Infine, per il mais Bt è stata evidenziata una diminuzione della contaminazione da fumonisine, effetto collaterale della modificazione genetica, che può rappresentare un vantaggio per la salute umana e animale.

### Bibliografia

1. FAO/WHO. *Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology*. Geneva: WHO; 1991.
2. OECD. *Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology. Concepts and principles*. Paris: OECD; 1993.
3. Directorate General Research. *Europeans, science and technology, Final report*. Brussels: European Commission; 2001. (Eurobarometer 55.2).

4. Directorate General Research. Eurobarometer. *Europeans, science and technology*. Brussels: European Commission; 2005. (Special Eurobarometer 224 / Wave 63.1 – TNS Opinion & Social).
5. Directorate General Research. *Europeans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends. Final report on Eurobarometer 64.3*. Brussels: European Commission; 2006.
6. European Food Safety Authority. *Europeans, Science and Technology, Food-related risks*. Brussels: European Commission; 2010. (Special Eurobarometer 354 / Wave 73.5 – TNS Opinion & Social).
7. Europa. Regolamento 258/97 (CE) del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 gennaio 1997 sui nuovi prodotti e i nuovi ingredienti alimentari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* 1997;L 043:1-6.
8. Europa. Direttiva 2001/18 (CE) del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 marzo 2001 sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati e che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* 2001;L106:1-38.
9. Europa. Regolamento 1829/2003 (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 sugli alimenti e mangimi geneticamente modificati. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* 2003;L268:1-23.
10. EFSA Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *EFSA J* 2011;9(5):2150, 37 pp. Disponibile all'indirizzo: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2150/epdf>; ultima consultazione 19/12/2016.
11. Kubo K, Saito M. Current developmental situation and future trends in genetically-modified foods with varying functionality and nutrient content, and their safety assessment. *J Japan Soc Nutr Food Sci* 2000;53(4):169-74.
12. Sunde RA. Research needs for human nutrition in the post-genome-sequencing era. *J Nutr* 2001;131(12):3319-23.
13. Ye X, Al-Babili S, Klott A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I. Engineering the provitamin A (β-Carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 2000;287:303-5.
14. Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J Amer Coll Nutr* 2002;21(Suppl 3):184S-90S.
15. Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silveston AL, Drake R. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnol* 2005;23(4):482-87.
16. Budziszewski GJ, Croft KPC, Hildebrand DF. Uses of biotechnology in modifying plant lipids. *Lipids* 1996;31(6):557-69.
17. Zimmerman MB, Hurrell RF. Improving iron, zinc and vitamin A nutrition through plant biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(2):142-5.
18. Qu LQ, Yoshihara T, Ooyama A, Goto F, Takaiwa F. Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta* 2005;222(2):225-33.
19. Goto F, Yoshihara T, Masuda T, Takaiwa F. Genetic improvement of iron content and stress adaptation in plants using ferritin gene. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2001;18:351-71.
20. Stomp AM, Han KH, Wilbert S, Gordon MP, Cunningham SD. Genetic strategies for enhancing phytoremediation. *Ann NY Acad Sci* 1994;721:481-91.
21. King JC. Biotechnology: a solution for improving nutrient bioavailability. *Int J Vit Res* 2002;72(1): 7-12.
22. Lonnerdal B. Expression of human milk proteins in plants. *J Amer Coll Nutr* 2002;21(Suppl. 3):218S-21S.

23. Bhalla PL, Swodoba I, Singh MB. Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen. *Proc Natl Acad Sci USA*.1999; 96(20):11676-80.
24. Nakamura R, Matsuda T. Rice allergenic protein and molecular-genetic approach to hypoallergenic rice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60(8): 1215-21.
25. Liu Q, Singh S, Green A. High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *J Amer Coll Nutr* 2002;21(Suppl. 3):205S-11S.
26. Murphy DJ. Production of novel oils in plants. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10(2):175-80.
27. May OL, Wofford TJ Breeding transformed cotton expressing enhanced fiber strength. *J New Seeds* 2000;2(1):1-13.
28. Muir S. R, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric De Vos CH, Van Tunen AJ, Verheyen ME. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnol* 2001;19(5):470-74.
29. Le Gall G, Dupont MS, Mellon FA, Davis AL, Collins GJ, Verhoyern ME, Colquhoun JJ. Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *J Agric Food Chem* 2003;51(9):2438-46.
30. Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P, Aquilani R, Bouvier F, Camara B, Giuliano G. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Lett* 2002;519(1-3):30-4.
31. Sala F, Rigano M, Barbante A, Basso B, Walmsley AM, Castiglione S. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 2003;21(7-8):803-8.
32. Yusibov V, Hooper DC, Spitsin SV, Fleysh N, Kean RB, Mikheeva T, Deka D, Karasev A, Cox S, Randall J, Koprowski H. Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine* 2002;20(25/26):3155-64.
33. Han Mei, Su Tao, Zu YuanGang, An ZhiGang. Research advances on transgenic plant vaccines. *Acta Genetica Sinica* 2006;33(4):285-93.
34. Maloney BJ, Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li TC, Miyamura T, Arntzen CJ, Mason HS. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine* 2005;23:1870-4.
35. Thanavala Y, Mahoney M, Pal S, Scott A, Richter L, Natarajan N, Goodwin P, Arntzen CJ, Mason HS. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(9):3378-82.
36. Rigano MM, Alvarez ML, Pinkhasov J, Jin Y, Sala F, Arntzen CJ, Walmsley AM. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxinogenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 2004;22(7): 502-8.
37. Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2001;75(18):8434-39.
38. Pniewski T, Kapusta J, Bociag P, Kostrzak A, Fedorovicz- Stronska O, Czyz M, Gdula M, Krajewski P, Wolko B, Plucienniczak A. Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation. *Plant Cell Rep* 2012;31(3):585-95.
39. Schillberg S, Fischer R, Emans N. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(3):433-45.
40. Donini M, Morea V, Desiderio A, Pashkoulov D, Villani ME, Tramontano A, Benvenuto E. Engineering stable cytoplasmic intrabodies with designed specificity. *J Mol Biol* 2003; 330(2):323-32.
41. Arakawa T, Chong DKX, Langridge WHR. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnol* 1998;16(3):292-7.
42. Snowden SL, Langridge W.R. Plant-based-mucosal immunization. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2003;20(3/4):165-82.

43. Kim TG, Galloway DR, Langridge WHR. Synthesis and assembly of anthrax lethal factor-cholera toxin B-subunit fusion protein in transgenic potato. *Mol Biotechnol* 2004;28(3):175-83.
44. Mason HS, Haq TA, Clements JD. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing synthetic LT-B gene. *Vaccine* 1998;16(13):1336-43.
45. Sugita K, Endo-Kasahara S, Tada Y, Yasuda H, Hayashi Y, Jomori T, Ebinuma H, Takaiwa F. Genetically modified rice seeds accumulating GLP-1 analogue stimulate insulin secretion from a mouse pancreatic beta-cell line. *FEBS Lett* 2005;579(5):1085-88.
46. Warzecha H, Mason HS, Lane C, Trygvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol* 2003;77(16):8702-11.
47. Kramer U, Chardonens AN. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;55(6):661-72.
48. Davison J. Risk mitigation of genetically modified bacteria and plants designed for bioremediation. *J Industr Microbiol Biotechnol* 2005;32(11/12):639-50.
49. Kausch AP, Hague J, Oliver M, Li Y, Daniell H, Mascia P, Watrud LS, Stewart CN. Transgenic perennial biofuel feedstocks and strategies for bioconfinement. *Biofuels* 2010;1(1):163-76.
50. Macek T, Kotrba P, Svatos A, Novakova M, Demnerova K, Mackova M. Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. *Trends in Biotechnology* 2008;26 (3):146-52.
51. de Wilde C, Peeters K, Jacobs A, Peck I, Depicker A. Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants. *Mol Breed* 2002;9(4):271-82.
52. Huntley SK, Ellis D, Gilbert M, Chapple C, Mansfield SD. Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H-transformed poplars: improved chemical savings and reduced environmental toxins. *J Agric Food Chem* 2003;51(21):6178-83.
53. Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H-P, Matros A, Peterek S, Schijlen EGWM, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnol* 2008;26(11):1301-8.
54. Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnol* 1998;16(10):925-928.
55. Ruiz ON, Hussein HS, Terry N, Daniell H. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol* 2003;132(3):1344-52.
56. WHO. *Safety aspects of genetically modified foods of plant origin*. Geneva: WHO; 2000. (WHO/SDE/PHE/FOS/00.6).
57. Millstone E, Brunner E, Mayer S. Beyond substantial equivalence. *Nature* 1999;401:525-526.
58. WHO. Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food. *ITS Environmental Health Criteria* 70. Geneva: WHO; 1987.
59. Schenkelaars Biotechnology Consultancy. *GM food crops and application of substantial equivalence in the European Union*. The Netherlands; 2001. Disponibile all'indirizzo: [http://www.iatp.org/files/GM\\_Food\\_Crops\\_and\\_Application\\_of\\_Substantial\\_E.htm](http://www.iatp.org/files/GM_Food_Crops_and_Application_of_Substantial_E.htm); ultima consultazione 13/3/2014.
60. Novak WK, Haslberger AG. Substantial equivalence of antinutrients and inherent plant toxins in genetically modified novel foods. *Food Chem Toxicol* 2000;38(6):473-83.
61. Konig A, Cockburn A, Crevel RWR, Debruyne E, Grafstroem R, Hammerling U, Kimber I, Knudsen I, Kuiper HA, Peijnenburg AACM, Penninks AH, Poulsen M, Scauzu M, Wal JM. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem Toxicol* 2004;42(7):1047-88.
62. Redenbaugh K, Lindemann J, Malyi L. Application of the principles of substantial equivalence in the safety evaluation of FLAVR SAVR tomato, BXN cotton and oil-modified rapeseed. In: *Application*

- of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology..* Geneva: WHO; 1995. (WHO/FNU/FOS/95.1). p. 37-50.
63. Noteborn HPJM, Bienemann-Ploum ME, Van den Berg JHJ, Alink GM, Zolla L, Reynaerts A, Pensa M, Kuiper H. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CryIAb expressed in transgenic tomatoes. In: Engel K-H, Takeoka GR, Teranishi R. (Ed.). *Genetically Modified Foods-Safety Aspects, ACS symposium Series 605*. Washington DC: American Chemical Society; 1995. p. 134-47.
  64. Veneria E, Fanasca S, Monastra G, Finotti E, Ambra R, Azzini E, Durazzo A, Foddai MS, Maiani G. Assessment of the nutritional values of genetically modified wheat, corn and tomato crops. *J Agric Food Chem* 2008;56(19): 9206-14.
  65. Taylor ML, Satniewski EP, Riordan SG, Nemeth MA, George B, Hartnell GF. Comparison of broiler performance when fed diets containing Roundup Ready (event RT73), non transgenic control, or commercial canola meal. *Poultry Sci* 2004;83(3):456-61.
  66. Fuchs RL, Re DB, Rogers SG, Hammond B.G. Safety evaluation of glyphosate-tolerant soybeans. In *Food Safety Evaluation*. Paris: OECD; 1996. p. 61-75.
  67. Taylor NB, Fuchs RL, Macdonald J, Shariff AR, Padgett SR. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. *J Agric Food Chem* 1996;47(10):4469-73.
  68. Sanders PR, Lee TC, Groth RME, Astwood JD Fuchs RL. Safety assessment of insect-protected corn. In: Thomas JA (Ed.). *Biotechnology and safety assessment. 2nd ed.* Philadelphia: Taylor and Francis; 1998. p. 241-56.
  69. Brake J, Vlachos D. Evaluation of transgenic event 176 “Bt” corn in broiler chickens. *Poultry Sci* 1998;77(5):648-53.
  70. Brake J, Faust MA, Stein J. Evaluation of transgenic event Bt11 hybrid corn in broiler chickens. *Poultry Sci* 2003;82(4):551-59.
  71. Sidhu RS, Hammond BG, Fuchs RL, Mutz J-N, Holden LR, George B, Olson T. Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem* 2000;48(6):2305-12.
  72. Tutel’ian VA, Asiuk IN, Sorokina EIu, Alessshko-Ozhevskii IuP, Gapparov MM, Zhminchenko VM, Kodntsova VM, Nikol’skaia GV. Medical and biological assessment of genetically modified corn line MON 810 resistant to European corn borer and line GA21 resistant to glyphosate: a chemical study. *Voprosi Pitaniia* 2001; 70: 25-7.
  73. Autran JC, Benetrix F, Bloc D, Burghart P, Chaurands M, Combe N, Melcion JP. Composition and technological value of genetically modified and conventional maize (*Zea mays* L.) grains. *Sciences des Aliments* 2003; 23(2):223-47.
  74. Lavrik PB, Bartnicki DE, Feldman J, Hammond BG, Keck PJ, Love SL, Naylor MW, Rogan GJ, Sims SR, Fuchs RL. Safety assessment of potatoes resistant to Colorado potato beetle. In: Engel K-H, Takeoka GR, Teranishi R (Ed.). *Genetically modified foods-safety aspects*. Washington DC: ACS Symposium Series 605; 1995. p. 148-59.
  75. Monro JA, James KAC, Conner AJ. *Comparative nutritional evaluation of a transgenic herbicide-resistant potato and the parent cultivar*. Christchurch, New Zealand: Institute for Crop & Food Research; 1993. (Food Info Report no. 6)
  76. Rogan GJ, Bookout JT, Duncan DR, Fuchs RL, Lavrik PB, Love S., Mueth M, Olson T, Owens ED, Raymond PJ, & Zalewski J. Compositional analysis of tubers from insect and virus resistant potato plants. *J Agric Food Chem* 2000;48(12):5936-45.
  77. Bianco G, Schmitt-Kopplin P, Crescenzi A, Comes S, Kettrup A, Cataldi TRI. Evaluation of glycolaldehydes in tubers of genetically modified virus Y-resistant potato plants (va. Desiree) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (NACE-ESI-MS). *Anal Bioanal Chem* 2003;375(6):799-804.

78. Hashimoto W, Momma K, Katsube T, Ohkawa Y, Ishige T, Kito M, Utsumi S, Murata K. Safety assessment of genetically engineered potatoes with designed soybean glycinin: compositional analyses of the potato tubers and digestibility of the newly expressed protein in transgenic potatoes. *J Sci Food Agric* 1999;79(12):1607-12.
79. Nida DL, Patzer S, Harvey P, Stipanovic R, Wood R, Fuchs RL. Glyphosate-tolerant cotton: the composition of cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. *J Agric Food Chem* 1996;44(7):1967-74.
80. Sims SR, Berberich S, Nida DL, Segalini L, Leach JN, Ebert C, Fuchs RL. Crop physiology and metabolism: analysis of expressed proteins in fiber fractions from insect-protected and glyphosate-tolerant cotton varieties. *Crop Sci* 1996;36:1212-16.
81. Cai WenQi, Fang RongXiang, Shang HongSheng, Wang Xu, Zhang FengLi, Li YueRen, Zhang JiuChun, Cheng XiaoYing, Wang GuiLing, Mang KeQiang. Development of CMV-and TMV-resistant chili pepper: field performance and biosafety assessment. *Mol Breed* 2003;11(1):25-35.
82. Jonnala RS, Dunford NT, Chenault K. Nutritional composition of genetically modified peanut varieties. *J. Food Sci* 2005; 70 (4): S254-56.
83. Novak WK, Haslberger AG. Substantial equivalence of antinutrients and inherent plant toxins in genetically modified novel foods. *Food Chem Toxicol* 2000;38(6):473-83.
84. Cagni D, Ghizzoni C, Porretta S. Analysis of the volatile fraction of tomato concentrate from genetically modified fruits. *Riv Ital EPPOS*. 2000;29:21-7.
85. National Research Council. Safety of genetically engineered food: approaches to assessing unintended health effects. Washington DC: National Academies Press; 2004.
86. Aumaitre A, Aulrich K, Chesson A, Flachowsky G, Piva G. New feeds from genetically modified plants: substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain. *Livestock Prod Sci* 2002;74(3):223-8.
87. EFSA Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *EFSA J* 2004;99:1-93.
88. McCann MC, Trujillo WA, Riordan SG, Sorbet R, Bondanova NN, Shidu RS. Comparison of the forage and grain composition from insect-protected and glyphosate-tolerant MON 88017 corn to conventional corn (*Zea mays* L.). *Agric Food Chem* 2007;55(10):4034-42.
89. Nair RS, Fuchs RL, Schuette SA. Current methods for assessing safety of genetically modified crops as exemplified by data on Roundup Ready Soybeans. *Tox Pathol* 2002;30(1):117-25.
90. Aulrich K, Bohme H, Daenicke R, Halle I, Flachowsky G. Genetically modified feeds in animal nutrition. 1st Communication: *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn in poultry, pig and ruminant nutrition. *Arch Anim Nutr* 2001;54(3):183-95.
91. Masoero F, Moschini M, Rossi F, Prandini A, Pietri A. Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(b)) grown in northern Italy. *Maydica* 1999;44:205-9.
92. Pabst C, Utz HF, Melchinger AE, Eder J, Magg T, Klein D, Bohn M. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic Bt vs. non-Bt maize hybrids under European corn borer pressure. *Agronomy J* 2005;97(1):219-24.
93. Marasas WFO. Fumonisin: Their implications for human and animal health. *Nat Toxins* 1995;3(4):193-8.
94. Iavicoli I, Brera C, Carelli G, Caputi R, Marinaccio A, Miraglia M. External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75(6):381-6.
95. Rheeder J., Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham Y EW, Shepard GS, Van Scalkwyk DJ. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Tanskei. *Phytopathol* 1992;82(3):353-57.

96. International Agency for Research on Cancer. *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. 1993;56:1-445.
97. Munkvold GP, Hellmich RL, Rice LG. Comparison of Fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Dis* 1999;83(2):130-8.
98. Munkvold GP, Hellmich RL. Genetically modified, insect resistant maize: Implications for management of ear and stalk diseases. Online. *Plant Health Progress* 2000;doi:10.1094/PHP-2000-0912-01-RV.
99. Munkvold GP, Hellmich RL, Showers WB. Reduced Fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of corn genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathol* 1997;87:1071-7.
100. Odvody GN, Chilcutt CF, Parker RD, Benedict JH. Aflatoxin and insect response of near-isogenic Bt and Non-Bt commercial corn hybrids in South Texas. In: *Proceedings of the Aflatoxin/Fumonisin Workshop* Yosemite, CA 2527; 2000. p. 121-22.
101. Ostry V, Ovesna J, Skarkova J, Pouchova V, Ruprich J. A review on comparative data concerning Fusarium mycotoxins in Bt maize and non-Bt isogenic maize. *Mycotox Res* 2010;26:141-145.
102. Wiatrak PJ, Wright DL, Marois JJ, Wilson D. Influence of planting date on aflatoxin accumulation in Bt, non-Bt, and tropical non-Bt hybrids. *Agron J* 2010;97(2):440-5.
103. Williams WP, Windham GL, Buckley PM, Daves CA. Aflatoxin accumulation in conventional and transgenic corn hybrids infested with Southwestern Corn Borer (lepidoptera: Crambidae). *J Agric Urban Entomol* 2002;19(4):227-36.
104. Wu F. Bt corn and impact on mycotoxins. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2007;2:60.
105. Pietri A, Piva G. Occurrence and control of mycotoxins in maize grown in Italy. In: Piva G, Masoero F (Ed.). *Proceedings of the 6th International Feed Production Conference*. Piacenza; 2000. p. 226-36.
106. Valenta H, Danicke S, Flachowsky G, Bohme T. Comparative study on concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Mycotoxin Res* 2001;17(Suppl. 1):15-8.
107. Bakan B, Melcion D, Richard-Molard D, Cahagnier B. Fungal growth and fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J Agricult Food Sci* 2002; 50(4):728-31.
108. Clements MJ, Campbell KW, Maragos CM, Pilcher C, Headrick JM, Pataky JK, White DG. Influence of Cry1Ab protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and Fusarium ear rot of corn. *Crop Sci* 2003; 43:1283-93.
109. de la Campa R, Hooker D, Miller J, Schaafsma A, Hammond B. Modeling Effects of Environment, Insect Damage, and Bt Genotypes on Fumonisin Accumulation in Maize in Argentina and the Philippines. *Mycopathologia* 2005;159:539-52.
110. Hammond BG, Campbell KW, Pilcher CD, Degooyer TA, Robinson AE, McMillen BL, Spangler SM, Riordan SG, Rice LG, Richard JL. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. *J Agric Food Chem* 2004;52(5):1390-7.
111. Magg T, Melchinger AE, Klein D, Bhoan M. Relationship between european corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by Fusarium spp in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts and commercial varieties. *Plant Breed* 2004;121:146-54.
112. Maupin LM, Clements MJ, Walker SL, White DG. Effects of Cry1Ab on Aspergillus ear rot and aflatoxin in commercial corn hybrids. *Phytopatol* 2002;91(6):6.
113. Reuter T, Aulrich K, Berk A, Falchowsky G. Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition. Chemical composition and nutritional evaluation. *Arch Anim Nutr* 2002;56(1):23-31.

114. Dowd PF. Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions: utility and limitations. *J Econ Entomol* 2000;93(6):1669-79.
115. Cahagnier B, Melcion D. Mycotoxines de Fusarium dans le maïs-grains à la récolte: relation entre la présence d'insectes (pyrale, sesamie) et la teneur en mycotoxines. In: Piva G, Masoero F (Ed.). *Proceedings of the 6th International Feed Production Conference*. Piacenza; 2000. p. 237-49.
116. Folcher L, Delos M, Marengue E, Jarry M, Weissenberger A, Eychenne N, Regnault-Roger C. Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agron Sustain Dev* 2010;30(4):711-9.
117. Wild PC, Gong Yun Yun. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcin* 2010;31(1):71-82.
118. World Health Organization. *Fumonisin B1*. Geneva: WHO; 2000. (Environmental Health Criteria 219).
119. Locatelli S, Carlotta Balconi C. Indagine sulla contaminazione da micotossine in maïs: campagna 2013. *Mangimi e Alimenti* 2014. Disponibile all'indirizzo: <http://mangimiealimenti.it/articoli/914-indagine-sulla-contaminazione-da-micotossine-in-mais-campagna-2013>; ultima consultazione 11/12/16.
120. Bidoli E, De Dottori M, Serraino D, Vicario G, Zanier L. *Registro Tumori del Friuli-Venezia Giulia: dati di incidenza, 1999-2003*. Aviano: Centro di Riferimento Oncologico; 2007. p. 1-78. <http://www.epicentro.iss.it/temi/tumori/FVG99-03.asp>; ultima consultazione 21/03/2012.
121. Franceschi S, Bidoli E, Baròn AE, La Vecchia C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(17):1407-11.



## 2. RICOMBINAZIONE NATURALE NELLE PIANTE E INSERIMENTO DEL DNA TRANSGENICO

Il miglioramento genetico (*breeding*) classico delle piante per ottenere nuove varietà ha utilizzato sia metodi genetici associati alla variabilità genetica naturale, sia metodi artificiali. La struttura genetica delle popolazioni vegetali è stata modificata profondamente dalle tecniche di miglioramento genetico classico, nel quale giocano un ruolo essenziale i meccanismi di ricombinazione cromosomica (1). La ricombinazione cromosomica influenza non solo la variabilità genetica, ma anche la velocità e l'efficienza con cui si ottiene la combinazione genica desiderata. I miglioratori (*breeders*) selezionando i ricombinanti, finiscono per selezionare inavvertitamente, genotipi vegetali con un'alta frequenza di fusioni tra cromosomi accoppiati. È ben noto che la frequenza di tali fusioni è sotto controllo genetico e che le *cultivar* moderne hanno una frequenza di fusioni superiore a quella della popolazione naturale da cui derivano (2, 3).

Il meccanismo di ricombinazione predominante nelle piante è il processo di unione, non omologa, dei filamenti terminali del DNA (ricombinazione illegittima), che si ritiene sia un meccanismo naturale di riparo delle rotture della doppia elica (4). Le caratteristiche principali di questo meccanismo sono:

- l'unione dei filamenti terminali per semplice azione di ligasi, senza alterazione della sequenza, è un evento raro;
- l'unione dei filamenti è generalmente associata a delezioni che vanno da 1 pb a più di 1 kb;
- l'unione avviene con maggior frequenza nelle aree con ripetizioni corte (5).

Questi dati suggeriscono, perciò, che il meccanismo di riparo nelle piante sia più suscettibile di errore che in altri organismi, e che errori che cambiano la sequenza genica originale avvengano con una frequenza molto alta.

Studi sull'evoluzione dei geni che conferiscono resistenza a malattie (6) e che influiscono sulla qualità della pianta (7), suggeriscono che tali geni originano dal rimescolamento di domini di sequenza all'interno della famiglia genica. È noto da qualche tempo che nelle piante, come in altri organismi, vi siano dei punti caldi di rottura per la ricombinazione (8, 9), e che vi siano forti differenze nella frequenza di ricombinazione in differenti regioni del genoma (10-12). In particolare, sono punti caldi per la ricombinazione le regioni ricche di geni (7, 9). La spiegazione di questo meccanismo non è nota, anche se si ritiene siano coinvolte alcune caratteristiche strutturali dei cromosomi come le regioni prive di nucleosomi, che facilitano l'attacco delle nucleasi (11).

L'ingegneria genetica ha sviluppato metodi alternativi per integrare DNA esogeno in una pianta come il metodo biolistico e la trasformazione mediata da *Agrobacterium*, descritti sommariamente nell'introduzione.

Il metodo biolistico è basato sull'ingresso in un tessuto vegetale di micropiroteili, d'oro o tungsteno, ricoperti di DNA, sparati nelle cellule. La capacità di queste particelle di inserire il DNA nelle cellule vegetali senza danneggiarle non è nota. Il metodo con *Agrobacterium* sfrutta la capacità di questo batterio del suolo di copiare e trasferire, nel nucleo della cellula vegetale, una porzione specifica di DNA (denominato T-DNA) presente su un plasmide che induce tumore (Ti), DNA che è integrato nel nucleo della cellula. Il processo avviene attraverso tre passaggi che possono essere sintetizzati in iniziazione, trasferimento da batterio a pianta e inserimento nel nucleo (13). Questi processi richiedono le proteine *vir* del batterio e alcuni fattori della pianta. Il T-DNA si integra nel genoma della pianta, anche in assenza di qualsiasi

omologia con tale genoma, utilizzando il meccanismo di ricombinazione illegittima descritto sopra (14, 15). Il meccanismo di ricombinazione illegittima richiede a sua volta l'attivazione del meccanismo di rottura della doppia elica (16).

L'inserzione del DNA transgenico nel cromosoma può avvenire o come singola copia o con inserzioni multiple (17-19). Oltre ad un'inserzione "perfetta", possono avvenire dei riarrangiamenti del costrutto transgenico e del sito bersaglio. I riarrangiamenti sono spesso associati ad instabilità nell'espressione del transgene (20, 21). L'integrazione mediata dall'*Agrobacterium*, può dare origine a schemi d'integrazione complessi, comprese ripetizioni dirette od invertite (22). In alcuni casi, il DNA della pianta si trova come riempimento tra le ripetizioni di T-DNA che si può trovare ripetuto anche per fusione diretta (21). Al sito di inserzione è possibile osservare riarrangiamenti cromosomici, che possono essere sia inversioni (19) che traslocazioni (23). Inoltre si osservano sequenze appartenenti al plasmide batterico al di fuori del sito d'inserzione, sia a destra sia a sinistra di questo (24).

Il sequenziamento delle regioni fiancheggianti il T-DNA ha evidenziato che si tratta di regioni ricche in AT (25); tali regioni sono anche i siti preferenziali dei transgeni introdotti con il metodo biolistico (26, 27). Questi risultati suggeriscono che il meccanismo cellulare d'inserzione del T-DNA e del DNA "nudo" del metodo biolistico sia lo stesso.

Studi di mappatura hanno dimostrato che almeno in pomodoro (28) e in patata (29) non vi sono preferenze per l'integrazione del transgene. Tuttavia i transgeni, e in particolare i transgeni contenenti T-DNA, per i quali sono disponibili più dati, preferiscono per l'inserzione le regioni ricche di geni. La preferenza del T-DNA per domini attivi della cromatina supera il 70% nel tabacco (17) in *Arabidopsis* e nel riso (12). Tale preferenza conferisce al T-DNA la capacità di indurre mutazioni a causa della perdita di funzioni geniche (30).

La localizzazione del sito d'integrazione e la sua struttura sono rilevanti ai fini dell'identificazione di geni espressi stabilmente. Infatti, loci transgenici con espressione instabile sono correlati con pattern d'integrazione molto complessi (19, 20, 25). Nel tabacco espressioni stabili si ottengono quando il transgene è localizzato preferibilmente nei telomeri (31). Nelle monocotiledoni, analogamente, il transgene è localizzato preferibilmente sulla parte distale del braccio cromosomico (32), in regioni ricche di geni (10-12).

Integrazioni complesse si osservano anche con il metodo biolistico (33). L'analisi di 13 linee di avena transgenica ha dimostrato che il DNA transgenico era inframmezzato dal DNA genomico dell'ospite e che il numero delle inserzioni del DNA transgenico nei loci del transgene variava da 2 a 12 (33).

I meccanismi di ricombinazione illegittima forniscono alle piante un modo "naturale" per sviluppare una nuova variabilità genetica, ma questi meccanismi che, come si è detto, sono più suscettibili di errori, possono causare degli effetti indesiderati sia nel *breeding* classico sia nell'integrazione di DNA estraneo. Nel *breeding* classico, la pratica di selezionare le linee con caratteristiche favorevoli, scartando quelle con proprietà indesiderate, riduce il numero di effetti indesiderati descritti (Tabella 4).

**Tabella 4. Effetti indesiderati ottenuti in programmi di riproduzione controllata**

Pianta	Modifica	Effetto indesiderato	Riferimento bibliografico
Orzo	Resistente a malattia	Bassa resa	34
Sedano	Resistente agli insetti	Alta concentrazione di furanocumarine	35, 36
Mais	Alto contenuto in lisina	Bassa resa	37
Patata	Resistente agli insetti	Bassa resa, alta concentrazione di glicocalcoidi	38, 39
Zucchina	Resistente agli insetti	Alta concentrazione di cucurbitacina	40, 41

Uno dei casi più noti, tra quelli indicati, è quello della patata Lenape, ottenuta, alla fine degli anni '60 da Wilford Mills, alla *Pennsylvania State University*, incrociando una varietà coltivata, la *Delta gold*, con una patata selvatica originaria del Perù. I geni selvatici conferivano alla nuova varietà un'ottima resistenza agli insetti e all'attacco del fungo *Phytophthora infestans*. Le patate Lenape, fatte analizzare a seguito di un episodio di intossicazione, contenevano un'alta concentrazione di glicoalcaloidi, caratteristica che ha causato il ritiro dal commercio di questa varietà (42).

Alcuni studi effettuati con tecniche di microarrays, hanno evidenziato che l'ingegneria genetica causa perturbazioni minori nell'espressione di altri geni rispetto al *breeding* tradizionale (vedi capitolo 3). Dati di letteratura hanno evidenziato che le piante transgeniche finora prodotte sono sostanzialmente: a) identiche come fenotipo (43); b) simili, sotto il profilo genico, alla loro controparte tradizionale (44-50).

## Bibliografia

1. Allard RW. History of plant population genetics. *Ann Rev Gen* 1999;33:1-27.
2. Rees H. Genetic systems, recombination and variability. In: Haywars MD, Bosemak RO, Carezo M, Roamgosa I (Ed.). *Plant breeding: Principles and prospects*. New York: Barnes and Noble; 1993. p. 9-15.
3. Riley R, Chapman V, Jonhson R. The incorporation of alien disease resistance in wheat genetic interferes with the regulation of meiotic chromosome synapsis. *Genet Res* 1968;12(2):199-219.
4. Britt AB. DNA damage and repair in plants. *Ann Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol* 1996;47:75-100.
5. Gourbunova V, Levy AA. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends Plant Sci* 1999;4(7):263-9.
6. Richter TE, Pryor TJ, Bennetzen J, Hulbert SH. New rust resistance specificities associated with regulation of meiotic chromosome synapsis. *Genetics* 1995;141(2):373-81.
7. Fridman E, Plebant T, Zamir. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(9):4718-23.
8. Lichten M, Goldman AS. Meiotic recombination hot spots. *Ann Rev Gen* 1995;29:423-44.
9. Schnable PS, Hsia A-P, Nikolau BJ. Genetic recombination in plants. *Curr Op Plant Biol* 1998;1(2):123-9.
10. Gill KS, Gill BS, Endo TR, Taylor T. Identification and high-density map of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics* 1996;144: 1883-91.
11. Faris JD, Haen KM, Gill S. Saturation mapping of gene-rich recombination hot spot region in wheat. *Genetics* 2000;154(2):823-35.
12. Barakat A, Gallois P, Raynal M, Mestre-Ortega D, Sallaud C, Guiderdoni E, Delsney M, Bernardi G. The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic *Arabidopsis* and rice. *FEBS Lett* 2000;471(2-3):161-4.
13. Ward DV, Zambrisky PC. The six functions of *Agrobacterium virE2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(2):385-6.
14. Ohba T, Yoshioka Y, Machida C, Machida Y. DNA rearrangements associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example of multiple duplications of DNA around the integration target. *Plant J* 1995;7(1):157-64.
15. Gelvin SB. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Ann Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol* 2001;52:223-56.

16. Salomon S, Puchta H. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J* 1998;17(20): 6086-95.
17. Koncz C, Martini N, Mayrhofer R, Koncz-Kalman Z, Korber H, Redei GP, Schell J. High-frequency T-DNA mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(21):8467-71.
18. Palowski SW, Somers DA. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Mol Biotech* 1996;6(1):17-30.
19. Laufs P, Autran D, Traas J. A chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in Arabidopsis. *Plant J* 1999;18(2):131-9.
20. Fladung M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Mol Gen Genetics* 1999;260(5-6):574-81.
21. Kumar S, Fladung M. Transgene repeats in aspen: molecular characterization suggests simultaneous integration of independent T-DNAs into receptive hotspots in the host genome. *Mol Gen Genetics* 2000;264(1-2):20-8.
22. Kizkova L, Hroudá M. Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. *Plant J* 1998;16(6):673-80.
23. Castle LA, Errampalli D, Atherton TL, Franzmann LH, Yoon ES, Meinke DW. Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in Arabidopsis. *Mol Gen Genetics* 1993;241(5-6):504-14.
24. De Buck S, De Wilde C, van Montagu M, Depicker A. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation. *Mol Breeding* 2000;6(5):459-68.
25. Matzke AJM, Matzke MA. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr Opin Plant Biol* 1998;1(2):142-8.
26. Sawasaki T, Takahashi M, Goshima N, Morikawa H. Structure of transgene loci in transgenic Arabidopsis plant obtained by particle bombardment. Junction regions can bind to nuclear matrices. *Gene* 1998;218(1):27-35.
27. Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix P, Fauquet C, Huang N, Kohli A, Mooibroek H, Nicholson L, Nguyen T, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers DA, Stoger E, Taylor N, Visser R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and reality. *Mol Breed* 2005;15(3):305-27.
28. Thomas CM, Jones DA, English JJ, Carroll BJ, Bennetzen JL, Harrison K, Burbidge A, Bishop GJ, Jones JDG. Analysis of the chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNA in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Mol Gen Genetics* 1994;242(5):573-85.
29. Jacobs JE, van Eck J, Arens P, Verkerl-Bakker B, te Lintel Hekkert B, Bastiaansen HJM, El-Kharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ. A genetic map of potato (*S. tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theor Appl Gen* 1995;91(3): 289-300.
30. Koncz C, Nemeth K, Redei GP, Schell J. T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 1992;20(5):963-76.
31. Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuheuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke M, Matzke AJ. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* 1997; 9(8):1251-64.
32. Pedersen C, Jimmy J, Beker D, Jahne-Gartner A, Lorz H. Localization of introduced genes on the chromosome of transgenic barley, wheat, triticale by fluorescence in situ hybridization. *Theor Appl Gen* 1997;94(6-7):749-747.
33. Pawlowski WP, Somers DA. Transgenic oat integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(21):12106-10.

34. Thomas WTB, Baird E, Fuller JD, Lawrence P, Young GR, Russel J, Ramsay L, Waugh R, Powell W. Identification of a QTL decreasing yield in barley linked to Mlo powdery mildew resistance. *Mol Breed* 1998;4(5):381-93.
35. Seligman PJ, Mathias CGT, O'Malley M, Beier RC, Fehrs LJ, Serill WS, Halperin WE. Phytodermatitis from celery among grocery store workers. *Arch Dermatol* 1987;123(11):1478-82.
36. Beier RC. Natural pesticides and bioactive components in food. *Rev Environ Contamin Toxicol* 1990;113:47-137.
37. Villegas E, Vasal SK, Bjarnason NM. Quality Maize: what it is and how it was developed. In: Mertz ET (Ed.). *Quality protein maize*. St. Paul: American Association of Cereal Chemists; 1990. p. 27-48.
38. Zitnak A, Johnston GR Glycoalkaloid content of b5141-6 potatoes. *Am J Pot Res* 1970;47(7):256-60.
39. Harvey MH, McMillan M, Morgan MR, Chan HW. Solanidine is present in sera of healthy individuals and in amounts dependent on their dietary potato consumption. *Hum Toxicol* 1985;4(2):187-94.
40. Kirschman JC, Suber RL. Recent food poisonings from cucurbitacin in traditionally bred squash. *Food Chem Toxicol*. 1989;27(8):555-6.
41. Coulston F, Kolbye AC. Biotechnologies and food: assuring the safety of foods produced by genetic modification. *Reg Toxicol Pharmacol* 1990; 12(3):S1-S196.
42. Fedoroff N, Brown NM. Mendel in the Kitchen. Washington DC: Joseph Henry Press; 2004.
43. Bouché N, Bouchez D. Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted: *Curr Opin Plant Biol* 2001;4(2):11-7.
44. El Ouakfaoui S, Miki B. The stability of the Arabidopsis transcriptome in transgenic plants expressing the marker genes nptII and uidA. *Plant J* 2005; 41(6):791-800.
45. Zhang L, Fetch T, Nimala J, Schmierer D, Brueggeman R, Steffenson B, Kleinhofs A. Rpr1, a gene required for RPG1-dependent resistance to stem rust in barley. *Theor Appl Gen* 2006;113(5):847-55
46. Baudo MM, Lyons R, Powers S, Pastori GM, Edwards KJ, Holdsworth MJ, Shewry PR. Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. *Plant Biotech J* 2006;4(4):369-80.
47. Dubouzet JG, Ishihara A, Matsuda F, Miyagawa H, Iwata H, Wakasa K. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses of high-tryptophan rice expressing a mutant anthranilate synthase alpha subunit, *J Exp Bot* 2007; 58(12):3309-21.
48. Batista R, Saibo N, Lourenço T, Oliveira MM. Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(9):3640-5.
49. Cheng KC, Beaulieu J, Iquira E, Belzile FJ, Fortin MG, Strömviik MV. Effect of transgenes on global gene expression in soybean is within the natural range of variation of conventional cultivars. *J Agric Food Chem* 2008;56(9):3057-67.
50. Kogela KH, Vollb LM, Schäfer P, Jansena C, Wuc Y, Langena G, Imania J, Hofmannb J, Schmiedlb A, Sonnewaldb S, von Wettsteina D, Cookc RJ, Sonnewaldb U. Transcriptome and metabolome profiling of fieldgrown transgenic barley lack induced differences but show cultivar-specific variances. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(14):6198-6203.

### 3. EFFETTI NON PREVISTI DOVUTI ALL'INSERZIONE DEL TRANSGENE

I nuovi prodotti, con profili nutrizionali volutamente diversi dalla controparte d'origine, siano essi OGM o convenzionali, richiedono un'analisi attenta per evitare eventuali effetti indesiderati sui componenti della pianta; effetti originati dall'inserimento casuale del nuovo gene nel genoma della pianta. Infatti, come già descritto nel Capitolo 2 l'integrazione del transgene avviene nelle piante con un meccanismo di ricombinazione illegittima, non essendovi sequenze preferite per l'integrazione nel genoma (1). Alla luce delle conoscenze odierne è impossibile prevedere il destino e il sito d'integrazione di un particolare costrutto transgenico, anche conoscendone la sequenza. Nel pomodoro (2) e nella patata (3), ad esempio, è stato dimostrato, con analisi di sequenza, che non vi sono preferenze per il sito di integrazione. Invece i transgeni ottenuti con T-DNA si integrano preferibilmente in regioni ricche di geni. La preferenza del T-DNA per le regioni trascrizionalmente attive deriva dal fatto che il T-DNA utilizza lo stesso *pathway* del meccanismo di riparo delle piante, basato sulla ricombinazione non omologa delle terminazioni (4). Questo meccanismo fornisce alle piante un mezzo "naturale" per sviluppare una nuova variabilità genetica, che può provocare effetti indesiderati sia nel breeding classico sia nella transgenesi. Vi sono molti esempi di effetti non previsti derivanti dalle modifiche introdotte dai transgeni (5-15 e Tabella 5). Tali effetti si manifestano spesso solo con la coltivazione della pianta in particolari condizioni ambientali. Come conseguenza alcuni fenotipi transgenici non sono adatti allo sviluppo commerciale.

**Tabella 5. Esempi di effetti non previsti in piante transgeniche**

Pianta	Effetto non previsto	Rif.
Colza	La sovraespressione della fitoene sintetasi provoca un aumento di 500 volte nei livelli di $\alpha$ e $\beta$ -carotene ma non della luteina, il carotenoide più importante nei semi di controllo	5
Colza	Le piante rese resistenti al glufosinato di ammonio con la introduzione del gene Bar, regolato dal promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), diventano sensibili all'erbicida se infettate dal CaMV	6
Mais	Gli stocchi del mais Bt contengono più lignina dei controlli con probabile effetto sulla degradazione e sulla digestione	7
Patata	Piante di patata, trasformate con geni di lectina per renderle resistenti agli insetti, hanno dei bassi livelli fogliari di glicocalcoidi una difesa naturale della pianta dagli attacchi degli insetti	8
Patata	Le piante, in cui era stato introdotto il gene della levansucrase batterica per ottenere la sintesi dei fruttani, avevano un ridotto trasporto degli zuccheri e uno sviluppo dei tuberi alterato	9
Riso	Il riso transgenico, contenente il gene della glicinina, isolato dalla soia, contiene il 20% in più di proteina e il 50% in più di vitamina B6 rispetto ai controlli	10
Riso	Il cosiddetto <i>golden rice</i> , trasformato per esprimere un alto contenuto di $\beta$ -carotene, un precursore della Vitamina A, esprime anche alti livelli di altri carotenoidi, precursori poco efficaci della vitamina stessa	11
Riso	Un riso transgenico, realizzato per avere un basso contenuto in glutelina, una proteina responsabile d'intolleranze alimentari, ha alti livelli di prolamine, un'altra classe di proteine responsabili di intolleranze alimentari	12
Soia	La soia, resa resistente all'erbicida glifosato, ha un contenuto in lignina del 20% superiore al controllo, a temperatura del suolo normale (20°C), ma dà una resa più bassa, a causa della rottura dei gambi, a temperatura del suolo elevate (45°C)	13

Ne sono un esempio, una varietà di frumento e una varietà di patata. Nel caso del frumento, la sovraespressione della fosfatidilserina sintetasi con l'obiettivo di rendere le piante resistenti all'alluminio, ha portato allo sviluppo di aree necrotiche (14). Nel caso della patata, l'introduzione della capacità di produrre il fruttano ha perturbato il trasporto dei carboidrati nelle cellule e lo sviluppo dei tuberi (15, 16). In un altro esempio l'espressione del gene dell'invertasi di lievito nella patata ha portato non solo alla modifica prevista del metabolismo dei carboidrati ma anche ad una diminuzione del contenuto in glicoalcaloidi. Poiché i glicoalcaloidi sono tossici, tale patata è stata sottoposta a un'attenta valutazione e si è scoperto che la riduzione del contenuto in glicoalcaloidi era associata a differenze nella capacità di maturazione della pianta transgenica rispetto a quella non modificata (17).

Questi esempi dimostrano che, mirando anche ad una singola modifica, si possono avere degli effetti inaspettati sui livelli di altri costituenti della pianta transgenica.

Per individuare la presenza di effetti non intenzionali, sono attualmente disponibili tecniche analitiche capaci di generare una grande quantità di dati, come la genomica funzionale, la proteomica e la metabolomica. Nell'applicazione di queste tecniche agli alimenti, è essenziale avere a disposizione controlli multipli al fine di valutare la variabilità biologica intrinseca e quella dovuta alle condizioni ambientali.

L'utilizzazione della genomica (*DNA microarray technology*) per migliorare le strategie di valutazione delle PGM e l'identificazione di effetti non previsti è stata valutata nell'ambito del progetto dell'Unione europea *New Methodologies for Assessing the Potential of Unintended Effects in Genetically Modified Food Crops GMOCARE* (18). Studi recenti con i microarrays hanno dimostrato che l'inserimento del DNA transgenico causa solo perturbazioni minori nell'espressione degli altri geni della pianta.

Maggiori applicazioni ha avuto la proteomica che è un'unione di tre metodologie: l'elettroforesi bidimensionale (2D) ad alta risoluzione, utilizzata per separare le proteine presenti nel campione; l'analisi dell'immagine, utilizzata per effettuare la comparazione e la spettrometria di massa utilizzata per caratterizzare le proteine d'interesse.

L'applicazione della proteomica alle patate transgeniche ha dimostrato che l'esame di 1111 proteine in 32 varietà non GM (di cui 8 popolazioni locali) rivelava differenze in ben 1077 proteine (19). Questo risultato dimostra che più del 96% delle proteine ha livelli di espressione differenti nelle varietà non GM. Quando sono state paragonate 10 linee GM, ottenute con tre costrutti diversi, con le linee isogeniche non GM, soltanto 9 proteine presentavano differenze significative sulle 730 esaminate. La modifica genetica causava variazioni nei livelli di espressione in meno dello 1,3% delle proteine totali. Risultati simili sono stati ottenuti nel mais (20, 21).

L'insieme dei metaboliti in una cellula è chiamato metabolone, e la scienza di misurarli metabolomica. Nel nostro caso la metabolomica ha come obiettivo di identificare le differenze metaboliche tra PGM e una popolazione di controllo fatta crescere sotto identiche condizioni. In metabolomica vengono utilizzate differenti tecniche analitiche selezionate in base alla natura chimica del metabolita da analizzare (22-34). Utilizzando la gas cromatografia collegata alla spettrometria di massa in patate transgeniche, modificate per il metabolismo del saccarosio e il contenuto in amido, sono stati trovati trealosio, maltosio e isomaltosio, assenti invece nella patata non modificata (22). Sempre con la spettrometria di massa non sono state evidenziate differenze nel contenuto in glicoalcaloidi in patate transgeniche rispetto alle patate convenzionali (27). Catchpole e collaboratori (28) hanno analizzato il profilo metabolico di 5 linee di patata non GM e 6 linee GM, modificate per esprimere l'inulina, con l'aggiunta di uno o due geni del carciofo. L'analisi ha riguardato 252 metaboliti, tra questi, nelle patate GM, è stato evidenziato un aumento di solo 6 metaboliti e in particolare di quelli coinvolti nel metabolismo del fruttano, risultato atteso in quanto l'inulina è un polifruttano. Il profilo degli altri metaboliti

non presentava differenze tra linee GM e le corrispondenti linee isogeniche non GM, mentre era possibile distinguere, sotto il profilo metabolico le linee non GM tra loro. In questo caso, la modifica genetica *per se* non ha influenzato in modo significativo il profilo metabolico.

Altri studi hanno riguardato tre linee di grano transgenico paragonato con linee di grano convenzionale, coltivate per tre anni in differenti località del Regno Unito (29). Le analisi effettuate hanno dimostrato un effetto più significativo del sito e dell'anno di coltivazione che non del genotipo. Le differenze tra linee transgeniche e linee convenzionali erano generalmente dello stesso ordine di grandezza delle differenze osservate tra le linee di controllo coltivate in differenti siti e in anni diversi. In un riso transgenico che *sovraesprime* un gene mutato per l'antranilato sintetasi si osserva l'accumulo di grandi quantità di triptofano. L'accumulo di triptofano aveva solo effetti minori sul metaboloma e sul trascrittoma della pianta, paragonata con la controparte tradizionale (30). La validità di questi esperimenti è comunque influenzata dalla scelta di un comparatore appropriato (31-34).

Per effettuare questi confronti possono essere utilizzate le tavole con gli spettri di massa di parecchie centinaia di composti, presenti nelle piante, resi disponibili sul web dal *Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm* (<http://www-en.mpimp-golm.mpg.de/webbasedRsrc/index.html>; ultima consultazione 11/03/2014).

Studi di risonanza magnetico nucleare su pomodori, trasformati per produrre più flavonoidi, che sono dei potenti antiossidanti, hanno dimostrato che i flavonoidi, nel transgenico, contenevano alcuni composti (per lo più glicosidi dell'aglicone più comune il kempferolo) nuovi per il pomodoro (35, 36). Sebbene tali composti siano stati identificati, in precedenza, in altre piante, si sa poco sull'assorbimento e gli effetti biologici di questi composti nell'uomo. È questo il caso che richiede maggiori indagini sui composti "desiderati" per la valutazione della sicurezza d'uso.

Il complesso dei lavori disponibili dimostra che gli effetti non previsti non si trasformano automaticamente in rischi per la salute e che soltanto le PGM che presentano differenze significative rispetto alla controparte devono essere sottoposti ad ulteriori indagini e valutazioni (37-48).

Le nuove tecniche analitiche sono in grado di fornire una grande quantità di dati, tuttavia la loro interpretazione presenta alcune difficoltà dovute alla variabilità naturale a livello di genotipo e dei metaboliti. La possibilità di evidenziare i potenziali rischi associati all'inserimento del transgene è condizionata dalla disponibilità di approfondite conoscenze sulla variazione naturale a livello di geni, proteine e metaboliti anche in funzione delle diverse condizioni ambientali ipotizzabili. Sono comunque necessari altri studi per validare queste metodologie e il loro impiego per la valutazione degli effetti non previsti dovuti all'inserimento del transgene (49).

## Bibliografia

1. Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engelf KH, Gatehouse AMR, Karenlampi S, Kok EJ, Leguay J-J, Lehesranta S, Noteborn HPJM, Pedresen J, Smith M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem Toxicol* 2004;42(7):1089-125.
2. Thomas CM, Jones DA, English JJ, Carroll BJ, Bennetzen JL, Harrison K, Burbidge A, Bishop GJ, Jones JD. Analysis of chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNAs in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Mol Gen Genetics* 1994;242(5):573-85.
3. Jacobs JME, Van Eck HJ, Arens P, Verkerk-Bakker B, te Lintel Hekkert B, Bastianssen HJM, El-Khabotly A, Pereira A., Jacobsen E, Stiekema WJ. A genetic map of potato (*S. tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons and classical markers. *Theor Appl Gen* 1995;91:289-300.



4. Goubunova V, Levy AA. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends Plant Sci* 1999;4(7):263-69.
5. Shewmaker CK, Sheely JA, Daley M, Colburn S, Ke DY. Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* 1999;20(4):401-12.
6. Al-Kaff NS, Kreike MM, Covey SN, Pitcher R, Page AM, Dale PJ. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter regulated transgene. *Nature Biotechnol* 2000;18(9):995-99.
7. Saxena D, Stotzky G. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *Am J Botany*.2001;88(9):1704-6.
8. Birch ANE, Geoghegan IE, Griffiths DW, McNicol JW. The effects of genetic transformation for pest resistance on foliar solanidine-based glycolalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*) *Ann Appl Biol* 2001;140(2):143-49.
9. Turk SCHJ, Smeekens SCM. Genetic modification of plant carbohydrate metabolism. In: Chopra VL, Malik VS, Bhat SR (Ed.) *Applied Plant Biotechnology*. Enfield: Science Publishers; 1999. p. 71-100.
10. Momma K, Hashimoto W, Ozawa S, Kawai S, Katsube T, Kito M, Utsumi S, Murata K. Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63(2):314-18.
11. Potrykus I. Nutritionally enhanced rice to combat malnutrition disorders of the poor. *Nutr Rev* 2003;61:101-4.
12. Kusaba M, Miyahara K, Iida S, Fukuoka H, Takano T, Sassa H, Nishimura M, Nishio T. Low glutelin content: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell* 2003;15(6):1455-67.
13. Gertz JM, Vencill WK, Hill NS. Tolerance of transgenic soybean (*Glycine max*) to heat stress. In: *British Crop Protection Council (Ed.). Proceedings of the 1999 Brighton Crop Protection Conference: Weeds. Vol 3*. Farnham: BCPC; 1999. p. 835-40.
14. Delhaize E, Hebb DM, Richard KD, Lin JM, Ryan PR, Gardner RC. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum*) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *J Biol Chem* 1999;274(11):7082-88.
15. Dueck ThA, Werf A, Jordi WRM, Lotz LAP. Methodological approach to a risk analysis for polygene-genetically modified plants (GMPs): a mechanistic study. *AB Nota Vol. 50*. Wageningen: Research Institute for Agrobiological and Soil Fertility (AB-DLO); 1998.
16. Turk SCHJ, Smeekens SCM. Genetic modification of plant carbohydrate metabolism, In: Chopra VL, Malik VS, Bhat SR (Ed.) *Applied Plant Biotechnology*. Enfield: Science Publisher; 1998. p. 71-100.
17. Engel KH, Gerstner G, Ross A. Investigation of glycoalkaloids in potatoes as an example for the principle of substantial equivalence. In: Federal Institute of Consumer Health Protection and Veterinary Medicine (Ed.). *Novel Food Regulation in the EU-Integrity of the Process of Safety Evaluation*. Berlin: FICHPVM; 1998. p. 197-209.
18. Kuiper HA, Kok EJ, Engel KH. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food assessment. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(2):238-43.
19. Lehrsanta SJ, Davies HV, Shepherd LVT, Nunan N, McNicol JW, Auriola S, Koistinen KM, Suomalainen S, Kokko HI, Kärenlampi SO. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiol* 2005;138(7):1690-99.

20. Balsamo GM, Cangahuala-Inocente GC, Bertold JB, Terenzi H, Arisi ACM. Proteomic analysis of four brazilian MON810 maize varieties and their four non-genetically-modified isogenic varieties. *J Agric Food Chem* 2011;59(21):11553-9.
21. Coll A, Nadal A, Rossignol M, Puigdomènech P, Pla M. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. *Transgenic Res* 2011;20(4):939-49.
22. Roessner U, Wagner C, Kopka J, Willmitzer L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J* 2000;23(1):131-42.
23. Fiehn O. Metabolomics: The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48(1-2):155-71.
24. Frenzel T, Miller A, Enge K-H. Metabolite profiling: a fractional method for analysis of major and minor compounds in rice grains. *Cereal Chem* 2002;79(2):215-21.
25. Frenzel T, Miller A, Enge K-H. A methodology for automated comparative analysis of metabolite profiling data. *Eur Food Res Technol* 2003;216(4): 335-42.
26. Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie AR. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 2001;13(1):11-29.
27. Zywicki B, Catchpole GS, Draper J, Fiehn O. Comparison of rapid liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field-grown potatoes. *Anal Biochem* 2005;336 (2):178-86.
28. Catchpole GS, Beckmann M, Enot DE, Mondhe M, Zywicki B, Taylor J, Hardy N, Smith A, King RD, Kell DB, Fiehn O, Draper J. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(40):14458-62.
29. Baker JM, Hawkins ND, Ward J, Lovegrove A, Napier JA, Shewry PR, Beale MH. A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotech J* 2006;4(4):381-392.
30. Dubouzet JG, Ishihara A, Matsuda F, Miyagawa H, Iwata H, Wakasa K. Integrated metabolomic and transcriptomic analyses of high-tryptophan rice expressing a mutant anthranilate synthase alpha subunit. *J Exp Bot* 2007; 58(12):3309-21
31. Barros E, Lezar S, Anttonene MJ, van Dijk JP, Röhlhig RM, Kok EJ, Enge K-H. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomic, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnol J* 2010;8(4):436-51.
32. Coll A, Nadal A, Collado R, Capellades G, Kubista M, Messeguer J, Pla A. Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. *Plant Mol Biol* 2010;73(3):349-62.
33. Batista R, Oliveira M: Plant natural variability may affect assessment data. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010;58(3, suppl. 1):S8-S12.
34. Heineman JA, Kurenbach B, Quist D. Molecular profiling – a tool for addressing emerging gaps in the comparative risk assessment of GMOs. *Environ Int* 2011;37(7):1285-93.
35. Le Gall G, Dupont MS, Mellon FA, Davis AL, Collins GJ, Verhoeven ME, Colquhoun IJ. Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *J Agric Food Chem* 2003;51:2438-46.
36. Usani M, Redestig H, Hirai T, Oikawa A, Matsud F, Fukushima A, Arita M, Watanabe S, Yano M, Hiwasa-Tanase K, Ezura H, Saito K, Covering chemical diversity of genetically-modified tomatoes using metabolomics for objective substantial equivalence assessment. *PlosOne* 2011; 6(2): e16989.

37. Plischke M, Choi YH, Brakefield PM, Klinkhamer P, Bruinsma M. Metabolomic plasticity in GM and non-GM potato leaves in response to aphid herbivory and virus infection. *J Agric Food Chem* 2012;60(6):1488-93.
38. Yuwei Chang, Chunxia Zhao, Zhen Zhu, Zeming Wu, Jia Zhou, Yanni Zhao, Xin Lu, Guowang Xu. Metabolic profiling based on LC/MS to evaluate unintended effects of transgenic rice with cry1Ac and sck genes. *Plant Mol Biol* 2012;78(4-5):477-87.
39. Montero M, Coll A, Nadal A, Messeguer J, Pla M. Only half the transcriptomic differences between resistant genetically modified and conventional rice are associated with the transgene. *Plant Biotech J* 2001; 9(6):693-702.
40. Batista R, Martins I, Jenó P, Ricardo CP, Oliveira MM. A proteomic study to identify soya allergens: The human response to transgenic versus non-transgenic soya samples. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;144(1):29-38.
41. Albo AG, Mila S, Digilio G, Motto M, Aime S, Corpillo D. Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying Cry1ab gene and comparison to the corresponding wild-type. *Maydica* 2007;52(4):443-55.
42. Batista R, Saibo N, Lourenco T, Oliveira MM. Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(9):3640-5.
43. Levandi T, Leon C, Kaljurand M, Garcia-Canas V, Cifuentes A. Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for comparative metabolomics of transgenic versus conventional maize. *Anal Chem* 2008; 80(16):6329-35.
44. Lovegrove A, Salt L, Shewry PR. Establishing substantial equivalence: proteomics. In: Jones HD, Shewry PR (Ed.). *Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization protocols. Methods Mol Biol* 2008; 478:273-88.
45. Kiambi DK, Fortin M, Stromvick M. Linking transcript profiles to metabolites and metabolic pathways: a systems biology approach to transgene risk assessment. *Plant Omics* 2008;1(1):26-36.
46. van Dijk JP, Leifert C, Barros E, Kok EJ. Gene expression profiling for food safety assessment: examples in potato and maize. *Reg Toxicol Pharmacol* 2009;58(3) (Suppl.1):S21-5.
47. Ricroch AE, Berge JB, Kuntz M. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. *Plant Physiol* 2011;155(4):1752-61.
48. Satoh R, Nakamura R, Komatsu A, Oshima M, Teshima R. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants. *Reg Toxicol Pharmacol* 2011;59(3):437-44.
49. Gong CY, Wang T. Proteomic evaluation of genetically modified crops: current status and challenges. *Front Plant Sci* 2013;41(4):1-8.

## 4. ALIMENTAZIONE ANIMALE CON PGM

La sperimentazione animale gioca un ruolo molto importante nella valutazione della sicurezza d'uso di un nuovo alimento (1-4). In generale, gli studi tossicologici su animali modello come il ratto (5-24) o il topo (25-33), non hanno dimostrato effetti tossici o nocivi delle piante transgeniche analizzate. Nel topo, alimentato con soia resistente all'erbicida, Malatesta e altri hanno osservato delle alterazioni ultrastrutturali nelle cellule del pancreas (28, 29), del fegato (30), e dei testicoli (31) ma hanno attribuito gli effetti osservati, che comunque si sono rivelati essere transeunti, alle tracce di erbicida presenti nella soia transgenica utilizzata (32). D'altra parte, uno studio che utilizzava lo sviluppo del testicolo di topo come potente marcatore di eventuali effetti tossici, ha dimostrato che l'alimentazione con soia transgenica, resistente l'erbicida glifosato, non aveva alcun effetto sulla sintesi delle macromolecole, sulla crescita e il differenziamento cellulare, come pure sulle dimensioni e il peso degli animali trattati (26, 27).

Sono stati pubblicati anche molti studi nutrizionali sugli effetti della somministrazione di PGM a volatili (34-58, 96), suini (40, 61-73, 83, 96), ruminanti (34, 40, 64, 74-80, 82, 84-90), pecore (74, 80-81, 92) e pesci (34, 59-60, 97-98), senza che siano state riscontrate differenze significative tra gli animali alimentati con PGM e quelli alimentati senza PGM.

Analogamente non sono state descritte differenze sui prodotti d'origine animale, ottenuti da animali alimentati con PGM rispetto a quelli alimentati senza PGM.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata negli studi a lungo termine e multi generazionali condotti con diete contenenti varie specie di PGM (99). Questi risultati hanno confermato la scelta dell'EFSA di considerare sufficiente per una valutazione biologica e tossicologica uno studio di 90 giorni nei roditori (100).

Una bibliografia più esauriente sulla sperimentazione animale con PGM si può trovare nei siti dell'*International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (<http://bibliosafety.icgeb.org/>) e della *Federation of Animal Science Societies* (<https://www.fass.org/>).

### 4.1. Destino del DNA transgenico

Il destino del DNA dopo somministrazione orale è stato valutato mediante sperimentazioni animali effettuata su topi, alimentati direttamente nel lume gastrointestinale con il batteriofago M13. Frammenti di questo DNA sono stati ritrovati nei linfociti degli animali 24 ore dopo la somministrazione (101-106). Tuttavia, questi esperimenti, che pure avevano destato preoccupazioni in sede di valutazione della sicurezza degli alimenti transgenici, presentano alcune criticità da un punto di vista metodologico che riguardano essenzialmente la mancanza di metilazione del DNA utilizzato. Infatti il batteriofago M13mp18 usato, era stato preparato circolarizzato nel plasmide pEGFP-C1 e utilizzato come tale o linearizzato dopo digestione con un enzima di restrizione. Il genoma del batteriofago M13 consiste di 7250 paia di basi e contiene sequenze 5'-purpurCpGppirpir-3' (purina, citosina, guanina, pirimidina) che non sono metilate durante la produzione in *Escherichia coli*. Anche il plasmide pEGFP-C1 contiene sequenze che non sono metilate durante la sintesi in *E. coli*. Invece ci dobbiamo aspettare che tali sequenze siano metilate nelle cellule animali.

Il significato della mancata metilazione è che tali sequenze hanno una forte funzione di stimolo dell'attività infiammatoria e della risposta immune (107, 108). La mucosa del colon contiene un numero significativo di cellule che presentano l'antigene, cellule dendritiche,

macrofagi e linfociti B. Tutte queste cellule possono inglobare il DNA o per pinocitosi o per fagocitosi. Una volta attivate, le cellule dendritiche migrano nei tessuti linfoidi per fare pervenire l'antigene ai linfociti T e B *naive* per indurre la risposta immune antigene specifica. L'attivazione delle funzioni cellulari include anche un'endocitosi aspecifica che può spiegare il ritrovamento, da parte di questi autori, del DNA nei linfociti di vari tessuti. Quest'osservazione rappresenta una risposta normale al DNA non metilato, risposta assente nel caso delle piante che possiedono degli enzimi capaci di metilare le citosine (109). Tuttavia, il DNA non è stato ritrovato in tutti gli animali o in tutti i tessuti, ma in modo variabile dal 20 al 90% a seconda dello studio, il che fa pensare che la concentrazione fosse al limite del valore di rilevamento.

Doerfler *et al.* hanno anche cercato il DNA del batteriofago M13 nei feti e nei neonati delle madri alimentate con M13. In una sola cellula, con la tecnica FISH, hanno osservato l'ibridazione in due posizioni identiche su due cromatidi dello stesso cromosoma, il che suggerirebbe l'integrazione e la replicazione del gene inserito (105,106). Da questa singola osservazione Doerfler e altri hanno concluso che il DNA nudo, proveniente dal siero della madre, attraversa la placenta e può essere integrato nelle cellule somatiche del feto. Una spiegazione diversa è che siano stati i linfociti che trasportavano i frammenti di DNA M13, ad attraversare la barriera placentare e raggiungere i tessuti fetali (110). Infine, ammesso che frammenti del DNA M13 fossero stati integrati nel cromosoma dei linfociti, bisogna ricordare che questi non si riproducono e sono così fortemente differenziati, che un'eventuale espressione del DNA estraneo sarebbe limitata al ciclo vitale di questa cellula specifica.

Negli animali, alimentati per 8 generazioni con il gene della proteina fluorescente verde (GFP), non è stato mai ritrovato questo gene, avvalorando l'ipotesi che il DNA, assunto oralmente, non è trasmesso attraverso la linea germinale. Se lo stesso costrutto GFP era somministrato per iniezione sottocutanea, il DNA permaneva nel muscolo fino a 17 mesi dopo l'iniezione, mentre negli organi lontani dal sito d'iniezione il DNA era determinabile fino a 24 ore dopo (111).

Questo complesso di esperimenti conferma la natura transeunte della presenza di DNA, assunto nella dieta, nei tessuti e che tale DNA è eliminato dal sistema fegato-bile-intestino (112).

#### 4.1.1. Degradazione del DNA dopo il raccolto

Nella situazione reale, dal momento in cui una pianta viene raccolta, i processi autolitici e l'attacco microbico portano ad una diminuzione del DNA ed RNA totali e ad una riduzione della lunghezza delle catene degli acidi nucleici. La velocità di tale riduzione è influenzata da svariati fattori come i fattori ambientali, i procedimenti di trasformazione e la digestione nel tratto gastrointestinale.

Alcuni procedimenti di preparazione dei mangimi, come l'estrusione meccanica degli oli, l'estrazione chimica od i trattamenti a temperature maggiori di 90°C producono una forte frammentazione del DNA (113-115), anche se vi sono differenze da pianta a pianta. Inoltre, i mangimi, con l'ovvia eccezione dei foraggi utilizzati nel pascolo, sono generalmente trattati a scopo di conservazione, per migliorarne la palabilità od il valore nutrizionale.

Anche le condizioni d'insilamento che producono un ambiente acido (pH 3,5-5,0), causano la degradazione del DNA in piccoli frammenti (116-117). La concentrazione di DNA specifico diminuisce, dopo insilamento, sia nel mais convenzionale sia nel mais Bt fino a ridursi allo 1,3-3,0% del valore iniziale (118). Inoltre, i frammenti di DNA, presenti in mangimi insilati, sono degradati più rapidamente dei frammenti presenti nel materiale fresco.

Nel fluido del rumine delle pecore, è stato rilevato un frammento di 1914 paia di basi, contenente l'intera regione codificante di *cryIA8b*, 5 ore dopo la somministrazione di chicchi di

mais (119). Mentre lo stesso frammento era assente dal fluido del rumine di pecore alimentate con mais insilato; nel fluido si ritrovava, invece, solo un frammento più piccolo di 211 paia di basi dopo 3 ore dalla somministrazione. Un frammento più grande era, invece, presente nel fluido delle pecore alimentate con mais in grani anche dopo 24 ore dalla somministrazione.

Le proteine sono invece presenti per l'intera durata della conservazione dei foraggi essiccati o dei pannelli, ottenuti per estrazione acquosa, a bassa temperatura, come nel caso della barbabietola da zucchero (120).

L'estrazione chimica o fisica di oli, zuccheri e amido dalle piante, come pure i processi di trasformazione per produrre altri alimenti di origine vegetale, causano una significativa, e in alcuni casi completa, degradazione del DNA (121-124). In generale, la macinazione e la molitura a secco hanno scarsa influenza sulla struttura del DNA, ma se le forze di frizione creano dei riscaldamenti locali vi può essere della degradazione.

#### **4.1.2. Valutazione dell'assunzione di DNA transgenico**

La quantità di DNA nei mangimi è meno dello 0,025% in peso secco (125), e il contributo del DNA transgenico a tale quantità è trascurabile. La maggior parte del DNA è degradato nella digestione, e una volta frammentato perde la sua funzionalità e spesso non è possibile risalire alla sua origine.

Per calcolare la quantità di DNA transgenico assunto, dobbiamo ipotizzare che il DNA non sia degradato e considerare la quantità di DNA presente nel mangime somministrato. Phipps e Beever hanno calcolato che un bovino assume, giornalmente circa 24 kg di mangime che contiene circa 54-57 g di DNA. Gli stessi autori hanno calcolato che il DNA transgenico assunto era di 54 µg/giorno pari allo 0,000094% del DNA totale assunto, quando allo stesso animale veniva somministrato un mangime contenente il 40% di insilato e il 20% di granella, entrambi composti da mais Bt.

In un altro studio si è trovato che il rapporto tra DNA transgenico e DNA della pianta è di 1:234.000 e rappresenta in peso lo 0,00042% del DNA totale (126).

#### **4.1.3. Sperimentazioni animali sul destino del DNA transgenico ingerito**

Una piccola quantità di frammenti di DNA vegetale, sopravvissuti alla digestione, potrebbe essere assorbita nella mucosa intestinale o direttamente dalle cellule epiteliali o dalle cellule che presentano l'antigene del sistema immunitario. Se la superficie dell'epitelio fosse danneggiata per una qualunque ragione, il DNA od altre macromolecole potrebbero diffondere nella lamina propria. Doerfler ha alimentato i topi con foglie di soia, ritrovando nella milza e nel fegato, un gene specifico delle piante e precisamente il gene dei cloroplasti *rubisco*, che codifica per la ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi (111). Tuttavia, tale gene non era espresso nei tessuti animali. Altri autori, non hanno trovato frammenti del gene *cp4 epsps*, che conferisce la resistenza al glifosato, nel muscolo di ratto, alimentato con soia tollerante l'erbicida (16); od alimentato con riso, contenente il gene esogeno della colina ossidasi (18). Non sono stati ritrovati frammenti di DNA transgenico neppure nelle galline alimentate con semi transgenici (46, 47, 112).

Nonostante le difficoltà tecniche, associate alla determinazione del DNA vegetale, per la presenza di un alto rumore di fondo dovuto al DNA cellulare e a quello dei microbi intestinali o del rumine, vi sono alcuni studi significativi su questo argomento. Nei linfociti di una mucca alimentata con soia tollerante l'erbicida, Bertheau *et al.* (127) hanno potuto misurare la presenza del gene dei cloroplasti *rubisco*, mentre non sono riusciti a determinare il DNA transgenico che

codifica per l'enzima 5-enoilpiruvilsicchimato-3-fosfato sintetasi. Nessuno dei due geni era presente nel latte della stessa mucca. Anche in altri esperimenti non si è trovata traccia di DNA transgenico nel latte di vacche alimentate con soia tollerante l'erbicida (128) o con semi di cotone resistente agli insetti (93).

Esperimenti più significativi sono stati condotti su maiali alimentati con mais Bt e sacrificati 4, 8, 12, 24, 48 e 72 ore dopo l'alimentazione con mais transgenico. Quelli dei gruppi sacrificati a 12 ore non ricevevano altri mangimi, quelli dei gruppi sacrificati successivamente ricevevano mangimi in cui il mais era sostituito da orzo e frumento. Il DNA ricombinante era misurabile nell'intestino fino a 48 ore dopo l'alimentazione, mentre non vi era presenza di DNA transgenico nei tessuti; tessuti nei quali si trovava, invece, DNA caratteristico del mais (129). Nel succo gastrico e in tre porzioni dell'intestino (duodeno, digiuno, cieco) dei maiali si è osservata una sopravvivenza di frammenti del DNA dei cloroplasti di mais dipendente dal tempo dell'ultima alimentazione. Questi stessi frammenti non sono stati invece ritrovati negli organi esaminati (sangue, muscolo, fegato, milza e linfonodi). In nessun caso è stato possibile rilevare la presenza di DNA transgenico nei campioni esaminati.

Risultati analoghi sono stati ottenuti in polli da carne e maiali alimentati con soia tollerante il glifosato (130), e in polli alimentati con mais Bt176, resistente alla piralide (47). In altri esperimenti, sempre con polli, un frammento di 1800 bp del gene *CryIA(b)*, è stato ritrovato solo nel gozzo e nel ventriglio, ma non in altri tessuti, mentre nel sangue dei pesci era possibile misurare il DNA di un gene costitutivo del mais e precisamente quello della *zeina* (59). Nelle galline ovaiole è stata misurata la presenza di DNA del gene marcatore *bla*, e del gene *CryIA(b)*, e del gene dei cloroplasti di mais *ivr*, sia nelle carni che nelle uova. Nelle carni, ma non nelle uova, è stato possibile amplificare frammenti del gene *ivr*, ma non sono stati ritrovati né il gene *bla* né il gene *CryIA(b)* (131).

Un'analisi esaustiva su: a) polli da carne alimentati con mais Bt; b) galline ovaiole alimentate con mais Bt e mais tollerante il glufosinato; c) maiali alimentati con mais Bt; mais e barbabietole da zucchero tolleranti il glufosinato; d) pecore alimentate con mais Bt; mais e barbabietole da zucchero, tolleranti il glufosinato, insilati; e) vitelli alimentati con mais Bt insilato, ha rilevato frammenti di DNA vegetale in alcuni tessuti, ma mai di DNA transgenico (132, 133). Risultati analoghi sono stati ottenuti su vacche e galline alimentate con mais Bt (85, 96). Nei linfociti delle vacche è stato identificato DNA dei cloroplasti, con frammenti di lunghezza inferiore a 200 paia di basi; DNA dei cloroplasti assente, però, negli altri organi esaminati (muscolo, fegato, milza, reni), ma presente in tracce nel latte. In nessun campione bovino era presente DNA transgenico.

Invece nei tessuti delle galline (muscolo, fegato, milza e reni) era possibile amplificare frammenti del DNA dei cloroplasti, DNA che non era presente nelle uova. Il gene specifico per la proteina Bt era assente in tutti i tessuti delle galline.

Uno studio sui maiali alimentati con soia, tollerante il glifosato, ha dato analoghi risultati (134). Frammenti di DNA vegetale sono stati trovati anche nei tessuti e nel fluido gastrointestinale di bufali e conigli alimentati con mangimi non transgenici; risultati questi che confermano la presenza nei tessuti di frammenti di DNA alimentare subito dopo i pasti (135).

Il muscolo di manzi, vacche da latte, maiali e polli, alimentati con MON810, è stato analizzato sia per la presenza dello specifico transgene che del promotore p35S, ampiamente utilizzato nella produzione di PGM (136). Mentre era possibile identificare il DNA della pianta ed, in particolare, il gene mitocondriale *rbcL*, sia nel muscolo sia nel latte, non si trovavano i frammenti del DNA transgenico.

È stata descritta un'unica eccezione nella quale frammenti molto piccoli dei geni *cry1a(b)* e *cp4epsps* (rispettivamente 106 e 146 basi) sono stati trovati nel latte di animali alimentati con foraggi non transgenici o biologici. Questo risultato è stato attribuito ad una contaminazione

ambientale dovuta ai batteri del suolo *B. thuringiensis* e *Agrobacterium sp.* che contengono i geni *cry1a(b)* e *cp4epsps* (137).

Risultati negativi sulla presenza di DNA transgenico si ottengono anche quando, prima del consumo, la pianta transgenica viene sottoposta a procedimenti industriali o all'insilamento; processi nei quali il DNA viene degradato in frammenti della dimensione di circa 200 paia di basi (138-140).

Questi lavori suggeriscono che vi sia nell'organismo un processo continuo e costante di trasferimento di frammenti di DNA, provenienti dalla dieta e che questo fenomeno fisiologico non sia un problema specifico della modifica genetica. Infatti, in due volontari umani, è stato possibile dimostrare il passaggio di DNA di coniglio, attraverso l'epitelio intestinale, nel circolo sanguigno. Il DNA era rappresentato da un frammento di 250bp, la cui concentrazione presentava un picco circa 3 ore dopo l'ingestione (141).

Particolarmente significativo è lo studio condotto da Trabalza-Marinucci *et al.* alimentando per tre anni delle pecore, insieme alla loro progenie, con mais Bt 176, questi autori non hanno trovato DNA transgenico nei tessuti, nel sangue, nel fluido del rumine, né nei batteri del rumine stesso (142). Usando un metodo molto sensibile, Nemeth *et al.* hanno trovato piccoli frammenti dei transgeni *cry1a(b)*, utilizzato nel mais, e *cp4epsps*, utilizzato nella soia, nel 25% di 60 campioni di latte analizzati, ottenuto da animali alimentati sia con transgeni che senza (136). I frammenti ritrovati erano di 106 coppie di basi per *cry1a(b)*, che ha un'unità funzionale minima di 3500 coppie di basi, e di 146 coppie di basi per *cp4epsps*, che ha un'unità funzionale minima di 1800 coppie di basi. Questi autori hanno concluso che tali frammenti di DNA derivavano da una contaminazione ambientale d'origine sconosciuta. Mentre Rizzi *et al.*, nel latte di bovine alimentate con mais Bt, non hanno riscontrato il DNA transgenico, e neppure i geni costitutivi del mais (143).

In contrasto con tutte queste osservazioni, Tudisco *et al.* hanno trovato, invece, nelle capre alimentate con soia resistente al glifosato, frammenti del DNA transgenico nel sangue e nel latte e nei tessuti della prole alimentata con lo stesso latte (144). Questi risultati, non confermati dagli altri studi, richiedono un ulteriore approfondimento perché sono in contrasto con la capacità delle cellule dei vertebrati, compreso l'uomo, di attivare la famiglia di proteine APOBEC3 per degradare il DNA estraneo eventualmente assorbito (145).

## 4.2. Destino delle proteine transgeniche

Nei non ruminanti le proteine sono digerite nello stomaco e nel colon a di- e tri-peptidi (146). Nei ruminanti, la maggior parte delle proteine è degradata dai microrganismi del rumine e incorporata nelle proteine microbiche o degradata completamente ad ammoniaca. Piccole quantità passano attraverso il rumine e sono degradate nell'intestino. Quantità minute, 0,08 ng di proteina Bt per grammo di proteina, si possono trovare anche nelle feci (110).

Nella valutazione della sicurezza d'uso dei transgeni si è fatto spesso ricorso a studi *in vitro*, capaci di mimare le condizioni dello stomaco o del rumine. Questi studi hanno dimostrato che le proteine transgeniche presenti nei prodotti commerciali sono degradate rapidamente (18, 133-162). Tali studi potrebbero non rappresentare la situazione *in vivo*, nella quale le proteine potrebbero essere protette dalle altre componenti della matrice alimentare. Inoltre, le proteine, utilizzate negli studi *in vitro*, sono prodotte in microrganismi e potrebbero avere una stabilità diversa da quelle prodotte nelle piante transgeniche.

Studi *in vivo* sono stati condotti su vitelli e maiali alimentati con mais Bt11, contenente la proteina Cry1Ab. Tracce della proteina Cry1Ab sono state trovate nel tratto gastrointestinale, ma non nel fegato, milza, reni, muscolo e altri tessuti (148-150). Nel caso delle galline ovaiole



alimentate con soia, resistente all'erbicida, la proteina transgenica era assente nelle uova, nel fegato e nelle feci (154). Nei prodotti di origine animale non sono mai stati ritrovati frammenti di proteina transgenica (43, 84, 147-163). Una serie di altri esperimenti *in vivo* ha dimostrato che le proteine transgeniche sono digerite alla stessa velocità delle altre proteine presenti nel mangime (34, 147, 148).

I processi metabolici coinvolti nella digestione, assorbimento e utilizzazione degli amminoacidi e dei peptidi da parte degli animali da reddito, rendono molto improbabile la possibilità di ritrovare proteine (transgeniche) intatte nei prodotti animali tanto che nessuna di queste proteine è stata rilevata finora (164).

### 4.3. Conclusioni

Studi effettuati nell'ambito del progetto europeo ENTRANSFOOD (165) hanno dimostrato l'utilità di utilizzare il modello proposto dall'EFSA nello studio della tossicità dell'alimento GM, con e senza *spiking* con la nuova proteina purificata. I risultati ottenuti hanno dimostrato che lo studio nel ratto, a 90 giorni, è sufficientemente sensibile e specifico per individuare la presenza, o l'assenza degli effetti biologici/nutrizionali/tossicologici, dovuti al nuovo gene inserito, essendo lo *spiking* capace di separare potenziali effetti non intenzionali del nuovo gene inserito dai potenziali effetti non intenzionali della dieta utilizzata (164-170).

L'EFSA, dopo aver analizzato le potenzialità e i limiti della sperimentazione animale per valutare la sicurezza delle PGM, ha concluso che uno studio d'alimentazione a 90 giorni nei roditori, condotto in accordo con le linee guida OECD per l'analisi tossicologica dei composti chimici, è sufficiente per la valutazione delle PGM nella fase di autorizzazione alla commercializzazione (99). Va comunque sottolineato che gli studi devono seguire un protocollo sperimentale standardizzato e a tal fine l'EFSA ha recentemente pubblicato delle linee guida specifiche per la realizzazione di questi studi (171).

Questa conclusione è anche confermata dall'analisi di 12 studi a lungo termine e 12 studi multigenerazionali, i cui risultati dimostrano l'assenza di variazioni statisticamente significative nei parametri osservati e quindi di rischi per la salute animale (99). La validità di questi studi a lungo termine (*vedi* anche quanto descritto nella sez. 5.1.2. per il caso degli studi effettuati da Séralini) è stata comunque messa in discussione perché la maggior parte delle sperimentazioni è stata effettuata utilizzando protocolli sperimentali non standardizzati che presentano quindi alcune limitazioni nella valutazione statistica dei risultati ottenuti (99).

La sicurezza d'uso delle PGM, dimostrata da questo complesso di risultati, è ulteriormente rafforzata dal fatto che in alimentazione umana le PGM, come soia e mais, non sono consumati crudi da dopo cottura od una serie di procedimenti industriali che inattivano l'attività biologica delle proteine transgeniche inserite (171).

### Bibliografia

1. Flachowsky G, Aulrich K, Bohme H, Halle I. Studies on feeds from genetically modified plants (GMP)-Contributions to nutritional and safety assessment. *Animal Feed Sci Technol* 2007;133(1-2):2-30.
2. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW, Carere A, Carpy AJM, Galli CL, Kleiner J, Knudsen I, Koeter HB, Levy LS, Madsen C, Mayer S, Narbonne JF, Pfannkuck F, Prodanchuck MG, Smith MR, Steinberg P. Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food Chem Toxicol* 2002;40(2-3):145-91.

3. Aumaitre A., Aulrich K, Chesson A, Flachowsky G, Piva G. New feeds from genetically modified plants – substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility and safety for animals and the food chain. *Livestock Sci* 2002;74(3):223-38.
4. Flachowsky G, Chesson A, Aulrich K. Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. *Arch Animal Nutr* 2005;59(1):1-40.
5. Hashimoto W, Momma K, Yoon HJ, Ozawa S, Ohkawa Y, Ishige T, Kito M, Utsumi S, Murata K. Safety assessment of transgenic potatoes with soybean glycinin by feeding studies in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63(11):1942-46.
6. Momma K, Hashimoto W, Yoon HJ, Ozawa S, Fukuda Y, Kawai S, Takaiwa F, Utsumi S, Murata K. Safety assessment of rice genetically modified with soybean glycinin by feeding studies on rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64(9):1881-6.
7. Palombo JD, DeMichele SJ, Liu JW, Bistrrian BR, Huang YS. Comparison of growth and fatty acid metabolism in rats fed diets containing equal levels of gamma-linolenic acid from high gamma-linolenic acid canola oil or borage oil. *Lipids* 2000;35(9):975-81.
8. Cherenkova M, Sommer A, Ceresnakova Z, Nitrayova S, Prostedna M. Nutritional evaluation of genetically modified maize corn performed on rats. *Arch Anim Nutr* 2002;56(3):229-35.
9. Hammond B, Dudeck R, Lemen J, Nemeth M. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. *Food Chem Toxicol* 2004;42(6):1003-14.
10. Zhu Y, Li D, Wang F, Yin J, Jiin H. Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from roundup ready or conventional soybeans using rats. *Arch Anim Nutr* 2004;58(4):295-310.
11. Kosieradzka I, Sawosz E, Malepszy S, Pastuszewska B, Klucinski W. Effect of supplemental cucumber fruits, modified in terms of the level of sweet protein thaumatin on the health parameters in rats. *Ann Animal Sci* 2003;3 (S2):277-80.
12. Lee SH, Park HJ, Cho SY, Chun HK, Park YH, Jeong MH, Park SH. Evaluation of nutritional safety for the herbicide-resistant rice in growing male rats. *Korean J Nutr* 2003;36(10):1030-35.
13. El-Sanhoty R, El-Rahman AAA, Bogl KW. Quality and safety evaluation of genetically modified potatoes Spunta with Cry V gene: compositional analysis, determination of some toxins, antinutrients compounds and feeding study in rats. *Nahrung* 2004;48(1):13-18.
14. Chen ZL, Gu H, Li Y, Su Y, Wu P, Jiang Z, Ming X, Tian J, Pan N, Qu LJ. Safety assessment for genetically modified sweet pepper and tomato. *Toxicol* 2003;188(2-3):297-307.
15. Hammond BG, Dudek R, Lemen J, Nemeth M. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. *Food Chem Toxicol* 2004;42(6):1003-14.
16. Hammond BG, Dudek R, Lemen J, Nemeth M. Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn borer-protected corn. *Food Chem Toxicol* 2006;44(7):1092-9.
17. Chen XP, Zhuo Q, Gu LZ, Piao JH, Yang XG. The nutritional evaluation of transgenic rice. *Acta Nutrimenta Sinica* 2004;26(2):119-23.
18. Zhao ZH, Yang LT, Ai X, Zhang DB, Zou SX. Influence of genetically modified rice containing codA gene on physiological metabolism and genetic horizontal transformation in fed rats. *J Agric Biotechnol* 2005;13 (3):341-6.
19. Wang Y, Lai W, Chen J, Mei S. Toxicity of anti-herbicide gene (bar) transgenic rice. *J Hygiene Res* [abstract] 2000;29:141-2.
20. Winnicka A, Sawosz E, Klucinski W, Kosieradzka I, Szopa J, Malepszy S, Pastuszewska B. A note on the effect of feeding genetically modified potatoes on selected indices of nonspecific resistance in rats. *J. Anim Feed Sci* 2001;10(Suppl. 2):13-18.
21. Zhuo Q, Chen X, Piao J, Han C. Study on the teratogenicity effects of genetically modified rice which expressed cowpea trypsin inhibitor in rats. *J Hygiene Res* [abstract] 2004;33:74-7.

22. Zhuo Q, Chen X, Piao J, Gu L. Study on food safety of genetically modified rice which expressed cowpea trypsin inhibitor by 90 day feeding test on rats. *J Hygiene Res* [abstract] 2004;33:176-9.
23. Healy C, Hammomd BG, Kirkpatrick J. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from corn rootworm-protected, glyphosate tolerant Mon 88017 corn. *Food Chem Toxicol* 2008;46(7):2517-24.
24. Rhee GS, Cho DH, Won YH, Seok JH, Kim SS, Kwack SJ, Lee RD, Chae SY, Kim JW, Lee BM, Choi KS. Multigenerational reproductive and developmental study of bar gene into genetically modified potato in rats. *J Toxicol Environ Health* 2005;68(23-24):2263-76.
25. Fares NH, El-Sayed AK. Fine structural changes in the ileum of mice fed on delta-endotoxin-treated potatoes and transgenic potatoes. *Nat Toxins* 1998; 6:219-33.
26. Brake DG, Evenson DP. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. *Food Chem Toxicol* 2004;42(1):29-36.
27. Brake DG, Thaler R, Evenson DP. Evaluation of Bt (*Bacillus thuringiensis*) corn on mouse testicular development by dual parameter flow cytometry. *J Agric Food Chem* 2004;52(7):2097-102.
28. Malatesta M, Caporaloni C, Rossi L, Battistelli S, Rocchi MB, Tonucci F, Gazzanelli G. Ultrastructural analysis of pancreatic acinar cells from mice fed on genetically modified soybean. *J Anat* 2002;201(5):409-15.
29. Malatesta M, Caporaloni C, Gavaudan S, Rocchi MB, Serafini S, Tiberi C, Gazzanelli G. Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analyses of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Cell Struct Funct* 2002;27(4):175-80.
30. Malatesta M, Biggiogera M, Manuali E, Rocchi MB, Gazzanelli G. Fine structural analyses of pancreatic acinar cell nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Eur J Histochem* 2003;47(4):385-88.
31. Vecchio L, Cisterna B, Malatesta M, Martin TE, Biggiogera M. Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. *Eur J Histochem* 2004;48(4):448-54.
32. Battistelli S, Citterio B, Baldelli B, Parlani C, Malatesta M. Histochemical and morphometrical study of mouse intestine epithelium after a long term diet containing genetically modified soybean. *Eur J Histochem* 2010;54(3): 154-7.
33. Teshima R, Watanabe T, Okunuki H, Isuzugawa K, Akiyama H, Onodera H, Imai T, Toyoda M, Sawada J. Effects of subchronic feeding of genetically modified corn (CBH351) on immune system in BN rats and B10A mice. *J Food Hyg Soc Japan* 2002;43(5):273-79.
34. Hammond BG, Vicini JL, Hartnell GF, Naylor MW, Knight CD, Robinson EH, Fuchs RL, Padgett SR. The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *J Nutr* 1996;126(3):717-27.
35. Brake J, Vlachos D. Evaluation of transgenic event 176 "Bt" corn in broiler chickens. *Poultry Sci* 1998;77(5):648-53.
36. Aulrich K, Halle I, Flachowsky G. Inhaltsstoffe und Verdaulichkeit von Maiskoren der Sorte Cesar und der gentechnisch veränderten Bt-Hybride bei legehennen. In: *Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten Reiche Kongress*. Giessen; 1998. pp. 465-468.
37. Denbow DM, Grabau EA, Lacy GH, Kornegay ET, Russel DR, Umbeck PF. Soybeans transfomed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poultry Sci* 1998;77(6):878-81.
38. Sidhu RS, Hammond BG, Fuchs RL, Mutz JN, Holden LR, George B, Olson T. Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mais L.*) *J Agric Food Chem* 2000;48(6):2305-12.

39. Ash J, Novak C, Scheideler E. The fate of genetically modified protein from roundup ready soybeans in the laying hen. *Poultry Sci* 2003;12(2):242-5
40. Ulrich K, Bohme H, Deniker R, Halle I, Flachowsky G. Genetically modified feeds in animal nutrition. 1st Communication: Bacillus thuringiensis (Bt) corn in poultry, pig and ruminant nutrition. *Arch Tierernahr* 2001;54(3):183-95.
41. Piva G, Morlacchini M, Pietri A, Rossi F, Prandini A. Growth performance of broilers fed insect-protected (Mon 810) or near isogenic control corn. *Poultry Sci.* 2001;80(Suppl. 1):320.
42. Rossi F, Morlacchini M, Fusconi G, Pietri A, Mazza R, Piva G. Effect of Bt corn on broiler growth performance and fate of the feed-derived DNA in the digestive tract. *Poultry Sci* 2005;84(7):1022-30.
43. Gaines AM, Allee G, Ratliff BW. Nutritional evaluation of Bt (MON810) and Roudup Ready corn compared with commercial hybrids in broilers. *Poultry Sci* 2001;80(Suppl. 1):51.
44. Yonemochi C, Fujisaki H, Harada C, Hanazumi M. Evaluation of transgenic event CBH 351 (starlink) corn in broiler chicks. *Anim Sci J* 2002; 73(3): 221-8.
45. Humphrey BD, Huang N, Klasing KC. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks. *J Nutr* 2002; 132(6):1214-8.
46. Chambers P, Duggan P, Heritage J, Forbes. The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens. *J Antim Chem* 2002;49(1):161-4.
47. Tony MA, Butschke A, Broll H, Grohmann L, Zagon J, Halle I, Daenicke S, Schauzu M, Hafezd HM, Flachowsky G. Safety assessment of Bt 176 maize in broiler nutrition: degradation of maize-DNA and its metabolic fate. *Arch Anim Nutr* 2003;57(4):235-52.
48. Brake J, Faust MA, Stein J. Evaluation of transgenic event Bt11 hybrid corn in broiler chickens. *Poultry Sci* 2003;82(4):551-59.
49. Taylor ML, Hartnell GF, Riordan SG, Nemeth MA, Karunanandaa K, George B, Astwood JD. Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from Roundup ready (NK603), Yieldgard x Roundup ready (MON810 x NK603), non-transgenic control, or commercial corn. *Poultry Sci* 2003;82(3):443-53.
50. Taylor ML, Hartnell GF, Riordan SG, Nemeth MA, Karunanandaa K, George B, Astwood JD. Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from YieldGard (MON810), YieldGard x Roundup Ready (GA21), nontransgenic control, or commercial corn. *Poultry Sci* 2003;82(5): 823-30.
51. Taylor ML, Hyun Y, Hartnell GF, Riordan SG, Nemeth MA, Karunanandaa K, George B, Astwood JD. Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from YieldGard Rootworm (MON863), YieldGard Plus (MON810 x MON863), nontransgenic control, or commercial reference corn hybrids. *Poult Sci* 2003;82(12):1948-56.
52. Chesson A, Flachowsky G. Transgenic plants in poultry nutrition. *World's Poult Sci J* 2003;59(2):201-7.
53. Taylor ML, Stanisiewski EP, Riordan SG, Nemeth MA, George B, Hartnell GF. Comparison of broiler performance when fed diets containing roundup ready (event RT73), nontransgenic control, or commercial canola meal. *Poultry Sci* 2004;83(3):456-61.
54. Kan C, Hartnell GF. Evaluation of broiler performance when fed Roundup Ready wheat (event MON 71800), control, and commercial wheat varieties. *Poultry Sci* 2004;83(8):1325-34.
55. Taylor ML, Hartnell GF, Nemeth MA, Karunanandaa K, George B. Comparison of broiler performance when fed diets containing corn grain with insect-protected (corn rootworm and European corn borer) and herbicide-tolerant (glyphosate) traits, control corn, or commercial reference corn. *Poultry Sci* 2005;84(4):587-93.

56. von Wettstein D, Warner J, Kannangara CG. Supplements of transgenic malt or grain containing (1,3-1,4)beta-glucanase increase the nutritive value of barley-based broiler diets to that of maize. *Brit Poult Sci* 2003;44(3):438-49.
57. Mandal AB, Elangovan AV, Shrivastav AK, Johri AK, Kaur S, Johri TS. Comparison of broiler chicken performance when fed diets containing meals of Bollgard II hybrid cotton containing Cry-X gene (Cry1Ac and CryAb gene), parental line or commercial cotton. *Brit Poult Sci* 2004;45(5):657-63.
58. Aeschbacher K, Messikommer R, Meile L, Wenk C. Bt176 corn in poultry nutrition: physiological characteristics and fate of recombinant plant DNA in chickens. *Poultry Sci* 2005;84(3):385-94.
59. Sanden M, Bruce I, Azizur Rahman M, Hemre G-I. The fate of transgenic sequences present in genetically modified plant products in fish feed, investigating the survival of gm soybean DNA fragments during feeding trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 2004;237(1-4):391-405.
60. Sanden M, Krogdhal A, Bakke-Mckellep AM, Buddington RK, Hemre G-I. Growth performance and organ development in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr fed genetically modified (GM) soybean and maize. *Aquacult Nutr* 2006;12(1):1-14.
61. Spencer JD, Allee GL, Sauber TE. Growing-finishing performance and carcass characteristics of pigs fed normal and genetically modified low-phytate corn. *J Anim Sci* 2000;78(6):1529-36.
62. Spencer JD, Allee GL, Sander T. Phosphorous bioavailability and digestibility of normal and genetically low phytate corn for pigs. *J Anim Sci* 2000;78(3):675-81.
63. Haryu Y, Taguchi Y, Itakura E, Mikami O, Miura K, Saeki T, Nakajima Y. Longterm biosafety assessment of a genetically modified (GM) plant: the genetically modified (GM) insect-resistant Bt11 corn does not affect the performance of multi-generations or life span of mice. *Open Plant Sci J* 2009;3:49-53.
64. Bohme H, Aulrich K, Daenicke R, Flachowsky G. Genetically modified feeds in animal nutrition. 2nd Communication: glufosinate tolerant sugar beets (roots and silage) and maize grains for ruminants and pigs. *Arch Tierernahr* 2001;54(3):197-207.
65. Weber T, Richert B. Grower-finisher growth performance and carcass characteristics including attempts to detect transgenic plant DNA and protein in muscle from pigs fed genetically modified Bt corn. *J Anim Sci* 2001; 79(Suppl. 2):67.
66. Piva G, Morlacchini M, Pietri A, Piva A, Casadei G. Performance of weaned piglets fed insect-protected (MON810) or near isogenic control form. *J Anim Sci* 2001;79(Suppl. 1):441.
67. Cromwell GL, Lindemann MD, Randolph JH, Parker GR, Coffey RD, Laurent KM, Armstrong CL, Mikel WB, Stanisiewski EP, Hartnell GF. Soybean meal from Roundup ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. *J Anim Sci* 2002;80(3):708-15.
68. Reuter T, Aulrich K, Berk A, Flachowsky G. Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: chemical composition and nutritional evaluation. *Arch Anim Nutr* 2002;56(1):23-31.
69. Reuter T, Aulrich K, Berk A. Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: fattening performance and slaughtering results. *Arch Anim Nutr* 2002;56(3):319-26.
70. Hyun Y, Bressner GE, Ellis M, Lewis AJ, Fischer R, Stanisiewski EP, Hartnell GF. Performance of growing-finishing pigs fed diets containing Roundup Ready corn (event NK603), a nontransgenic genetically similar corn, or conventional corn lines. *J Anim Sci* 2004;82(2):571-80.
71. Guthrie TA; Apgar GA, Griswold KE, Lindemann MD, Radcliffe JS, Jacobson BN. Nutritional value of a corn containing a glutamate dehydrogenase gene for growing pigs. *J Animal Sci* 2004;82(6):1693-8.

72. Cromwell GL, Henry BJ, Scott AL, Gerngross MF, Dusek DL, Fletcher DW. Glufosinate herbicide-tolerant (Liberty Link) rice vs. conventional rice in diets for growing-finishing swine. *J Animal Sci* 2005;83(5):1068-74.
73. Yang XY, Chen SR, Han JH, Yang JM, Yang XG. The nutritional evaluation of genetically modified rice – comparative feeding study of minipigs. *Acta Nutrimenta Sinica* 2005; 27(1):38-41.
74. Barriere Y, Verite R, Brunshwig P, Surault F, Emile JC. Feeding value of corn silage estimated with sheep and dairy cows is not altered by genetic incorporation of Bt176 resistance to *Ostrinia nubilalis*. *J Dairy Sci* 2001; 84(8):1863-71.
75. Calsamiglia S, Hernandez B, Hartnell GF, Phipps R. Effects of corn silage derived from a genetically modified variety containing two transgenes on feed intake, milk production, and composition, and the absence of detectable transgenic deoxyribonucleic acid in milk in holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 2007;90(10):4718-23.
76. Tremblay GF, Laberge S, Castonguay Y, Chiquette J, Ouellet DR, Delaney S, Petit HV, Michaud R. Outcome of Bt transgenes and protein in corn silage, processed grains, and rumen content. *Can J Animal Sci* 2008;88(1): 85-95.
77. Russel JR, Hersom MJ, Pugh A, Barret K, Farnham D. Effects of grazing crop residues from Bt-corn hybrids on the performance of grazing beef cows. *J Anim Sci* 2000;78(S2):79.
78. Russel JR, Farnham D, Berryman RK, Hersom MJ, Pugh A, Barret K. Nutritive value of the crop residues from Bt-corn hybrids and their effects on performance of grazing beef cows. *Beef Research Report*. Ames: Iowa State University; 2000. p. 56-61.
79. Donkin SS, Velez JC, Stanisiewski EP, Hartnell GF. Effect of feeding Roundup Ready corn silage and grain on feed intake, milk production and milk composition in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2000; 83 (S1):273.
80. Weisbjerg M, Hvelplund T, Purup S, Vestergaard M, Sejrsen K. Genetically modified beets and beet pulp as feeds for ruminants: experiments with sheep and dairy cattle at Research Centre Foulum, Denmark. In: *Proceedings of the International Symposium on Genetically Modified Crops and C-products as Feeds for Livestock*. Nitra, Slovak Republic; 2001. p. 37-40.
81. Hartnell GF, Hvelplund T, Weisbjerg R. Nutrient digestibility in sheep fed diets containing roundup ready or conventional fodder beet, sugar beet, and beet pulp. *J Anim Sci* 2005;83(2):400-7.
82. Folmer JD, Grant RJ, Milton CT, Beck JF. Utilization of Bt corn residues by grazing beef steers and Bt corn silage and grain by growing beef cattle and lactating dairy cows. *J Anim Sci* 2002;80(5):1352-61.
83. Beagle JM, Apgar GA, Jones KL, Griswold KE, Radcliffe JS, Qui X, Lightfoot DA, Iqbal MJ. The digestive fate of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase deoxyribonucleic acid from transgenic corn in diets fed to weanling pigs. *J Anim Sci* 2004;84(3):597-607.
84. Aulrich K, Bohne H, Daenicke R, Halle I, Flachowsky G. Novel Feeds – A Review of Experiments at our Institute. *Food Res Intern* 2002;35(2-3):285-93.
85. Yonemochi C, Ikeda T, Harada C, Kusama T, Hanazumi M. Influence of transgenic corn (CHB 351, named Starlink) on health condition of dairy cows and transfer of Cry9C protein and *cry9C* gene to milk blood, liver and muscle. *Anim Sci J* 2003;74(2): 81-8.
86. Singh M, Tiwari DP, Kumar A, Ravi Kumar M. Effect of feeding transgenic cottonseed vis-a-vis non-transgenic cottonseed on haematobiochemical constituents in lactating Murrah buffaloes. *Asian-Austr J Anim Sci* 2003; 16(12):1732-7.
87. Jung HG, Sheaffer CC. Influence of Bt transgenes on cell wall lignification and digestibility of maize stover for silage. *Crop Sci* 2004;44(5):1781-9.
88. Erickson GE, Robbins ND, Simon JJ, Berger LL, Klopfenstein TJ, Stanisiewski EP, Hartnell GF. Effect of feeding glyphosate-tolerant (roundup-ready events GA21 or NK603) corn compared with

- reference hybrids on feedlot steer performance and carcass characteristics. *J Anim Sci* 2003;81(10):2600-8.
89. Grant RJ, Fanning KC, Kleinschmit D, Stanisiewski EP, Hartnell GF. Influence of glyphosate-tolerant (event NK603) and corn rootworm protected (event MON863) corn silage and grain on feed consumption and milk production in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2003;86(5):1707-15.
  90. Ipharaguerre IR, Younker RS, Clarke JH, Stanisiewski EP, Hartnell GF. Performance of lactating dairy cows fed corn as whole plant silage and grain produced from a glyphosate-tolerant hybrid (event NK603). *J Dairy Sci* 2003;86(5):1734-41.
  91. Stanford K, Aalhus JL, Dugan MER, Wallins GL, Sharma R, McAllister TA. Effects of feeding transgenic canola on apparent digestibility, growth performance and carcass characteristics of lambs. *Can J Anim Sci* 2003; 83(2):299-305.
  92. Duggan PS, Chambers PA, Heritage J, Forbes JM. Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation of DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. *FEMS Microbiol Lett* 2000;191(1):71-7.
  93. Castillo AR, Gallardo MR, Maciel M, Giordano J, Conti GA, Gaggiotti MC, Quaino O, Gianni C, Hartnell GF. Effects of feeding rations with genetically modified whole cottonseed to lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2004; 87(6):1778-85.
  94. Kumar RS, Singhal KK. Chemical composition and nutritional evaluation of transgenic cottonseed for ruminants. *Indian J Animal Sci* 2004;74(8):868-71.
  95. Rossi F, Moschini M, Fiorentini L, Masoero F, Piva G. Analytical composition and rumen degradability of isogenic and transgenic corn varieties. *J Sci Food Agric* 2003;83(13):1337-41.
  96. Aumaitre A. Safety assessment and feeding value for pigs, poultry and ruminants of pest protected (Bt) plants and herbicide tolerant (glyphosate, glufosinate) plants: interpretation of experimental results observed worldwide on GM plants. *Italian J Animal Sci* 2004;3(2):107-21.
  97. Brown PB, Wilson KA, Jonker Y, Nickson TE. Glyphosate tolerant canola meal is equivalent to the parental line in diets fed to rainbow trout. *J Agric Food Chem* 2003;51(12):4268-72.
  98. Glencross B, Curnow J, Hawkins W, Kissil GW, Peterson D. Evaluation of the feed value of a transgenic strain of the narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) in the diet of the marine fish, *Pagrus auratus*. *Aquaculture Nutr* 2003;9(3):197-206.
  99. EFSA. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol* 2008;46(Suppl 1): S2-S70.
  100. Snell C, Bernheim A, Bergè J-B, Kuntz M, Pascal G, Parts A, Richoch AE. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. *Food Chem Toxicol* 2012;50(3-4):1134-48.
  101. Schubbert R, Lettman C, Doerfler W. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol Gen Genetics* 1994;242(5):495-504.
  102. Doerfler W. Uptake of foreign DNA by mammalian cells via the gastrointestinal tract in mice: methylation of foreign DNA—a cellular defence mechanism. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;24:209-24.
  103. Schubbert R, Renz D, Schmitz B, Doerfler W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(3):961-6.
  104. Doerfler W, Schubbert R, Heller H, Kammer C, Hilger-Eversheim K, Knoblauch M, Remus R. Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. *Trends Biotechnol* 1997;15(8):297-301.
  105. Doerfler W, Schubbert R. Uptake of foreign DNA from the environment: the gastrointestinal tract and the placenta as portals of entry. *Wien Klin Wochenschr* 1998;110(2):37-9.

106. Schubbert R, Hohlweg U, Renz D, Doerfler W. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission of the fetus. *Mol Gen Genetics* 1998;259(6):569-76.
107. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatosobu Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* 1997;158(8):3635-9.
108. Yi AK, Krieg AM. Cutting edge: rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol* 1998;161(9): 4493-7.
109. Vlasova TI, Vanyushin BF. DNA methylation by wheat cytosine DNA methyltransferase: modulation by protease inhibitor E-64. *Biochem Mol Biol Inter* 1998;45(1):145-53.
110. Lo ES, Lo YM, Hjelm NM, Thilaganatha B. Transfer of nucleated maternal cells into fetal circulation during the second trimester of pregnancy. *Brit J Haematol* 1998;100(3):605-6.
111. Hohlweg U, Doerfler W. On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol Genet Genomics* 2001;265(2):225-33.
112. Deaville ER, Maddison BC. Detection of transgenic and endogenous plant DNA fragments in the blood, tissues, and digesta of broilers. *J Agric Food Chem* 2005;53(26):10268-75.
113. Forbes JM, Blair GE, Chiter A, Perks S. Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation. Report CS0116. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK; 1998.
114. Gawienowski MC, Eckoff SR, Yang P, Rayapati PJ, Binder T, Briskinn DP. Fate of maize DNA during steeping, wet-milling and processing. *Cereal Chem* 1999;76(3):371-4.
115. Bauer T, Weller P, Hammes WP, Hertel C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *Eur Food Res Technol* 2003; 217(4):338-43.
116. Hupfer C, Mayer J, Hotzel H, Sachse K, Engel K-H. The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *Eur Food Res Technol* 1999;209(5):301-4.
117. Han JunHua, Yang YueXin, Men JianHua, Bian LiHua, Guo Jun. Comparison of ileal digested production of parental rice and rice genetically modified with cowpeas trypsin inhibitor. *Biomed Environ Sci* 2006;19(1): 42-6.
118. Aulrich K, Pahlow G, Flachowsky G. Influence of ensiling on the DNA-degradation in isogenic and transgenic corn. *Proc Soc Nutr Physiol* 2004;11: 90.
119. Duggan PS, Chambers PA, Heritage J, Forbes JM. Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep. *Br J Nutr* 2003; 89(2):159-66.
120. Chiter A, Forbes JM, Blair GE. DNA Stability in plant tissues: implications for the possible transfer of genes from genetically modified food. *FEBS Lett* 2000;481(2):164-8.
121. Alexander TW, Sharma R, Okine EK, Dixon WT, Forster RJ, Stanford K, McAllister TA. Impact of feed processing and mixed ruminal culture on the fate of recombinant EPSP synthase and endogenous canola plant DNA. *FEMS Microbiol Lett* 2002;214(2):263-9.
122. Gryson N, Messens K, De Loose M, Verleyen T, Dewettinck K. Detection of DNA during the refining of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 2002;79(2): 171-4.
123. Gryson N, Messens K, Dewettinck K. Influence of different oil-refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 2004;81(3):231-4.
124. Watson JC, Thompson WF. Purification and restriction endonuclease analysis of plant nuclear DNA. In: Weissbach A, Weissbach H (Ed.). *Methods for Plant Molecular Biology*. San Diego: Academic Press; 1988.
125. Phipps RH, Beever DE. New technology: issues relating to the use of genetically modified crops. *J Anim Feed Sci* 2000;9(4):543-61.



126. Beever DE, Kemp CF. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutr Abstr Rev Series B: Livestock Feeds and Feeding*. 2000;70:175-82.
127. Bertheau Y, Helbling JC, Fortabat MN, Makhzami S, Sotinel I, Audéon C, Nignol AC, Kobilinsky A, Petit L, Fach B, Brunschweig P, Duhem K, Martin P. Persistence of plant DNA in the blood of dairy cows fed genetically modified (Bt176) and conventional corn silage. *J Agric Food Chem* 2009;57(2):509-16.
128. Phipps R, Beever D, Humphries D. Detection of transgenic DNA in milk from cows receiving herbicide tolerant (CP4EPSPS) soybean meal. *Livestock Prod Sci* 2002;74(3):369-73.
129. Reuter T, Aulrich K. Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: fate of feed-ingested foreign DNA in pig bodies. *Eur Food Res Technol* 2003;216(3):185-92.
130. Klotz A, Mayer J, Einspanier R. Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs and poultry. *Eur Food Res Technol* 2002; 214(4):271-5.
131. Khummirdetch V, Intarachote U, Treemane S, Tragoonroog S, Thummabood S. Detection of GMOs in the broilers that utilized genetically modified soybean meals as a feed ingredient. In: *Plant and Animal Genome IX Conference*, San Diego: 2001.
132. Einspanier R, Flachowsky G. Biotechnology: potential absorption and biological functions of digested fragments of DNA or protein in animals fed genetically modified crops. *Encyclopedia of Animal Science* 2009, DOI: 10.1081/E-EAS-120045416.
133. Einspanier R, Klotz A, Kraft J, Aulrich K, Poser R, Schwägele F, Jahreis G, Flachowsky G. The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *Eur Food Res Technol* 2001;212(2):129-34.
134. Jennings JC, Kolwyck DC, Kays SB, Wheysell AJ, Surber JB, Cromwell GL, Lirette RP, Glenn KC. Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal. *J Anim Sci* 2003;81(6):1447-55.
135. Tudisco R, Infascelli F, Cutrignelli MI, Bovera F, Morcia C, Faccioli P, Terzi V. Fate of feed plant DNA monitored in water buffalo (*Bubalus bubalis*) and rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Livestock Sci*. 2006;105(1-3): 12-18.
136. Nemeth A, Wurz A, Artim L, Charlton S, Dana G, Glenn K, Hunst P, Jenning J, Shilito R, Song P. Sensitive PCR analysis of animal tissue samples for fragments of endogenous and transgenic plant DNA. *J Agric Food Chem* 2004;52(20):6129-35.
137. Agodi A, Barchitta M, Grillo A, Sciacca S. Detection of genetically modified DNA sequences in milk from the Italian market. *Int J Hyg Environ Health* 2006;209(1):81-8.
138. Wiedemann S, Lutz B, Kurtz H, Schwarz FJ, Albrecht C. In situ studies on the time-dependent degradation of recombinant corn DNA and protein in the bovine rumen. *J Animal Sci* 2006;84(1):135-44.
139. Lutz B, Wiedemann S, Albrecht C. Degradation of transgenic Cry1Ab DNA and protein in Bt-176 maize during ensiling process. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2006;90(3-4):116-23.
140. Flachowsky G, Aulrich K, Bohme H, Halle I. Studies on feeds from genetically modified plants (GMP) – Contributions to nutritional and safety assessment. *Anim Feed Sci Technol* 2007;133(1-2):2-30.
141. Forsman A, Ushameckis D, Bindra A, Yun Z, Blomberg J. Uptake of amplifiable fragments of retrotransposon DNA from the human alimentary tract. *Mol Gen Genomics* 2003;270(4):362-8.
142. Trabalza-Marinucci M, Brandi G, Rondini C, Avellini L, Giammarini C, Costarelli S, Acuti G, Orlandi C, Filippini G, Chiaradia E, Malatesta M, Crotti S, Antonini C, Amagliani G, Manuali E, Mastrogiacomo AR, Moscati L, Haouet MN, Gaiti A, Magnani M. A three-year longitudinal study on

- the effects of a diet containing genetically modified Bt176 maize on the health status and performance of sheep. *Livestock Sci* 2008;113(2-3):178-90.
143. Rizzi A, Brusetti L, Arioli S, Nielsen KM, Tamagnini I, Tamburini A, Sorlini C, Daffonchio D. Detection of feed-derived maize DNA in goat milk and evaluation of the potential of horizontal transfer to bacteria. *Eur Food Res Technol* 2008;227(6):1699-709.
  144. Tudisco R, Mastellone V, Cutrignelli MI, Lombardi P, Bovera F, Mirabella N, Piccolo G, Calabrò S, Avallone L, Infascelli F. Fate of transgenic DNA and evaluation of metabolic effects in goats fed genetically modified soybean and their offsprings. *Animal* 2010;4(10):1662-71.
  145. Stengleim MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS. APOBEC3 proteins mediated the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17(1):222-9.
  146. Webb KE. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J Anim Sci* 1990;68(9):3011-22.
  147. Noteborn HPJM, Bienenmann-Ploum ME, van den Berg JHJ, Alink GM, Zolla L, Reynaerts A, Pensa M, Kuiper HA. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CRY1A(b) expressed in transgenic tomatoes. *ACS Symposium Series no. 605*. Washington DC: American chemical Society; 1995. p. 134-47.
  148. Harrison LA, Bailey MR, Naylor MW, Ream JE, Hammond BG, Nida DL, Burnett BL, Nickson TE, Mitsky TA, Taylor ML, Fuchs RL, Padgett SR. The expressed protein in glyphosate tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium sp.* Strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J Nutr* 1996;126(3):728-40.
  149. Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotech* 1996;14(10):1274-8.
  150. Walsh MC, Buzoianu SG, Gardiner GE, Rea MC, Gelencsér E, Jánosi A, Epstein MM, Ross RP, Lawlor PG. Fate of transgenic DNA from orally administered Bt MON810 maize and effects on immune response and growth in pigs. *PlosOne* 2011; 6(11): e27177.
  151. Okunuki H, Teshima R, Shigeta T, Sakushima J, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Sawada J. Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. *J Food Hyg Soc Japan* 2002;43(2):68-73.
  152. Chowdhury EH, Kuribara H, Hino A, Sultana P, Mikami O, Shimada N, Guruge KS, Saito M, Nakajima Y. Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J Anim Sci* 2003; 81(10):2546-51.
  153. Chowdhury EH, Shimada N, Murata H, Mikami O, Sultana P, Yoshioka M, Yamanaki N, Hirai N, Nakajima Y. Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Vet Hum Toxicol* 2003;45(2):72-5.
  154. Ash J, Novak C, Scheideler SE. The fate of genetically modified protein from Roundup Ready Soybeans in laying hens. *J Appl Poultry Res* 2003;12(2):242-5.
  155. Guertler P, Paul V, Steinke K, Wiedemann S, Preissinger W, Albrecht C, Spieker H, Schwarz EJ, Meyer HHD. Long-term feeding of genetically modified corn (MON810) - Fate of *cry1Ab* DNA and recombinant protein during the metabolism of the dairy cow. *Livestock Sci* 2010;131(2-3):250-9.
  156. Weber TE, Richert BT. Grower-finisher growth performance and carcass characteristics including attempts to detect transgenic plant DNA and protein in muscle from pigs fed genetically modified "Bt" corn. *J Animal Sci* 2001; 79(Suppl. 2):67.
  157. Calsamiglia S, Hernandez B, Hartnell GF, Phipps RH. Effects of feeding corn silage produced from corn containing MON810 and GA2 genes on feed intake, milk production and composition in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003;86:S62.

158. Beever DE, Phipps RH. The fate of plant DNA and novel proteins in feeds for farm livestock: A United Kingdom perspective. *J Anim Sci* 2001; 79(E Suppl.): E290-E295.
159. Lutz B, Wiedermann S, Einspanier R, Mayer J, Albrecht C. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *J Agric Food Chem* 2005;53(5):1453-6.
160. Faust MA. Milk production study finds no Bt in milk. *Integrated Crop Management - Special Livestock Edition, Vol. 6*. Ames: Iowa State University; 1997.
161. Faust MA. Livestock products: composition and detection of transgenic DNA/proteins. In ADAS-ASAS (Ed.). *Proceedings of Symposium: Agriculture, Biotechnology, MarketVol . 29*. Baltimore; 2000.
162. Vijay P, Guertler P, Wiedemann S, HHD. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize (MON810) in relation to total dietary feed proteins in dairy cow digestion. *Transgenic Res*. 2010;19(4):683-9.
163. Alexander TW, Sharma R, Deng MY, Whetsell AJ, Jennings JC, Wang Y, Okine E, Darmgaard D, McAllister TA. Use of quantitative real-time and conventional PCR to assess the stability of the cp4 epsps transgene from roundup ready canola in the intestinal, ruminal and fecal contents of sheep. *J Biotechnol* 2004;112(3):255-66.
164. Alexander TW, Reuter T, Aulrich K, Sharma R, Okine EK, Dixon WT, McAllister TA. A review of the detection and fate of novel plant molecules derived from biotechnology in livestock production. *Animal Feed Sci Techno* 2007;133(1/2):31-62.
165. European Network Safety Assessment of Genetically Modified Food Crops. *Main conclusions and recommendations*. Wageningen, NL: RIKILT - Institute of Food Safety; 2004. Disponibile all'indirizzo: [http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/estudos\\_alimentares13.pdf](http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/estudos_alimentares13.pdf); ultima consultazione 11/12/16.
166. Knudsen I, Poulsen M. Comparative safety testing of genetically modified foods in a 90-day rat feeding study designed allowing distinction between primary and secondary effects of the new genetic event. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007;49(1):53-62.
167. Schroder M, Poulsen M, Wilcks A, Kroghsbo S, Miller A, Frenzel T, Danier J, Rychlik M, Emami K, Gatehouse A, Shu Q, Engel K-H, Knudsen I. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(3):339-49.
168. Poulsen M, Kroghsbo S, Schroder M, Wilks A, Jacobsen H, Miller A, Frenzel T, Danier J, Rychlik M, Shu Q, Emami K, Sudhakar D, Gatehouse A, Engel K-H, Knudsen I. A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin *Galanthus nivalis* (GNA). *Food Chem Toxicol* 2007;45(3):350-63.
169. Poulsen M, Schroder M, Wilcks A, Kroghsbo S, Lindecrona RH, Miller A, Frenzel T, Daniel J, Rychlik M, Shu Q, Emani K, Taylor M, Gatehouse A, Engel K-H, Knudsen I. Safety testing of GM-rice expressing PHA-E lectin using a new animal design. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(3): 364-77.
170. Knudsen I, Soborg I, Eriksen F, Pilegaard K, Pedersen J. Risk management and risk assessment of novel plant foods: Concepts and principles. *Food Chem Toxicol* 2008;46(5):1681-705.
171. EFSA Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. *EFSA Journal* 2011;9(12):2438.

## 5. TOSSICITÀ DELLE PROTEINE TRANSGENICHE ESPRESSE DALLE PGM

Le piante, nel corso dell'evoluzione, hanno sviluppato una serie di composti chimici per difendersi dall'attacco di virus, batteri e insetti. Molti di questi composti chimici (alcuni sono indicati in Tabella 6) sono tossici per l'uomo e in molti casi cancerogeni nell'animale da esperimento (1-4).

**Tabella 6. Molecole naturali tossiche presenti in alcuni vegetali**

Molecola	Pianta	Concentrazione media in ppm
Acido caffeico	Caffè	1800
	Carota, ciliegia, lattuga, mela, melanzana, pera, uva	50-200
	Aneto, basilico, dragoncello, rosmarino, salvia, timo	>1000
Acido clorogenico	Caffè	21600
	Albicocca, ciliegia, pesca, susina	50-500
Alcol $\alpha$ -metilbenzilico	Cacao	1,3
Benzil acetato	Basilico	82
Catecolo	Caffè	100
Estragolo	Basilico	3800
	Finocchio	3000
4D-limonene	Mango	40
	Pepe nero	8000
	Succo d'arancia	31
Psolarene	Prezzemolo	14
	Sedano	0,8-25
Sinigrina	Cavolo	35-590
	Cavolfiore	12-66
	Rafano	4500
	Senape	1600-72000

Piselli, fagioli, cereali e patate contengono lecitine che possono causare nausea, vomito e diarrea. Funghi, zucchine, cetrioli, ceci, olive, carote contengono sostanze chimiche tossiche per l'uomo. Le carote, ad esempio, contengono una sostanza neurotossica, ma bisognerebbe mangiarne almeno 400 per assumere una dose efficace. Le olive contengono una sostanza molto amara l'oleuropeina, che è eliminata nella spremitura e che veniva usata dagli antichi romani come insetticida mentre, oggi, viene venduta come un rimedio naturale ad azione antibatterica. Il caffè tostato contiene circa 800 sostanze chimiche volatili, 16 delle quali cancerogene nel topo. Comunque il rischio cancerogeno del caffè per l'uomo, secondo l'*International Agency for Research on Cancer*, classificato inizialmente come 2B, cioè forse cancerogeno, è stato recentemente considerato inesistente.

La cassava, di uso comune nelle aree tropicali e subtropicali, contiene un glucoside cianogenico capace di liberare acido cianidrico (HCN). Per essere consumati i tuberi di cassava devono essere pelati, grattugiati e pressati per eliminare i liquidi. La pasta deve essere asciugata

al sole, fermentata o riscaldata tutta la notte per eliminare l'HCN che si è formato. Gli ultimi residui di acido cianidrico sono eliminati con la cottura.

All'inizio degli anni '60, si scoprì che l'acido cis-13-docosenoico (acido erucico), uno dei costituenti principali dell'olio di colza era tossico. L'olio di colza era largamente impiegato nella preparazione dei fritti. Nel 1968, con un programma di riproduzione controllata, sviluppato in Canada, era stato possibile produrre una pianta (denominata canola da *Canadian oil*) con un contenuto in acido erucico sotto al 2%; l'olio, così ottenuto, idoneo al consumo umano, non era equivalente al tradizionale olio di colza, che viene ancora prodotto per uso industriale.

È stato calcolato che un americano assume mediamente con la dieta 1,5 g di composti naturali tossici al giorno; con valori più alti per i vegetariani (2-4). L'uomo non vive, perciò, in armonia tossica con i propri alimenti e alcuni di questi composti possono essere i responsabili delle intolleranze alimentari. Ad oggi, non è possibile valutare gli effetti dell'esposizione a lungo termine a queste sostanze con la dieta. Tuttavia, le varietà moderne coltivate sono state selezionate in modo da ridurre al minimo possibile la presenza di questi composti.

Nell'analisi di composizione delle piante transgeniche le concentrazioni di questi composti tossici è misurata con cura e tale concentrazione viene valutata in confronto con la controparte non modificata. Tuttavia, si stima che nel mondo vegetale, ad oggi, siano stati identificati circa 80.000 metaboliti, per cui non vi sono linee guida condivise su quanti e quali di questi debbano essere analizzati per valutare la sicurezza d'uso. I dati di confronto tra composti delle PGM e controparti non modificate si trovano nei *Consensus Documents* dell'OECD e nella base di dati della FAO (<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/gm-foods-platform/en/>); una lista dei composti naturali di rilevanza tossicologica è stata compilata dalla Commissione del *Codex Alimentarius* (5). I metodi per la valutazione di tali composti sono stati elaborati nell'ambito del progetto *Food Safety in Europe* (6); ed è stata realizzata, contemporaneamente, una banca dati europea sulla composizione degli alimenti (*European Food Information Resource Network*, <http://www.eurofir.net>). Ulteriori informazioni in merito possono essere ottenute dalla banca dati del CREA (Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione) (<http://nut.entecra.it/646/tabelle-di-composizione-degli-alimenti.html>), dal portale dell'*International Framework for Food Description* (<http://www.languag.org>), e per i mangimi dalla banca dati AFRIS (*Animal Feed Resources Information System*) della FAO (<http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/afri/default.htm>); inoltre dati di composizione sono reperibili anche dai *Food Composition Databases* dello *United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service* (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>).

Tuttavia, nel corso dell'evoluzione, sia gli animali, sia l'uomo hanno elaborato dei meccanismi di difesa di tipo generale per essere in grado di difendersi non solo dalle tossine d'origine naturale, ingerite con la dieta, ma anche da quelle di sintesi. Si calcola che, nell'alimentazione umana, oltre il 99% delle tossine ingerite sia di origine naturale e che solo l'1% siano composti tossici di sintesi, derivanti dalla contaminazione dei vegetali commestibili con pesticidi e/o erbicidi (1-4).

I meccanismi di difesa nell'uomo sono molteplici e includono:

- i meccanismi di detossificazione cellulare, basati sulla glutatione-S-transferasi, una famiglia di enzimi multifunzionali, particolarmente attivi sugli agenti alchilanti;
- l'attivazione dei meccanismi di riparo del DNA, efficaci quando si formano addotti tra il DNA e composti chimici;
- il ricambio continuo delle cellule esposte alle tossine come quelle degli strati superficiali della bocca, dell'esofago, dello stomaco, del sistema gastrointestinale, della pelle e dei polmoni;
- l'induzione delle difese contro gli agenti ossidanti.

## 5.1. Tossicità del DNA e delle proteine transgeniche

Non vi sono indicazioni sulla tossicità del DNA introdotto con la dieta, nonostante i timori descritti nella sezione sulla sperimentazione animale. Il DNA ingerito è rapidamente idrolizzato nel tratto gastroenterico umano (7-22).

Le valutazioni sulla tossicità, quindi, una volta escluso un aumento di concentrazione delle molecole tossiche naturali (effetti non intenzionali), prendono in considerazione l'eventuale tossicità dovuta al prodotto del gene inserito (proteina) o dell'organismo da cui il gene è stato ottenuto (11). Alcuni dei geni più utilizzati, insieme agli organismi da cui sono stati ottenuti, sono riportati in Tabella 7. Nella letteratura scientifica non vi è segnalazione di una qualche tossicità per gli organismi donatori.

**Tabella 7. I geni più comuni inseriti nelle PGM**

Gene	Caratteristica conferita alla PGM	Origine
<i>nptII</i>	Resistenza alla kanamicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptomyces</i> sp.
<i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry3A</i> , <i>cry1F</i>	Resistenza agli insetti	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>pat</i> , <i>bar</i>	Resistenza all'erbicida glufosinato	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> <i>S. viridochromogenes</i>
<i>epsps</i>	Resistenza all'erbicida glifosato	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , o gene del mais modificato
<i>barnase</i> BacteriaRibonucleASE	Maschio sterilità	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>als 1</i>	Resistenza all'erbicida sulfonilurea	Selezionato in molte piante
<i>δ-12 desaturasi</i>	Modifica del profilo degli acidi grassi	Soia
<i>nitrilasi</i>	Resistenza all'erbicida bomoxylinil	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
<i>proteina del capsid</i>	Resistenza al virus Y	Potivirus Y della patata
<i>proteina del capsid</i>	Resistenza ai virus CMV Resistenza al virus ZYMV Resistenza al virus WMV2	Virus del mosaico del cetriolo Virus del mosaico della zuccina Virus del mosaico del cocomero

Una domanda da porsi è se, per la proteina ottenuta dal gene inserito, sono disponibili dati relativi al suo consumo nell'alimentazione tradizionale in grado di comprovare la sua sicurezza d'uso. Ad esempio, le  $\delta$ -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 bersaglio di queste tossine è tale che, negli Stati Uniti, gli spray a base di Bt sono, dal 1971, esenti dai limiti di tolleranza. Quest'esenzione vuol dire che non vi sono limiti alla quantità di Bt cui uomini e animali possono essere esposti (10, 11).

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 (12), ma è presente negli alimenti di origine vegetale o microbica, assunti nella

dieta. L'enzima è stato utilizzato per conferire alle piante una tolleranza all'erbicida glifosato, capace di inibire selettivamente EPSPS.

Nella produzione di PGM sono stati utilizzati anche geni che conferiscono resistenza ai virus, come i geni delle proteine del capsido del potivirus Y della patata, del virus del mosaico del cetriolo e del virus del mosaico del cocomero. Tuttavia, la frequenza naturale delle infezioni virali nelle piante ha esposto ed espone l'uomo alle proteine dei virus vegetali, senza che siano stati mai associati, a tale esposizione, fenomeni di tossicità od allergicità.

Anche nel caso in cui siano disponibili per la nuova proteina dati di consumo come alimento tradizionale, sono stati effettuati studi di tossicità nell'ambito della valutazione della sicurezza d'uso. Ad esempio, somministrando la proteina EPSPS purificata per gavaggio ad una concentrazione 1.000 volte superiore a quella che si otterrebbe assumendo la PGM che la contiene, non è stato osservato alcun effetto nel topo (13, 14). Altri studi di tossicità a 90 giorni, alimentando topi con mais in modo da somministrare giornalmente 45 mg di proteina EPSPS per kg di peso corporeo, non hanno dimostrato alcun effetto di tossicità (15).

Analogamente non sono stati riscontrati effetti tossici o allergizzanti per l'enzima (fosfinotricina acil transferasi), espresso dai geni *pat* e *bar*, che conferisce la resistenza all'erbicida glufosinato somministrando per due settimane a topi l'enzima alla concentrazione di 5g/kg di peso corporeo, (16, 17). Esperimenti di tossicità acuta nel ratto e di mutagenesi, con la somministrazione di 64 g/kg di peso corporeo di riso transgenico hanno confermato la sicurezza d'uso del prodotto del gene *bar* (18).

Uno studio di gavaggio acuto, con un dosaggio cumulativo di 5g di proteina transgenica/kg di peso corporeo ha confermato l'innocuità della proteina *nptII*, che conferisce la resistenza alla kanamicina (19, 20). Anche i prodotti di altri geni, meno comuni impiegati per la produzione di PGM, non hanno evidenziato tossicità (21-22).

Prima di effettuare studi di tossicità, è necessario analizzare l'identità molecolare, biochimica, strutturale e funzionale della nuova proteina espressa. Tale analisi deve comprendere la degradazione, in condizioni simulate di digestione, le modifiche post-traduzione, la risposta biologica e l'eventuale attività immunologica (legame ai recettori, attività enzimatica, specificità di substrato, ecc.), l'eventuale omologia di sequenza con proteine, che sono note causare effetti nocivi.

La decisione di effettuare ulteriori test più specifici viene presa caso per caso. Per esempio, quando la proteina ha una funzione biologica specifica, come una lectina od un inibitore delle proteasi; quando la proteina ha un'attività tossica; quando non vi è una storia documentata di esposizione nell'uomo o nell'animale; quando la struttura primaria della proteina è modificata; quando la proteina non viene degradata rapidamente e quando i livelli di assunzione previsti potrebbero causare effetti avversi.

A tale proposito, un problema generale è rappresentato dal livello di espressione della proteina nella pianta che generalmente non consente di estrarre dalla PGM una quantità di proteina sufficiente per le analisi. Per questo motivo, nella maggior parte dei casi, le proteine sottoposte a test sono state prodotte in batteri o lieviti, previa analisi rigorosa delle proprietà funzionali e strutturali delle stesse, mediante il confronto con le proteine espresse nelle piante modificate. Infatti, un diverso *folding* proteico, un diverso grado di glicosilazione o fosforilazione potrebbero influenzare l'eventuale tossicità o l'attività biologica della proteina stessa.

Una volta verificata l'identità funzionale e strutturale, le proteine, espresse nelle piante transgeniche, sono state somministrate, per via orale, alla più alta dose possibile, ad animali di laboratorio, in studi di tossicità acuta, i cui risultati, espressi come NOAEL sono riportati in Tabella 8. Tali NOAEL, sebbene non permettano di calcolare in modo univoco una dose accettabile giornaliera (ADI), ci consentono di valutare i livelli di assunzione in un intero anno da parte dell'uomo (Tabella 9).

**Tabella 8. Tossicità acuta nel topo delle nuove proteine espresse nelle PGM\***

Proteina	Funzione	NOAEL in mg/kg peso corporeo	Rif.
Cry1Ab	Resistenza agli insetti	4000	23, 24
Cry1Ac	idem	4200	23, 24
Cry2Aa	idem	3000	23, 24
Cry2Ab	idem	3700	23, 24
Cry3A	idem	5200	23, 24
CP4 EPSPS	Tolleranza al glifosato	475	25
mz EPSPS	Tolleranza al glifosato	350	25
Forfinotricina, fosfotransferasi, <i>nptII</i>	Resistenza alla kanamicina	5000	20

**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.

**Tabella 9. Livelli ipotetici di assunzione delle proteine transgeniche\*\* in Italia**

Pianta	Gene inserito	Concentrazione della proteina transgenica nella parte edibile	Consumo annuale kg/pro capite	Assunzione ipotetica annuale della proteina transgenica
Novartis Mais Bt11	Cry1Ab	1,4 µg/kg	3,9	5,46 µg/procapite
Monsanto Mais MON810	Cry1Ab	0,3 µg/kg	3,9	1,17 µg/procapite
Monsanto Mais MON863	Cry3Bb1	70 µg/kg	3,9	72,54 µg/procapite
Dow AgroScience Mais Herculex 1	Cry1F	90 µg/kg	3,9	351 µg/procapite
Monsanto Soia	CP4 EPSPS	27,0 µg/kg	Non disponibile	

\*\*I consumi annuali espressi in kg/pro capite si riferiscono all'anno 2007 e sono stati raccolti dalla FAO (<http://faostat.fao.org/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID=368#ancor>)

I dati ottenibili dalle analisi dei consumi nazionali ci consentono di formulare delle previsioni sull'eventuale esposizione dei consumatori alle proteine transgeniche presenti nella dieta, assumendo che gli alimenti consumati siano solo transgenici. I dati, basati sul consumo delle parte edibile in peso fresco, sono chiaramente indicativi, dato che ingredienti contenenti mais o soia sono presenti in una grande quantità di alimenti trasformati e che vi sono forti differenze di consumo in base all'età e al sesso.

Inoltre, bisogna considerare che il consumo giornaliero di proteine è circa 100-300 milioni di µg al giorno. In questo contesto l'esposizione alle proteine transgeniche risulta essere molto bassa.

### 5.1.1. Tossicità delle proteine Cry sugli organismi non target

Le proteine, indicate in Tabella 9, non hanno dimostrato effetti sugli uccelli, gli invertebrati acquatici, le api, i predatori coccinellidi e i vermi (26). Una particolare attenzione è stata dedicata all'endotossina Cry1Ab quando si è visto che era tossica per gli invertebrati del suolo della specie *Collembola (Folsomia candida)*. Il livello a cui non si osserva alcun effetto



(NOAEL) su queste specie è 88 µg di tossina/kg di suolo. Incorporando nel suolo le piante GM senescenti, dopo il raccolto, si ottiene una concentrazione di endotossina di 0,42 µg di tossina/kg di suolo, che rappresenta un fattore di sicurezza di circa 200 volte per le specie in questione (27).

Il meccanismo d'azione delle proteine Cry è basato sul legame con un recettore specifico, per cui sono stati condotti degli studi sul legame delle proteine Cry1Ab5 e Cry9C con i tessuti del tratto gastrointestinale di roditori e primati non umani (28, 29). Infine, le proteine espresse non hanno potenziali effetti mutageni, teratogeni o cancerogeni (4, 30).

Analizzando la tossicità associata al consumo delle PGM non si può non sottolineare il fatto che i mais, contenenti la tossina Cry, presentano un vantaggio per il consumatore, perché hanno un minor contenuto in fumonisine, rispetto ai mais tradizionali. Le fumonisine, sono un gruppo di composti potentemente cancerogeni, che residuano nel latte e nelle carni degli animali che li consumano (31).

### 5.1.2. Controversie riguardanti gli studi tossicologici di Séralini

Nel 2007, Séralini e collaboratori, hanno rianalizzato i dati di uno studio di tossicità nel ratto, a 90 giorni, presentato dalla Monsanto per l'approvazione del Mais MON 863, resistente alla *Diabrotica virgifera virgifera* (32). Secondo Séralini, i parametri clinici misurati erano indicativi di una sofferenza epatorenale. Secondo un gruppo di esperti e il *GMO panel* dell'EFSA, invece, Séralini non aveva dimostrato una correlazione dose/risposta, una riproducibilità dei dati nel tempo e non aveva tenuto conto del fatto che le variazioni osservate erano all'interno della normale variabilità biologica (33).

In seguito, Séralini e collaboratori hanno pubblicato un lavoro che indica una sofferenza epatorenale dovuta ai mais transgenici NK603, MON810 e MON863 (34). Il *GMO panel* dell'EFSA di nuovo ribadiva che le affermazioni degli autori su nuove tossicità per fegato e reni, non erano documentate dai dati presentati nel loro lavoro e che le critiche all'approccio statistico già formulate per il lavoro precedente (33) erano del tutto applicabili al nuovo. Tuttavia Séralini, pur riconoscendo che il suo lavoro non dimostrava la tossicità cronica di tali PGM, ha evidenziato la necessità di effettuare studi di tossicità cronica sulle PGM in questione (35).

Séralini ha recentemente, con grande diffusione mediatica, pubblicato i risultati di una sperimentazione a lungo termine condotta con mais Monsanto NK603, resistente al glifosato (Roundup) e il glifosato stesso, che ha evidenziato una serie di effetti sulla salute dei ratti Spague-Dawley (36). In questa sperimentazione a lungo termine, 200 ratti (100 maschi e 100 femmine), sono stati randomizzati in 10 gruppi distinti, ciascuno contenente 10 ratti. Nella sperimentazione è stato utilizzato un gruppo di controllo per ciascun sesso per testare la tossicità del Roundup (somministrazione di semplice acqua non addizionata con l'erbicida) e contenente il 33% di una linea di mais isogena con NK603; sei gruppi sono stati alimentati con una dieta contenente l'11, il 22 e il 33% di NK603, trattato e non trattato con glifosato. Agli ultimi tre gruppi è stata fornita la dieta di controllo e acqua contenente un preparato commerciale di Roundup a concentrazioni corrispondenti a 50 ng/L (pari a quella che si trova raramente in alcuni acquedotti), 0,45 g/L e 2,5 g/L (corrispondente alla metà della concentrazione usata in agricoltura). Il preparato commerciale di Roundup usato, GT Plus, per il quale non vengono forniti dati di composizione, era diverso da quello usato normalmente in campo aperto, Weather-MAX.

Questa impostazione sperimentale risponde alle linee guida dell'OECD per gli studi di tossicità subcronica (37) ma non alle linee guida sugli studi di carcinogenicità che richiedono gruppi di almeno 50 animali di entrambi i sessi (38).

Alla fine dell'esperimento, è stata osservata una mortalità maschile più alta rispetto ai controlli solo nel gruppo alimentato con l'11% di mais transgenico, mentre, quando i ratti maschi sono alimentati con il 22 e il 33% di mais transgenico, muiono 3 volte meno dei ratti maschi alimentati con mais non transgenico, come se il mais NK 603 esercitasse un'azione protettiva. Nelle femmine la mortalità più alta si osservava nel gruppo alimentato con il 22% di NK603; inoltre, non vi erano differenze significative tra Roundup e mais NK603 trattato e non trattato con Roundup. Gli autori, pur osservando queste differenze anomale tra le dosi utilizzate di erbicida e di mais, sostengono che l'effetto tossico si verifica ad una dose molto bassa (effetto soglia); effetto che rimane perciò tale anche alle alte dosi. Questa affermazione non è sostenuta da alcuna analisi statistica e i grafici che indicano mortalità e tumori non sono in accordo con quanto affermato nel testo.

Gli autori avanzano l'ipotesi che la mortalità e i tumori, osservati specialmente nei ratti femmine, sia dovuto all'effetto soglia di NK603 e di Roundup sul sistema endocrino. Per corroborare questa tesi, viene fatto erroneamente riferimento al lavoro di Vandenberg *et al.*, (39) che invece nega esplicitamente l'esistenza di una soglia per gli effetti dannosi dei distruttori endocrini. Inoltre, effetti soglia non sono necessariamente correlati ad effetti negativi sul sistema endocrino (40, 41). I risultati osservati, quindi, possono significare più semplicemente che l'erbicida e il mais transgenico non avendo alcun effetto misurabile non danno incrementi di tossicità all'aumentare della dose.

È noto, d'altra parte da lungo tempo, che i ratti Sprague-Dawley, alimentati *ad libitum*, invecchiando sviluppano naturalmente tumori, più frequenti nella ghiandola mammaria delle femmine (42, 43), con valori che vanno dal 60% nei maschi all'80% nelle femmine (44-49).

La Commissione europea ha incaricato l'EFSA di valutare i risultati di Séralini al quale l'EFSA ha chiesto di poter visionare i risultati grezzi dello studio. Séralini ha negato all'EFSA tale possibilità, nel corso della conferenza stampa tenuta a Bruxelles nella sede del Parlamento europeo (disponibile dal sito de *La France Agricole*: <http://www.lafranceagricole.fr/actualite-agricole/ogm-etude-des-dangers-a-verifier-reactions-video-62274.html>).

Questo atteggiamento getta un'ombra di dubbio sull'appropriatezza dell'esperimento, inoltre, la valutazione del lavoro effettuata dall'EFSA ha evidenziato numerose lacune nella metodologia scientifica utilizzata che hanno motivato la conclusione che il lavoro non impatta sulla valutazione del glifosato e del mais NK603 (50, 51). L'atteggiamento di Séralini è stato stigmatizzato dal Comitato etico del *Centre National de la Recherche Scientifique*: "Dans le cas présent il regrette que les chercheurs concernés aient fait le choix d'une communication inadaptée à la qualité et à l'objectivité de débat public" (<http://www.cnrs.fr/comets/spip.php?article47>).

È importante segnalare che in appendice al parere dell'EFSA (50) sono stati pubblicati i pareri sulla sperimentazione di Séralini *et al* delle autorità competenti di Danimarca, Francia, Germania, Paesi Bassi e Italia (per l'Italia, l'Istituto Superiore di Sanità e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana). Tutte le autorità competenti hanno giudicato i risultati dello studio non coerenti e di qualità insufficiente per una valutazione del rischio. Particolarmente significativo, a questo riguardo, è il parere negativo dell'*Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail* francese, cui Séralini ha fornito ulteriori dati pur rifiutando di nuovo di mettere a disposizione i dati grezzi.

### 5.1.3. Il caso degli effetti del mais GM sulla fertilità

Il Ministero austriaco della salute, famiglia e giovani ha commissionato uno studio a lungo termine su topi alimentati con il mais NK603xMON810 e una linea isogenica non modificata come controllo. Lo studio, diretto dal prof. Jürgen Zentek dell'Università di Vienna, presentato

ad un congresso, a novembre 2008, avrebbe indicato che i topi alimentati con il mais transgenico avevano meno figli dei topi di controllo. I mezzi di comunicazione diffusero immediatamente i risultati come un'evidenza che il mais transgenico riduceva la fertilità. Greenpeace scrisse che "Consumption of GM maize reduced fertility" chiedendo la chiusura dell'EFSA per incompetenza e la rimozione dal mercato di tutti i mais autorizzati. Sebbene il prof. Zentek avesse messo in guardia contro generalizzazioni troppo frettolose, da allora lo studio è stato ampiamente citato come evidenza dei rischi associati alle piante transgeniche. Lo stesso Governo austriaco presentò il lavoro allo *Standing Committee on the Food Chain and Animal Health* (SCFCAH) della Commissione UE, come parte dello sforzo del Governo stesso sulla sicurezza dei transgeni. Lo SCFCAH chiese al Governo Austriaco di fornire i dati grezzi dello studio. L'EFSA, esaminati i dati, concluse che tali dati erano incompleti e contraddittori e mancanti delle informazioni indispensabili per una valutazione scientifica dello studio. Lo stesso Governo Austriaco dopo aver annunciato che gli scienziati incaricati dello studio non erano stati in grado di presentare una valutazione statistica soddisfacente, a marzo 2010, ha ritirato lo studio presentato allo SCFCAH (<http://www.gmo-compass.org/eng/news/499.docu.html>). La pubblicazione della smentita comunque non ha avuto da parte dei media la stessa enfasi dell'annuncio sull'impotenza quindi la notizia continuerà a circolare come vera per moltissimo tempo ancora.

## 5.2. Conclusioni

In Italia, se tutto il mais consumato fosse transgenico e il consumo omogeneo nella popolazione, un individuo, assumerebbe, ad esempio nel caso del mais Novartis Bt11, 0,015 µg di proteina transgenica al giorno e dovrebbe consumare 600 tonnellate di mais in un singolo pasto per arrivare al dosaggio (4.000 mg/kg) che non ha prodotto effetti nell'animale da esperimento. L'esposizione con la dieta alle proteine transgeniche, sia nella forma funzionalmente attiva sia in quella denaturata è del tutto trascurabile e al di sotto di qualunque livello di rischio.

Le controversie suscitate dallo studio di Séralini, il cui protocollo sperimentale è stato riconosciuto non valido, fatto che ha comportato anche il ritiro dell'articolo da parte dell'editore della rivista scientifica che lo aveva pubblicato, hanno comunque avuto il merito di stimolare la comunità scientifica e in particolare l'EFSA e la Comunità europea a fare chiarezza sulle metodologie da utilizzare negli studi di tossicità a medio e lungo termine. In tale ambito EFSA ha pubblicato un rapporto tecnico in cui ha valutato l'applicabilità agli alimenti e ai mangimi dei protocollo OECD TG 453 sugli studi di tossicità cronica e di cancerogenità nel ratto (52). Inoltre, sono stati finanziati dalla Comunità Europea alcuni progetti tra cui il progetto GRACE (<http://www.grace-fp7.eu/>) con lo scopo di valutare l'applicazione agli alimenti e ai mangimi GM di alcuni protocolli sperimentali sia *in vivo* che *in vitro*.

## Bibliografia

1. Dolan LC, Matulka RA, Burdock GA. Natural occurring toxins. *Toxins* 2010;2(9):2289-332.
2. Ames BN, Gold LS. Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(19):7772-6.
3. Ames BN, Profet M, Gold LS. Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(19):7777-81.

4. Ames BN, Profet M, Gold LS. Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(19):7782-6.
5. Codex Alimentarius Commission. *Guidelines for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA Plants*. FAO, WHO; 2003. (CAC/GL 45-2003) Disponibile all'indirizzo: [http://www.fao.org/input/download/standards/10021/CXG\\_045e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/10021/CXG_045e.pdf); ultima consultazione 18/1/2016).
6. Food Safety in Europe (FOSIE): risk assessment of chemicals in food and diet. *Food Chem Toxicol* 2002;40:137-424.
7. Martin-Orue SM, O'Donnell AG, Arino J, Netherwood T, Gilbert HJ, Mather JC. Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulations. *British J Nutr* 2002;87:533-42.
8. Netherwood T, Martin-Orue SM, O'Donnell AG, Gocking S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnol* 2004;22(2):170-2.
9. Netherwood T, Martin-Orue SM, O'Donnell AG, Gocking S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnol* 2004;22(2):204-9.
10. Netherwood T, Martin-Orue SM, O'Donnell AG, Gocking S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnol* 2004;22(6):654-5.
11. Hammond BG. 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. Paris: OECD; 1997.
12. Shimada N, Kim YS, Miyamoto K, Yoshioka M, Murata H. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. *J Vet Med Sci* 2003;65(2):187-91.
13. Steinrucken HC, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5- enoilpyruvylshikimate-5-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Comm* 1980;94(4):1207-12.
14. Harrison LA, Bailey MR, Naylor MW, Ream JE, Hammond BG, Nida D, Burnett BL, Nickson TE, Minsky TA, Taylor ML, Fuchs RL, Padgett SR. The expressed protein in glyphosate tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium sp.* Strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J Nutr* 1996;126(3):728-40.
15. Lee T, Leach J, Ledesma B, Hammond BG, Naylor M, Fuchs R, Sindhu R, Rodriguez D, Astwood J. Safety assessment of mEPSPS protein in Roundup ready corn plants. *Proc Soc Toxicol Annu Meet* 2001;411.
16. Wehrman A, van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnol* 1996;14(10):1274-8.
17. Herouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debryne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, Klis RJ, van der Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005;41(2):134-49.
18. Wang Y, Lai W, Chen J, Mei S. Toxicity of anti-herbicide gene (BAR) transgenic rice. *Wei Sheng Yan Jiu* 2000;29(3):141-2.
19. Redenbaugh K, Hiatt W, Martineau B, Lindemann J, Emlay D. Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (APH(3')II): Review of its safety and use in the production of genetically engineered plants. *Food Biotechnol* 1994;8(2/3):137-65.
20. Fuchs RL, Ream JE, Hammond BG, Naylor MW, Leimgruber RM, Berberich SA. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Nature Biotechnol* 1993;11(12):1543-7.

21. Atkinson HJ, Johnston KA, Robbins M. Prima facie evidence that a phytocystatin for the transgenic plant resistance to nematodes is not a toxic risk in the human diet. *J Nutr* 2004;134(2):431-34.
22. Ewen SWB, Path FRC, Pustzai A. Effects of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nirvalis* lectin on rat small intestine. *Lancet* 1999;354(9187):1353-4.
23. Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000;32(2):156-73.
24. Hammond BG, Cockburn A. The safety assessment of proteins introduced into crops developed through agricultural biotechnology. In: Hammond BG (Ed.). *Food Safety of Proteins in Agricultural Biotechnology*. CRC Press, Taylor and Francis Group; 2008. p. 259-88.
25. Canadian Food Inspection Agency. *DD2005-53: Determination of the safety of Monsanto Canada Inc.'s Roundup Ready® Alfalfa (Medicago sativa L.) events J101 and J163*. Ottawa: CFIA; 2005.
26. *Bacillus thuringiensis* cryIA genes. In: Copping LG (Ed.) *The biopesticide manual: a world compendium*. Alton, UK: British Crop Protection Council; 2001.
27. Noteborn HPJM, Bienenman-Ploum ME, van den Berg JHJ, Alink GM, Zolla L, Reynaerts A, Pensa M, Kuiper HA. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein Cry1Ab expressed in transgenic tomatoes. In: Engel K-H, Takeoka GR, Teranishi R (Ed.). *Genetically modified foods-safety aspects, ACS Symposium Series 605*. Washington DC: American Chemical Society; 1995. p. 134-47.
28. US Environmental Protection Agency. Assessment of scientific information concerning Starlink corn Cry9C Bt corn plant-pesticide. *Federal Register* 2000;65(211):65246-51.
29. Kuiper HA, Kleter GA, Noteborn HPJM, Kok EJ. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J* 2001;27(6):503-28.
30. Munkvold GP, Hellmich RL, Rice LG. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant Dis* 1999;83(2):130-8.
31. Masoero F, Moschini M, Rossi F, Prandini A, Pietri A. Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1Ab) grown in northern Italy. *Maydica* 1999; 44:205-9.
32. Séralini G-E, Cellier D, Vedomois JS. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. *Arch Environ Cont Toxicol* 2007;52(4):596-602
33. Doull J, Gaylor D, Greim HA, Lovell DP, Lynch B, Munro IC. Report of an expert panel on the reanalysis by Séralini et al. (2007) of a 90-day study conducted by Monsanto in support of the safety of a genetically modified corn variety (MON 863). *Food Chem Toxicol* 2007;45(11):2073-85.
34. de Vendômois JS, Roullier F, Cellier D, Séralini G-E. A comparison of the effects of three gm corn varieties on mammalian health. *Int J Biol Sci* 2009; 5(7):706-26.
35. de Vendômois JS, Cellier D, Vélot C, Clair E, Mesnage R, Séralini G-E. Debate on GMOs Health risks after statistical findings in regulatory test. *Int J Biol Sci* 2010;6(6):590-8.
36. Séralini G-E, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, de Vendômois JS. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem Toxicol* 2012. L'articolo è stato ritirato dalla rivista: si veda <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512005637>; ultima consultazione 07/04/2014, ma è ancora disponibile sul sito di Séralini <http://www.gmoSeralini.org/en/>; ultima consultazione 14/04/2014.
37. OECD. Test n. 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4*. Paris: OECD; 1998.
38. OECD. Test n. 453. Combined Chronic Toxicity/carcinogenicity Studies. *OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4*. Paris: OECD; 2009.

39. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012;33(3):378-455.
40. Calabrese EJ. Hormesis: Why is important to toxicology and toxicologists. *Environ Toxicol Chem* 2008;27(7):1451-74.
41. Stern BR. Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: Overview update and regulatory considerations. *J Toxicol Environ Health, part A* 2010;73(2):114-27.
42. Suzuki H, Mohr U, Kimmerle G. Spontaneous endocrine tumors in Sprague-Dawley rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1979;95(2):187-96.
43. Keenan KP, Smith PF, Hertzog P, Soper K, Ballam GC, Clark RL. The effects of overfeeding and dietary restriction on Sprague-Dawley rat survival and early pathology biomarkers of aging. *Toxicol Pathol* 1994;22(3):300-15.
44. PW Durbin, MH Williams, N Jeung, JS Arnold. Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female Charles River (Sprague-Dawley) rat: the influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Res* 1966;26(3):400-11.
45. Hotchkiss CE. Effect of surgical removal of subcutaneous tumors on survival of rats. *J Am Vet Med Assoc* 1995;206(10):1575-9
46. McMartin DN, Sahota PS, Gunson DE, Hsu HH, Spaet RH. Neoplasms and related proliferative lesions in control Sprague-Dawley rats from carcinogenicity studies. Historical data and diagnostic considerations. *Toxicol Pathol* 1992;20(2):212-25.
47. Kaspareit J, Rittinghausen S. Spontaneous neoplastic lesions in Harlan Sprague-Dawley rats. *Exper Toxicol Pathol* 1999;51(1):105-7.
48. Nakazawa M, Tarawatani T, Uchimoto H, Kawaminami A, Ueda M, Ueda A, Shinoda Y, Iwakura K, Kura K, Sumi N. Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats. *Exp Anim* 2011;50(2):99-103.
49. Dinse GI, Peddada SD. Comparing tumor rates in current and historical control group in rodent cancer bioassay. *Stat Biopharm Res* 2001;3(1):97-105.
50. EFSA. Final review of the Séralini *et al.* (2012) publication on a 2-year rodent feeding study with glyphosate formulations and GM maize NK603 as published online on 19 September 2012 in Food and Chemical Toxicology. *EFSA J* 2012;10(11):2986
51. Butler D: Hyped GM maize study faces growing scrutiny. *Nature* 2012;490: 158.
52. EFSA Considerations on the applicability of OECD TG 453 to whole food/feed testing. *EFSA Journal* 2013;11(7):3347 [18 pp.].

## 6. ALLERGENICITÀ DELLE PGM

La maggior parte degli alimenti può causare reazioni avverse che, sulla base del loro meccanismo di azione, possono essere classificate come allergie o come intolleranze alimentari (1). Nel caso delle intolleranze, eliminando per almeno 3 mesi dalla dieta gli alimenti non tollerati, i sintomi tendono a scomparire in ben 7 casi su 10. La gamma dei sintomi delle intolleranze alimentari è molto ampia e può essere confusa con l'allergia alimentare comprendendo manifestazioni d'origine nervosa (affaticamento, ansietà, attacchi di panico e capogiri), metaboliche (aumento o perdita di peso), gastrointestinali (afte, colite, costipazione, crampi e anche artrite e asma).

Esiste, ancora oggi, molta confusione sulle differenze tra allergia e intolleranza alimentare (2). In base ai meccanismi patogenetici bisogna distinguere le reazioni tossiche (gastroenteriti da tossine batteriche, intossicazioni da funghi) da quelle non tossiche, suddivisibili, a loro volta, in immunomediata (allergie alimentari vere e proprie) e non immunomediata (intolleranze alimentari).

Le reazioni immunomediata sono distinguibili tra quelle mediate dalle immunoglobuline IgE e quelle mediate dalle immunoglobuline IgG (3). Le IgG specifiche sono *marker* di un'alterata permeabilità della mucosa intestinale, conseguente a malattie infiammatorie croniche intestinali e/o malassorbimento (4, 5). Purtroppo questi sintomi sono spesso mascherati e, proprio nelle forme IgG mediate, si manifestano anche a distanza di molti giorni dall'ingestione dell'alimento non tollerato.

Spesso le reazioni di intolleranza alimentare sono dovute agli additivi chimici (circa 3000) usati nella produzione degli alimenti. Quelli più spesso coinvolti sono agenti preservanti come l'acido benzoico e i suoi derivati (da E 210 a E 219, secondo la classificazione del Codex Alimentarius, *Class Names and International Numbering System for Food Additives*, (CAC/GL 36-1989), il solfito di sodio e i suoi derivati (da E 220 a E 227), i nitriti (da E 249 a E 252) e l'acido salicilico; i coloranti come la tartazina (E 102) e l'eritrosina (E 127); i glutammati (da B 550 a B 553).

Le vere reazioni allergiche, mediate da IgE, sono solo il 20% di tutte le reazioni avverse agli alimenti (6). Molti consumatori, ma anche molti medici, definiscono allergia qualunque risposta anormale ad un alimento, indipendentemente dal meccanismo coinvolto nella reazione avversa. Tale sovrastima della prevalenza dell'allergia alimentare è documentata da numerosi studi sulla percezione del fenomeno (7-9), che hanno reso evidente anche la presenza di due situazioni contrapposte: la diagnosi di allergia in assenza della stessa e il mancato riconoscimento delle allergie vere (7).

Le vere allergie alimentari, che si presentano ogni volta che l'alimento responsabile è ingerito, spesso indipendentemente dalla quantità assunta, possono a loro volta essere suddivise in reazioni di ipersensibilità immediate e in reazioni di ipersensibilità differite. Nelle reazioni immediate, i sintomi si sviluppano entro pochi minuti, al massimo un'ora, dall'ingestione di quantità anche molto piccole dell'alimento. Le reazioni di ipersensibilità differita si instaurano dopo circa 24 ore dall'ingestione e sono molto meno severe delle reazioni immediate.

L'allergia alimentare "vera" implica un meccanismo immunologico e si realizza in due fasi:

1. La sensibilizzazione, che ha luogo quando un individuo predisposto entra a contatto con l'allergene, cui segue la produzione di IgE capaci di legarsi a determinati siti dell'allergene, denominati epitopi. Questa prima fase è asintomatica.
2. La reazione allergica vera e propria, che si verifica quando l'individuo è esposto di nuovo all'allergene. Il riconoscimento dell'allergene da parte delle IgE comporta il rilascio di

mediatori chimici, il più importante dei quali è l'istamina. A questo punto l'individuo manifesta sintomi clinici più o meno gravi.

L'esposizione agli allergeni alimentari, che sono sempre proteine, distinte in allergeni maggiori o minori secondo la severità dei sintomi clinici imputabili (10, 11), stimola, negli individui suscettibili, geneticamente predisposti, la formazione di anticorpi IgE specifici per l'allergene ingerito (12). Le IgE si legano ai macrofagi dei tessuti o ai basofili del sangue, ed, a questo punto, l'individuo è sensibilizzato all'alimento senza aver ancora sperimentato una reazione allergica. L'esposizione successiva porta ad un'interazione tra allergene e le IgE legate sulla superficie delle cellule, e questa interazione stimola un rilascio massiccio di mediatori vasoattivi (istamina, leucotrieni, e una proteasi neutra la triptasi) da parte dei macrofagi e dei basofili; mediatori che danno origine alla risposta allergica (12-16).

Le reazioni cliniche variano moltissimo tra individui diversi che possono manifestare urticaria, rigonfiamento dei muscoli della faccia o della gola, vomito, diarrea, asma, difficoltà respiratorie e ipotensione. Queste sono le reazioni allergiche agli alimenti meglio caratterizzate e si manifestano da pochi minuti a circa un'ora dall'ingestione.

Vi sono poi le ipersensibilità di tipo IV, mediate dalle cellule del tratto gastroenterico e non dalle IgE, nelle quali i sintomi si manifestano tra le 6 e le 24 ore dall'ingestione; esistono anche situazioni miste in cui sia le IgE che le cellule del sistema immune sono coinvolte nella reazione (11).

Le allergie alimentari sono associate al consumo di un numero limitato di proteine specifiche (13-17) contenute in:

- frutta (kiwi, banana, avocado, mele, pere);
- noci (noccioline americane, le noci del genere *Juglans*, mandorla, nocciola, castagna);
- vegetali della famiglia delle *Umbelliferae* (sedano, carota, prezzemolo, finocchio), delle *Solanaceae* (patata, peperone, melanzana e caffè);
- alcune spezie (senape, semi di sesamo, paprica, coriandolo, pepe di Caienna, semi di cumino);
- latte bovino e i suoi derivati; la proteina più allergenica è una  $\beta$ -lattoglobulina assente nel latte umano;
- soia; la soia viene largamente utilizzata dalle persone che sono intolleranti al latte bovino e il 30% di queste finisce con lo sviluppare un'allergia alla soia;
- pesce nel quale gli allergeni comuni a molte specie sono contenuti nella carne (alcuni pesci come il merluzzo e lo sgombro contengono alte concentrazioni d'istamina, che possono dare sintomi simili a quelli dell'allergia);
- raramente nei cereali (grano, mais, orzo, segale, riso, sorgo, miglio); in questo caso vi possono essere reazioni crociate con i pollini delle graminacee;
- raramente nei crostacei (gamberetti, granchi, aragosta, scampi, gambero di fiume).

Questi alimenti danno origine al 90% delle allergie alimentari, sebbene siano noti almeno 160 alimenti, associati a manifestazioni allergiche. Il rimanente 10% delle allergie alimentari è causata da proteine allergeniche meno comuni e interessano un numero limitato di persone (18).

La distribuzione delle allergie alimentari varia da Paese a Paese, essendo correlata strettamente alle abitudini alimentari. Nei Paesi scandinavi, ad esempio, è molto comune l'allergia al merluzzo, mentre in Medio Oriente è diffusa l'allergia al sesamo. Nell'America del Nord le allergie alimentari colpiscono circa il 7% della popolazione adulta e 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 50%, della popolazione intervistata, ha dichiarato di essere allergica (7-9, 19-23). Nel caso dei bambini, il 40-60% dei genitori era convinto che il proprio figlio fosse allergico. Tuttavia quando gli intervistati, o i bambini, erano sottoposti ad



analisi cliniche appropriate questa percentuale diminuiva a meno del 2% negli adulti e al 7% nei bambini. Se tali analisi cliniche comprendevano, oltre al test cutaneo, anche la somministrazione controllata dell'alimento, la prevalenza delle allergie alimentari era solo dello 0,9% sia nei bambini che negli adulti (24, 25).

L'opinione pubblica sulle allergie, oltre ad essere in contrasto con i dati scientifici, è tuttavia fuorviata dalla percezione, largamente amplificata dalla stampa, che le allergie siano in aumento. Al contrario, alcuni studi recenti hanno rilevato una diminuzione delle allergie respiratorie (26-28) e una prevalenza costante delle allergie alimentari intorno al 2-3% (24, 25, 29, 30). Tuttavia, permane un'incertezza sulla prevalenza delle allergie alimentari nella popolazione in quanto gli studi effettuati sono nella maggior parte eterogenei, e le analisi sono state condotte su persone che si dichiaravano allergiche (8).

Allo scopo di definire la prevalenza delle allergie alimentari in Europa, la Commissione Europea ha ultimato il progetto EuroPrevall ([http://cordis.europa.eu/result/report/rcn/51771\\_en.html](http://cordis.europa.eu/result/report/rcn/51771_en.html)). Inoltre, recentemente l'EFSA ha effettuato uno studio basato sui dati di letteratura disponibili, per valutare la frequenza delle allergie alimentari in Europa. Lo scopo di questo studio è stato quello di: stabilire, quando possibile, dei livelli soglia di concentrazione per ogni allergene; e di valutare la disponibilità di metodi analitici in grado di determinare gli allergeni stessi (31). Il miglioramento delle tecniche diagnostiche potrebbe spiegare un certo numero di allergie alimentari, che prima non era possibile individuare (31). Inoltre, nella dieta degli europei sono stati introdotti frutti esotici, come il kiwi che, nel nostro Paese, è diventato un allergizzante significativo (32).

Le variazioni nelle abitudini alimentari ci 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? Finora non vi è alcuna evidenza documentale che le PGM approvate per la commercializzazione abbiano causato reazioni allergiche o che la trasformazione genica abbia causato un aumento significativo dell'allergenicità di una pianta (33).

Tuttavia, esiste un caso in cui il trasferimento di un allergene è stato documentato: la soia, nella quale era stato inserito il gene della noce brasiliana codificante l'albumina 2S, con l'intento di aumentare il contenuto di metionina nei mangimi. Sebbene l'allergenicità di questa proteina non fosse nota, uno studio effettuato da Pioneer Hi-Bred International, durante lo sviluppo del prodotto, dimostrò il suo legame con le IgE dei sieri di persone allergiche alla noce brasiliana (34). A seguito di questa osservazione, è stato dimostrato che la proteina in questione (Ber e 1) è l'allergene maggiore della noce. Nonostante che la soia fosse stata sviluppata solamente per uso mangimistico, il prodotto fu abbandonato a causa del rischio associato.

## 6.1. Storia dell'uso sicuro della pianta come alimento

Il concetto di storia d'uso sicuro di una pianta come alimento è entrato a far parte dei regolamenti sulla sicurezza degli alimenti fin dall'inizio degli anni '90, anche se tale concetto è definito in maniera diversa dalle varie agenzie regolatorie. Ad esempio, l'EFSA richiede una documentazione specifica caso per caso mentre la FDA considera generalmente sicuri gli alimenti consumati comunemente prima del gennaio 1958 (35). In generale, gli alimenti tradizionali, sebbene considerati avere una storia d'uso sicuro, non possono essere considerati tali in ogni circostanza dato che differenti individui possono tollerarli in modo differente. Inoltre, gli alimenti tradizionali sono considerati sicuri nel contesto del loro uso da parte del gruppo di popolazione che li consuma, delle condizioni di preparazione e delle pratiche culturali

associate. Alimenti con una storia sicura in una parte del mondo possono essere considerati del tutto “nuovi” e perciò da sottoporre ad una valutazione di sicurezza in un’altra parte del mondo.

Per la valutazione della potenziale allergenicità di una pianta transgenica, sono state elaborate varie linee guida (16, 36-39), che concordano sulle caratteristiche da prendere in considerazione:

- la storia dell’uso sicuro della pianta come alimento;
- l’origine del gene inserito;
- la sequenza del gene inserito e delle regioni fiancheggiatrici il sito d’inserzione;
- la comparazione della nuova/e proteina/e con quelle allergeniche, ad esempio quelle responsabili del morbo celiaco se il DNA inserito proviene dal grano, dall’orzo o cereali correlati;
- 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 all’organismo da cui proviene il gene inserito;
- l’analisi *in vivo* mediante il test cutaneo (*skin prick*) o la somministrazione controllata dell’alimento che si ritiene essere responsabile dell’allergia (*double-blind placebo-controlled food challenge*, DBPCFC).

Nei 15 anni trascorsi dall’introduzione delle prime PGM, sono stati effettuati molti studi sperimentali per individuare i metodi idonei per valutare l’allergenicità di una proteina; i risultati ottenuti non hanno permesso di individuare un test univoco idoneo a questo scopo. In alternativa, sono raccomandate strategie, come richiesto dal Codex Alimentarius (38) e dall’EFSA (39), basate su una combinazione delle analisi dei parametri sopra indicati e che consentono di valutare la presenza od assenza di un rischio di allergenicità.

Nel 2012 l’EFSA, in collaborazione con le autorità competenti di Austria e Norvegia, ha organizzato un workshop sulle metodologie idonee alla valutazione dell’allergenicità delle PGM; in questo ambito sono state evidenziate le limitazioni associate all’impiego dei sieri umani (disponibilità, riproducibilità e variabilità dei sieri in base al donatore). Inoltre, è emersa la potenzialità di utilizzare a questo scopo le nuove tecniche di “*profiling*” soprattutto la spettroscopia di massa (40).

## 6.2. Origine del gene inserito

Per quanto riguarda l’origine del gene inserito non sono mai state descritte allergie dovute a:

- *Bacillus amyloliquefaciens* da cui deriva l’enzima barnase che conferisce il carattere della maschio-sterilità;
- *Streptomyces hygroscopicus* da cui deriva l’enzima fosfinotricina-acetil-transferasi che conferisce la resistenza all’erbicida glufosinato (Liberty);
- *Agrobacterium sp.* ceppo CP4, origine dell’enzima 5-enolpiruvilscichimato-3-fostato sintetasi (EPSPS) che conferisce la resistenza all’erbicida glifosato (è da notare che tale enzima è presente in piccole quantità nella soia non trasformata, enzima che non rientra nei sei allergeni maggiori e i quattro minori propri della soia);
- *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 classificata come non allergenica, 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 (41). Tuttavia questi

lavoratori erano esposti alle forme microbiche di *Bacillus thuringiensis*, che inalavano, ma non assumevano con la dieta la forma troncata della tossina, presente nelle piante transgeniche. Inoltre la proteina Cry1Ac strettamente correlata alle altre proteine Cry1, somministrata, ad alte dosi, per via intraperitoneale o per gavaggio induce una risposta IgM, IgG, una risposta mucosale IgA, ma non una risposta IgE, dimostrando così l'assenza o un basso potenziale allergico (42-44). Tale conclusione è suffragata anche dal fatto che le proteine Cry, espresse nelle piante, non sono glicosilate e non sono omologhe, nella sequenza, a proteine allergizzanti note.

Nel caso in cui la nuova proteina inserita, derivi da un alimento allergizzante, o da una pianta che causa allergie respiratorie, sono necessari studi di legame con IgE del siero di pazienti allergici alla sorgente del transgene utilizzato. Nella selezione dei sieri, bisogna tener conto di fattori demografici, dell'età e dell'ambiente in cui si vive che influenzano il profilo di riconoscimento delle IgE specialmente nel caso di reazioni crociate. Ad esempio, la sensibilità al polline di betulla può indurre allergia a ciliegia, mela, nocciola (45-47). Uno studio multicentrico condotto in 4 Paesi ha dimostrato che olandesi, austriaci e italiani del nord erano allergici alla mela perché allergici al polline di betulla. Le IgE che legavano l'allergene maggiore del polline di betulla (Bet v 1), legavano anche l'allergene maggiore della mela (Mal d 1). Gli spagnoli, invece, che non sono esposti al polline di betulla, quando erano allergici alla mela rispondevano ad un altro allergene della mela (Mal d 3), identificato come una proteina di trasporto dei lipidi (46). Lo studio ha anche dimostrato che le differenze osservate non erano ascrivibili a differenze genetiche nelle popolazioni studiate, ma erano il risultato solamente dell'esposizione ambientale. Risultati simili sono stati ottenuti nel caso dell'allergia alla ciliegia riguardo all'esposizione al polline di betulla (45, 47). Questi studi dimostrano la necessità di una buona caratterizzazione e selezione dei pazienti, prima dell'uso dei loro sieri in protocolli di valutazione dell'allergenicità.

Se poi la sorgente del transgene causa raramente allergie, sarà molto difficile se non impossibile reperire una quantità di sieri sufficiente per eseguire analisi statisticamente significative. In questo caso, si ricorre ad altri elementi significativi al fine della valutazione come la concentrazione della nuova proteina. Generalmente è necessaria una concentrazione tra 0,1 e 1% delle proteine totali per sensibilizzare un individuo (48, 49), anche se alcuni individui reagiscono anche a quantità molto basse di un particolare alimento (2, 50, 51). Ad esempio, la dose più bassa che provoca allergie è 1 mg nel caso dell'uovo e 0,1 mL nel caso del latte.

La risposta allergica a dosi molto basse pone problemi seri nei processi di trasformazione alimentare di alcuni alimenti. Ad esempio il mais, in sostanza non allergenico (52), può essere contaminato dalla soia o dal latte, allergizzanti potenti e queste contaminazioni possono creare problemi agli allergici (51, 53, 54).

### 6.3. Proprietà chimico-fisiche delle proteine espresse

Un'altra caratteristica delle proteine allergeniche alimentari è la stabilità della proteina alle manipolazioni alimentari e alle condizioni proteolitiche e acide dello stomaco umano (55). Infatti, 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, finora utilizzate, sono digerite in meno di 30 secondi, nelle prove effettuate in fluido gastrico simulato, a pH 2, secondo la *United States Pharmacopoeia*, mentre le proteine che causano allergie sono stabili nell'intervallo da 8 a 60 minuti (56), comunque, non tutte le proteine stabili alla digestione causano allergie alimentari (57).

Tra le proteine molto labili si trovano quelle che causano sindromi allergiche orali (58). Gli allergeni di quest'ultima categoria sono allergeni che danno reazioni crociate, quando la via di sensibilizzazione principale è l'inalazione. Queste proteine non sono considerate allergeni veri (59) e come tali non pongono particolari rischi se espresse in piante transgeniche.

Nel gruppo delle proteine stabili alla digestione, vi sono le taumatina-simili della mela e dell'uva che causano allergie molto raramente mentre altre come le proteine di trasferimento dei lipidi, provenienti da alcune varietà di piante, provocano allergie severe (45, 60). Alcune di queste proteine stabili sono inducibili, in condizioni patologiche per la pianta, per cui la loro espressione è variabile, fatto che può complicare il loro riconoscimento come allergeni (61).

È stato, infine, riportato che i saggi di digestione utilizzati non mimano perfettamente le condizioni digestive dello stomaco (62, 63) e a seconda delle condizioni sperimentali si possono avere risultati differenti sulla stessa proteina (64-69). Per questo motivo è stata messa a punto e validata, mediante un test multilaboratorio, una metodologia standardizzata, capace di dare risultati riproducibili (64). Si tratta, perciò, di un saggio importante anche se talvolta non conclusivo. Infatti, la proteina Cry9C, espressa nel mais Starlink, in base al test è risultata stabile per più di 4 ore nelle stesse condizioni sperimentali.

Per questa ragione la FDA, ne aveva limitato il consumo ai soli animali, prima che le analisi *in vitro* e *in vivo* ne avessero dimostrato la non allergenicità (67). La patatina, il maggior allergene della patata, invece si comporta al contrario venendo rapidamente digerita (68). Tuttavia, la patatina rappresenta più del 40% delle proteine della patata, il che corrisponde circa a 5 g di patatina per piatto di patate, quindi l'alta concentrazione nella dieta la protegge dalla digestione. In ogni valutazione, perciò, concentrazione e digeribilità debbono essere considerate insieme agli altri test di allergenicità (63, 64).

Alcune autorità regolatorie richiedono anche analisi della stabilità della proteina al calore e ai trattamenti effettuati durante la preparazione degli alimenti, va comunque sottolineato che: le analisi di stabilità non sono standardizzate e i trattamenti industriali variano in base alla tipologia di prodotto e alla ditta di produzione, perciò, i risultati ottenuti non sono di facile e univoca interpretazione.

Altre caratteristiche comuni delle proteine allergiche sono la solubilità in acqua o in soluzioni saline, la glicosilazione, un peso molecolare compreso tra 10 e 70 kD (kilodalton) e la sequenza amminoacidica (34, 36). Molte proteine allergiche si presentano in forma di dimeri o trimeri, per cui il loro peso molecolare effettivo è intorno a 150-200 kD, e vi sono casi di allergeni, come quelli del latte, con peso molecolare intorno a 1,4 kD. Oggi, si conoscono le sequenze di molte proteine allergiche, e si ritiene che l'allergenicità sia legata a somiglianze di sequenza che coinvolgono almeno otto amminoacidi contigui (69). Tali sequenze minime (epitopi), sono capaci di legare due molecole di IgE sulla superficie della membrana del linfocita. Questo evento dà origine alla reazione allergica, sia nei linfociti B sia nei linfociti T (70). L'omologia degli epitopi è probabilmente la causa delle allergie crociate (Tabella 10).

Molti degli allergeni indicati nella Tabella 10 sono definiti come allergeni incompleti perché stimolano una risposta a causa di un'omologia di sequenza con l'allergene completo e non in seguito ad una sensibilizzazione dell'individuo esposto. Questa reazione crociata tra pollini come agenti sensibilizzanti e alimenti vegetali, come agenti che stimolano la risposta immunitaria è stata osservata in alcune sindromi allergiche orali (71). L'incapacità di questi allergeni vegetali di sensibilizzare gli individui attraverso la via gastrica è stata attribuita alla suscettibilità degli stessi alla digestione proteolitica.

Tabella 10. Reazioni crociate tra allergeni respiratori e alimentari\*

Allergene sensibilizzante proveniente da:	Alimento che stimola la risposta
Parietaria	Pisello, melone, pistacchio, camomilla, basilico, gelso, ciliegia
Composite	Sedano, prezzemolo, carota, finocchio, cicoria, mela, banana, cocomero, melone, zucca, castagna, noce, nocciola, arachide, camomilla, miele, girasole
Graminacee	Fumento, anguria, melone, zucca, pesca, albicocca, prugna, ciliegia, kiwi, limone, arancia, mandorla, pomodoro, patata, melanzana
Betullacee	Sedano, prezzemolo, pomodoro, carota, finocchio, mela, pera, pesca, albicocca, ciliegia, prugna, fragola, lampone, kiwi, mandorla, arachide, noce, nocciola, arancia, grano, segale
Poligonacee	Grano saraceno
Dermatofagoidi	Lumache di terra, molluschi monovalvi
Lattice della gomma	Banana, ananas, papaia, kiwi, avocado, pera, mela, pomodoro, uva, patata, mango melone, castagna e alimenti manipolati con guanti di lattice

\*Fonte: [http://www.asmaeallergia.it/reazioni\\_crociate.php](http://www.asmaeallergia.it/reazioni_crociate.php)

## 6.4. Omologia di sequenza

La maggior parte delle proteine, responsabili di allergie respiratorie od alimentari sono state sequenziate e la loro sequenza è disponibile in alcuni database come AllergenOnline dell'Università del Nebraska (<http://www.allergenonline.org>). Informazioni dettagliate sulle basi di dati disponibili sono state realizzate dal progetto dell'UE *Communicating about Food allergies – Information for Consumers, Regulators and Industry* (<http://www.inflammation-repair.manchester.ac.uk/informAll/>).

È possibile utilizzare strumenti bioinformatici (72-93) per evidenziare nelle proteine transgeniche somiglianze con allergeni di sequenza nota, ancora prima di procedere alla trasformazione delle piante.

Proteine che hanno in comune lunghi tratti di sequenza sono spesso omologhe ed hanno in comune la struttura tridimensionale (78, 79). In particolare, le proteine che hanno più del 70% di sequenza comune con una proteina allergenica, hanno alte probabilità di essere allergeniche a loro volta; mentre proteine con meno del 50% di sequenza in comune non lo sono quasi mai.

Questa osservazione è evidente nel caso della tropomiosina, presente in molte specie animali, ma allergizzante solo in alcune. Infatti, costruendo un albero filogenetico, utilizzando la sequenza amminoacidica delle diverse tropomiosine paragonata a quella del gamberetto, è possibile osservare una chiara biforcazione nell'allergenicità (Tabella 11).

Le linee guida CODEX e FAO-WHO raccomandano un valore soglia del 35% di identità su un segmento di 80 amminoacidi della proteina transgenica (6, 38) per ipotizzare reazioni allergiche. Questa soglia ha lo scopo di identificare quei segmenti di sequenza che rappresentano motivi funzionali, e che conservano la struttura conformazionale degli epitopi.

Tabella 11. Cluster allergenico della tropomiosina

Organismo	% di identità con la proteina del gamberetto	Allergenicità
Aragosta	92	sì
Granchio	88	sì
Blatta	82	sì
Acaro	80	sì
Nematode	72	sì
Mollusco	64	sì
Gallina	57	no
Maiale	55	no
Coniglio	49	no
Uomo	53	no

Tuttavia, nella letteratura scientifica, non vi sono casi di legame crociato di IgE con proteine che condividono il 35% di sequenza su una lunghezza di 80 amminoacidi (80). Il criterio è, perciò, troppo conservativo e sovrastima il rischio di allergie crociate. In alternativa, si può esaminare l'allineamento dell'intera sequenza (81) o aumentare la percentuale d'identità sulla lunghezza di 80 amminoacidi fino al 50%, soglia per la quale esiste qualche esempio di reazione crociata, seppur debole, utilizzando i sieri di individui con sintomi di allergia alla fonte di entrambe le proteine (87).

Ad oggi non vi sono studi che abbiano validato la soglia del 35% (o del 50%) di omologia di sequenza su una lunghezza di 80 amminoacidi per predire la reattività crociata, tanto che continuano ad essere usati metodi che valutano l'omologia di sequenza su 6 od 8 amminoacidi (71-80). Usando una finestra di 6 amminoacidi più dei due terzi delle proteine contenute nella base di dati Swiss-Prot presentavano identità casuali (83, 84), identità che spariscono se l'analisi viene fatta su frammenti di otto amminoacidi (83-87). Il razionale per la scelta degli 8 amminoacidi deriva dal fatto che le sequenze minime (epitopi), capaci di legare due molecole di IgE sulla superficie della membrana del linfocita, sono composte da un minimo di 8 amminoacidi e sono state identificate sia nei linfociti B sia nei linfociti T (69, 70).

Anche i metodi basati su 6 od 8 amminoacidi non sono stati validati, ma alcune autorità regolatorie continuano a farvi ricorso. Pioneer Hi-Bred e Dow AgroScience hanno sviluppato un mais contenente il gene che codifica per la tossina del *Bacillus thuringiensis* Cry 1 F, approvato per la commercializzazione negli USA e nel Canada dopo studi che avevano dimostrato l'assenza di allergenicità della proteina codificata. Le autorità di Taiwan hanno richiesto di identificare le omologie di tale proteina con le altre note, utilizzando il metodo dei 6 amminoacidi. Venne trovato un singolo frammento di 6 amminoacidi omologo ad un frammento di 6 amminoacidi dell'allergene Der p 7 dell'acaro della polvere. Sebbene non vi fosse nessun'altra omologia di sequenza, le autorità di Taiwan hanno richiesto uno studio con sieri di persone allergiche all'acaro della polvere. I sieri utilizzati hanno evidenziato un chiaro legame delle IgE dei pazienti con Der p 7 e nessun legame con Cry 1 F (94).

L'analisi bioinformatica è puramente indicativa dato che l'omologia di sequenza, ottenuta paragonando 6 od 8 amminoacidi è del tutto casuale (87, 88). Infatti, studi di omologia di sequenza su 312 proteine allergeniche e 100 non allergeniche, hanno indicato come allergeniche 7 delle proteine non allergeniche e non hanno identificato correttamente 20 delle proteine allergeniche (87).

La somiglianza di sequenza amminoacidica tra proteina transgenica e allergeni noti, serve per procedere ad ulteriori esami *in vitro* e *in vivo*, come quelli previsti dalla Regolamento di esecuzione (UE) 503/2013 della commissione relativo alle domande di autorizzazione di

alimenti e mangimi geneticamente modificati in applicazione del Regolamento (CE) 1829/2003. Questo regolamento stabilisce che:

“In presenza di un’indicazione di omologia della sequenza o di similarità della struttura, una procedura importante per valutare la possibilità che l’esposizione alle nuove proteine espresse provochi una reazione allergica in individui già sensibilizzati a proteine cross-reattive si basa su test *in vitro* che misurano la capacità di una IgE specifica del siero di pazienti allergici di legarsi alle proteine testate. La specificità e l’affinità della risposta all’IgE umana variano da un individuo all’altro. In particolare, la specificità degli anticorpi IgE ai diversi allergeni presenti in un alimento/una fonte e/o ai diversi epitopi presenti in una data proteina può variare tra gli individui allergici [...]. Lo screening specifico del siero deve essere eseguito utilizzando appropriati test immunochimici su sieri individuali provenienti da soggetti con allergia dimostrata e ben caratterizzata alla fonte o all’allergene potenzialmente cross-reattivo. Sono metodi appropriati i dosaggi di legame IgE come i test RAST (radio- allergosorbent test), EAST (enzyme-allergosorbent test), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e l’elettroforesi seguita da immunoblotting con sieri specifici contenenti IgE”

Inoltre il regolamento prevede l’impiego di altri test:

“Benché finora non convalidati a fini di regolamentazione, altri test (dosaggi cellulari *in vitro* o test *in vivo* su modelli animali) possono fornire informazioni utili, ad esempio sul potenziale di nuova sensibilizzazione della nuova proteina espressa.”

## 6.5. Saggi *in vitro*

Vari studi, condotti *in vitro*, allo scopo di confermare il legame delle IgE del siero, ottenuto da pazienti con allergia alimentare dimostrata, alle proteine identificate come potenzialmente allergizzanti dall’analisi bioinformatica, hanno dato risultati negativi (87).

La disponibilità di sieri di pazienti allergici alla forma non modificata della pianta può dare risultati significativi. I sieri di 18 pazienti, allergici alla soia, sono stati utilizzati *in vitro* per analizzare la soia transgenica. Gli stessi pazienti sono stati sottoposti al test cutaneo con estratti di soia convenzionale e transgenica. Entrambi i metodi hanno dimostrato che non vi era una differenza significativa nel potenziale allergenico della soia transgenica rispetto a quella convenzionale (88, 89). Altri studi hanno utilizzato il legame delle IgE per valutare il rischio di prodotti GM (31, 91, 92). Il disegno sperimentale e l’interpretazione dei risultati negli studi di legame con IgE sono complessi per la presenza di numerosi fattori di confondimento come la struttura molecolare della proteina (monomero, multimerico, folding appropriato, presenza o assenza di ponti disolfuro, presenza o assenza di N-glicani) e la concentrazione della proteina nell’alimento, che condiziona la sensibilità (92-94). I test devono essere capaci di individuare il legame ad epitopi lineari e conformazionali. Il solo legame non rappresenta una misura del rischio dato che tests positivi possono essere il risultato della reattività crociata delle IgE agli N-glicani della pianta. Un test positivo deve essere interpretato alla luce di indagini cliniche appropriate.

I saggi *in vitro* hanno come limite la mancanza di un numero adeguato di estratti di allergeni ben caratterizzati e standardizzati. Infatti, spesso gli standard si limitano a 1 o 2 proteine (allergeni maggiori). Sebbene l’analisi *in vitro* delle IgE possa dare informazioni utili al clinico, si possono avere falsi negativi se gli epitopi riconosciuti dalla IgE di un individuo non sono presenti nel materiale da analizzare. Inoltre il test delle IgE non distingue tra proteine che

contengono un singolo sito di legame (epitopo) da quelle che hanno siti multipli di legame. Le prime non causano degranulazione dei macrofagi a differenza delle seconde. I metodi basati sulla misura delle IgE dimostrano la sensibilizzazione all'allergene ma non l'allergia vera e propria. Infatti, l'albero decisionale messo a punto da FAO/WHO suggerisce delle procedure dettagliate per la selezione dei sieri da analizzare (6).

Inoltre, il numero di sieri necessari è strettamente dipendente da decisioni politiche e socio-economiche. Un conto è decidere che si può accettare un 5% di probabilità di una reazione allergica nell'1% della popolazione, un altro conto è considerare accettabile una probabilità dell'1% nello 0,1% della popolazione. La scelta del rischio più basso richiede un numero più elevato di sieri. Tuttavia, anche utilizzando un numero elevato di sieri, la mera presenza di anticorpi IgE contro proteine allergeniche non correla con l'espressione di sintomi clinici ma può essere dovuta a reazioni crociate o ai carboidrati legati alla proteina (95).

## 6.6. Saggi *in vivo*

A causa dei limiti sopra citati, sono stati effettuati tentativi di sviluppare altri metodi *in vitro*, che, però non sono stati ancora validati (96).

Il test cutaneo (*skin prick*), che consiste nel pungere la pelle con una piccola quantità di allergene, osservando la risultante reazione cutanea in relazione all'istamina, è molto utile per gli allergeni respiratori, ma poco attendibile per gli allergeni alimentari. Questi ultimi, infatti, sono poco stabili e si denaturano molto rapidamente, per cui si preferisce ricorrere ai saggi *in vitro* descritti sopra.

Il DBPCFC (*Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge*, test controllato di provocazione orale con placebo a doppio cieco) rappresenta l'unico modo certo di diagnosi di una reazione allergica agli alimenti nell'uomo (97, 98), anche se vi sono alcune riserve d'ordine etico nella sua applicabilità (99). Il test consiste nella somministrazione di piccole quantità (5-10 mg) dell'alimento da controllare e può essere eseguito solo in una struttura sanitaria attrezzata, dato che in caso di risposta positiva il paziente può andare incontro a shock anafilattico. Ad oggi non è stato utilizzato se non nel caso di un individuo che ha voluto sottoporsi volontariamente al test con il mais Starlink.

## 6.7. Modelli animali

Le raccomandazioni FAO/WHO (6) richiedono la valutazione dell'allergenicità di ciascuna nuova PGM in due specie animali separate, od in alternativa utilizzando due diverse modalità di somministrazione in una singola specie animale, pur riconoscendo che ad oggi non vi sono modelli animali validati per predire l'allergenicità di una proteina.

Sono stati effettuati numerosi tentativi di sviluppare modelli animali capaci di mimare la risposta allergica, ma tale risposta è influenzata dalla struttura dell'allergene usato, dal ceppo, dalla via di somministrazione e dall'uso o meno di adiuvanti (100-110).

È stato possibile in topi BALB/c dimostrare una correlazione tra allergenicità della proteina e risposta IgE, ma solo quando la proteina era somministrata per via intraperitoneale (104). La somministrazione con gli alimenti non dava la stessa risposta, probabilmente a causa dell'induzione della tolleranza.

Nel ratto, invece, era possibile ottenere una risposta IgE anche con la somministrazione orale alla presenza di adiuvanti (102). Tuttavia, tra i fattori che influenzavano la risposta, vi era



un'esposizione precedente dell'animale o dei suoi progenitori all'antigene (103). Somministrando soia convenzionale o transgenica al ratto bruno norvegese si stimolava, in entrambi i casi, un'analogia risposta IgG ma non una risposta IgE (104).

Altri modelli animali sono rappresentati dal cane, nel quale, indipendentemente dalla razza e dall'età, si stima che circa l'8% sia affetto da reazioni avverse agli alimenti (107) o il maiale che sviluppa malattie mediate da IgE, nel caso dei legumi e dei pollini (108). Questi ultimi modelli pongono problemi organizzativi e di costo, dovendo lavorare su una popolazione molto larga per cogliere l'evento allergico (101, 107).

Non vi sono ancora modelli animali validati per predire le allergie alimentari, anche perché animali differenti rispondono in modo differente a proteine specifiche (111). Tuttavia alcuni modelli animali sono stati usati con successo per identificare i meccanismi della risposta allergica (112, 113). Alla luce della mancanza di dati sui modelli animali e le allergie alimentari umane, e la complessa diversità genetica che predispone gli individui all'allergia, non è chiara l'utilità di questi modelli nel predire l'allergenicità potenziale nell'uomo di una PGM o una nuova proteina (114-116).

Al fine di identificare un nuovo approccio per la valutazione dell'allergenicità, recentemente ai modelli animali è stata applicata la proteomica. Il primo studio ha rivelato solamente che le differenze tra il gruppo alimentato con mais transgenico e quello di controllo erano più piccole di quelle osservate all'interno del singolo gruppo (117). Il secondo, invece, non ha osservato alcuna differenza significativa nei profili allergenici del mais MON810 rispetto alla controparte non transgenica (118).

## 6.8. Il caso del mais *Starlink*

Le prove *in vitro* e *in vivo* forniscono tutti gli elementi atti a valutare gli effetti allergici o di ipersensibilizzazione dovuti al consumo di organismi transgenici (119-131). È necessario, però, rilevare che il risultato positivo ad uno solo dei test sopra indicati non è sempre indice di allergenicità. Mentre nel caso della soia arricchita in metionina è stato possibile dimostrare che la nuova proteina inserita era un allergene maggiore della noce brasiliana (34), la resistenza alla digestione e alla denaturazione termica della proteina Cry9C, inserita nel mais *Starlink* dell'Aventis (ex AgrEvo) non hanno costituito prova conclusiva di allergenicità, per la FDA che ha autorizzato tale mais solo per il consumo animale in attesa di altri saggi. Tuttavia, quando nel settembre 2000, tracce di mais *Starlink*, a causa di una contaminazione accidentale, sono state trovate in circa 300 prodotti destinati al consumo umano distribuiti nell'area di Chicago, sotto forma di *corn-flakes*, *tortillas*, *tacos* ecc., una serie di indagini è stata condotta dalle autorità statunitensi.

I *Centers for Diseases Control and prevention* statunitensi hanno selezionato 28 persone sospettate di aver avuto reazioni allergiche a seguito dell'ingestione dei prodotti contenenti *Starlink*, a fronte di circa 2000 che si erano presentate in ospedale dichiarando reazioni allergiche dovute allo *Starlink* (132, 133). Nessuno dei sieri delle 17 persone, che si sono sottoposte al test, conteneva IgE specifiche per la proteina Cry9C. Questo risultato non poteva però escludere una reazione allergica a *Starlink*, perché la proteina impiegata per il saggio non era glicosilata, a differenza della proteina espressa nella pianta (67). Altri studi su modelli animali hanno escluso effetti immunotossici del mais *Starlink* (134). Una singola persona dei 17 ha richiesto di essere sottoposta al test di sensibilità cutanea al mais *Starlink*, test che è risultato negativo. Successivamente questa stessa persona è ricorsa al test più specifico (DBPCFC), ingerendo 21 g del mais transgenico, quantità corrispondente al contenuto di una *tortilla*. Anche

questo test ha dato risultato negativo (135), per cui le autorità USA hanno dato il via libera al consumo umano del mais *Starlink*.

## 6.9. Il caso della papaia resistente al virus

Un caso diverso è rappresentato dalla papaia SunUp, resistente al virus *ringspot*, trasmesso dalla puntura degli afidi, che inibisce la fotosintesi arrestando la crescita e facendo morire la pianta. Infezioni di questo virus hanno distrutto le piantagioni del Brasile, di Taiwan e delle Hawaii. Per combattere questo virus è stato utilizzato un gene del capsido virale che, inserito nel genoma della papaia, inibisce la replicazione virale conferendo alla pianta il carattere della resistenza (136).

La papaia GM resistente al virus era stata autorizzata al consumo umano fin dal 1996, l'*Animal and Plant Health Inspection Service* (APHIS) gli aveva accordato lo status "non regolamentato", considerandola esente dalla regolamentazione sulle piante transgeniche (137) perché la popolazione è continuamente esposta alle proteine dei virus vegetali che d'altra parte non sono tossiche per l'uomo.

Dopo l'introduzione in commercio si è visto che la proteina codificata dal transgene aveva un'omologia di sei amminoacidi con un allergene, inserito nel 1997 nella banca dati Swiss-Prot. Si tratterebbe di Asc s 1, allergene dei nematodi del genere *Ascaris* (*Ascaris suum*, *A. lumbricoides*). A parte che con un'omologia su soli sei amminoacidi si potrebbe trattare di un falso positivo, vi sono anche dubbi sull'allergenicità della proteina in questione. La proteina da sola, isolata dal resto del fluido celomico del parassita, non è capace di indurre una risposta IgE o dell'inteleuchina-4, in un modello murino (138). Va sottolineato che dopo più di un decennio di consumo non vi sono evidenze di allergie derivanti dal consumo della papaia transgenica.

## 6.10. Il caso del pisello resistente agli insetti

Alcuni ricercatori australiani hanno reso il pisello (*Pisum sativum*) resistente ad un insetto (*Bruchus pisorum*), che può causare perdite nella resa fino al 30% (139). La resistenza era conferita da un inibitore dell' $\alpha$ -amilasi, ottenuto dal fagiolo (*Phaseolus vulgaris*), che inibisce l'attività di un' $\alpha$ -amilasi necessaria al parassita per la digestione dei polisaccaridi, in assenza di questo enzima il parassita, non potendosi nutrire, muore.

L' $\alpha$ -amilasi non presenta rischi per la salute umana od animale (140), e non ha caratteristiche allergeniche note od omologia di sequenza con gli allergeni conosciuti. Tuttavia, le sue caratteristiche, come l'abbondanza di amminoacidi solforati (141), potrebbero dal punto di vista biochimico farla assomigliare alla superfamiglia delle prolamine (142). Per questo motivo, il pisello transgenico è stato studiato nei topi BALB/c (125). Mentre nei topi, alimentati con piselli di controllo, non sono state osservate reazioni immunitarie, nei topi alimentati con piselli transgenici, sono state osservate: un'ipersensibilità ritardata, un'inflammatione delle vie respiratorie, una produzione di citochine infiammatorie, un aumento del tasso di IgG1 nel sangue, ma non del tasso di IgE.

Il trattamento della farina di pisello transgenico al calore non aveva alcun effetto su queste reazioni. Non si è avuta, invece, alcuna reazione nei topi alimentati con farina di cece transgenico codificante la stessa  $\alpha$ -amilasi del fagiolo. Le proprietà immunogeniche erano perciò ascrivibili al pisello transgenico in quanto tale e non all' $\alpha$ -amilasi.

L'analisi per spettrometria di massa delle proteine purificate rispettivamente dal fagiolo donatore e dal pisello transgenico ha evidenziato delle differenze di massa molecolare nelle due proteine, dovute ad una differente glicosilazione della proteina prodotta dal pisello transgenico rispetto a quella del fagiolo. È la struttura glucidica, che cambia in base ai differenti enzimi di glicosilazione, ad essere direttamente responsabile dell'immunogenicità osservata (143). Infatti, IgE "anti-carboidrati" sono state trovate nei sieri di pazienti con allergie alimentari (144).

Sebbene il pisello transgenico non mostri proprietà allergizzanti in senso stretto, il progetto di sviluppo di questa pianta transgenica è stato bloccato. In effetti, lo studio immunologico condotto non sarebbe stato richiesto dalle autorità regolatorie in base alle linee guida internazionalmente accettate. In base a questa esperienza si può concludere che una proteina trasgenica può subire delle modificazioni post-traduzionali diverse nelle diverse piante, e quindi è fondamentale effettuare una valutazione caso per caso.

## 6.11. Il caso della fragola al pesce artico

Il primo tentativo di conferire al pomodoro la resistenza al freddo utilizzando l'inserzione di un gene che codifica per una proteina antigelo, isolato dal pesce passera del mare Artico, fu un fallimento e non produsse pomodori resistenti al gelo (145).

Successivamente questo approccio fu esteso alla fragola, senza effettuare la verifica dell'efficacia della trasformazione in serra o in campo aperto (146, 147). Esperimenti per conferire alle piante resistenza al gelo sono continuati anche in seguito, ma sempre con risultati molto modesti (148, 149), probabilmente dovuti a meccanismi post-traduzionali differenti nelle piante rispetto a quelli presenti nei pesci. Infatti, risultati migliori sono stati ottenuti per le piante di eucalipto rese resistenti al freddo con un gene della pianta *Arabidopsis thaliana* (150).

Questo tentativo ha colpito l'immaginario collettivo che ha percepito la fragola resistente al gelo come una combinazione dal sapore disgustoso per cui si continua a sbandierare la fragole pesce in tutte le campagne anti OGM. È invece interessante notare come nel quotidiano giapponese *The Mainichi Daily News*, qualche tempo fa vi fosse la pubblicità della *Nissui* per un preparato di polpette di pesce in salsa di fragola. Giornali e televisioni hanno associato erroneamente la resistenza al gelo alla produzione da parte della fragola di glicol etilenico, l'antigelo dei radiatori.

Esaminando, invece, le proteine antigelo, dal punto di vista scientifico, occorre ricordare che queste sono presenti in tutti gli organismi che devono superare indenni le gelate e il freddo come i batteri, i funghi, i pesci, gli insetti e le piante (151, 152). Noi assumiamo quotidianamente con la dieta proteine antigelo, provenienti dalle piante e dai pesci, tali consumi sono dell'ordine di 50-500 mg al giorno per un islandese che ha una dieta prevalente di pesce artico e di 1-10 mg al giorno per le popolazioni dei climi temperati (153), essendo tale variazione legata alle temperature medie del periodo di consumo.

Non sono mai stati descritti effetti nocivi derivanti dal consumo di tali proteine che peraltro non sono allergizzanti (123).

## 6.12. Conclusioni

Le PGM di prima generazione, modificate essenzialmente per migliorarne le caratteristiche agronomiche, hanno subito solo lievi modifiche del loro profilo proteico. Ad esempio nella soia,

resistente al glifosato, non sono state osservate variazioni qualitative o quantitative nella composizione naturale degli allergeni (95, 154).

Nel caso di PGM di seconda generazione, oggi allo studio, modificate per migliorarne le proprietà nutrizionali, si possono prevedere delle modificazioni non trascurabili nella frazione proteica della pianta, soprattutto nel caso in cui si cerchi di variare la composizione in proteine od amminoacidi. In questo caso, oltre a studiare le proprietà immunologiche della proteina codificata, sarà necessario valutare tali proprietà nell'alimento intero. Particolare attenzione andrà prestata anche alle PGM che sovra esprimono enzimi dato che molti allergeni hanno un'attività enzimatica. Vanno analizzati, altresì, gli oli provenienti da PGM che sovra esprimono alcuni acidi grassi, dato che le piccole quantità di proteine che si trovano negli oli possono provocare allergie (155). Inoltre, la modifica genetica può essere utilizzata anche per diminuire il potenziale allergenico di una PGM (156).

Infine, a causa delle reazioni crociate, nel caso esistano indicazioni in letteratura di pollinosi, andrà valutato anche la potenziale allergicità alimentare del polline.

Le linee guida dell'EFSA raccomandano anche la sorveglianza post-marketing per le PGM soprattutto quando il nuovo alimento non può essere paragonato ad un alimento equivalente tradizionale, come nel caso in cui la composizione della PGM abbia subito una variazione significativa (39). Questo approccio è rafforzato dalla normativa sull'etichettatura sancita dal Regolamento (CE) n. 1830/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati.

Tale sorveglianza dovrebbe raccogliere dati sulla sensibilizzazione e sul consumo al fine di mettere in evidenza un eventuale legame tra consumo ed esposizione alla nuova proteina. Anche se questa metodologia presenta delle limitazioni, ad esempio, i dati di consumo desunti dagli acquisti delle famiglie, sono parziali perché il 30% dei consumi ha luogo fuori dell'ambiente familiare (157).

Si può concludere ragionevolmente che, compiendo la valutazione dell'allergenicità prima della commercializzazione delle PGM, nel caso in cui nessuno dei test descritti sopra sia positivo, la probabilità che la nuova proteina scateni delle reazioni immunologiche è molto piccola.

## Bibliografia

1. Bindsley-Jensen C, Skov PS, Madsen F, Poulsen LK. Food allergy, food intolerance-what is the difference? *Ann Allergy* 1994;72(4):317-20.
2. Crespo JF, James JM, Rodriguez J. Diagnosis and therapy of food allergy. *Mol Nutr FoodRes* 2004;48(5):347-55.
3. Mills EN, Breiteneder H. Food allergy and its relevance to industrial food proteins. *Biotechnol Adv* 2005;23(6):409-14.
4. Lea R, Whorwell PJ. The role of food intolerance in irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am* 2005;34(2):247-55.
5. Zar S, Benson MJ, Kumar D. Food-specific serum IgG4 and IgE titers to common food antigens in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005;100(7):1550-7.
6. Food and Agriculture Organization. *Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies*. Roma: FAO; 1995.
7. Mills ENC, Mackie AR, Burney P, Beyer K, Frewer L, Madsen C, Botjes E, Crevel RWR, van Ree R. The prevalence, cost and basis of food allergy across Europe. *Allergy* 2007;62(7):717-32.

8. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(3):638-46.
9. Zuidmeer L, Godham K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, Sodergren E, Dahlstrom J, Lindner T, Sigurdardottir ST, McBride D, Keil T. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(5):1210-8.
10. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(5):821-30.
11. Ciarocchi M, Boniglia C, Giampaoli S, Sanzini E. *Tutela dei consumatori affetti da allergie alimentari: presupposti e modalità di intervento*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/27).
12. Sicherer SH. Determinants of systemic manifestations of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(5 Supl.):S251-7.
13. Hill DJ, Hosking CS, Reyes-Benito LV. Reducing the need for food allergen challenges in young children: a comparison of in vitro with in vivo tests. *Clin Exp Allergy* 2001;31(7):1031-5.
14. Plebani M. Clinical value and measurement of specific IgE. *Clin Biochem* 2003; 36(6):453-69.
15. Chandra RK, Gill B, Kumani S. Food allergy and atopic disease. Introduction and overview. *Clin Rev Allergy Immunol* 1995;13(4):293-314.
16. Lehrer SB, Horner WE, Reese G. Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996;36(6):553-64.
17. Bender AE, Matthews DR. Adverse reactions to foods *Br J Nutr* 1981; 49(3):403-7.
18. Hefle SL, Nordlee JA, Taylor SL. Allergenic foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996;36(Suppl. 1):S69-S89.
19. Burr ML, Merret TG. Food intolerance: a community survey. *Br J Nutr* 1983;49(2):217-9.
20. Jansen JJ, Kardinal AF, Huijbers G, Vlieg-Boestra BJ, Martens BP, Ockhuizen T. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93(2):446-56.
21. Altman DR, Chiamonte LT. Public perception of food allergy. *Environ Toxicol Pharmacol* 1997;4(1-2):95-9.
22. Madsen C. Prevalence of food allergy/intolerance in Europe. *Environ Toxicol Pharmacol* 1997;4(1-2):163-7.
23. Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Thévenin F. Enquête épidémiologique sur l'allergie alimentaire en France. *Rev Medecine Int* 1998;19(Suppl. 3):471.
24. Bock SA. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987;79(5):683-8.
25. Burks AW, Sampson H. Food allergies in children. *Curr Probl Pediatrics* 1993;23(6):230-52.
26. Ronchetti R, Villa MP, Barreto M, Rota R, Pagani J, Martella S, Falasca C, Paggi B, Guglielmi F, Ciofetta G. Is the increase in childhood asthma coming to an end? Findings from three surveys of schoolchildren in Rome, Italy. *Eur Respir J* 2001;17(5):881-6.
27. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, Takken-Sahli K, Neu U, Stricker T, Varonier HS, Wutrich B, Sennhauser FH. No further increase in asthma, hay fever and atopic sensitization in adolescents living in Switzerland. *Eur Respir J* 2004;23(3):359-60.
28. Downs SH, Marks GB, Sporik R, Belosouva EG, Car NG, Peat JK. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy. *Thorax* 2002; 57(Suppl. II):36-9.
29. Madsen C. Prevalence of food allergy: an overview. *Proc Nutr Soc* 2005; 64(4):413-7.

30. Osterballe M, Hansen TK, Mortz CG, Host A, Bindslev-Jensen C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16(7):567-73.
31. University of Portsmouth; Literature searches and reviews related to the prevalence of food allergy in Europe. EFSA supporting publication 2013:EN-506, 343 pp.
32. Pastorello AE, Pravettoni N, Spano M, Farioli L, Ansaloni R, Rotondo F, Incovaia C, Asman I, Bengtsson A, Ortolani C. Identification of the allergenic component of kiwi fruit and evaluation of their cross-reactivity with timothy and birch pollens *J Allergy Clin Immunol* 1996;98(3):601-10.
33. Taylor SL. Review of the development of methodology for evaluating the human allergic potential of foods derived from genetically modified crop plants. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(7):604-9.
34. Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas JA, Bush RK. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med* 1996;334(11): 688-92.
35. Constable A, Jonas D, Cockburn A, Davi A, Edwards G, Hepburn P, Herouet-Guicheney C, Knowles M, Moseley B, Oberdörfer R, Samuels F. History of safe use as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. *Food Chem Toxicol* 2007;45(12):2513-25.
36. Metcalfe DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson HA, Taylor SL, Fuchs RL. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Sci Food Sci Nutr* 1996; 6(Suppl. 1):S165-S86.
37. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. *Allergenicity of Genetically Modified Foods*. Roma: FAO/WHO; 2001.
38. Codex Alimentarius Commission. Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome 30 June - 5 July 2003. Appendix III, Guideline for the safety assessment of foods derived from recombinant DNA plants and Appendix IV, Annex to the assessment of possible allergenicity. 2003; pp. 47-60.
39. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. *EFSA J* 2010;8(7):1700.
40. European Food Safety Authority. Workshop on key allergens and compositional analysis in the allergenicity assessment of genetically modified plants. Paris, 21<sup>st</sup> March 2012. *EFSA Supporting Publications* 2012:289. [11 pp.].
41. Bernstein IL, Bernstein JA, Miller IM, Tierzeva S, Bernstein DI, Lummus Z, Selgrade MK, Doerfler DL, Seligy VL. Immune response in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis*. *Pesticides Environ Health Perspect* 1999;107(7):575-82.
42. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA, Lopez-Revilla R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induce systemic and mucosal immune response in mice. *Life Sciences* 1999;64(21):1897-912.
43. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, de la Riva GA, Lopez-Revilla R. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol* 1999;49(6):578-84.
44. Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martinez Gil AF, de la Riva GA, Lopez-Revilla R. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(2):147-55.
45. Pastorello EA, Vieths S, Pravettoni V, Farioli L, Trambaioli C, Fortunato D, Lüttkopf D, Calamari M, Ansaloni R, Scibilia J, Ballmer-Weber BK, Poulsen LK, Wütrich B, Hansen KS, Robino AM, Ortolani C, Conti A. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(3):563-70.

46. Fernández-Rivas M, Bolhaar S González-Mancebo E, Asero R, van Leeuwen A, Bohle B, Ma Y, Ebner C, Rigby N, Sancho AI, Miles S, Zuidmeer L, Knulst A, Breiteneder H, Mills C, Hoffmann-Sommergruber K, van Ree R. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(2):481-8.
47. Reuter A, Lidholm J, Andersson K, Ostling J, Lundberg M, Scheurer S, Enrique E, Cistero-Bahima A, San Miguel-Moncin M, Ballmer-Weber BK, Vieths S. A critical assessment of allergen-based *in vitro* diagnosis in cherry allergy across Europe. *Clin Exp Allergy* 2006;36(6):815-23.
48. Anderson JA. Allergic reactions to foods. *Crit Rev Food Sci Technol* 1996; 36(Suppl 1):S19-S38.
49. Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Bock SA, Burks AW, Christie L, Hill D J, Host A, Hourihane JO, Lack G, Metcaife DD, Moneret-Vautrin DA, Vadas PA, Rance F, Skyprec DJ, Trautman TA, Malmheden Yman I, Zieger RS. Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(1):24-30.
50. Steinman HA. "Hidden" allergens in foods. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98(2):241-50.
51. Crevel RWR, Ballmer-Weber BK, Holzhauser T, Hourihane JO'B, Knulst AC, Mackie AR, Timmermans F, Taylor SL. Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy* 2008;63(5):597-609.
52. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Fariolo L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, Conti A, Lametti S, Fortunato D, Bonomi S, Ortolani C. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(4):775-83.
53. Gern JE, Yang F, Evrand HM, Sampson HA. Allergic reactions to milk-contaminated nondairy products. *N Engl J Med* 1991;324(14):976-9.
54. Malmheden Yman I, Eriksson A, Everitt G, Yman L, Karlsson T. Analysis of food proteins for the verification of contamination or mislabelling. *Food Agric. Immunol*. 1994;6(2):167-72.
55. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnol* 1996;14(10):1269-73.
56. Besler M, Steinhart H, Paschke A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756(1-2):207-28.
57. Fu TJ, Abbot UR, Hatzos C. Digestibility of food allergens and non allergic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid: A comparative study. *J Agric Food Chem* 2002;50(24):7154-60.
58. Yagami T, Haishima Y, Nakamura A, Osuna H, Ikezawa Z. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(4):752-62.
59. Aalberse RC, Stapel SO. Structure of food allergens in relation to allergenicity. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12(suppl. 14):10-4.
60. Vassilopoulou E, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Rigby NR, Mills EN, van Ree R, Saxoni-Papageorgiou P, Papadopoulos NG. Severe immediate allergic reactions to grapes: part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143(2):92-102.
61. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(5):821-30.
62. Bannon GA, Goodman RE, Leach JN, Rice E, Fuchs RL, Astwood JD. Digestive stability in the context of assessing the potential allergenicity of food proteins. *Comments Toxicol* 2002;8(3):271-85.
63. Ofori-Anti AO, Ariyaratna H, Chen L, Lee HL, Pramod SN, Goodman RE. Establishing objective detection limits for the pepsin digestion assay used in the assessment of genetically modified foods. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008;52(2):94-103.

64. Thomas K, Aaalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, Hadfield N, Hatzos C, Hefle SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, van Ree R, Woolhiser M, Zawodny J. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;39(2):87-98.
65. Untersmayr E, Poulsen LK, Platzer MH, Pedersen MH, Boltz-Nitulescu G, Skov PS, Jensen-Jarolim E. The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(2):377-82.
66. Untersmayr E, Jensen-Jarolim E. The effect of gastric digestion on food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006;6(3):214-9.
67. Raybourne RB, Williams KM, Vogt R, Reissman DB, Winterton BS, Rubin C. Development and use of an ELISA test to detect IgE antibody to Cry9c following possible exposure to bioengineered corn. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;132(4):322-8.
68. Seppälä U, Alenius H, Turjanmaa UK, Reunala T, Palosuo T, Kalkinen N. Identification of patatin as a novel allergen for children with prick test responses to raw potato. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1):165-71.
69. Romagnani S, Mohapatra SS. Human T-cell responses to grass pollen allergens. In: Mohapatra SS, Knox RB (Ed.). *Pollen biotechnology. Gene expression and characterization*. New York: Chapman & Hall; 1996, p. 164-75.
70. Kaminogawa S. Food allergy, oral tolerance and immunomodulation. Their molecular and cellular mechanisms. *Biosci Biotech Biochem* 1996;60(11): 1749-56.
71. Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988;61(6 Pt 2):47-52.
72. Pearson WR. Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol Biol* 2000;132(2):185-219.
73. Gendel SM. Bioinformatics and food allergens. *JAOAC Int* 2004;87(6): 1417-22.
74. Gendel SM, Jenkins JA. Allergen sequence databases. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(7):633-7.
75. Goodman RE. Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(7):655-60.
76. Dong W, Yang L, Shen K, Kim B, Kleter GA, Marvin HJP, Guo R, Liang W, Zhang D. GMDD: a database of GMO detection methods. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 260. doi:10.1186/1471-2105-9-260; ultima consultazione 21/03/2014.
77. Madsen CB, Hattersley S, Buck J, Gendel SM, Houben GF, Hourihane JO, Mackie A, Mills EN, Nørhede P, Taylor SL, Crevel RW. Approaches to risk assessment in food allergy: report from a workshop “developing a framework for assessing the risk from allergenic foods”. *Food Chem Toxicol* 2009;47(2):480-9.
78. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(2):228-38.
79. Goodman RE, Silvanovich A, Hileman RE, Bannon GA, Rice EA, Astwood JD. Bioinformatic methods for identifying known and potential allergens in the safety assessment of genetically modified crops. *Comments Toxicol* 2002;8(3):251-69.
80. Kleter GA, Peijnenburg Ad ACM. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acids sequences identical to potential, IgE binding linear epitopes of allergens. *BMC Struct Biol* 2002; 2: 8. doi: 10.1186/1472-6807-2-8.
81. Gendel SM. The use of amino acid sequence alignments to assess potential allergenicity of proteins, used in genetically modified foods. *Adv Food Nutr Res* 1998;42(1/2):45-62.



82. Goodman RE, Hefle SL, Taylor SL, van Ree R. Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy: A review. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;137(2):153-66.
83. Ladics GS, Bannon GA, Silvanovich A, Cressman RF. Comparison of conventional FASTA identity search with the 80 aminoacids sliding window FASTA search for elucidation of potential identities to known allergens. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(8):985-8.
84. Goodman RE, Hefle SL. Gaining perspective on the allergenicity assessment of genetically modified crops. *Expert Opin Immunol* 2005;1(4):561-78.
85. Silvanovich A, Nemeth MA, Song P, Herman R, Tagliani L, Bannon GA. The value of short amino acid sequence matches for prediction of protein allergenicity. *Toxicol Sci* 2006;90(1):252-8.
86. Verma AK, Misra A, Subash S, Das M, Dwivedi PD. Computational allergenicity prediction of transgenic proteins expressed in genetically modified crops. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011;33(3):410-22.
87. Goodman RE, Tetteh AO. Suggested improvements for the allergenicity assessment of genetically modified plants used in foods. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11(4):317-24.
88. Stadler MB, Stadler BM. Allergenicity prediction by protein sequence. *FASEB J.* 2003;17(9):1141-3.
89. Gendel SM. Sequence databases for assessing the potential allergenicity of proteins used in transgenic foods. *Adv Food Nutr Res* 1998;42:63-92.
90. Oehlschlager S, Reece P, Brown A, Hughson E, Hird H, Chilsom J, Atkinson H, Meredith C, Pumphrey R, Wilson P, Sunderland J. Food allergy: towards predictive testing for novel foods. *Food Add Cont* 2001; 18(12):1099-107.
91. Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschack G, Astwood JD, Hefle SL. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;128(4):280-91.
92. Goodman RE, Leach JN. Assessing the allergenicity of proteins introduced into genetically modified crops using specific human IgE assays. *JAOAC Int* 2004; 87(6):1423-32.
93. Goodman RE. Performing IgE serum testing due to bioinformatics matches in the allergenicity assessment of GM crops. *Food Chem Toxicol.* 2008;46 (Suppl. 10):S24-S34.
94. Ladics GS, Bardina L, Cressman RF, Mattson JL, Sampson HA. Lack of cross-reactivity between the *Bacillus thuringiensis* derived protein Cry1F in maize grain and dust mite Der p7 protein with human sera positive for Der p7-IgE. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006;44(2):136-43.
95. Sten E, Skov PS, Andersen SB, Torp AM, Olesen A, Bindslev-Jensen U, Bindslev-Jensen LK, Bindslev-Jensen C. A comparative study of the allergenic potency of wild type and glyphosate-tolerant gene-modified soybean cultivars. *APMIS* 2004;17(1):21-8.
96. Ladics GS, Knippels LMJ, Penninks AM, Bannon GA, Goodman RE, Herouet-Guicheney C. Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010;562(2):212-24.
97. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, Knultst AC, Moneret-Vautrin DA, Nekam K, Niggemann B, Osterballe M, Ortolani C, Ring J, Schnopp C, Werfel T. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods – position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004;59(7):690-97.
98. Sampson HA. Food allergy: accurately identifying clinical reactivity. *Allergy* 2005;60(1):19-24.
99. Perry TT, Matsui EC, Conocer-Walker MK, Wood RA. Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(5):1164-8.
100. Penninks AH, Knippels LMJ. Determination of protein allergenicity: studies in rats. *Toxicol Lett* 2001;120(1/3):171-80.

101. Helm RM, Burks AW. Animal models of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002;2(6):541-6.
102. Adel-Patient K, Wal JM. Animal models for assessment of GMO allergenicity: advantages and limitations. *Allerg Immunol* 2004;36(3):88-91.
103. Kimber I, Dearman RJ, Penninks AH, Knippels LM, Buchanan RB, Hammerberg B, Jackson HA, Helm RM. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1125-30.
104. Dearman RJ, Caddick H, Stone S, Basketter DA, Kimber I. Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology* 2001;167(3):217-31.
105. Knippels LMJ, Penninks AH, Houben G. Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy-protein free diet: the importance of dietary control in oral sensitization research. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(6):815-20.
106. Teshima R, Akiyama H, Okunuki H, Sakushima J, Goda Y, Onodera H, Sawada J, Toyoda M. Effects of subchronic feeding on genetically modified corn (CBH351) on immune system in BN rats and B10A mice. *J Food Hyg Soc* 2000;41(3):188-93.
107. Ermel RW, Kock M, Griffey SM, Reinhart GA, Frick OL. The atopic dog: a model for food allergy. *Lab Animal Sci* 1997;47(1):40-9.
108. Helm RM, Furuta G, Stanley JS, Jianhui Y, Cockrell G, Connaughton C, Simpson P, Bannon GA, Burks AW. A neonatal swine model for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(1):135-42.
109. Knippels LMJ, Wijk F, Penninks AH. Food allergy: what do we learn from animal models? *Curr Opinion Allergy Clin Immunol* 2004;4(3):205-9.
110. Gizzarelli F, Corinti S, Barletta B, Iacovacci P, Brunetto B, Butteroni C, Afferni C, Onori R, Miraglia M, Panzini G, Felice G, Tinghino R. Evaluation of allergenicity of genetically modified soybean protein extract in a murine model of oral allergen-specific sensitization. *Clin Exper Allergy* 2006;36(2):238-48.
111. Matsuda T, Matsubara T, Hino S. Immunogenic and allergenic potential of natural and recombinant innocuous proteins. *J Biosci Bioeng* 2006;101(3): 203-11.
112. McClain S, Bannon GA. Animal model for food allergy: opportunities and barriers. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6(2):141-4.
113. Kimber I, Dearman RJ, Penninks AH, Knippels LMJ, Buchanan RB, Hammerberg B, Jackson HA, Helm RM. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1125-30.
114. Helm RM, Ermel RW, Frick OL. Non murine animal models of food allergy. *Environ Health Perspect* 2003;111(2):239-44.
115. Dearman RJ, Kimber I. Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin Exp Allergy* 2009;39(4):458-68.
116. Thomas K, Herouet-Guicheney C, Ladics G, McClain S, McIntosh S, Privalle L, Woolhiser M. Current and future methods for evaluating the allergenic potential of proteins: International workshop report 23-25 October 2007. *Food Chem Toxicol* 2008;46(9):3219-25.
117. Batista R, Martins I, Jenó P, Ricardo CP, Oliveira MM. A proteomic study to identify soya allergens - the human response to transgenic versus non-transgenic soya samples. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;144(1):29-38.
118. Adel-Patient K, Guimaraes VD, Paris A, Drumare M-F, Ah-Leung S, Lamourette P, Nevers M-C, Canlet C, Molina J, Bernard H, Créminon C, Wal J-M. Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse. *PlosOne* 2011;6(1):e16346.

119. Germolec DR, Kimber I, Goldman L, Selgrade MJ. Key issues for the assessment of the allergic potential of genetically modified foods: Breakout Group Report. *Env Health Perspect* 2003;111(8):1131-9.
120. Ladics GS, Holsapple MP, Astwood JD, Kimber I, Knippels LMJ, Helm RM, Dong W. Workshop overview: Approaches to the assessment of the allergenic potential of food from genetically modified crops. *Toxicol Sci* 2003;73(1):8-16.
121. Kleter GA, Peijnenburg Ad ACM. Presence of potential allergy-related linear epitopes in novel proteins from conventional crops and the implication for the safety assessment of these crops with respect to the current testing of genetically modified crops. *Plant Biotech J* 2003;1(5):371-80.
122. Spok A, Gautisch H, Laffer S, Pauli G, Saito H, Sampson H, Sibanda E, Thomas W, van Hage W, Valenta R. Suggestions for the assessment of the allergenic potential of genetically modified organisms. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;137(2):167-80.
123. Bindslev-Jensen C, Sten E, Earl LK, Crevel RWR, Bindslev-Jensen U, Hansen TK, Skov PS, Poulsen LK. Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type III HPLC 12 using the FAO/WHO 2001 decision tree for novel foods. *Food Chem Toxicol* 2003;41(1):81-7.
124. Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005;41(2):134-49.
125. Prescott VE, Campbell PM, Moore A, Mattes J, Rothenberg ME, Foster PS, Higgins TJ, Hogan SP. Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *J Agric Food Chem* 2005;53(23):9023-30.
126. Sinagawa-García SR, Rascón-Cruz Q, Valdez-Ortiz A, Medina-Godoy S, Escobar-Gutiérrez A, Paredes-López O. Safety assessment by *in vitro* digestibility and allergenicity of genetically modified maize with an amaranth 11S globulin. *J Agric Food Chem* 2004;52(9):2709-14.
127. Hefle SL, Taylor SL, van Ree R. Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy: a review. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;137(2):153-66.
128. Lehrer SB, Bannon GA. Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods: perception and reality. *Allergy* 2005;60(5):559-64.
129. Prescott VE, Hogan SP. Genetically modified plants and food hypersensitivity diseases: usage and implications of experimental models for risk assessment. *Pharmacol Therap* 2006;111(2):374-83.
130. Kok EJ, Keijer J, Kleter GA, Kuiper HA. Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008;50(1):98-113.
131. Goodman RE, Vieths S, Sampson HA, Hill D, Ebisawa M, Taylor SL, van Ree R. Allergenicity assessment of genetically modified crops – what makes sense? *Nature Biotechnol* 2008;26(1):73-81.
132. Centers for Disease Control and Prevention. *Investigation of human health effects associated with potential exposure to genetically modified corn. A report to the U.S. Food and Drug Administration from the Centers for Disease Control and Prevention*. Atlanta: CDC; 2001. Disponibile all'indirizzo: <http://www.cdc.gov/nceh/ehhe/cry9creport/pdfs/cry9creport.pdf>; ultima consultazione 21/03/2014.
133. Bucchini L, Goldberg R. Comments from environmental defense on EPA “Cry9C Food Allergenicity Background Document” 29 february 2000. <http://www.biotech-info.net/Comment3.pdf> e <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2000/february/foodal.pdf>; ultima consultazione 21/03/2014.
134. Teshima R, Watanabe T, Okunuki H, Isuzugawa K, Akiyama H, Onodera H, Imai T, Toyoda M, Sawada J. Effect of subchronic feeding of genetically modified corn (CBH351) on immune system in BN rats and B10A mice. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2002;43(5):273-9.

135. Sutton SA, Assa'ad AH, Steinmetz C, Rothenberg ME. A negative, double-blind, placebo-controlled challenge to genetically modified corn. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112(5):1011-2.
136. Tennant P, Fermi G, Fitch MM, Mansard RM, Slighted JL, Gonzales D. Papaya ring spot virus resistance of transgenic Rainbow and Sunup is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *Eur J Plant Pathos* 2001;107(6):645-53.
137. USDA-APHIS. Cornell University and University of Hawaii, availability of determination of non-regulated status for papaya lines genetically engineered for virus resistance. *Federa Register* 1996;61(180):48663-4.
138. Paterson JCM, Garside P, Kennedy MW, Lawrence CE. Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. *Infect Immun* 2002;70(11):6058-67.
139. Schroeder HE, Gollasch S, Moore A, Tabe LM, Craig S, Hardie DC, Chrispeels MJ, Spencer D, Higgins T. Bean alpha-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol* 1995;107(4):1233-9.
140. Pusztai A, Bardocz GG, Alonso R, Chrispeels MJ, Schroeder HE, Tabe LM, Higgins TJ. Expression of the insecticidal bean alpha-amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. *J Nutr* 1999;129(8):1597-603.
141. Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-De-Sá MF. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. *Eur J Biochem* 2002;269(2):397-412.
142. Breiteneder H, Mills ENC. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(1):14-23.
143. Malandain H. IgE-reactive carbohydrate epitopes-classification, cross-reactivity and clinical impact. *Allerg Immunol* 2005;37(4):122-8.
144. van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129(3):189-97.
145. Hightwoer R, Baden C, Penzes E, Lund P, Dunsmuir P. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 1991;17(5):1013-21.
146. Firsov AP, Dolgov SV. Agrobacterial transformation and transfer of the antifreeze protein gene of winter flounder to the strawberry. *ISHS Acta Horticulturae* 1996;484:581-6.
147. Khammuang S, Dheeranupattana S, Hanmuangjai P, Wongroung S. Agrobacterium-mediated transformation of modified antifreeze protein gene in strawberry. *Songklanakarin J Sci Technol* 2005;27(4):693-703.
148. Kenward KD, Brandle J, McPherson J, Davies PD. Type II fish antifreeze protein accumulation in transgenic tobacco does not confer frost resistance. *Transgenic Res* 1999; 8(2): 105-17.
149. Fan Y, Liu B, Wang H, Wang S, Wang J. Cloning of an antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep* 2002;21(4):296-301.
150. Walt E. Cold-tolerant trees win. *Nature Biotechnol* 2011;29(12):1063.
151. Davies PL, Sykes BD. Antifreeze proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7(6):828-34.
152. Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):6263-8.
153. Crevel RWR, Fedyk JK, Spurgeon MJ. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. *Food Chem Toxicol* 2002;40(7):899-903.
154. Burks AW, Fuchs RL. Assessment of endogenous allergens in glyphosate-tolerant and commercial soybean varieties. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96(6Pt1):1008-10.
155. Frémont S, Errahali Y, Bignol M, Metche M, Nicolas JP. Allergenicity of oils. *Allerg Immunol* 2002;34(3):91-4.

156. Le LQ, Mahler V, Lorenz Y, Scheurer S, Bielmet S, Vieths S, Sonnewald U. Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc 1-silenced transgenic tomato plants *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(5):1176-83.
157. Elliot P, Robertson C, Diamond J, Best N. *Surveillance and post market monitoring of potential health effects of novel (including GM) foods: feasibility study. Final Report.* (FSA. Project Code:GO1021). London: Food Standard Agency;2003

## 7. GENI MARCATORI PER LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

I geni per la resistenza agli antibiotici sono stati utilizzati negli stadi iniziali dello sviluppo delle biotecnologie agricole per ottenere un marcatore atto ad identificare *in vitro* le cellule vegetali trasformate geneticamente.

Il costrutto genico comprendente la resistenza agli antibiotici viene inserito in un batterio quale *Escherichia coli* e successivamente trasferito, con varie metodiche, nelle cellule vegetali. Le cellule vegetali così trasformate sono in grado di crescere in presenza dell'antibiotico, mentre quelle non trasformate muoiono.

Nel caso in cui il gene marcatore sia sotto il controllo di un promotore procariotico esso non viene espresso nella pianta. In alcuni casi, la pianta considerandolo un gene estraneo può metilarlo rendendolo inattivo.

La possibilità di un trasferimento dei geni per la resistenza agli antibiotici dalla pianta PGM ai microrganismi intestinali dell'uomo e degli animali è stata ampiamente dibattuta dalla comunità scientifica e dai mezzi di divulgazione.

I rischi che sono stati considerati al fine di valutare l'impatto sulla salute umana o animale del possibile 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 o animale 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 presente nella popolazione batterica.

Nell'affrontare tale problematica occorre però tenere presente anche altri fattori:

- la quantità di DNA transgenico contenuto nella maggior parte delle PGM non supera lo 0,2% della materia secca;
- l'intestino degli uomini e degli animali è esposto costantemente, oltre che al DNA proveniente dagli alimenti, anche a quello proveniente da altre fonti quali ad esempio cellule epiteliali esfoliate, linfociti, batteri, virus;
- poiché le cellule eucariotiche non possiedono meccanismi naturali per il trasferimento dei geni ai batteri, la trasformazione è l'unico meccanismo per il trasferimento di DNA da una pianta ad un batterio. È noto che il trasferimento dell'antibiotico-resistenza da pianta a batterio richiede almeno quattro passaggi:
  - 1) il DNA rilasciato dalle cellule vegetali deve sopravvivere all'attacco delle nucleasi della pianta e dei batteri;
  - 2) il DNA deve essere assorbito dal batterio competente, per trasformazione naturale;
  - 3) il DNA deve essere mantenuto nel batterio o per integrazione nel genoma dell'ospite o sotto forma di plasmide;
  - 4) il gene deve essere espresso e la proteina risultante deve essere funzionale.

Inoltre, il gene in questione può essere espresso solo se sotto il controllo di idonee sequenze. Una volta incorporato in un batterio ricevente, è necessaria una pressione selettiva per amplificare la popolazione trasformata, che altrimenti sarebbe diluita e persa a causa della microflora preesistente.

Altro importante aspetto da considerare nella valutazione è come avviene il processo di trasformazione all'interno dei batteri. I meccanismi di trasformazione possibili sono due:

- la ricombinazione omologa, tra due copie d’inserti integrati in tandem nel genoma della pianta;
- la ricombinazione illegittima, che non richiede regioni fiancheggianti omologhe.

La ricombinazione omologa è un evento piuttosto raro che può interessare circa una cellula su 10.000 (1); ancora più rara è la ricombinazione illegittima tanto che in *Haemophilus influenzae* ha una efficienza 100 volte inferiore a quella della ricombinazione omologa (2) perché questa specie batterica preferisce assumere DNA con sequenze omologhe alle proprie. Altre specie invece, come *Bacillus* e *Acinetobacter* sp., non sono così stringenti per quanto riguarda la sequenza da integrare, anche se in *Bacillus* sp. è stata osservata una relazione logaritmico-lineare tra l’aumento di divergenza delle sequenze di DNA e la diminuzione del numero dei trasformati (3). È stato inoltre osservato che, affinché la ricombinazione avvenga, i batteri devono trovarsi in uno stato fisiologico, definito competenza, che permetta l’assorbimento di DNA esogeno (4). Lo stato di competenza è un fenomeno limitato nel tempo, che avviene in risposta a specifiche condizioni ambientali, quali l’accesso ai nutrienti, le condizioni di crescita, la densità cellulare (5). La porzione di batteri nota essere capace di trasformazione naturale è circa l’1% di tutte le specie batteriche descritte (6); tra queste vi sono alcuni ceppi importanti nella catena alimentare quali *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter* sp., *Lactobacillus lactis*, *Campylobacter* sp., *Helicobacter pylori* e gli streptococchi (7).

Per quantificare il fenomeno della resistenza agli antibiotici, nell’ambito del progetto “Patologie gravi e farmacoresistenza”, coordinato dall’Istituto superiore di sanità e finanziato dal Ministero della Salute, in collaborazione con la Pfizer Italia, sono stati identificati, classificati e inseriti in una banca dati nazionale circa 6000 ceppi batterici per i quali è stato definito lo spettro di suscettibilità agli antibiotici.

Da questa indagine è emerso che in Italia oltre un quarto dei batteri che causano infezioni quali setticemie, polmoniti, endocarditi, ascessi profondi e infezioni chirurgiche, sono resistenti ad uno o più antibiotici usati per curare tali malattie. In alcuni batteri, che molto di frequente sono causa d’infezioni, quali lo Stafilococco, la resistenza alle penicilline ha raggiunto la soglia dell’80%, mentre nei reparti di terapia intensiva le resistenze agli antibiotici hanno superato il 90% (<http://www.piazzasalute.it/at/view.php?cs=ps1&at=110901&cod=9931>).

È necessario che la sanità pubblica incoraggi tutte le forme di educazione al corretto uso degli antibiotici non solo per il personale sanitario, ma anche per i cittadini stessi, nella consapevolezza che gli antibiotici, a differenza degli altri farmaci, non sono farmaci “individuali”, bensì “sociali”, nel senso che l’uso nel singolo paziente influenza profondamente ciò che può succedere nella collettività in cui vive: la famiglia, l’ospedale, la comunità.

Da questi studi emerge con chiarezza come l’uso “non appropriato” degli antibiotici può portare ad insorgenza di resistenze più di quanto non può accadere a causa del trasferimento genico dalle cellule vegetali.

Oggi giorno l’impiego dei geni marcatori per le resistenze agli antibiotici non è più permesso pertanto le PGM di nuova generazione non esprimono tali geni. La normativa europea ha infatti stabilito che i marcatori di resistenza agli antibiotici dovevano essere eliminati dalle PGM entro il 31 dicembre 2004 per le PGM, autorizzate alla commercializzazione, ed entro il 31 dicembre 2008 per le PGM destinate alla ricerca e sviluppo.

I geni che sono stati fino ad ora utilizzati sono stati oggetto di un progetto europeo, in collaborazione con la WHO, per la valutazione della sicurezza d’uso delle PGM: *European network safety assessment of genetically modified food crops*; nell’ambito di tale progetto i geni per la resistenza agli antibiotici sono stati suddivisi in tre gruppi principali (8) (Tabella 12).

Tabella 12. Geni marcatori per la resistenza agli antibiotici\*

Gruppo	Gene	Origine	Substrato	Inattivatore dell'antibiotico
I	<i>hph</i>	<i>E. coli</i>	Igromicina B	Igromicina fosfotransferasi
I	<i>nptII</i>	<i>E. coli</i>	Kanamicina Neomicina	Amminoglicoside-3-fosfotransferasi II
II	<i>bla</i>	<i>E. coli</i>	Ampicillina Penicillina G Amoxicillina	TEM-1 $\beta$ -lattamasi
II	<i>aadA</i>	<i>E. coli</i> +Plasmide R538-1	Streptomicina Spectinomica	Amminoglicoside-3- adeniltransferasi
II	<i>cat</i>	<i>E.coli</i> +Trasposone Tn9	Cloroanfenicolo	Acetiltransferasi
III	<i>nptIII</i>	<i>Enterococcus sp</i> + Plasmide R	Kanamicina Neomicina Geneticina Amikacina	Amminoglicoside-3- fosfotransferasi III
III	<i>tetA</i>	<i>E. coli</i>	Tetraciclina	Meccanismo di trasporto

\*Rielaborato da (8)

## 7.1. Geni per la resistenza agli antibiotici del Gruppo I

Il gruppo I contiene geni di resistenza agli antibiotici presenti nei batteri del suolo e dell'intestino che hanno un uso limitato in medicina umana e veterinaria. L'igromicina non è usata in terapia umana e la kanamicina solo raramente, mentre la neomicina ha ancora una vasta applicazione soprattutto come farmaco topico (9).

Il marcatore utilizzato con maggior frequenza nelle PGM è stato, invece, il gene *nptII*, che codifica per l'enzima amminoglicoside-3-fosfotransferasi II (APH(3')II), che inattiva, mediante fosforilazione ATP-dipendente, gli antibiotici amminoglicosidici, kanamicina e neomicina (10, 11). Questo enzima non disattiva la gentamicina usata in clinica (in genere una miscela di gentamicine C1, C1a e C2, prive del gruppo idrossilico, in posizione 3', necessario per l'azione dell'enzima stesso) ma disattiva le gentamicine A e B, non rilevanti sul piano clinico (12). La neomicina, inoltre, è poco usata a causa della sua tossicità ed ha un uso limitato al trattamento dell'otite esterna e, in combinazione con altri antibiotici, al trattamento dell'intestino, prima di un intervento chirurgico.

La kanamicina è stata il primo amminoglicoside ad essere usato in terapia; nel corso del tempo è stato sostituito da altri antibiotici della stessa famiglia (gentamicina, tobramicina e amikacina) a causa dei suoi effetti collaterali.

L'amikacina è un antibiotico di seconda linea nel trattamento delle infezioni da micobatteri, come la tubercolosi, anche se il suo utilizzo per via parenterale si è ridotto a causa dell'insorgenza di resistenze dovute all'aumento di infezioni tubercolotiche tra i malati di HIV/AIDS (13, 14).

Esperimenti condotti sia *in vivo* sia *in vitro* hanno dimostrato che l'enzima APH(3')II è sicuro, privo di tossicità o allergicità (11). 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  $3 \times 10^{-15}$  trasformanti al giorno, cinque ordini di grandezza inferiore alla frequenza di mutazione per la resistenza alla kanamicina, dovuta alla replicazione cellulare (11). Il consumo del transgenico, in altre parole, aggiungerebbe un batterio resistente al giorno ai 300.000 resistenti prodotti naturalmente durante un singolo ciclo di replicazione cellulare.

Le stesse considerazioni possono essere fatte in caso di infezione da *M. tuberculosis*, dove un mutante antibiotico resistente compare ad una frequenza di  $10^{-6}$  per divisione cellulare: un paziente infetto, con carica batterica compresa comunemente tra  $10^{10}$  e  $10^{13}$  microorganismi, presenterà batteri antibiotico resistenti senza aver ricevuto alcun trattamento antibiotico (15, 16).

La proteina *nptIII*, prodotta in *E. coli*, chimicamente e funzionalmente identica a quella ingegnerizzata nel cotone, nella patata e nel pomodoro, è stata somministrata mediante sonda gastrica nel topo. Questo studio ha dimostrato che nell'animale da esperimento non vi erano effetti dannosi fino ad una concentrazione cumulativa di 5000 mg/kg di peso corporeo (17).

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 (18) e che l'ingestione di altri batteri antibiotico-resistenti deriva dal consumo di alcuni formaggi (18).

## 7.2. Geni per la resistenza agli antibiotici del Gruppo II

Nel gruppo II, ricadono geni di resistenza, come il gene *bla*, largamente presenti nei microorganismi e che conferiscono resistenza ad antibiotici utilizzati in campi ben definiti della medicina umana e veterinaria. Il gene *bla* è molto diffuso nelle cellule di *Escherichia coli* dell'intestino umano e in altri enterobatteri come *Haemophilus*, *Neisseria*, *Salmonella* ecc.

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  $\beta$ -lattamasi, che degrada gli antibiotici beta-lattamici, cui appartiene l'ampicillina. Tale gene, molto diffuso in natura (si conoscono almeno 30 microorganismi del terreno che lo contengono), non è espresso nella pianta.

Tuttavia, la  $\beta$ -lattamasi conferisce la resistenza non solo agli antibiotici  $\beta$ -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, quali il Comitato scientifico per l'alimentazione umana (*Scientific Committee for Food*, SCF) e quello animale (*Scientific Committee for Animal Nutrition*, SCAN) e un panel di esperti nel trasferimento di materiale genetico da organismo ad organismo.

La conclusione dei tre gruppi è stata che la probabilità di trasferimento del gene *bla* funzionale nei batteri gastrointestinali è in concreto eguale a zero (19). Vale la pena di riportare l'opinione conclusiva del panel di esperti europei:

“Given that even using the most favourable figures for the transfer frequency of genetic material from GMP to micro-organisms is  $10^{-12}$  which is  $10^6$  less frequent than the lower end of the frequency range for micro-organisms to micro-organisms transfer, even with the lowest estimate of the presence of resistance of 1% for micro-organisms and assuming for GMP 100% presence of the antibiotic resistance gene, then the transfer frequency from

GMP to result in antibiotic resistance is  $10^4$  lower than that which could be anticipated to occur in the normal situation [...]. Of course this is the figure for the most favourable transfer, the figure for the least favourable rate of transfer gives a theoretical additional level of antibiotic resistance due to the growth of GMPs of  $2.5 \times 10^{13}$  lower than the normal rate for micro-organism to micro-organism transfer”.

Tutte queste considerazioni valgono ovviamente per gli animali che consumano le PGM crudo e non per l'uomo che con la cottura provoca la denaturazione delle macromolecole.

Nonostante il linguaggio specialistico, le conclusioni degli esperti europei sono molto simili a quelle della FDA per il gene *nptII*. Infatti, nel dicembre 1996 il mais Bt fu autorizzato alla commercializzazione nel territorio dell'UE (20).

Il caso del mais Bt 176 è stato un buon modello per esaminare i possibili meccanismi di trasferimento della resistenza all'ampicillina.

Il gene *bla* Tem1, usato in biologia molecolare (ad es. nei vettori della serie pBR322 e pUC) è stato clonato nel vettore pUC18 e il risultante costruito è stato integrato nel genoma del mais; in assenza di ulteriori informazioni, dobbiamo assumere che il vettore e il gene *bla* siano intatti e inalterati, anche se le piante, una volta rimossa la pressione selettiva per mantenere tali geni (21), inattivano i geni estranei con meccanismi come la metilazione.

I meccanismi di trasformazione più diffusi sono la ricombinazione omologa, tra due copie di pUC18 integrate in tandem nel genoma del mais e la ricombinazione illegittima che non richiede la presenza di regioni fiancheggiatrici omologhe. Questi meccanismi richiedono che pUC18 sopravviva alla digestione da parte delle nucleasi del mais, 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, tra i quali pUC18 rappresenterà una piccolissima frazione, essendo un milionesimo del DNA totale della cellula del mais. Esperimenti con DNA su modelli animali hanno dimostrato che la maggior parte del DNA recuperato nelle feci ha dimensioni intorno a 400 paia di basi e solo una piccola frazione ha dimensioni intorno a 1,7 Kb (22).

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 (23) che nel tratto gastroenterico sono da 100 a 1.000 volte più numerosi di *E. coli*. In questa situazione dobbiamo anche considerare che i batteri enterici non sono capaci di trasformazione naturale, infatti per inglobare il DNA in *E. coli* è stato necessario sviluppare metodi fisici (elettroporazione) e chimici.

Utilizzando il DNA transgenico del mais sono stati condotti esperimenti di elettroporazione in *Escherichia coli* senza che sia stato possibile ottenere colonie resistenti all'ampicillina; analoghi risultati sono stati ottenuti nel tentativo di trasferire pUC19, essenzialmente identico a pUC18, da una patata GM al patogeno vegetale *Erwinia chrysanthemi* (24). Inoltre nel corso di esperimenti condotti alimentando animali con PGM contenenti il gene *bla*, è stato osservato che questo gene viene digerito nello stesso modo degli altri geni della pianta (vedi § Sperimentazione animale).

Risultati analoghi furono ottenuti con la somministrazione di un hamburger e un frullato di latte di soia transgenica, contenente come marcatore il gene *nptII*, a volontari umani (25). Nelle feci di 12 volontari sani non è stata trovata traccia di DNA transgenico o di batteri kanamicina resistenti. Lo stesso esperimento fu ripetuto su 7 volontari che avevano subito l'asportazione chirurgica del colon. In questo caso le feci contenevano fino al 3,7% di DNA transgenico. Nello stesso gruppo di esperimenti è stato dimostrato che il DNA nel cavo orale umano ha un'emivita di 6 secondi. Poiché i geni per la resistenza agli antibiotici sono molto diffusi tra le popolazioni batteriche e gli eventi di trasferimento dalle piante transgeniche ai batteri stessi, se avvengono,

hanno frequenze molto basse e non sono state dimostrate *in vivo*, è poco probabile che i geni marcatori possano dare un contributo significativo alla diffusione dell'antibiotico resistenza nelle popolazioni batteriche, considerato che, negli ultimi 50 anni, si stima siano state rilasciate nell'ambiente più di 1 milione di tonnellate di antibiotici, il 50% del quale dovuto agli usi in medicina veterinaria e in agricoltura (26, 27).

Non vi è dubbio che il problema attuale della presenza di ceppi batterici resistenti agli antibiotici è il risultato del cattivo uso degli antibiotici in medicina e negli allevamenti animali. Nonostante nell'UE la quantità di antibiotici usati in terapia e profilassi sia, in un anno, di circa 5.460 tonnellate per l'uomo e di 5.040 tonnellate per gli animali (28), la discussione sui geni di resistenza agli antibiotici inseriti nelle PGM attira l'attenzione molto più dell'abuso degli antibiotici stessi in medicina e medicina veterinaria (29, 30). È, infatti, il cattivo uso degli antibiotici in medicina che ha portato allo sviluppo di forme di  $\beta$ -lattamasi più resistenti di quelle codificate dal gene *bla* TEM1, usato nel mais transgenico, che codifica per una forma più antica di  $\beta$ -lattamasi.

Alcuni ricercatori hanno investigato anche la possibilità che il DNA transgenico potesse essere inglobato nelle cellule di mammifero a causa dell'alimentazione. Tuttavia, le evidenze presentate non sono stati convincenti poiché i risultati ottenuti con DNA modello (31) sono stati attribuiti ad artefatti di clonaggio (32). Altri esperimenti sono stati fatti su bovini e polli alimentati con mais Bt; nelle cellule del sangue delle vacche e in vari tessuti dei polli è stato ritrovato un piccolo frammento (199 bp) di DNA dei cloroplasti di mais, ma non il DNA transgenico. Lo stesso esperimento condotto nelle cellule del sangue dei tori non evidenziò la presenza di frammenti di DNA estraneo (33, 34).

Inoltre, un'indagine eseguita sulla flora batterica del ruminante non ha evidenziato differenze tra i batteri del ruminante di bovini alimentati con mais GM e i batteri di quelli alimentati con linee isogeniche (34). In esperimenti di trasformazione con il gene *bla*, è stato osservato che tale gene dava origine a trasformanti quando era inserito nel plasmide pUC18, con una frequenza di  $10^{-5}$  per cellula e di  $10^{-11}$  quando era utilizzato DNA estratto dalla farina ottenuta dal mais Bt176, mentre non si otteneva alcuna trasformazione con DNA, estratto dal mais insilato o dal latte di capre alimentate con il mais Bt176 (34, 35).

La resistenza all'ampicillina è abbastanza diffusa negli isolati batterici gram-negativi; tale diffusione varia con il sito geografico e la frequenza di somministrazione di antibiotici. Nelle persone esposte all'antibiotico, il 60% degli isolati fecali presentava la resistenza all'ampicillina (36-38), mentre nelle persone non esposte tale frequenza scendeva al 10% (39, 40). In Italia la distribuzione di isolati resistenti all'ampicillina nella popolazione generale è di circa il 7%. Tale resistenza è meno frequente per gli enterococchi, perché in questi batteri la resistenza è dovuta alle mutazioni sulla proteina di legame dell'antibiotico, piuttosto che a mutazioni sul gene *bla* (41). L'evoluzione di nuove  $\beta$ -lattamasi dimostra che il gene *bla* TEM1 può mutare in condizioni di pressione selettiva (30); questo fatto rafforza il concetto che il vero problema è il cattivo uso degli antibiotici e che il passaggio del gene *bla* dal mais ai batteri è molto improbabile e che se avvenisse sarebbe come aggiungere una goccia d'acqua all'oceano (41, 42).

L'altro gene classificato nel gruppo II, l'*aad* conferisce la resistenza alla streptomina e alla spectinomina, due antibiotici aminoglicosidici poco usati. La streptomina è usata per il trattamento di infezioni rare come la tularemia e la brucellosi, mentre la spectinomina viene impiegata nelle gonorree anogenitali (43). Sia il gene *aad*, che il gene *cat*, che conferisce la resistenza al cloroanfenicolo sono molto comuni e possono essere ritrovati frequentemente in natura (44-46).

### 7.3. Geni per la resistenza agli antibiotici del Gruppo III

Gli antibiotici del gruppo III sono importanti in terapia e perciò i rispettivi geni sono stati e devono essere evitati nella produzione delle piante transgeniche.

### 7.4. Conclusioni

Il DNA di qualsiasi alimento può, per quanto con una frequenza molto bassa, trovare il modo per entrare nelle cellule di uomini od animali che lo consumano. Nel caso improbabile che tale DNA ricombini con i cromosomi dell'ospite, la probabilità che possa poi esercitare una qualsiasi azione biologica è ancora più remota. Anche in questo scenario, molto ipotetico, non vi è un meccanismo con cui la cellula modificata possa trasmettere tale effetto ad altre cellule od alle cellule germinali (47, 48).

Il destino del DNA transgenico nel tratto gastrointestinale è stato analizzato sia nei ruminanti (agnelli) che nei non ruminanti (maiali) alimentati con colza tollerante il glifosato, nelle tipiche condizioni di allevamento. Il DNA transgenico e quello nativo esibiscono la stessa stabilità e persistenza nel tratto gastrointestinale. Le tecniche usate hanno dimostrato la presenza di frammenti, a basso peso molecolare, sia di DNA transgenico sia nativo e la presenza del primo anche nei reni e nel fegato dei maiali (49). In altri esperimenti non è stato possibile identificare frammenti, anche piccoli, del gene *cp4 epsps* nel latte di mucche nella cui dieta la soia tollerante il glifosato rappresentava il 26% dei pasti somministrati (50). Il transgene è stato identificato nella fase solida del digesto nel rumine e nel duodeno, ma non nella fase liquida dello stesso o nelle feci o nel sangue, indicando una rapida degradazione del transgene in tali ambienti (51). Questi risultati dimostrano che il DNA transgenico non è processato nell'organismo in modo diverso dall'altro materiale genetico assunto con la dieta, a sostegno della conclusione che la possibilità che i batteri intestinali acquisiscano geni dalle piante è molto improbabile.

Esperimenti con le api hanno dimostrato che i batteri del loro intestino non assumono il transgene presente nel polline (52), anche le larve di lepidotteri che mangiano foglie di tabacco transgenico degradano il 99% del DNA del gene marcatore (53).

Esistono molte barriere biologiche e fisiche che rendono improbabile il trasferimento di un gene integrato nel cromosoma della pianta ad altri organismi (54). Queste barriere includono la degradazione nello stomaco e nell'intestino da parte dell'ambiente acido e delle nucleasi (55, 56), gli enzimi di restrizione e di modificazione nei batteri che distruggono il DNA estraneo che entra nella cellula (57), l'assenza di sequenze terminali omologhe che rende inefficace l'integrazione nel genoma dell'ospite (58) e l'assenza di una pressione selettiva. Infine, volendo anche ipotizzare che il DNA sopravviva alla digestione e venga integrato ed espresso nelle cellule epiteliali dell'intestino, occorre ricordare che le cellule modificate hanno una bassa sopravvivenza e sarebbero sostituite rapidamente da cellule nuove non trasformate.

Il trasferimento genico da piante transgeniche a batteri richiede il verificarsi di tutta una serie di condizioni specifiche: 1) il frammento di DNA rilasciato dalla pianta deve contenere la sequenza completa della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico; 2) tale frammento deve essere assunto da un batterio competente; 3) deve superare indenne gli enzimi digestivi del citoplasma ed essere integrato in modo stabile nel genoma del batterio. Questa integrazione deve avvenire in una zona non silenziata del genoma e a valle di un promotore che ne attivi l'espressione. Se ciò avviene in maniera corretta ed esistono le condizioni per cui la proteina assuma la corretta configurazione strutturale, l'espressione della stessa deve anche conferire al

batterio un vantaggio rispetto agli altri miliardi di batteri presenti nell'intestino, altrimenti tale caratteristica verrà persa nelle generazioni successive.

Ad oggi non vi è prova sperimentale di eventi di trasferimento genico in natura (47, 58, 59), anche somministrando, per via orale, a ratti 100 µg di plasmidi al giorno, con sequenze omologhe a quelle dei batteri del tratto gastroenterico, contenenti i geni di resistenza *nptII* e *aadA*, non sono stati osservati eventi di trasformazione (60). D'altra parte finora non è stato osservato alcun trasferimento del DNA, contenuto nella dieta, ai batteri gastrointestinali (61). L'analisi dell'evidenza scientifica sopra descritta ha portato l'EFSA a concludere che (62, 63):

- la frequenza di trasferimento orizzontale di geni dalle PGM ad altri organismi è molto bassa per tutti e tre i gruppi di geni che conferiscono la resistenza agli antibiotici.
- vi è già un consistente numero di ceppi resistenti a tali antibiotici nell'ambiente:
- il gruppo I ha una storia pluriennale di uso sicuro per cui non è razionale escluderlo nella preparazione di piante transgeniche. Il gruppo II può essere utilizzato solo nella fase di sviluppo (esperimenti di campo) ma non nelle PGM commercializzate. Il gruppo III non deve essere usato in alcun caso.

Non sono, perciò, le piante transgeniche a mettere a repentaglio il potenziale salva vita degli antibiotici, ma la trasmissione tra uomo, animali e alimenti. È su queste vie di trasmissione che bisogna intervenire in modo efficace (64-66).

## Bibliografia

1. Zawadzki P, Roberts MS, Cohen FM. The log-linear relationship between sexual isolation and sequence divergence in *Bacillus* transformation is robust. *Genetics* 1995;140(3):917-32.
2. Pifer ML. Plasmid establishment in competent *Haemophilus influenzae* occurs by illegitimate transformation. *J Bacteriol* 1986;168(2):683-7.
3. Dubnau D. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* 1991; 55(3):395-424.
4. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:711-21.
5. Jonas DA, Elmadfa I, Engel KH, Heller KJ, Kozianowski G, König A, Müller D, Narbonne JF, Wackernagel W, Kleiner J. Safety considerations of DNA in food. *Ann Nutr Metab* 2001;45(6):235-54.
6. Dubnau D. DNA uptake in bacteria. *Ann Rev Microbiol* 1999;53:217-44.
7. van den Eede G, Aarts H, Buhk H-J, Corthier G, Flint HJ, Hamines W, Jacobsen B, Midtvedt T, van der Vossen J, von Wright A, Wackernagel W, Wilcks A. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food Chem Toxicol* 2004;42(7):1127-56.
8. WHO. *Health aspects of marker genes in genetically modified plants. Report of a WHO Workshop*. Geneva: World Health Organization; 1993. (WHO/FNU/FOS/93.6).
9. Nielsen KM, Gebhard F, Smalla K, Bones AM, van Elsas JD. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theor Appl Genet* 1997;95(5-6):815-21.
10. Calgene Inc. CA, USA. Request for advisory opinion "Kan" gene safety and use in the production of genetically engineered plants. FDA Docket Number 90°-0416; 1990.
11. Davies JE. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. In: Lorian V (Ed). *Antibiotics in laboratory medicine 2<sup>nd</sup> ed*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. p. 790-809.
12. Smith CA, Baker EN. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2002;2(2):143-60.

13. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(2):267-74.
14. Wu X, Zhang J, Zhuang Y, Zhang X, Li G, He X. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Chinese Med J* 1999;112(6):524-8.
15. Friedberg EC, Fischhaber PL. TB or not TB: how *Mycobacterium tuberculosis* may evade drug treatment. *Cell* 2003;113(2):139-40.
16. Fuchs RL, Ream JE, Hammond BG, Naylor MW, Leimgruber RM, Berberich SA. 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (*nptII*) protein. *Bio/Technol* 1993;11(13):1543-7.
17. Flavell RB, Dart E, Fuchs RL, Fraley RT. Selectable marker genes: Safe for plants? *Nature Biotechnol* 1992;10(2):141-4.
18. Teuber M, Perreten V, Wirsching F. Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittel-mikrobiologie. *Lebensmittel-Teknologie* 1996;29:182-89.
19. EU Experts Panel. *Antibiotic resistance transfer between genetically modified plants and microorganisms*. EU XI/E.2. *Chemical Substances and Biotechnology*. Brussels: European Commission; 1998.
20. Europe. Commission Decision 97/98/EC of 23 January 1997 concerning the placing on the market of genetically modified maize (*Zea mays* L.) with the combined modification for insecticidal properties conferred by the Bt-endotoxin gene and increased tolerance to the herbicide glufosinate ammonium pursuant to Council Directive 90/220/EEC. *Official Journal L 031* p. 69-70, January 23, 1997.
21. McElroy D, Bretell RIS. Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends Biotechnol* 1994;12(2):62-8.
22. Schubert RC, Lettman RC, Doerfler W. 1994. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol Gen Genet* 1994;242(5):495-504.
23. Sakyers AA, Shoemaker NB. Genetics of human colonic bacteria. In: Mackie R, White BA, Isaacson R (Ed.). *Gastrointestinal Microbes and Host Interactions* vol. 2. London: Chapman & Hall; 1987. p. 299-320.
24. Schlüter K, Fütterer F, Potrykus I. Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency. *Nature Biotechnol* 1995;13(10):1094-8.
25. Netherwood T, Martin-Orue SM, O'Donnell AG, Gockling S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nature Biotechnol* 2004;22(2):204-9.
26. Bennet PM, Livesey CT, Nathwani D, Reeves D.S., Saunders JR, Wise R. An assessment of the risk associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: Report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(3):418-31.
27. Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2001;4(5):493-99.
28. Salyers A. The real threat from antibiotics. *Nature* 1996;384:304.
29. Smith DL, Dushoff J, Morris JG. Agricultural antibiotics and human health. *PloS Medicine* 2005;2(8):731-5.
30. Medeiros AA. 1977. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamase accelerated by generations of  $\beta$ -lactamase antibiotics. *Clin Infect Dis* 1977;24(Suppl. 1): S19-S45.
31. Schubbert R, Renz D, Schmitz B, Dorfler W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leucocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(3):961-6.

32. Beever DE, Kemp CF. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutr Abstr Rev Series A* 2000;70:197-204.
33. Einspanier R, Klotz A, Kraft J, Aulrich K, Poser R, Scwagele F, Jahrheis G, Flachowsky G. The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *Eur Food Res Technol* 2001;212(2):129-34.
34. Einspanier R, Lutz B, Rief S, Berezina O, Zverlov V, Schwarz W, Mayer J. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *Eur Food Res Technol* 2004;218(3):269-73.
35. Rizzi A, Brusetti L, Arioli S, Nielsen KM, Tamagnini I, Tamburini A, Sorlini C, Daffonchio D. Detection of feed-derived maize DNA in goat milk and evaluation of the potential of horizontal transfer to bacteria. *Eur Food Res Technol* 2008;227(6):1699-709.
36. Bonten M, Stobberingh E, Philips J, Houben A. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* in fecal samples of healthy people in two different areas in an industrialized country. *Infection* 1992;20(5):258-62.
37. Shanahan PMA, Thomson CJ, Amyes SGB. Beta-lactam resistance in aerobic fecal flora from general practice patients in UK. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(9):760-3.
38. Levy SB, Marshall B, Schluenderberg S, Rowse D, Davis J. High frequency of antimicrobial resistance in human fecal flora to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemoter* 1988;32(12):1801-6.
39. Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Gamboa H, Carattoli A, Paradisi F, Rossolini GM. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemoter* 2007;51(4):1179-84.
40. Okamoto R, Okubo T, Inoue M. Detection of genes regulating beta-lactamase production in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1998;40(11):2550-4.
41. Alliance for the prudent use of antibiotics. *AMROAR scientific meeting report on commensals as reservoirs of antibiotic resistance*. Boston: APUA; 2008. Disponibile all'indirizzo [http://www.tufts.edu/med/apua/about\\_us/publications\\_21\\_803507810.pdf](http://www.tufts.edu/med/apua/about_us/publications_21_803507810.pdf); ultima consultazione 6/3/2012.
42. Gay PB, Gillespie SH. Antibiotic resistance markers in genetically modified plants: A risk to human health? *Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(10): 637-46.
43. Bartlett JG. *Pocket Book of Infectious Disease Therapy*. Baltimore; Williams and Wilkins: 1997.
44. Kehrenberg C, Schwarz S. Distribution of florfenicol resistance genes *fxaA* and among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemoter* 2006;50(4):1156-63.
45. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familiar relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57(1):138-63.
46. Murray IA, Shaw WV. O-acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemoter* 1997;41(1):1-6.
47. Royal Society. *Genetically modified plants for food use and human health – an update*. London: The Royal Society; 2002. (Policy document 4/02).
48. Ramessar K, Peremarti A, Gómez-Calera S, Naqvi S, Moralejo M, Muñoz P, Capell T, Christou P. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. *Transgenic Res* 2007;16(3):261-80.
49. Sharma R, Damgaard D, Alexander TW, Dugan MER, Aalhus JL, Stanford K, McAllister TA. Detection of transgenic and endogenous plant DNA in digesta and tissues of sheep and pigs fed roundup ready canola meal. *J Agric Food Chem* 2006;54(5):1699-709.

50. Phipps RH, Beever DE, Humphries DJ. Detection of transgenic DNA in milk from cows receiving herbicide tolerant (CP4 EPSPS) soybean meal. *Livestock Prod Sci* 2002;74(3):269-73.
51. Phipps RH, Deaville ER, Maddison BC. Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood and feces of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003;86(12):4070-8.
52. Mohr KI, Tebbe CC. Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;75(3):573-82.
53. Brinkmann N, Tebbe CC. Leaf-feeding larvae of *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) drastically reduce copy numbers of *aadA* antibiotic resistance genes from transplanted tobacco but maintain intact *aadA* genes in their feces. *Environ Biosafety Res* 2007;6(1/2):121-33.
54. Bertolla F, Simonet P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Res Microbiol* 1999;150(6):375-84.
55. Nordgard L, Nguyen T, Midtvedt T, Benno Y, Traavik T, Nielsen KM. Lack of detectable DNA uptake by bacterial gut isolates grown *in vitro* and by *Acinetobacter baylyi* colonizing rodents *in vivo*. *Environ Biosafety Res* 2007; 6(1/2):149-60.
56. Jonas DA, Elmadafa I, Engel K-H, Heller KJ, Kozianowski G, König A, Müller D, Narbonne JF, Wackernagel W, Kleiner J. Safety consideration of DNA in food. *Ann Nutr Metabol* 2001;45(6):235-54.
57. Frank SA. Recognition and polymorphism in host-parasite genetics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994;346(1317):283-93.
58. Fink R, Moran E. Biosafety for large-scale containment level I operations using recombinant DNA technology: no emerging hazards. *Appl Biosafety* 2005;10(1):30-9.
59. Kleter GA, Peijnenburg CM, Aaarts HJM. Health considerations regarding horizontal transfer of microbial transgenes present in genetically modified crops. *J Biomed Biotechnol* 2005;4(4):326-52.
60. Nordgard L, Brusetti L, Raddadi N, Traavik T, Aaverhoff B, Nielsen KM. An investigation of horizontal transfer of feed introduced DNA to the aerobic microbiota of the gastrointestinal tract of rats. *BMC Res Notes* 2012;5(1):170-81.
61. Rizzi A, Raddadia N, Sorlini C, Nordgard L, Nielsen KM, Daffonchio D. The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012;52(2):142-61.
62. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *EFSA J* 2004;48:1-18.
63. EFSA. Consolidated presentation of the joint scientific opinion of the GMO and BIOHAZ panels on the "Use of antibiotics resistance genes as marker genes in genetically modified plants" and the scientific opinion of the GMO panel on "Consequences of the opinion on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants on previous EFSA assessments of individual GM plants". *EFSA J* 2009;1108:1-8.
64. Perrreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 1997;389:801-2.
65. Salyers AA, Amabile-Cuevas CF. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(11):2321-5.
66. Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 2004;12(9):412-5.



## 8. AMBIENTE E PGM

La maggior parte delle piante coltivate, essendo state selezionate, nel corso dei secoli, dall'uomo per la produzione di cibo e fibra ha un grado elevato di addomesticamento. Le piante coltivate differiscono tra loro per il numero delle caratteristiche acquisite rispetto alle caratteristiche naturalmente presenti nella controparte selvatica. L'adattamento continuo delle piante coltivate alle esigenze della produzione agricola è nota come sindrome dell'addomesticamento. Piante come il mais e il frumento la soia e la colza hanno subito modificazioni così profonde rispetto alla loro controparte selvatica da non essere più competitive negli ambienti naturali.

I sistemi agricoli moderni, sia convenzionali che biologici, alterano l'ambiente naturale causando un declino nella diversità delle piante, delle specie di invertebrati e degli uccelli. Tale impatto negativo si riverbera anche sulla diversità vegetale dei prati incolti e sui margini dei campi arati sia per l'utilizzo di foraggi ad alta resa, che per l'aumento nell'uso dei fertilizzanti, l'uso degli erbicidi e l'aumento della purezza delle sementi (1, 2).

Pertanto anche l'impatto delle PGM sull'ambiente deve essere visto nel quadro delle pratiche dei sistemi agricoli moderni in grado di influenzare tutte le caratteristiche ambientali (1).

Il rilascio commerciale delle piante transgeniche, avvenuto a metà degli anni '90 dello scorso secolo, è stato accompagnato, durante tutto questo periodo, da una continua controversia sui potenziali effetti ambientali di questa tecnologia. A causa di ciò, sono state elaborate molto rapidamente le procedure per valutare i rischi e per controllare i rilasci sia sul piano regolatorio con le direttive comunitarie 1990/220/CE e 2001/18/CE, che sul piano scientifico, (3-9).

La valutazione del rischio, per quanto riguarda l'ambiente, concerne soprattutto il flusso genico, gli effetti sui microrganismi del suolo e sugli invertebrati che si nutrono direttamente o indirettamente di tali piante.

Tutti gli studi finora effettuati hanno confermato che, in presenza di condizioni favorevoli, il flusso genico è un fenomeno spesso presente, sebbene a basse frequenze. Le conseguenze di tale flusso non sono immediatamente ovvie, specialmente se tali effetti sono paragonati con quelli del flusso genico dovuto alle piante convenzionali. Una conseguenza potrebbe essere quella di rendere, ad esempio, una popolazione selvatica più invasiva, nel caso in cui il gene proveniente dalla pianta transgenica conferisca un vantaggio selettivo. Tuttavia, uno studio, durato dieci anni, su quattro differenti piante transgeniche (colza, patata, mais e barbabietola) in 12 *habitat* differenti, ha dimostrato che tali piante non erano più invasive o più persistenti delle loro controparti convenzionali (10).

Inoltre, è molto difficile identificare un evento raro anche con i moderni metodi di screening ambientale (11). Anche i modelli teorici suggeriscono che un'accuratezza di screening dell'85% è priva di significato, salvo nel caso in cui il danno derivante dall'aver una nuova specie invasiva nell'ambiente non sia almeno otto volte superiore al danno ipotetico che deriverebbe da non averla (12).

Gli effetti ambientali sulle specie che si alimentano direttamente od indirettamente di piante transgeniche sono stati molto studiati sia in laboratorio sia in campo aperto. Molto spesso gli studi di laboratorio, condotti in condizioni controllate, non sono estrapolabili alle condizioni variabili di campo (13); condizioni nelle quali gli effetti osservati sono molto minori (8).

Molto più significativi sono gli effetti indiretti dovuti all'uso delle diverse pratiche agronomiche. Nella *Farm Scale Evaluation* (FSE), condotto nel Regno Unito per valutare l'impatto sulla biodiversità delle PGM resistenti all'erbicida, le differenze nella biodiversità

all'interno delle *cultivars* convenzionali erano più alte delle differenze tra piante geneticamente modificate e le stesse *cultivars* convenzionali (14-26).

Quasi contemporaneamente nel Regno Unito è stato condotto un altro studio "Botanical and rotational implications of genetically modified herbicide tolerance in winter oilseed rape and sugar beet" (BRIGHT), finanziato dall'industria ma condotto da istituzioni pubbliche. Nel progetto BRIGHT colza invernale e barbabietola da zucchero, resistenti agli erbicidi glifosato e glufosinato, sono state paragonate a *cultivar* tradizionali, in uno schema di rotazione quadriennale con cereali. In questi esperimenti non è stata osservata una diminuzione della biodiversità delle infestanti (27).

Quando negli USA le piante transgeniche sono state utilizzate su larga scala, il profilo e la quantità di prodotti chimici, utilizzati nella coltivazione, sono profondamente cambiati. Infatti, ad esempio, nel caso delle piante resistenti agli erbicidi, l'aratura viene omessa e questo fatto ha avuto come conseguenza un minor percolamento dei composti chimici nel suolo e un minor dilavamento degli stessi fuori dal terreno coltivato. L'assenza di aratura riduce anche l'impatto dell'agricoltura sul riscaldamento globale, perché la CO<sub>2</sub> intrappolata nel terreno non viene rilasciata (28). Gli effetti sulla biodiversità dipendono, oltre che dalla scelta della pianta transgenica, dalla rotazione delle colture, dalle tecniche di coltivazione e dal differente uso dei composti fertilizzanti e dei pesticidi (29, 30).

L'effetto delle pratiche agronomiche è stato osservato anche in uno studio sulla coltivazione del cotone (31). Lo studio, condotto per due anni, su 81 campi commerciali in Arizona, ha dimostrato che non vi sono differenze nella resa del cotone transgenico contenente la tossina del *Bacillus thuringiensis*, il cotone contenente sia la tossina sia la resistenza all'erbicida e il cotone non trasformato, perché in quest'ultimo caso gli agricoltori impiegavano più pesticidi per mantenere il controllo sugli insetti. Ovviamente questi trattamenti riducevano la biodiversità nei campi di cotone non trasformato, rispetto ai campi coltivati con cotone transgenico.

Esperimenti su larga scala sono stati condotti su mais, resistente alla piralide in Spagna (32-34), dove la superficie coltivata con il transgenico è circa il 5% del totale e in Ungheria (35) senza che si riscontrassero effetti sull'entomofauna presente. Parallelamente altri studi su larga scala condotti in Germania non hanno evidenziato effetti sulla microbiologia del suolo, sulla fauna non-target e sugli indicatori degli studi agro-zoologici quali lombrichi, collembola e nematodi. Nello stesso studio, la misurazione del flusso genico ha consentito al governo tedesco di stabilire che in futuro le distanze tra coltivazioni di mais transgenico e non transgenico debbono essere di 150 metri; questa distanza si raddoppia tra mais transgenico e mais biologico. L'agricoltore che vuole coltivare mais transgenico deve informare le aziende agricole vicine nel raggio di 300 m, deve assicurare che i semi delle PGM non si mescolino con quelli non GM, deve controllare i ricacci, deve tenere un registro delle pratiche agronomiche utilizzate nel caso del mais GM e non può usare lo stesso campo per coltivare mais tradizionale se non dopo due anni dall'ultimo raccolto GM (36). Da un'analisi critica della letteratura scientifica e dei rapporti tecnici degli ultimi 10 anni non sono emerse evidenze scientifiche di danni all'ambiente derivanti dalla coltivazione delle PGM (37).

In Italia, è stato realizzato un progetto congiunto tra Ministero dell'Ambiente e CNR, che su diverse specie vegetali (*Lotus corniculatus*, lattuga e mais) ha misurato, sia in campo aperto sia in laboratorio, il flusso genico, l'impatto sull'entomofauna e sulla microfauna, l'impatto sulla rizosfera, gli effetti sulla microflora intestinale dei bovini alimentati con mais Bt (38). I risultati di questo studio non hanno evidenziato alcun rischio particolare derivante dalla coltivazione e dall'uso di piante transgeniche. Un altro esperimento in campo aperto è stato realizzato in Italia dall'Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (<http://www.inran.it>; ultima consultazione 7/3/2012) (39).

Nella valutazione dell'impatto ambientale delle PGM vi è una discussione che continua da anni se debbano essere presi in considerazione anche aspetti come la sostenibilità, la globalizzazione, l'etica e l'impatto socio-economico (40, 41). Occorre domandarci se qualcuno di tali aspetti sia intrinseco alla tecnologia PGM o se essi implicino delle conseguenze che avrebbero luogo senza lo sviluppo delle PGM (42, 43). Molte volte, infatti, la domanda per un'ulteriore analisi anche della dimensione socio-economica appare parte di una strategia volta ad assicurare una conclusione negativa pre-determinata, piuttosto che un tentativo di contribuire ad una decisione informata e responsabile sulla sicurezza delle piante PGM.

La FAO, analizzando la situazione creatasi nei Paesi che consentono la coltivazione di PGM, ha concluso che in questi Paesi non vi sono stati casi di danni ambientali, ma che al contrario i contadini usano minor quantità di pesticidi o stanno sostituendo quelli più tossici con quelli meno tossici (44).

Nel 2013, molti Paesi hanno coltivato PGM a scopo commerciale per un totale di 182 milioni di ettari (45). Tra questi, 10 Paesi hanno superato il milione di ettari e precisamente USA, Brasile, Argentina, India, Canada, Cina, Paraguay, Pakistan, Sud Africa, Uruguay, Bolivia. Altri Paesi che hanno coltivato PGM sono, in ordine decrescente di ettari utilizzati: Filippine, Australia, Burkina Faso, Myanmar, Messico, Spagna, Sudan, Cile, Colombia, Honduras, Costa Rica, Repubblica Ceca, Romania, Portogallo, Germania, Polonia, Slovacchia, Repubblica Ceca. La crescita complessiva delle aree coltivate ad PGM è stata circa del 10% annuo negli ultimi anni. Questa crescita insieme alla decisione (vicina al 100%) di continuare la coltivazione di PGM, dopo la prima esperienza, presa da agricoltori piccoli e grandi, sia di Paesi in via di sviluppo che di Paesi sviluppati, è la dimostrazione che le PGM hanno dato, in maniera consistente, dei buoni ritorni economico-sociali, in sistemi agricoli differenti.

La soia con il 53% dell'area totale coltivata a PGM è la prima pianta utilizzata, seguita dal mais con il 30%, il cotone con il 12% e il colza con il 5%. Se si esamina il tipo di transgene utilizzato, domina la tolleranza agli erbicidi presente nella soia, nel mais, nel cotone, nell'erba medica con il 63% dell'area coltivata. Va segnalata la crescita del 23% delle PGM contenenti due o più transgeni (*stacked*), come il mais resistente agli insetti e tollerante l'erbicida, che ha portato ad una concomitante diminuzione del 6% delle PGM che avevano solamente la resistenza agli insetti, mettendo in evidenza uno scenario futuro in cui le coltivazioni saranno di PGM con più caratteristiche transgeniche. Stati Uniti e Cina hanno coltivato anche la papaya resistente a virus, mentre Australia e Colombia hanno coltivato il garofano con colore modificato. Vi sono state anche piccole coltivazioni di pioppo resistente alla processionaria in Cina, zuccina resistente a virus e l'erba medica (alfalfa) tollerante l'erbicida negli USA.

È chiaro che i dati sull'impatto ambientale delle PGM, ottenuti nei Paesi in cui questi sono coltivati, non possono essere trasferiti automaticamente alla realtà agricola italiana. Le differenti pratiche agronomiche impiegate possono rendere difficile il paragone tra sistemi agricoli. Tuttavia, molti dei dati scientifici analizzati in questa rassegna e prodotti in ambienti agricoli così diversi tra loro, possono essere utilizzati nella valutazione dell'impatto ambientale dei rilasci di PGM in Italia. A questo proposito, particolarmente significativo appare il lavoro di Wu e collaboratori i quali, esaminando la situazione verificatasi in 6 province del nord della Cina dove veniva coltivato il cotone resistente agli insetti, hanno osservato una diminuzione notevole delle infestazioni su altre piante coltivate quali mais, soia, frumento, noccioline americane e verdure (46).

## Bibliografia

1. Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 2002;418:671-7.

2. Hails R. Assessing the risk associated with new agricultural practices. *Nature* 2002;418:685-8.
3. Wolfenbarger LL, Phifer PR. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* 2000;290:2088-93.
4. Nicolini L, D'Agnolo G. Safety assessment of genetically modified plants. In: Santi L. (Ed.). *TEBIO International Exhibition and Congress on Biotechnology*. Genova; 2000. p. 25-50.
5. Pretty J. The rapid emergence of genetic modification in world agriculture: contested risks and benefits. *Environ Conserv* 2001;28(3):248-62.
6. Dale PJ, Clarke B, Fontes, EMG. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature biotech* 2002;20(6):567-74.
7. Conner AJ, Glare TR, Nap J-P. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J* 2003;33(1):19-46.
8. Firbank L, Lonsdale, M. Popper G. Reassessing the environmental risk of GM crops. *Nature biotech* 2005;23(12):1475-6.
9. Snow AA, Andow P, Gepts P, Hallerman EM, Power A, Tiedje JM, Wolfenbarger LL. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecol Appl* 2005;15(2):377-404.
10. Crawley MJ, Brown, SL, Hails RS, Kohn DD, Rees M. Transgenic crops in natural habitats. *Nature* 2001;409:682-3.
11. Jorgensen RB, Wilkinson J. Rare hybrids and methods for their detection. In: Poppy GM, Wilkinson MJ (Ed.). *GeneFlow from GM plants*. Oxford: Blackwell Scientific; 2005. pp. 113-42.
12. Smith CS, Lonsdale WM, Fortune J. When to ignore advice: invasion predictions and decision theory. *Biological Invasions* 1999;1(1):89-96.
13. Lövei GL, Arpaia S. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomol Exp Appl* 2005;114(1):1-14.
14. Firbank LG, Forcella F. Genetically modified crops and farmland biodiversity. *Science* 2000; 289:1481-2.
15. Firbank LG. The Farm Scale Evaluations of spring-sown genetically modified crops. Introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358(1439):1777-8.
16. Squire GR, Brooks DR, Bohan DA, Champion GT, Daniels RE, Haughton AJ, Hawes C, Heard MS, Hill MO, May MJ, Osborne JL, Perry JN, Roy DB, Woiwod IP, Firbank LG. On the rationale and interpretation of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439):1779-99.
17. Champion GT, May MJ, Bennett S, Brooks DR, Clark SJ, Daniels RE, Firbank LG, Haughton AJ, Hawes C, Heard MS, Perry JN, Randle Z, Rossall MJ, Rothery P, Skellern MP, Scott RJ, Squire GR, Thomas MR. Crop management and agronomic context of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439):1801-18.
18. Heard MS, Hawes C, Champion GT, Clark SJ, Firbank LG, Haughton AJ, Parish AM, Perry JN, Rothery P, Scott RJ, Skellern MP, Squire GR, Hill MO. Weeds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. I. Effects on abundance and diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439):1819-32.
19. Heard MS, Hawes C, Champion GT, Clark SJ, Firbank LG, Haughton AJ, Parish AM, Perry JN, Rothery P, Roy DB, Scott RJ, Skellern MP, Squire GR, Hill MO. Weeds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. II. Effects on individual species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439):1833-46.
20. Brooks DR, Bohan DA, Champion GT, Haughton AJ, Hawes C, Heard MS, Clark SJ, Dewar AM, Firbank LG, Perry JN, Rothery P, Scott RJ, Woiwod IP, Birchall C, Skellern MP, Walker JH, Baker

- P, Bell D, Browne EL, Dewar AJ, Fairfax CM, Garner BH, Haylock LA, Horne SL, Hulmes SE, Mason NS, Norton LR, Nuttall P, Randle Z, Rossall MJ, Sands RJ, Singer EJ, Walker MJ. Invertebrate responses to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops. I. Soil-surface-active invertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439): 1847-62.
21. Haughton AJ, Champion GT, Hawes C, Heard MS, Brooks DR, Bohan DA, Clark SJ, Dewar AM, Firbank LG, Osborne JL, Perry JN, Rothery P, Roy DB, Scott RJ, Woiwod IP, Birchall C, Skellern MP, Walker JH, Baker P, Browne EL, Dewar AJ, Garner BH, Haylock LA, Horne SL, Mason NS, Sands RJ, Walker MJ. Invertebrate responses to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops. II. Within-field epigeal and aerial arthropods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439):1863-77.
  22. Roy DB, Bohan DA, Haughton AJ, Hill MO, Osborne JL, Clark SJ, Perry JN, Rothery P, Scott RJ, Brooks DR, Champion GT, Hawes C, Heard MS, Firbank LG. Invertebrates and vegetation of field margins adjacent to crops subject to contrasting herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439):1879-98.
  23. Hawes C, Haughton AJ, Osborne JL, Roy DB, Clark SJ, Perry JN, Rothery P, Bohan DA, Brooks DR, Champion GT, Dewar AM, Heard MS, Woiwod IP, Daniels RE, Young MW, Parish AM, Scott RJ, Firbank LG, Squire GR. Responses of plants and invertebrate trophic groups to contrasting herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358(1439):1899-913.
  24. Carey PD, Short C, Morris C, Hunt J, Priscott A, Davis M, Finch C, Curry N, Little W, Winter M, Parkin A, Firbank LG. The multi-disciplinary evaluation of a national agri-environment scheme. *J Environ Manag* 2003; 69(1):71-91.
  25. Bohan DA, Boffey CWH, Brooks DR, Clark AJ, Dewar AM, Firbank LG, Haughton AJ, Hawes C, Heard MS, May MJ, Osborne JL, Perry JN, Rothery P, Roy DB, Scott RJ, Squire GR, Woiwod IP, Champion GT. Effects on weed and invertebrate abundance and diversity of herbicide management in genetically modified herbicide-tolerant winter-sown oilseed rape. *Proc Royal Soc B* 2005;272(1562):463-74.
  26. Lang A, Arndt M, Beck R, Bauchhenss J. Monitoring der Umweltwirkungen des Bt-Gens. In: Pommer G, Arndt M (Ed.). Forschungsprojekt im Auftrag des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz. Freising-Weihenstephan: Institut für Pflanzenschutz; 2005. p. 1-115.
  27. Sweet JB, Simpson EC, Law JR, Lutman PJW, Berry KJ, Payne RW, May MJ, Champion GT, Walker KC, Wightman PS, Lainsbury MA. Bright: botanical and rotational implications of genetically modified herbicide tolerance. *Asp Appl Biol* 2005;74:207-10.
  28. Robertson GP, Eldor AP, Harwood RR. Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science* 2000;289:1922-25.
  29. Amman K. Effects of biotechnology on biodiversity: herbicide-tolerant and insects-resistant GM crops. *Trends Biotech* 2005;23(8):388-94.
  30. Snow AA, Andow DA, Gepts P, Hallerman EM, Power A, Tiedje JM, Wolfenbarger LL. Genetically engineered organisms and the environment: current status and recommendations. *Ecol Appl* 2006;15(2):377-404.
  31. Cattaneo MG, Yafuso C, Schmidt C Huang C-Y, Rahamn M, Olson C, Ellers-Kirk C, Orr BJ, Antilla L, Dutilleul P, Carière Y. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(20):7571-6
  32. Farinós GP, de la Poza M, Hernandez-Crespo FP, Ortego F, Castañera P. Impact of Bt-maize on non-target arthropods in central Spain. *Proceedings of the XXIth Symposium of the International Working*

- Group on Ostrinia and of the VIIIth Diabrotica Subgroup Meeting Legnaro*: G. Carollo; 2001. p. 251.
33. Eizaguirre M, Albajes R, López C, Eras J, Lumbierres B, Pons X. Six years after the commercial introduction of Bt maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. *Transg Res* 2005;15(1):1-12.
  34. de la Poza M, Pons X, Farinós GP, López C, Ortego F, Eizaguirre M, Castañera P, Albajes R. Impact on farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protect* 2005;24(7):677-84.
  35. Kiss J, Szentkiralyi F, TóthF, Szénasi A, Kádár F, Arpàs K, Szekeres D, Edwards AR. Bt- corn impact on non-targets and adjusting to local IPM systems. In: Lelley T, Baláasz E, Tepfer M (Ed.). *Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems*. Wien: Facultas Universitätsverlag; 2003. p. 157-72.
  36. Weber, WE, Brigenzu T, Broer I, Eder J, Holz F. Coexistence between GM and non-GM maize crops-tested in 2004 at the field scale level (Erprobungsanbau 2004). *J Agron Crop Sci* 2006;193(2):79-92.
  37. Sanvido O, Stark M, Romeis J, Bigler F. Ecological impacts of genetically modified crops: ten years of field research and commercial cultivation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007;107:235-78.
  38. Ministero dell'Ambiente e Consiglio Nazionale delle Ricerche. *Biodiversità e organismi geneticamente modificati*. Accordo di programma tra Ministero dell'Ambiente e Consiglio Nazionale delle Ricerche. Sorlini C (Ed.). Roma: Rotografica; 2004.
  39. INRAN. *Agrobiotecnologie nel contesto italiano*. Roma: Tipografia Palombi e Lanci; 2006.
  40. Commandeur P, Joly PB, Levidov L, Tappeser B, Terragni F. Public debate and regulation of biotechnology in Europe. *Biotech Dev Monit* 1996;26(1): 2-9.
  41. Sagar A, Daemmrich A, Ashiya A. The tragedy of the commoners: biotechnology and its public. *Nature biotech* 2000;18(1):2-4.
  42. Council for Agricultural Science and Technology (CAST). *Applications of Biotechnology to Crops: Benefits and Risks*. Issue Paper 19. Ames, Iowa; 1999.
  43. Leisinger KM. *Ethical and Ecological Aspects of Industrial Property Rights in the Context of Genetic Engineering and Biotechnology*. Basel Switzerland: Novartis Foundation for Sustainable Development; 1996.
  44. ANON. Report of the FAO expert group on environmental effects of genetically modified crops, Roma: FAO; 2003.
  45. James C. *20th anniversary (1996 to 2015) of the global commercialization of biotech crops and biotech crop highlights in 2015*. Ithaca, NY: ISAAA; 2015. (ISAAA Brief No. 51).
  46. Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*. 2008;321:1676-8.

## 9. FLUSSO GENICO NELLE PIANTE

Il flusso genico è il trasferimento di informazioni genetiche tra piante sessualmente compatibili per mezzo di polline, semi e altro materiale vegetativo; tale trasferimento può essere trasmesso anche alla progenie.

Il flusso genico è una caratteristica biologica che precede la comparsa dell'uomo di milioni di anni ed è un meccanismo che serve a mantenere quella diversità biologica che assicura la sopravvivenza a lungo termine delle popolazioni e delle specie in ambienti che mutano; nelle piante questo scambio di informazione genetica avviene principalmente attraverso la dispersione del polline. In questo capitolo, il trasporto di tratti genetici per mezzo dei semi dovuto a movimenti meccanici, al vento, all'acqua e agli animali è considerato un meccanismo diverso di flusso genico e verrà trattato nel capitolo sulla coesistenza.

Il flusso genico non è un fenomeno negativo è ubiquitario nel mondo biologico ed ha giocato un ruolo fondamentale nello sviluppo delle specie di piante che conosciamo oggi. Ad esempio, in base ai risultati dell'analisi genomica più della metà del genoma del mais consiste di DNA esogeno proveniente da altre famiglie.

Una delle prime preoccupazioni sollevate alla comparsa delle PGM è stata la possibilità che queste potessero diventare (o dare origine) a delle infestanti o malerbe, ad organismi con impatto economico od ecologico negativo (1). Il processo con cui una pianta coltivata può "inselvaticarsi" richiede due fasi: 1) la fuoriuscita della pianta dal sito della coltivazione; 2) la creazione da parte della pianta fuoriuscita di una nuova popolazione.

Vi sono anche numerosi esempi di "specie selvatiche, invasive", trasportate dall'uomo (scientemente od inavvertitamente) in nuovi ambienti, nei quali hanno causato notevoli danni sia ambientali che economici (2).

Il flusso genico è comune in natura, e non è sorprendente che avvenga tra piante coltivate e specie selvatiche, che in molti casi sono le progenitrici delle prime. Per tale motivo i nuovi geni potrebbero passare da una pianta geneticamente modificata ad una pianta selvatica sessualmente compatibile. Questa possibilità ha fatto balenare l'ipotesi della comparsa di super infestanti, anche se i nuovi geni non sempre conferiscono una migliore capacità di sopravvivenza alla pianta trasformata.

Nell'ambito di questa esposizione considereremo "infestante", una pianta con caratteristiche strutturali e fisiologiche tali da avere un vantaggio competitivo sulle altre piante presenti nello stesso ambiente e in grado di persistere in ambienti coltivati dall'uomo. È noto che le infestanti sono state prodotte, inavvertitamente a seguito, dalle pratiche tradizionali di selezione e incrocio.

Mentre le piante selvatiche hanno un'architettura genica che consente loro di crescere indipendentemente dall'uomo, e indipendentemente dagli habitat controllati dall'uomo, sia le piante coltivate che quelle infestanti dipendono per la loro crescita dalle pratiche agricole. Piante coltivate e infestanti occupano quindi gli stessi habitat e spesso le infestanti crescono in associazione con una pianta coltivata specifica.

Le cultivar moderne selezionate non possiedono più caratteristiche infestanti e la loro capacità di diventare tali, in assenza di un'introggressione genica, è quasi impossibile. L'incorporazione permanente di geni da una popolazione ad un'altra è detta introggressione.

Perché possa verificarsi un incrocio tra PGM e una infestante, occorre che le due piante siano sessualmente compatibili e che il nuovo materiale genetico sia integrato stabilmente. Al fine di un incrocio entrambe le specie devono essere in fiore nello stesso momento, le piante devono essere sufficientemente vicine perché un vettore possa trasportare il polline e il polline

deve essere capace di compiere la fecondazione. Se il nuovo embrione così ottenuto darà origine a semi vitali, la pianta risultante  $F_1$  avrà spesso una fertilità ridotta (3).

In alcune piante (es. carota, girasole, fragola e rapa), dopo un primo incrocio con un progenitore e la formazione di un ibrido, l'ulteriore incrocio tra il nuovo ibrido e le piante progenitrici selvatiche limitrofe porterà alla stabilizzazione nelle generazioni successive del materiale genico inserito. Appare quindi particolarmente importante lo studio della capacità di sopravvivenza di tali ibridi e della capacità delle successive generazioni ibride di incrociarsi con la pianta parentale originale (reincrocio o *backcross*).

Il processo che porta all'incrocio può essere suddiviso in diverse fasi: nella prima un granulo di polline vitale deve raggiungere lo stigma di una pianta compatibile che è generalmente, ma non necessariamente, della stessa specie della pianta PGM.

Le piante potenzialmente riceventi possono essere piante coltivate non modificate e specie selvatiche correlate.

Nella seconda fase il polline GM, dopo l'atterraggio su uno stigma adatto, deve riuscire a fertilizzare l'ovulo della pianta, in competizione con altro polline che si è depositato sullo stesso stigma. Nella fase successiva di sviluppo del seme, il DNA modificato della pianta PGM deve essere incorporato nei geni della specie ricevente. Quest'ultimo passaggio dipende dai processi stocastici che andranno a determinare se il DNA transgenico si stabilirà, o meno, nella popolazione ricevente. Successivamente, quando il DNA transgenico sarà presente in un numero di piante sufficienti da rendere i processi stocastici trascurabili, saranno processi deterministici a governare la persistenza del DNA transgenico nelle generazioni successive.

Ellstrand *et al.* (3) hanno dimostrato che 12 delle 13 piante più importanti, coltivate a scopo alimentare, formano ibridi con la loro controparte selvatica almeno in alcune aree della loro distribuzione geografica.

Altri risultati suggeriscono che il flusso genico da pianta coltivata a selvatica è la regola piuttosto che l'eccezione. Nel Regno Unito un terzo delle 31 piante analizzate ibrida con uno o più elementi della flora selvatica (4), mentre nei Paesi Bassi lo fa un quarto delle 42 piante esaminate (5).

Va, tuttavia, rilevato che la probabilità d'incrocio (*outcrossing*) è limitata, nelle maggiori aree di coltivazione di tali piante dal fatto che la distribuzione geografica delle controparti selvatiche non si sovrappone a quella delle piante coltivate e che per alcune specie le parentali selvatiche non sono particolarmente vigorose.

Le potenziali ramificazioni del flusso genico delle PGM vanno viste nel contesto della produzione mondiale di alimenti, nella quale 200 specie rappresentano il totale delle attività economiche e culinarie umane. Infestanti sessualmente compatibili esistono per 21 delle 25 specie maggiormente coltivate (Tabella 13). Se, però, si esaminano le 180 infestanti più dannose che causano il 90% di tutte le perdite dovute alle malerbe, solo cinque gruppi (correlati a riso, colza, sorgo, canna da zucchero e avena) sono sessualmente compatibili con le specie coltivate (6). Ciò significa che è piccolo il numero di possibili combinazioni di flusso genico tra le infestanti più dannose e le piante coltivate.

In parecchi casi la distribuzione geografica delle infestanti non si sovrappone in maniera apprezzabile con l'areale di maggior coltivazione di una pianta. Tuttavia, anche se una data infestante non ha un rango elevato nella classifica mondiale, può causare perdite significative a livello locale o regionale, come accaduto negli USA per riso e frumento invernale a seguito di massicce infestazioni di *Oryza sativa* e *Aegilops cylindrica*.



Tabella 13. Piante coltivate più importanti e specie sessualmente compatibili<sup>a</sup>

Pianta	Nome scientifico	Specie infestante compatibile	Invasività **	Distribuzione geografica delle specie compatibili
Frumento	<i>Triticum aestivum</i> <i>T. turgidum</i> ssp <i>durum</i>	<i>T. aestivum</i>	D	Nepal
		<i>Aegilops cylindrica</i>	D	Turchia, USA
		<i>Ae. tauschii</i>	D	Iran
		<i>Ae. triuncialis</i>	D	Marocco, Turchia
		<i>Ae. ventricosa</i>	D	Marocco
Riso	<i>Oryza sativa</i> <i>O. glaberrima</i>	<i>O. sativa</i>	C	Globale
		<i>O. glaberrima</i> *	D	Africa Occidentale
		<i>O. barthii</i>	C	Nigeria
		<i>O. longistaminata</i>	D	Africa subsahariana
		<i>O. rufipogon</i>	C	Asia continentale ed insulare, Nuova Guinea, Nord Australia, America Latina
		<i>O. punctata</i>	C	Nigeria, Swaziland
Mais	<i>Zea mais</i>	<i>Zea mais</i> ssp. <i>mexicana</i> *	D	Messico
Soia	<i>Glycine max</i>	<i>G. soya</i>	D	Corea, Taiwan, Giappone, Cina di Nordest, Siberia, Argentina
Orzo	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>H. spontaneum</i>	D	Medioriente, Iran, Asia centrale
Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>S. bicolor</i>	D	Africa, USA
		<i>S. almum</i>	D	Argentina, Australia, Sud Africa, USA
		<i>S. halepense</i>	A	51 Paesi Asia Sud occidentale e Africa
		<i>S. propinquum</i>	D	Filippine
Miglio	<i>Eleusine coracana</i> <i>Pennisetum glaucum</i>	<i>E. coracana</i> ssp. <i>africana</i> *	D	Africa Occ.
		<i>P. sieberanum</i>	D	Africa Occ., Namibia
Cotone	<i>Gossypium hirsutum</i> <i>G. barbadense</i>	<i>G. hirsutum</i> *	D	Mesoamerica, Caraibi
		<i>G. tomentosum</i>	D	USA
Fagiolo	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>P. vulgaris</i>	D	Perù, Colombia
Arachide	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>A. hypogaea</i>	D	Taiwan
Colza	<i>Brassica napus</i> <i>B. rapa</i>	<i>B. napus</i>	D	Europa, Argentina, USA, Australia, Canada
		<i>B. juncea</i>	D	Argentina, USA, Canada, Messico, Fiji, Australia
		<i>B. rapa</i> ( <i>B. campestris</i> )	C	Globale-clima temperato
		<i>Hirshfeldia incana</i> ( <i>B. adpressa</i> )	C	Argentina, USA, Sud Africa, Europa, Australia
		<i>Raphanus raphanistrum</i>	C	Globale-clima temperato
		<i>Sinapis arvensis</i> ( <i>B. kaber</i> )	C	Globale-clima temperato

segue

continua

Pianta	Nome scientifico	Specie infestante compatibile	Invasività **	Distribuzione geografica delle specie compatibili
<b>Girasole</b>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>H. annuus</i>	D	Sud America, Messico, USA
		<i>H. petiolaris</i>	D	USA
<b>Canna da zucchero</b>	<i>Saccharum officinarum</i>	<i>S. officinarum</i>	D	Taiwan
		<i>S. spontaneum</i>	C	Asia, Africa, Medioriente, Mesoamerica
<b>Patata</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	Nessuna		
<b>Cassava</b>	<i>Manihot esculenta</i>	<i>M. esculenta</i> *	D	Dal sudest USA all'Argentina
		<i>M. reptans</i>		
<b>Avena</b>	<i>Avena sativa</i>	<i>A. fatua</i>	A	56 Paesi di Europa, Medioriente, Asia centrale, Nord America
		<i>A. sterilis</i>	A	19 Paesi di Europa, Medioriente, Asia centrale, Nord America
<b>Palma da olio</b>	<i>Elaeis guineensis</i>	Nessuna		
<b>Caffè</b>	<i>Coffea arabica</i> <i>C. canephora</i>	Nessuna		
<b>Cocco</b>	<i>Cocos nucifera</i>	<i>C. nucifera selvatica</i>	D	Pacifico occidentale
<b>Cece</b>	<i>Cicer arietinum</i>	Nessuna		
<b>Patata dolce</b>	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>I. trifida</i>	D	America centrale e del sud
<b>Fagiolino</b>	<i>Vigna unguiculata</i>	<i>V. unguiculata</i>	D	Niger e Nigeria
<b>Olivo</b>	<i>Olea europaea</i>	<i>O. europaea</i>	D	Bacino del Mediterraneo
		<i>S. cereale</i>	D	Argentina, USA. Iran, Turchia, Finlandia
<b>Segale</b>	<i>Secale cereale</i>	<i>S. montanum</i> *	D	Bacino del Mediterraneo, Iraq, Iran
		<i>Vitis ssp.*</i>	D	Globale
<b>Vite</b>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>V. aestivalis</i>	D	USA
		<i>V. candicans</i>	D	USA
		<i>V. hastata</i>	D	Malesia
		<i>V. rotundifolia</i>	D	USA
		<i>V. ripestris</i>	D	USA
		<i>V. tiliaefolia</i>	D	Honduras
		<i>V. trifolia</i>	D	India
		<i>V. vulpina</i>	D	USA

<sup>a</sup> Le piante sono ordinate su base decrescente di produzione secondo FAOSTAT

\* le piante indicate con l'asterisco sono classificate come non infestanti

\*\* Il livello è stato attribuito rielaborando la classificazione di Holm *et al.* (7, 8) delle 180 infestanti peggiori:

**A** infestanti più dannose;

**B** molto dannose;

**C** a bassa dannosità;

**D** non classificabili come infestanti.

## 9.1. Vigore degli ibridi

Molte piante coltivate sono poliploidi mentre le loro controparti selvatiche sono diploidi; l'incrocio tra specie con ploidia differente dà origine a ibridi che contengono un numero di cromosomi intermedi tra quello delle due specie originarie; poiché in fase di riproduzione, nel corso della meiosi, possono avvenire problemi nell'accoppiamento dei cromosomi omologhi, gli ibridi risultanti possono essere sterili con la conseguenza che la diffusione nell'ambiente viene automaticamente bloccata.

In generale l'ibridazione spontanea tra piante a differente ploidia, ha maggior successo quando la pianta materna è quella a ploidia più alta, perché l'embrione si sviluppa in modo anormale quando il rapporto genomico materno: paterno devia da 2:1 (9). I risultanti ibridi triploidi non sono sterili, come si è pensato per lungo tempo, perché alcuni sono capaci di produrre gameti euploidi, funzionando così da ponte per il flusso genico o la formazione di una nuova specie poliploide (10).

A livello del genoma la probabilità di trasferimento genico dipende dal livello di omologia genetica e strutturale tra pianta coltivata e controparte selvatica. L'introgresione sarà più alta nel caso in cui i genomi coinvolti abbiano un alto grado di omologia come nel caso della barbabietola *Beta vulgaris* x *B. maritima* (11). Analogamente l'introgresione di un gene di una pianta coltivata poliploide ad una specie correlata dipenderà dalla localizzazione dello stesso gene sul genoma; ad esempio l'introgresione di un gene dalla colza (genoma, *AACC*) verso la rapa campestre (genoma, *AA*) sarà favorita quando il gene è localizzato sul genoma *A* piuttosto che sul genoma *C* (12).

L'introgresione può avvenire solo nel caso in cui gli ibridi raggiungano la fase riproduttiva e producano progenie. Per tale motivo, è importante non solo stabilire il potenziale d'ibridazione tra taxa, ma anche valutare il vigore della generazione ibrida risultante.

È opinione comune che i geni delle piante coltivate, specialmente quelli associati all'addomesticamento (e forse anche i transgeni inseriti) siano svantaggiosi per le popolazioni selvatiche od abbiano effetti nocivi/fatali sul vigore delle popolazioni ibride (13), che non sarebbero così capaci di diffondersi. Tuttavia, i geni coinvolti nell'addomesticamento spesso presentano alleli recessivi, per cui in un incrocio tra pianta coltivata e specie selvatica compatibile l'allele dell'addomesticamento sarà annullato nello stato eterozigote e l'ibrido esprimerà il fenotipo selvaggio. In questo caso la prima generazione di ibridi sarà simile alla pianta selvatica, il che potrebbe aumentare la probabilità di sopravvivenza. Nelle generazioni successive, geni della pianta coltivata possono esprimersi nella specie selvatica riducendone la fittezza al di fuori dei campi coltivati (6).

Vi sono vari esempi di questo fenomeno di cattivo adattamento. Gli ibridi tra carota coltivata (*Daucus carota* ssp. *sativa*) e specie selvatica (*Daucus carota* ssp.) ereditavano la sensibilità al gelo della specie coltivata, per cui avevano una capacità di sopravvivere al gelo inferiore a quella della specie selvatica ma leggermente superiore a quella della specie coltivata (14). Una situazione simile è stata trovata negli ibridi di colza (*Brassica napus*) con *Brassica campestris*. I semi ibridi, risultanti da incroci reciproci, non esprimevano la dormienza (lo stato fisiologico in cui si trova il seme prima della germinazione) come la specie coltivata *Brassica napus* (15). Questo fatto diminuisce il vigore dei semi che rimangono nel terreno dopo il raccolto. In alcuni casi si osserva un sostanziale equilibrio tra effetti positivi e negativi risultanti dal flusso genico. L'incrocio tra girasole (*Helianthus annuus*) coltivato e controparte selvatica dà origine a semi con dimensione doppia rispetto a quelli della specie selvatica. Tali semi sono mangiati dagli uccelli in maniera significativamente maggiore, rispetto ai semi della pianta selvatica. La maggior dimensione è un segno positivo di vigore, perché il seme ha più riserve alimentari per svilupparsi, ma in questo caso la preferenza degli uccelli riduce la capacità degli ibridi di

sopravvivere (16). Inoltre, quando i semi degli ibridi  $F_1$  tra specie coltivata e specie selvatica di girasole venivano interrati, per verificarne la dormienza, questi presentavano una minor dormienza e una minor produzione di semi rispetto alla controparte selvatica (17). Altri esempi di equilibrio nel vigore sono stati osservati sempre in girasole (18) per la resistenza ai funghi, nella barbabietola per la resistenza a virus (19), e negli ibridi interspecifici tra il sorgo coltivato (*Sorghum bicolor*) e l'infestante *Sorghum halepense* (20).

In molti taxa gli ibridi interspecifici hanno un vigore migliore dei loro progenitori. Ad esempio, i semi degli ibridi tra colza *Brassica napus* e selvatica *Brassica rapa* sopravvivono meglio, in campo, dei semi di quest'ultima (21). Un altro esempio è dato dal ravanello (*Raphanus sativus*) nel quale gli ibridi tra varietà coltivata e specie selvatica producevano più frutti e più semi della specie selvatica (22). Gli ibridi tra varietà coltivata e specie selvatica compatibile, come dimostrato da questi esempi, possono essere sufficientemente adatti a riprodursi e sopravvivere, con conseguente diffusione dei geni della pianta coltivata.

In generale, il trasferimento di un transgene da pianta coltivata a specie selvatica dovrebbe essere più probabile nei casi in cui la caratteristica trasmessa sia neutra o benefica per la pianta ricevente. Invece, i risultati sperimentali non sono univoci in tal senso. Il trasferimento manuale di polline da una barbabietola resistente alla rizomania (che esprime le proteine del capsido virale del Virus BNYVV) alla barbabietola selvatica (*Beta vulgaris* sp. *maritima*) ha dato, in un caso, un aumento di resistenza al virus negli ibridi  $F_1$ , mentre in un'altro, naturalmente resistente, non è stato osservato alcun incremento (23). In altri esperimenti di trasferimento meccanico, il polline di *Brassica napus* L, contenente il gene *bar* (che conferisce la resistenza all'erbicida Basta) è stato depositato sui fiori del ravanello selvatico (*Raphanus raphanistrum*) ottenendo così degli ibridi interspecifici. Quando questi venivano coltivati, il numero di ibridi interspecifici diminuiva ad ogni generazione successiva, dimostrando, così, che il vigore era diminuito e che la probabilità di trasferimento genico stabile era molto bassa (24).

Nel girasole contenente la tossina Bt (25) è stato osservato un aumento del vigore degli ibridi  $F_1$ , mentre l'inserimento del gene per la resistenza ai funghi non ha mostrato effetti (17).

Una varietà transgenica della zucca (*Cucurbita pepo*) contenente la resistenza a due virus è stata confrontata, con varie controparti selvatiche. I risultati hanno dimostrato che la generazione  $F_1$  era sufficientemente vigorosa da contribuire all'insieme genetico delle generazioni successive, ma gli ibridi non erano più vigorosi dei progenitori selvatici (26). Un altro studio sulla dipendenza del vigore dal tipo di gene è stato condotto sul riso. Il trasferimento del gene *bar*, che conferisce la resistenza all'erbicida glufosinato, dal riso coltivato GM (*Oryza sativa*) alla varietà infestante, selvatica rossa (*Oryza sativa* forma *spontanea*) non ha influenzato né la dormienza né la produzione di semi (27).

Tutti questi studi si basano sul principio che il flusso genico sia unidirezionale: dalla popolazione transgenica a quella selvatica. In realtà, le conseguenze del flusso genico dipendono proprio dalla direzione (simmetrica o asimmetrica). Se il flusso è simmetrico tra due o più popolazioni, il suo effetto sarà la riduzione della diversità genetica tra le popolazioni e un aumento delle differenze genetiche tra individui della singola popolazione considerata. Se invece, il flusso è molto più alto da una popolazione donatrice ad un'altra ricevente, rispetto al flusso contrario, il risultato, a lungo termine, sarà lo spostamento degli alleli della popolazione ricevente, con la conseguente sostituzione con gli alleli della popolazione donatrice. Questo fenomeno è stato descritto almeno nel caso del fagiolo comune (*Phaseolus vulgaris*) nel quale il flusso genico dalla popolazione coltivata verso la popolazione selvatica è di 3-4 volte superiore a quello in direzione opposta (28). Papa e Gepts, sebbene non vi siano informazioni sufficienti su altre specie coltivate, in base ai dati disponibili sul rapporto tra differenze genetiche tra popolazioni coltivate e selvatiche e loro demografia, hanno formulato l'ipotesi che tale flusso asimmetrico sia presente anche nell'orzo (29), nell'erba medica (30) e nel mais (31).

Vi sono numerosi altri studi sul vigore degli ibridi, con o senza caratteri transgenici, riassunti da Ellstrand *et al.* (3) e da Eastham e Sweet (32). La maggior parte dei lavori sulla sopravvivenza dei transgeni nelle popolazioni naturali è stata indirizzata alla fittezza degli ibridi F<sub>1</sub>.

La fittezza è la capacità di un individuo di sopravvivere e riprodursi in un dato ambiente, lasciando una progenie più numerosa; essa è funzione di una grande varietà di parametri, che vengono espressi durante la vita della pianta, quali, ad esempio, la dormienza dei semi, la loro germinabilità, la crescita vegetativa e la fecondità maschile/femminile. Identificare, tra questi, gli elementi più critici non è facile e dipende dall'ecologia delle piante sessualmente compatibili.

La stima, della fittezza degli ibridi può avere, quindi, scarso valore predittivo nella valutazione della persistenza dei transgeni, nelle normali condizioni di coltivazione dove non sono presenti i fattori limitanti, presenti invece nell'ambiente non coltivato quali l'acqua e i nutrienti del suolo e dove la competizione inter-specifica è molto bassa. Esempi di di fittezza di alcuni ibridi sono riportati in Tabella 14.

**Tabella 14. Fittezza relativa degli ibridi selvatico/coltivato rispetto ai controlli selvatici\***

Ibrido	Fittezza relativa	Rif.
<i>Oryza sativa</i> (var rossa) x <i>O. sativa</i>	Ibridi > Controlli	33
<i>Sorghum halepense</i> x <i>S. bicolor</i>	Ibridi = Controlli	20
<i>Helianthus annuus</i> x <i>H. annuus</i>	Ibridi < Controlli	17
<i>Cucurbita pepo</i> x <i>C. pepo</i>	Ibridi < Controlli	26
<i>Hirschfeldia incana</i> x <i>Brassica napus</i>	Ibridi < Controlli	34
<i>Raphanus raphanistrum</i> x <i>Brassica napus</i>	Ibridi < Controlli	35
<i>Brassica rapa</i> x <i>B. napus</i>	Ibridi = Controlli	36
<i>Brassica rapa</i> x <i>B. napus</i>	Ibridi = Controlli	37
<i>Brassica rapa</i> x <i>B. napus</i>	Ibridi << Controlli	21
<i>Raphanus raphanistrum</i> x <i>Brassica napus</i>	Ibridi < Conrolli	38
<i>Raphanus raphanistrum</i> x <i>Brassica napus</i>	Ibridi < Controlli	35
<i>Raphanus raphanistrum</i> x <i>Brassica napus</i>	Ibridi << Controlli	35

\*Rielaborata da (9)

Alla luce dei risultati discussi precedentemente è chiaro che non è possibile impedire del tutto la dispersione dei geni. I predittori intuitivi della fuga dei transgeni, come le modalità di riproduzione, la ploidia della pianta coltivata rispetto a quella della controparte selvatica, l'abbondanza relativa di entrambe sul territorio in esame, non sono sufficienti per valutare correttamente il rischio associato. Il flusso genico dalla pianta coltivata alla controparte selvatica è in qualche modo non prevedibile e può essere considerato pianta-specifico, varietà-specifico, sito-specifico e anche stagione-specifico (4).

Le conoscenze acquisite non consentono di trarre conclusioni certe, anche se le osservazioni effettuate su piante convenzionali, introdotte in nuovi *habitat*, hanno dimostrato che solo il 10% di queste si acclimata nel nuovo ambiente e che solo il 10% di quelle acclimate diventa un'infestante (39, 40); di conseguenza, solo lo 0,1% delle specie introdotte in un nuovo ambiente ha la possibilità di diventare infestante. Pertanto, è quasi impossibile predire l'attendibilità di un evento così raro.

Queste osservazioni valgono nel caso considerassimo la PGM come una pianta esotica introdotta per la prima volta nell'*habitat* di coltivazione. Se, invece, ipotizziamo che la pianta

transgenica si comporti come la controparte convenzionale, la modificazione genetica andrà ad influenzare solo la fittezza della pianta trasformata (41), al contrario, se la caratteristica inserita nella pianta transgenica non ne aumenta la fittezza, questa si comporterà come la controparte convenzionale per quanto riguarda l'invasività; in termini ecologici potremmo affermare che, in questo caso, il rilascio del transgene sarebbe eguale in termini di rischio al rilascio della controparte convenzionale (42). In base a queste osservazioni, così come è necessario eseguire una valutazione del rischio nel caso di rilascio deliberato di una PGM anche nel caso di coltivazione di piante selezionate con tecniche tradizionali dovrebbe essere necessario valutare gli effetti potenzialmente dannosi sugli ecosistemi.

Dal 1996 al 2011, sono stati coltivati con piante transgeniche più di mille milioni di ettari, in 25 Paesi, senza che l'ipotesi di generare nuove infestanti da parte delle piante GM si sia avverata.

## 9.2. Autoimpollinazione e impollinazione incrociata

Il rilascio, il trasporto e la deposizione del polline, dalla parte maschile (antera) alla parte femminile (stilo e stigma) nei fiori, costituiscono il processo d'impollinazione.

I granuli di polline non sono capaci di disperdersi nell'ambiente autonomamente, ma hanno bisogno di vettori di dispersione. Questi possono essere biotici, come gli insetti, gli uccelli e i mammiferi, o abiotici, come il vento e l'acqua. Il 90% circa delle angiosperme è impollinato da animali, ma alcune di esse come il mais, la segale, i giunchi, le ciperacee, sono impollinate dal vento (43) (Tabella 15). In Italia, il vento e gli insetti sono i principali vettori di dispersione del polline. Le specie autoimpollinanti (*selfing*) dovrebbero essere prive di meccanismi che promuovono la dispersione del polline; in realtà, anche qui si osservano dei livelli apprezzabili di impollinazione incrociata/eterogama (*outcrossing*) specialmente quando queste sono visitate dagli insetti. Le specie impollinate dal vento possono, invece, essere o altamente autoimpollinanti o altamente eterogame, con rari casi intermedi (44). Le piante impollinate dagli insetti mostrano entrambe le modalità, ma con maggiore preponderanza di impollinazione eterogama. Una spiegazione per tale differenza può essere che il vento è una costante per queste popolazioni, mentre la presenza di insetti e le loro visite alle piante possono essere molto variabili.

Le specie allogame obbligate, impollinate dagli insetti, a differenza delle autoimpollinanti (autogame), non sono capaci di autofecondarsi e il polline prodotto, anche se si deposita sul proprio stigma, non entra in competizione con il polline proveniente dall'antera di un altro individuo della stessa specie.

La dispersione di polline da parte degli insetti è funzione del comportamento e della concentrazione degli insetti stessi che determinano l'andamento dei flussi di polline e l'efficienza dell'impollinazione. Gli imenotteri, ad esempio, eseguono voli corti, trasportano alta carica di polline con alta efficienza d'impollinazione, mentre i lepidotteri sono caratterizzati da voli lunghi, piccoli carichi di polline con scarsa efficienza d'impollinazione (44). Gli insetti specialisti che visitano fiori della stessa specie, senza visitare fiori di altre specie, sono impollinatori più efficienti depositando molto polline co-specifico. Le popolazioni d'insetti generalisti che visitano i fiori di molte piante possono presentare alcuni individui che preferiscono poche (od una) specie, dando così anch'essi un'alta efficienza (45-47).

Il polline delle piante zoogame ha assunto diverse forme di specializzazione; infatti, alcuni tipi di polline mostrano delle decorazioni superficiali, come spine o reticoli, che – intrappolando i lipidi di superficie – agiscono come adesivi favorendo l'aggregazione del polline in blocchi e l'adesione di questi ultimi agli insetti.

Tabella 15. Biologia riproduttiva delle piante coltivate più importanti

Pianta	Nome scientifico	Vettori del polline	Principale meccanismo di riproduzione
Frumento	<i>Triticum aestivum</i> <i>T. turgidum</i> ssp <i>durum</i>	Vento	Autoimpollinazione
Riso	<i>Oryza sativa</i> <i>O. glaberrima</i>	Vento	Autoimpollinazione
Mais	<i>Zea mais</i>	Vento	Esoimpollinazione
Soia	<i>Glycine max</i>	Insetti	Autoimpollinazione
Orzo	<i>Hordeum vulgare</i>	Vento	Autoimpollinazione
Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i>	Vento	Autoimpollinazione
Miglio	<i>Eleusine coracana</i>	Vento	Autoimpollinazione
	<i>Pennisetum glaucum</i>	Vento	Esoimpollinazione
Cotone	<i>Gossypium hirsutum</i>	Insetti	Autoimpollinazione
	<i>G. barbadense</i>	insetti	Autoimpollinazione
Colza	<i>Brassica napus</i>	insetti	Autoimpollinazione
	<i>B. campestris</i>	Insetti	Esoimpollinazione
Fagiuolo	<i>Phaseolus vulgaris</i>	insetti	Autoimpollinazione
Arachide	<i>Arachis hypogaea</i>		Autoimpollinazione
Girasole	<i>Helianthus annuus</i>	Insetti	Esoimpollinazione
Patata	<i>Solanum tuberosum</i>	Insetti	Autoimpollinazione
Canna da zucchero	<i>Saccharum officinarum</i>	Vento	Talea
Cassava	<i>Manihot esculenta</i>	Insetti	Esoimpollinazione,
Avena	<i>Avena sativa</i>	vento	Autoimpollinazione
Cocco	<i>Cocos nucifera</i>	Vento, insetti	Varie
Caffè	<i>Coffea arabica</i>	Insetti	Autoimpollinazione
	<i>C. canephora</i>	Insetti	Esoimpollinazione
Cece	<i>Cicer arietinum</i>	insetti	Autoimpollinazione
Fagiolino	<i>Vigna unguiculata</i>	insetti	Autoimpollinazione
Segale	<i>Secale cereale</i>	Vento	Esoimpollinazione
Palma da olio	<i>Elaeis guineensis</i>	Insetti	Esoimpollinazione
Patata dolce	<i>Iopmea batatas</i>	Insetti	Esoimpollinazione
Barbabietola	<i>Beta vulgaris</i>	Vento	Esoimpollinazione
Vite	<i>Vitis vinifera</i>	Vento, insetti	Esoimpollinazione
Olivo	<i>Olea europeae</i>	Insetti	Esoimpollinazione

In altri casi, dai pollini sporgono fili di polimeri che li aggrovigliano insieme per facilitare il trasporto da parte degli insetti oppure sulla superficie del polline stesso sono presenti sostanze viscosi; questi pollini hanno anche una superficie spessa e impermeabile che li protegge da eventuali cambiamenti climatici. L'efficienza d'impollinazione ottenuta tramite gli insetti è tale che la produzione di polline in queste piante si limita, in media, a 1.000 granuli di polline per antera. Una caratteristica importante è la distanza coperta durante il volo dagli insetti impollinatori; questa distanza permette di valutare il flusso genico dovuto al polline, anche se la

maggior parte di questi insetti compie voli brevi. Le farfalle, ad esempio, coprono in media distanze più grandi tra due visite consecutive ai fiori, rispetto ai bombi che, a causa del loro maggior dispendio energetico (45), volano solo tra fiori vicini.

Le api, al contrario, possono alimentarsi anche a 10 km di distanza dall'alveare anche se è stato osservato che, nelle aree coltivate, esse si limitano a compiere voli di poche centinaia di metri (48). Le api, inoltre, lasciando l'alveare, possono trasportare del polline proveniente da un precedente volo andando a impollinare anche piante più distanti di quelle visitate durante un singolo volo (49).

Come si può osservare il comportamento degli insetti è influenzato da molte caratteristiche riferibili alle popolazioni delle piante (dimensioni, densità, eventuale isolamento mecc) e dalle caratteristiche tipiche della popolazione degli insetti quali, ad esempio, le dimensioni e la distanza tra le popolazioni stesse.

In presenza di una popolazione continua di fiori, i voli sulle piante sono relativamente brevi (inferiori circa a 20 m) (49) e le piante più lontane rimangono senza impollinazione (50). D'altra parte, al diminuire del numero di piante presenti in una determinata popolazione, la distanza, alla quale l'impollinazione avviene con successo, diminuisce. Questo complesso di fattori può dare come risultato andamenti diversi di flusso genico tra popolazioni di piante identiche, ma situate a distanze diverse (51). Nel ravanello selvatico (*Raphanus sativus* L.) è stato osservato che grandi popolazioni poste a grandi distanze importavano più polline rispetto a piccole popolazioni vicine (3). Tuttavia nelle popolazioni vegetali, presenti nel territorio a bassa densità, il polline portato dagli insetti costituisce una frazione relativamente più grande che non nel caso di popolazioni ad alta densità (52). Altri parametri ecologici che possono influenzare l'impollinazione da parte degli insetti sono la forma della popolazione, la presenza o meno di ospiti alternativi e la velocità di fioritura (3).

Il flusso genico, determinato dall'azione degli insetti, può essere quindi molto variabile tra specie, tra popolazioni della stessa pianta e collegato a fasi temporali differenti. In generale, il flusso non raggiunge distanze superiori ai 100-200 metri, anche se per molte piante coltivate non è ancora noto fino a quale distanza massima il polline possa essere disperso. Per la patata (*Solanum tuberosum*) la distanza massima misurata per l'impollinazione da insetti è stata di 1.000 metri mentre per il colza (*Brassica napus*) di 4000 metri che sono diventati 3000 nel caso di trasporto anemofilo (53).

Le piante anemofile, impollinate cioè dal vento, comprendono tutte le gimnosperme, la maggior parte delle crittogame e un certo numero di angiosperme. Questo tipo di dispersione dipende principalmente dalle caratteristiche del vento, dalla velocità di caduta del polline e dall'altezza del rilascio rispetto al terreno; essendo un fatto casuale queste piante devono produrre una grande quantità di polline per aumentare la probabilità che esso si depositi su uno stigma compatibile.

In genere, la produzione di polline in queste piante è 10 volte più grande di quella delle piante zoogame: il loglio, l'erba marzolina e la scagliola, rilasciano da una spiga, tra i 2 e i 5 milioni di granuli di polline (54). I pollini di queste piante hanno caratteristiche superficiali tali e vescicole d'aria che gli consentono di rimanere in aria, sono piccoli e leggeri con diametri medi di 30  $\mu\text{m}$ , la maggior parte viene rilasciata al mattino presto quando le correnti ascensionali sono più forti.

Per il trasporto anemofilo sono importanti, non solo la velocità orizzontale e la direzione del vento, ma anche l'eventuale turbolenza (55, 56) che può essere di tipo: meccanico con alte velocità orizzontali del vento (come avviene durante i temporali); associata a correnti d'aria discendenti, con scarse correnti ascensionali; oppure a correnti ascensionali di origine termica, dovuta cioè all'aumento della temperatura dell'aria provocato dal sole.



In quest'ultimo caso le correnti ascensionali predominano su quelle verso il basso e giocano un ruolo importante nella dispersione del polline portandolo in alto e favorendo, così, la dispersione in aree più lontane. In base a quanto osservato e contrariamente alle credenze popolari è il tempo soleggiato e non i temporali a favorire la dispersione del polline.

Normalmente, in assenza di vento, la temperatura dell'aria diminuisce con l'altezza in media di 1 grado ogni 15 metri. Quando la temperatura scende meno della media, si formano delle correnti stratificate che non favoriscono la dispersione del polline, ma la sua concentrazione in strati d'aria ben definiti. Quando la diminuzione di temperatura è più alta della media, tutta l'umidità viene assorbita dall'atmosfera e in queste condizioni più asciutte si creano potenti correnti ascensionali che portano i pollini in alto nell'atmosfera, fino a raggiungere le correnti dalle quali possono essere trasportati a grandi distanze.

Un fattore importante che influenza l'efficienza d'impollinazione è la dimensione della popolazione coltivata. Nel caso del mais, ad esempio, la concentrazione in aria del polline, derivante da una coltivazione piccola, diminuisce più rapidamente con la distanza rispetto a quella derivante da coltivazioni estese (57).

Un altro fattore importante è la topografia della coltivazione; il polline di una popolazione coltivata su un pendio potrebbe essere trasportata da una folata di vento sopra una collina aumentando così l'altezza del rilascio. In generale, comunque, il polline trasportato dal vento percorre distanze maggiori di quelle percorse dal polline trasportato dagli insetti, anche se il numero di granuli trasportato a grandi distanze è molto piccolo. Grandi distanze sono state dimostrate soprattutto per i pollini rilasciati dagli alberi (fino a 250 km) (58) mentre le distanze massime misurate nel caso della barbabietola da zucchero e del mais (54) impollinate dal vento sono state di 800 m.

Le differenze tra impollinazione mediata dal vento e quella mediata dagli insetti sono numerose (Tabella 16).

**Tabella 16. Caratteristiche dell'impollinazione mediata dal vento e mediata dagli insetti**

Vento	Insetti
Muove il polline in grandi masse specialmente sottovento.	Muove il polline più o meno casualmente in tutte le direzioni, a seconda della posizione del nido o dell'alveare.
Nessuna specificità di specie. Tutto il polline è trasportato e depositato dove capita. La probabilità di deposizione su uno stigma compatibile è bassa, per cui la produzione di polline deve essere alta.	Spesso la distribuzione è sistematica all'interno di una specie vegetale, a causa della preferenza per un tipo di fiore o della specializzazione. Viene trasportato solo il polline della specie visitata. La probabilità di deposizione su uno stigma compatibile è alta, per cui la produzione di polline è bassa.
La quantità di polline trasportata è illimitata.	La quantità di polline trasportata è limitata. Solo dopo la deposizione può essere trasportato dell'altro polline.

Nonostante queste differenze, se si misurano le frequenze d'impollinazione, in funzione delle distanze, si ottengono degli andamenti paragonabili (59, 60), che dimostrano come la maggior parte del polline si depositi molto vicino alla pianta d'origine e solo una frazione molto piccola si depositi a grandi distanze (52, 59, 61-65).

Nel processo di dispersione, parte del polline perde la sua vitalità, morendo o perdendo la capacità di compiere la fecondazione. La vitalità del polline è influenzata da tre fattori: a) fattori interni, come il metabolismo del polline stesso; b) fattori morfologici, che dipendono dalla forma del fiore che può avere antere protette o meno; c) fattori ambientali come l'umidità, la temperatura

e la luce UV (64, 65). La vitalità è stata definita e misurata in molti modi (64, 66) e in questo lavoro si intende il periodo durante il quale il polline è capace di germinare su uno stigma.

Nelle fasi terminali di maturazione nel polline si ha un accumulo di amido che, a seconda della specie, viene convertito nel citoplasma in polisaccaridi (fruttani, callosio), disaccaridi (saccarosio) e monosaccaridi (glucosio e fruttosio); il polline può avere un contenuto d'acqua che va dal 5 al 50% in peso. Il polline con un alto contenuto in acqua può perderla rapidamente durante la dispersione (66, 67) per questo motivo prima e durante la dispersione, fruttani e saccarosio possono interconvertire tra loro per mantenere la pressione osmotica costante in modo da prevenire la perdita o la captazione d'acqua. La vitalità, infatti, può essere persa per disidratazione. Quando l'impollinazione avviene rapidamente, dopo l'apertura delle antere, il polline ha bisogno di poca protezione contro la disidratazione e le sue riserve consistono principalmente di polisaccaridi. Invece, quando il polline deve viaggiare a lungo ha bisogno di una forte protezione contro la disidratazione, che duri nel tempo. In questo caso, l'amido viene depolimerizzato in saccarosio che protegge e stabilizza le membrane del polline dalla disidratazione (68) preservandone la vitalità durante il trasporto: infatti i pollini più ricchi in saccarosio sopravvivono più a lungo rispetto a quelli con meno saccarosio (70), anche se gli stessi polisaccaridi conferiscono comunque una certa resistenza alla disidratazione (67, 70-76).

La vitalità del polline è correlata alla sua abilità competitiva: più è alta e più è bassa la vitalità del polline (77). È logico desumere che ad una bassa abilità competitiva debba corrispondere una lunga esposizione dello stigma. Per quanto questo concetto appaia banale, è completamente trascurato negli studi di flusso genico. Poca longevità del polline è generalmente associata con l'autoimpollinazione (Tabella 17). I valori indicati in Tabella 17 si riferiscono ai valori medi misurati dal momento della deiscenza delle antere; in caso di basse temperature, la vitalità del polline di mais può raggiungere alcuni giorni e quello del riso 20 min.

**Tabella 17. Durata della produzione del polline e vitalità dello stesso**

Pianta	Durata della deiscenza	Durata della vitalità	Impollinazione
Mais	6-10 giorni	10-30 minuti	95% anemofila
Pomodoro	2-3 giorni	24-48 ore	Autogama
Riso	2-3 ore	3-5 minuti	Autogama
Melanzana	2-3 giorni	24-38 ore	60% autogama
Soia	24-48 ore	n.d.	Autogama
Colza	4-10 giorni	n.d.	70% autogama

Per un incrocio efficace tra PGM e parente selvatica è necessario che la fioritura delle due piante avvenga in modo da avere una certa sovrapposizione temporale. Un altro elemento da valutare è la presenza o meno di piante selvatiche sessualmente compatibili con la specie coltivata. In Italia, ad esempio, non hanno parenti selvatiche il mais, la soia, la fragola, l'uva, mentre le hanno il frumento, il riso, il lino, la barbabietola, la cicoria, la melanzana. È possibile dalla combinazione delle caratteristiche di durata della deiscenza, della vitalità media del polline e della presenza, o meno, di piante selvatiche fare una previsione sulla possibilità di flusso genico in Italia (Tabella 18).

Tuttavia, la sola presenza di parentali selvatiche o inselvaticate non consente di affermare con sicurezza che il trasferimento genico avvenga, come dimostrato da tentativi di trasferimento meccanico del polline contenente un transgene da una melanzana modificata ad una non modificata; queste prove hanno ottenuto risultati positivi in meno dello 0,1% dei casi (A. Spena, Università di Verona, comunicazione personale).

**Tabella 18. Potenziale flusso genico, in Italia, da pianta a pianta (coltivata o selvatica) della stessa specie**

Flusso genico potenziale	Pianta
Nessuno	Mais, fragola, vite, soia, fagiolo, lupino, pisello
Limitato e localizzato	Melanzana, riso, patata, pomodoro, zucchini, trifoglio
Significativo ma localizzato	Girasole, orzo, frumento
Significativo e diffuso	Barbabietola, colza, lattuga, lino, cicoria

Nel caso del pomodoro, della soia e del riso (piante auto-impollinanti) la probabilità che trasferiscano geni ad infestanti o a parentali selvatiche è trascurabile. Nelle piante come il mais, impollinate principalmente dal vento, studi recenti, hanno dimostrato che, a distanza di pochi metri dal bordo del campo, la quantità di polline di mais rilevabile è quasi vicino allo zero (78). Al contrario, le leguminose, anche se mostrano tassi d'ibridazione praticamente nulli, risultano attraenti per gli insetti impollinatori e richiedono pertanto misure d'isolamento appropriate per mantenere basse le frequenze d'ibridazione.

L'ultima caratteristica da valutare è il carattere acquisito con l'inserimento del gene: il gene per la maschio-sterilità non conferirà alcun vantaggio competitivo ad una pianta infestante, altri geni come la resistenza agli erbicidi daranno vantaggi solo in caso di pressione selettiva nelle aree coltivate, mentre il gruppo di geni che conferiscono la resistenza a malattie o a parassiti possono essere vantaggiosi anche per le infestanti.

Valutando l'insieme delle caratteristiche descritte è stato possibile calcolare la probabilità di flusso genico verticale tra organismi sessualmente compatibili nel corso di un esperimento di rilascio deliberato di PGM; nel corso di questo studio che ha preso in esame i rilasci effettuati in Europa è stato osservato che il 91% dei rilasci non ha comportato flusso genico mentre il 9% dei rilasci potrebbe avere determinato un impatto ambientale limitato (79, 80). In questi ultimi casi, è possibile ridurre ulteriormente la probabilità di flusso genico adottando misure di contenimento quali la distanza tra i campi, le trappole per il polline o l'emasculazione. Poiché è stato osservato che il polline transgenico, disperso dagli insetti, in presenza di una trappola vegetale, diminuisce al di fuori del campo coltivato, l'inserimento di una barriera vegetale -di una specie etero specifica non impollinata dagli insetti- intorno ad una coltivazione di piante impollinate dagli insetti, può scoraggiare questi ultimi dal muoversi tra campi limitrofi; un altro tipo di barriera può essere costituito da piante di bordo non GM della stessa specie della pianta GM coltivata che possono assorbire il polline disperso dalle PGM (81-84).

D'altra parte, è noto che in una specie anemofila come il mais, è più importante il numero di piante presenti nel campo che il polline deve attraversare, piuttosto che la distanza. È intuibile che l'aumento della superficie coltivata con la pianta trappola, rispetto alla superficie coltivata con la PGM, aumenta l'efficacia di tale barriera; tuttavia, limitare il flusso genico in questo modo, su scala agronomica, è più difficile perché le piante di bordo sono efficaci nel limitare la dispersione del polline se la superficie da loro occupata è più grande di quella utilizzata per la PGM.

### 9.3. Flusso da piante transgeniche

Come indicato precedentemente, il flusso genico dipende da un numero tale di variabili da non consentire conclusioni univoche: solo la sorveglianza dei campi coltivati con PGM, come previsto dalla normativa europea, potrà fornire i dati necessari ad adottare e le strategie agronomiche più appropriate.

La disponibilità del transgene e di altri marcatori molecolari consentirà di migliorare le conoscenze attuali di agroecologia (85), molti studi hanno comunque confermato che le PGM, per quanto riguarda il flusso genico, si comportano generalmente come le piante non transgeniche (18, 86-109).

Gli effetti dell'ibridazione e dell'introggressione tra PGM e specie selvatiche sono difficili da predire perché la vitalità di un ibrido, contenente il gene derivato dalla PGM, dipenderà sia dal gene inserito sia dall'ecosistema. La maggior parte degli studi ha misurato le frequenze d'ibridazione tra pianta coltivata e controparte non transgenica, al fine di stabilire strategie agronomiche che consentano di ottenere prodotti, contenenti PGM nei limiti consentiti dalle normative, mentre sarebbe molto più importante misurare il livello d'introggressione nelle specie selvatiche e stabilire se tale evento abbia un impatto ecologico significativo.

Nell'Unione Europea è stato stabilito che una distanza di 200 metri, per quasi tutti i tipi di sementi, è il requisito ritenuto sufficiente per ottenere una purezza del 99,9%.

Le distanze stabilite sono il risultato di osservazioni sperimentali, basate sulle modalità d'impollinazione della pianta. Nella soia, ad esempio, l'impollinazione avviene prima che il fiore si schiuda e il polline rimanente sulle antere dopo l'apertura è poco vitale, per cui, anche se il fiore è visitato da insetti, un'impollinazione crociata con parentali selvatiche è un evento molto raro (104).

Nel caso del girasole, il movimento del polline verso altre piante coltivate o selvatiche può raggiungere distanze significative perché le api sono il principale agente impollinatore. Infatti, nel caso di girasoli GM per la tossina Bt si osserva un passaggio del transgene nella popolazione selvatica, con una conseguente diminuzione della presenza degli insetti erbivori nella stessa e l'aumento successivo della produzione di semi (105, 106). Tuttavia altri esperimenti con girasoli, resistenti al fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, hanno dimostrato che tale resistenza non dava particolari vantaggi agli ibridi risultanti in termini di vitalità (107-109). Questo flusso genico è limitato al Nord America, dove esiste ancora il girasole selvatico; in Europa, dove non esiste il girasole selvatico, gli unici girasoli presenti al di fuori dei campi coltivati sono i ricacci delle varietà coltivate.

### 9.3.1. Specie erbacee

Molti studi sono stati effettuati su piante da foraggio perché coltivate estensivamente e capaci, in alcuni casi, di ibridare con facilità con la controparte selvatica (110-112). Oggi, vengono coltivate circa 115 specie erbacee per la produzione di prati, foraggio e controllo dell'erosione del suolo.

Tra le foraggere impollinate dagli insetti, il trifoglio (*Lotus corniculatus*) GM, è in grado di ibridare con la controparte non transgenica posta ad una distanza di 120 metri, mentre lo stesso non forma alcun ibrido con le specie selvatiche *Lotus pedunculatus* e *Lotus tenuis* (113). L'erba medica, al contrario, mentre all'interno del campo coltivato presenta movimenti del polline solo fino a 4 m, all'esterno forma ibridi fino a 1.000 m di distanza (114).

Nel caso della festuca, impollinata dal vento, i risultati sono fortemente influenzati dalle condizioni meteorologiche come dimostrato dalla vitalità del polline che si riduceva al 5% in 30 min, in condizioni soleggiate, mentre in condizioni nuvolose tale valore veniva raggiunto in 240 min (96). Le distanze massime di flusso genico osservate con questa pianta sono state di 75 m (60, 115, 116) mentre frequenze d'ibridazioni minori, pari allo 0,53% ad una distanza di 0 metri, sono state misurate in altre foraggere come l'erba fienarola *Poa pratensis* (117).

L'agrostide (*Agrostis stolonifera*), resistente al glifosato, dava origine ad ibridi con piante sentinella, presenti al di fuori delle zone coltivate, fino a 23 km di distanza. La maggior parte del flusso genico, nella direzione dei venti prevalenti avveniva, però, ad una distanza di 2 km

(118). Poiché in agrostide è stata osservata la formazione di ibridi contenenti il transgene (119) anche al di fuori dei terreni coltivati, questa PGM non è stata autorizzata per la coltivazione.

### 9.3.2. Frumento

Le differenze, che in alcuni casi si osservano nel flusso genico da piante trasformate rispetto a quelle non trasformate, potrebbero essere legate alla localizzazione del transgene nel cromosoma, come nel caso del frumento.

Il frumento da pane *Triticum aestivum* L., esaploide con tre genomi denominati A, B e D, ha in comune il genoma D con la specie *Aegilops cylindrica*, tetraploide con due genomi C e D. Avendo le due specie in comune il genoma D proveniente dalla specie donatrice *Aegilops tauschii*, ci si aspetta che il flusso dei transgeni sia favorito quando il nuovo gene è inserito in questo genoma (120).

In Europa sono presenti 12 delle 22 specie note di *Aegilops* e una specie di grano, *T. monococcum* ssp. *aegilopoides*, localizzate vicino o all'interno delle aree dedicate alla coltivazione del frumento (121). In particolare, cinque specie tetraploidi, *Ae. cylindrica*, *Ae. triuncialis*, *Ae. geniculata*, *Ae. neglecta* e *Ae. biuncialis*, sono diffuse nella maggior parte dei Paesi europei. Sebbene le specie *Triticum* e *aegilops* siano in prevalenza autogame (con l'eccezione di *Ae. speltoides*), il flusso genico è possibile, in presenza di fioritura contemporanea e compatibilità sessuale.

Tuttavia, gli esperimenti di campo hanno dimostrato che la formazione degli ibridi diminuisce drasticamente a distanze superiori a 4 metri (122), anche se alcuni autori hanno osservato qualche incrocio a distanze maggiori (123-125). La formazione degli ibridi è, in questo caso, sfavorita dal fatto che il frumento è una pianta autoimpollinante, nella quale le spighe rimangono aperte per 8-60 minuti, a seconda del genotipo e delle condizioni ambientali (126, 127).

Misure sperimentali hanno dimostrato che il flusso genico tra *T. aestivum* e *Ae. biuncialis* e *Ae. geniculata* era dell'ordine dello 0,3% (128). Tuttavia, il comportamento del frumento transgenico in campo è stato ancora poco studiato, perché mancano metodi affidabili di trasformazione di questa pianta (129). Questo fatto non è sorprendente se si tiene conto che la quantità di DNA del frumento, dopo migliaia di anni di trasformazione, è la maggiore e la più complessa di qualsiasi altra pianta coltivata. Le dimensioni del genoma del frumento da pane sono di circa 13,5 gigabasi contro 3 gigabasi del genoma umano. Tale complessità si ritrova anche negli ibridi tra frumento coltivato e controparti selvatiche. Ibridi tra *Ae. cylindrica* e linee di *Triticum* contenenti il gene *bar* per la resistenza al glufosinato, il gene *kp4* per la resistenza ai funghi e il gene *gna* per la resistenza agli insetti sono stati prodotti trasferendo il polline di *Triticum* a piante di *Aegilops* emasculate (128). Gli ibridi F<sub>1</sub>, così ottenuti, che avevano una fertilità femminile variabile dallo 0,03 allo 0,6%, sono stati reincrociati con piante di *Aegilops*. Il 18% dei nuovi incroci, una volta seminati, ha germogliato e fiorito. Sono stati ottenuti 19 individui di cui solo uno era transgenico e conteneva il gene *bar*, con 43 cromosomi. I rimanenti incroci non erano transgenici e avevano tra 28 e 31 cromosomi con regioni A e D specifiche del frumento.

Nel nord Europa è stata osservata la capacità del frumento di ibridare, a frequenze molto basse, con l'*Hordeum marinum*, ma non con un'altra specie selvatica l'*Elymus caninus* (130). Più significativa è la capacità di ibridare con la Cerere cilindrica, *Aegilops cylindrica*, la cui diffusione in Italia è limitata al Piemonte, Friuli-Venezia Giulia e Puglia (131). Per quanto riguarda il flusso genico, un andamento analogo a quello del frumento è stato osservato nell'orzo GM, con frequenze molto basse a distanze superiori ai 12 metri (132-134).

### 9.3.3. Mais

Nel caso del mais, le infiorescenze maschili e femminili si formano su parti separate della pianta, per cui l'infiorescenza maschile, per favorire la sopravvivenza, produce molti più granuli pollinici di quelli necessari per fecondare una singola pianta. Una singola infiorescenza produce in media  $4,5 \times 10^6$  granuli (135). La maggior parte del polline, trasportato dal vento, cade entro 5 metri dal punto di deiscenza, perché i granuli pollinici hanno dimensioni e peso tali da rendere difficile il trasporto degli stessi da parte delle correnti d'aria (136).

Lo studio di sette diversi mais transgenici, contenenti la tossina Bt, ha confermato questo fatto con l'84-92% del polline caduto al suolo all'interno di tale distanza, e il 96-99% caduto al suolo entro la distanza di 25 metri, misurati nella direzione del vento prevalente (137). Risultati molto simili sono stati ottenuti in diversi studi che hanno misurato il grado d'ibridazione con la distanza (62, 138-150). La percentuale d'ibridazione di un mais GM con altro mais, coltivato nelle vicinanze, dipenderà da molti fattori come la profondità del campo coltivato in relazione ai venti dominanti, la distanza d'isolamento, le barriere locali al flusso genico, il clima e la topografia (146). Inoltre, i mais GM commerciali sono degli ibridi  $F_1$ , ottenuti incrociando un genitore transgenico e un genitore non transgenico. Ne risulta che il transgene nell'ibrido si trova in condizione di eterozigosi (emizigosi), per cui solo la metà dei suoi granuli pollinici conterrà il transgene e lo stesso avverrà per gli eventuali ibridi che si dovessero formare. Il mais, a differenza del suo progenitore, il teosinte, non rilascia semi nell'ambiente, il che previene la possibilità che sfugga alla coltivazione e ridiventi selvatico (6).

### 9.3.4. Colza

Nel caso della colza il flusso genico è stato largamente studiato per le distanze di dispersione del polline e per la complessità dei meccanismi coinvolti, il cui risultato è la competizione tra il vento, le api (*Bombus* spp. e *Apis mellifera*) e l'autoimpollinazione.

La colza (*Brassica napus* L., genoma AACC,  $2n = 38$ ) è un ibrido naturale tra due specie diploidi, la rapa *B. rapa* L. (AA,  $2n = 20$ ) e il cavolo *B. oleracea* L. (CC,  $2n = 18$ ). Vi sono popolazioni selvatiche di entrambi i progenitori anch'essi coltivati su larga scala.

Altre specie coltivate correlate con cavolo e rapa sono la senape etiope *B. carinata* (BBCC,  $2n = 34$ ), la senape nera *B. nigra* (BB,  $2n = 16$ ) e la senape marrone *B. juncea* (AABB,  $2n = 36$ ). Tuttavia, nonostante le evidenti correlazioni genetiche, non sono mai state osservate popolazioni di colza, o colza-simili, selvatiche. Alla tribù delle brassicacee appartengono 235 specie, 14 delle quali sono presenti in Europa nelle aree di coltivazione della colza (150, 151). Le più frequenti in Italia sono *Raphanus raphanistrum* L. ( $2n = 16$ ), *Brassica nigra* L. Koch ( $2n = 16$ ), *Sinapis arvensis* L. ( $2n = 18$ ), *Sinapis alba* L. ( $2n = 24$ ), *Hirschfeldia incana* (L.) Lagrèze-Fossat ( $2n = 14$ ) e *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC ( $2n = 22$ ), una specie quest'ultima fondamentalmente autogama.

Tutti i tipi di colza GM commercializzati finora sono tolleranti gli erbicidi. La dispersione di questi geni per la tolleranza, considerata la presenza delle specie selvatiche compatibili, potrebbe essere un problema considerevole nei sistemi agricoli potendo favorire la comparsa d'infestanti e spontanee tolleranti gli erbicidi.

Ibridi fertili interspecifici sono stati ottenuti in campo aperto tra *B. napus* transgenica, *B. campestris* e forme selvatiche di *B. rapa* (151-154). Dopo due generazioni d'ibridazione e re-incestro sono state ottenute delle piante *B. campestris*-simili, contenenti il transgene. Tuttavia, nelle generazioni successive è stata osservata una rapida diminuzione degli ibridi transgenici (155). Questo risultato è confermato anche dal fatto che la prima generazione d'ibridi, ottenuta

dagli ibridi transgenici F<sub>1</sub>, aveva una minor capacità fotosintetica e una minor vitalità riproduttiva, rispetto alla *B. napus* transgenica e alla selvatica *B. rapa* (156).

Il flusso genico richiede, oltre alla compatibilità genetica, anche la sincronizzazione della fioritura, il successo della fecondazione e la vitalità della progenie (157) condizioni che sono state osservate nel caso della colza, tollerante l'erbicida, con il *Raphanus raphanistrum* L. (24, 160). Tuttavia, le frequenze d'incrocio variavano da 10<sup>-7</sup> a 3x10<sup>-5</sup>, con le frequenze più alte osservate ai margini del campo coltivato. Frequenze molto basse sono state osservate anche in altri esperimenti di campo con una diversa impostazione agronomica (160-191) e in esperimenti su larga scala. Questi risultati, secondo alcuni autori (192, 193), che ritengono significativa la formazione spontanea d'ibridi tra specie coltivate e specie selvatiche, potrebbero anche essere dovuti ad una incompatibilità genetica locale tra specie diverse (194-199).

Basse frequenze d'ibridazione sono state osservate anche cambiando la modificazione genetica studiata. La colza, resa resistente agli insetti con l'introduzione del gene Bt, si comporta come la colza tollerante l'erbicida (200-203).

A causa di queste possibilità, sono state studiate delle strategie per ridurre al minimo il flusso genico. L'uso di zone spoglie intorno al campo coltivato è molto utile, poiché 10 m sono sufficienti per contenere la maggior parte del flusso genico dovuto al polline (204-208); 5 m sono sufficienti per ridurre il flusso genico di un terzo. Gli insetti invece non sono sensibili alla presenza di zone spoglie, ma reagiscono alle dimensioni dell'area coltivata dato che le loro visite ai fiori di colza diminuiscono con l'ampiezza dell'area stessa (209). Tuttavia, gli insetti impollinatori hanno comportamenti differenti secondo il taxa cui appartengono. Le api mellifere preferiscono la colza al ravanello selvatico, che è più visitato da *Bombus lapidarius*; il *Bombus terrestris* preferisce la colza. In generale, i bombi visitano i fiori con maggior frequenza delle api (209-211).

In base a quanto indicato nei lavori esaminati si possono trarre le seguenti conclusioni: il flusso genico da campo coltivato ad altro campo coltivato è piuttosto basso; il flusso genico aumenta con l'aumentare del numero di piante maschio-sterili; il flusso genico è più alto nelle varietà seminate in inverno che in quelle seminate in primavera (212). Visto il numero limitato di api presenti sulle varietà invernali, si può concludere che è il vento il maggior responsabile del flusso genico sulle grandi distanze, mentre gli insetti sono responsabili del flusso su piccole distanze (178).

Il Paese con la maggior esperienza sugli effetti del flusso genico nella colza è il Canada, dove sono disponibili 4 varietà resistenti agli erbicidi, tre transgeniche, resistenti rispettivamente a glifosato, glufosinato e bromoxynil e una non transgenica resistente all'imidazolinone (212).

Al fine di controllare le infestanti, gli agricoltori canadesi ruotano la varietà coltivata ogni 4 anni. La colza ha dei semi molto piccoli che possono essere perduti nel terreno al momento del raccolto in ragione di 3,5 semi/m<sup>2</sup> (215). Questi semi danno origine l'anno successivo a ricacci che non possono essere distinti dalle piante coltivate. Se i semi dispersi sono transgenici, si può avere fino al 22% d'ibridi transgenici all'interno del campo coltivato l'anno successivo (216).

La presenza dei ricacci, insieme all'impollinazione mediata dal vento e dagli insetti, ha portato alla comparsa di resistenze multiple nella stessa pianta. Varietà selvatiche resistenti agli erbicidi sono state ritrovate sia in Canada che in Giappone lungo le vie di trasporto della colza (214, 215). La colza con resistenze multiple rimane, però, sensibile agli erbicidi chimici convenzionali (216).

Sebbene, la comparsa di resistenze multiple abbia preoccupato molto i produttori di colture biologiche, i produttori convenzionali considerano che i benefici risultanti dall'uso della colza transgenica, in termini di risparmi nell'uso dei diserbanti, nella mancanza di aratura, e nel risparmio di carburante superino i rischi (approfondimenti possono essere reperiti al sito del *Canola Council of Canada*, <http://www.canola-council.org>). È evidente, quindi, che la

coltivazione della colza resistente agli erbicidi debba essere comunque condotta alla presenza di un monitoraggio ambientale adeguato.

### 9.3.5. Barbabietola

Tutte le varietà coltivate derivano dalla sottospecie *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, mentre *Beta vulgaris* ssp. *maritima* è il progenitore selvatico diffuso nel Mediterraneo e nelle coste atlantiche dell'Europa, del Medio Oriente e dell'India; una seconda sottospecie selvatica, *B. vulgaris* ssp. *adenensis*, è invece diffusa tra la Grecia e la Siria. Varietà coltivate sono la bietola (*cicla*), il cardo (*cicla* var. *flaviscens*) e la barbabietola da zucchero che è la più importante dal punto di vista agroeconomico.

La barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris*) si può trovare coltivata, selvatica e anche infestante con le tre forme capaci di ibridare tra loro (217-224); è una pianta biennale e sia la specie coltivata *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*, che la specie selvatica *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima*, devono svernare per poter produrre polline e semi. In generale, la barbabietola viene raccolta nel primo anno di coltivazione, prima della fioritura, che avviene nel secondo anno.

Le linee GM di barbabietola sono capaci di svernare nei climi dell'Europa centrale e orientale (224, 225), la specie selvatica è diffusa nelle regioni costiere con un clima invernale mite. In Italia, ad esempio, è diffusa nel delta del Po e nella laguna veneta, vicino alle aree dedicate alla produzione della specie coltivata, presente prevalentemente nella provincia di Ferrara. Tale diffusione geografica ha fatto sì che vi sia stato circa un secolo di flusso genico tra le due specie, senza che tale flusso abbia alterato la diversità genetica della specie selvatica in Italia (226-228); osservazioni simili sono state fatte anche in Francia (229). Va considerato che il rapporto tra numero di piante coltivate e numero di piante selvatiche, nell'area costiera dell'Emilia Romagna e del Veneto è di circa 10.000 a 1 (230).

Livelli molto bassi di flusso genico sono stati trovati anche in altri ambienti geografici (231-234), mentre in Ucraina, dove accanto alla selvatica *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* cresce anche una selvatica derivante da *Beta trigyna*, è stato misurato un flusso genico significativo. In questo studio, però, non è stato considerato il flusso dovuto alla secolare coltivazione di *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* (232).

Uno studio di monitoraggio, condotto per 6 anni, su due varietà di barbabietola GM, una resistente al glifosato, l'altra resistente al glufosinato, ha dimostrato che il flusso genico verso le controparti selvatiche rimane basso, intorno allo 0,4%, con qualche ibrido transgenico osservato oltre 100 m dalle piante transgeniche coltivate (233) ed è possibile diminuire la probabilità di dispersione del transgene inserendolo in linee impollinatrici tetraploidi (234).

### 9.3.6. Riso

Il riso coltivato (*Oryza sativa* L.) è una pianta autogama nella quale la maggior parte del polline ricade sullo stigma dello stesso fiore. La concentrazione del polline, rilasciato nell'aria, è molto bassa: da 95 granuli/m<sup>3</sup> a 380 granuli/m<sup>3</sup> (235). Il genere *Oryza*, comprende anche un'altra specie coltivata *Oryza glaberrima*, addomesticata in Africa e oltre 20 specie selvatiche largamente distribuite nelle aree tropicali e subtropicali. In questo genere vi sono dieci genomi differenti (AA, BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, JJHH, JJKK) che rappresentano una barriera riproduttiva efficace.

Il riso coltivato ha il genoma AA in comune con 6 specie selvatiche di *Oryza* (compresa un'infestante) per cui l'ibridazione avviene naturalmente tra il riso coltivato e le sue controparti selvatiche strettamente correlate. Tuttavia, la scarsa vitalità, il peso elevato e il limitato



movimento orizzontale del polline fanno sì che una distanza di 10 metri è considerata sufficiente per evitare la contaminazione tra campi limitrofi (236). In esperimenti con il riso resistente all'erbicida, il flusso genico era dello 0,01% a 5 metri dalla pianta transgenica, in accordo con quanto osservato anche per il riso non GM (237).

In Italia, la coltivazione del riso è accompagnata da un'infestante: il riso crodo *Oryza sativa* L. var. *sylvatica* Chiappelli (o riso rosso), il cui aspetto è molto simile a quello del riso coltivato. La caratteristica principale del riso crodo è la tendenza delle cariossidi a staccarsi dalla pannocchia e a cadere al suolo prima della raccolta del riso. La presenza di riso crodo nelle risaie ha serie conseguenze per gli agricoltori; comporta, infatti, una perdita di produzione che, in caso di elevata diffusione della pianta infestante nei campi, può portare ad una elevata riduzione dei profitti. Si calcola infatti, che la presenza di sole 10 piante di riso crodo al m<sup>2</sup>, possa provocare perdite di resa pari ad 1/4 del raccolto potenziale.

Distinguere la pianta infestante dal riso coltivato è piuttosto semplice: il riso crodo è solitamente più alto e le sue pannocchie si notano facilmente nella risaia; altra caratteristica distintiva di questa malerba è la colorazione rossastra del pericarpo. È comunque necessario sottolineare, che in alcuni casi, il riso crodo può crescere ad un'altezza molto simile a quella del riso coltivato e la colorazione delle cariossidi può assumere tonalità comprese tra il rosso e il bianco. Il riso coltivato ibrida facilmente con il riso selvatico crodo producendo degli ibridi fertili. Inoltre, essendo i tratti selvatici dominanti, il riso selvatico incrociandosi con un transgenico può diventare transgenico a sua volta (33, 237-258).

La maggior parte degli studi concorda sul fatto che il flusso genico nel riso è inferiore all'1%. Tuttavia, una volta che si siano formati gli ibridi, questi possono introgradire nella popolazione del riso crodo in poche generazioni. Gli ibridi di crodo divenuti resistenti all'erbicida possono competere con successo con il complesso riso coltivato-malerba. La capacità di sopravvivere all'applicazione degli erbicidi darebbe un forte vantaggio competitivo a questi ibridi. L'ibridazione naturale tra il riso coltivato a Taiwan, *Oryza rufipogon* ssp. *formosana*, e la specie selvatica è stata, ad esempio, la causa della quasi estinzione di quest'ultima (3). I valori del flusso genico misurati nelle piante di riso transgenico, indicano chiaramente che un piccolo passaggio di geni al riso crodo può avvenire. Se il riso selvatico acquisisse la resistenza all'erbicida, questo fenomeno potrebbe avere serie conseguenze ambientali e per le pratiche agronomiche, per cui, in caso di rilascio, devono essere adottate delle opportune strategie di monitoraggio, e di gestione della coltivazione, come il controllo della tempistica di fioritura del riso coltivato rispetto al selvatico.

### 9.3.7. Cotone

Nel cotone si conoscono 7 genomi denominati A, B, C, D, E, F e G. Il genoma A si trova solo in due specie diploidi presenti in Europa: il *Gossypium arboreum* e il *G. herbaceum*, mentre il genoma D si trova solo in alcune specie come il *G. thurberi* presenti in America. Le specie di cotone maggiormente coltivate negli USA: *G. barbadense*, *G. hirsutum* e *G. tomentosum*, essendo tetraploidi potrebbero essere il risultato di un antico incrocio tra i genomi A e D, quando e come ciò sia potuto avvenire, è ancora materia di studio.

Le specie tetraploidi selvatiche del nuovo mondo crescono nelle aree disturbate vicino all'oceano come infestanti; da queste infestanti si sono sviluppate le specie coltivate. Il flusso genico potrà aver luogo solo verso le specie con le caratteristiche genomiche appropriate e cioè con genomi A e D. Nel caso degli USA, questo fenomeno può riguardare le specie coltivate *G. barbadense* e *G. hirsutum*. Il flusso tra le specie coltivate è possibile grazie alla presenza d'insetti impollinatori quando la distanza tra pianta transgenica e pianta ricevente è breve. Sebbene *G. tomentosum* e *G. hirsutum* siano geneticamente compatibili, in genere non vi è

flusso genico perché i fiori di *G. tormentosum* sono ricettivi solo di notte e vengono impollinati dalle falene (259).

Le specie selvatiche sono assenti in alcune aree geografiche quali l'Australia, dove è stata studiata la probabilità che il cotone coltivato potesse diventare una infestante capace di ibridare con altre specie coltivate (260, 261). Tale possibilità si è dimostrata inesistente per le particolari condizioni climatiche e per la competizione con altre specie presenti nell'unica area in cui questo evento avrebbe potuto essere possibile (262).

Specie selvatiche sono invece presenti in Brasile (263, 264) e negli Stati Uniti (265). Tuttavia, la frequenza d'ibridazione diminuisce rapidamente con la distanza fino a scendere allo 0,03% a 50 m, proprio perché il cotone è generalmente autoimpollinante (262, 265, 266).

Risultati simili sono stati ottenuti in esperimenti condotti in Cina (267-270) e in Australia (271). In questa pianta, come nelle altre specie autoimpollinanti, sembra più facile minimizzare il rischio del flusso genico aumentando le distanze di sicurezza, analizzando la direzione dei venti prevalenti e la presenza d'insetti impollinatori.

### 9.3.8. Patata

Sulle effettive distanze d'impollinazione nella patata, per la quale la propagazione è asessuata e clonale, ci sono poche informazioni. Questa pianta è fondamentalmente autoimpollinante e il vento gioca un ruolo minimo sulla dispersione del polline con una distanza osservata da un minimo di 3 metri ad un massimo di 10 m (272-278).

La disponibilità di patate transgeniche ha stimolato la valutazione della dispersione del polline al fine di stabilire distanze di sicurezza adeguate. Questi lavori, fatti con transgeni diversi, hanno dimostrato che il flusso genico dalle PGM a quelle selvatiche compatibili era del 24% tra piante a stretto contatto (foglia contro foglia), del 2% a 10 metri e dello 0,01% a 20 metri. Distanze maggiori sono state osservate quando la pianta ricevente era una patata non trasformata e in presenza d'insetti impollinatori (278), tuttavia, per ragioni d'incompatibilità o di ploidia, il flusso da patate transgeniche verso le specie selvatiche dipende dalla regione di coltivazione; tale flusso è, infatti, trascurabile in Costa Rica, significativo in Messico (279) e dipendente dalla pianta selvatica esaminata in Perù (280). Il flusso genico da specie coltivate a selvatiche è in pratica inesistente in Europa dove gli ibridi tra la patata coltivata *Solanum tuberosum*, tetraploide, e le selvatiche *S. nigrum* e *S. dulcamara*, entrambe diploidi, sono sterili (281, 282).

### 9.3.9. Girasole

Il girasole (*Helianthus annuus* L.) è una pianta nativa del Nord America che viene impollinata dalle api selvatiche e domestiche ed è nota la capacità della specie coltivata di ibridare con le selvatiche isogeniche. La più alta percentuale (27%) di flusso genico è stata osservata con le selvatiche piantate ai margini della zona coltivata, a 3 m di distanza, ma un flusso genico è stato misurato anche ad 1 km di distanza dalla specie coltivata (25, 109, 283-289). Nel corso di questi studi è emerso che il flusso genico portava a ibridi stabili per più generazioni (17, 284).

L'analisi fenotipica degli ibridi ha dimostrato un gradiente di selezione tra gli alleli della specie coltivata e quelli della pianta selvatica dipendente dalla localizzazione geografica (110, 285, 286). Nel caso del girasole, la coltivazione commerciale di piante transgeniche potrebbe alterare profondamente l'equilibrio ecologico nelle sue zone d'origine (17, 286-289).

### 9.3.10. Soia

La soia è una pianta annuale originaria dell'Asia centro-orientale, in Europa è coltivata soprattutto in Francia e Italia. È una delle più importanti piante alimentari per la ricchezza dei semi in olio (18-20%) e, soprattutto, in proteine (40%). Essendo una pianta fondamentalmente autoimpollinante, vi sono pochi studi sul flusso genico, limitati al flusso tra pianta transgenica e controparte non transgenica. In Giappone, la formazione d'ibridi era pari allo 0,19% a distanze inferiori ad 1 m (290). Risultati simili sono stati ottenuti in Brasile (291-293) e in Cina (294), mentre in Romania non è stato misurato nessun flusso genico (295).

### 9.3.11. Alberi

In laboratorio sono state trasformate finora circa 33 specie di alberi per inserire caratteri quali la tolleranza agli erbicidi, la resistenza agli insetti e agli stress abiotici, per apportare modifiche alla qualità e alla quantità di fibra, per modificarne la crescita e lo sviluppo riproduttivo. A parte questa varietà di ricerche, la maggior parte delle sperimentazioni in campo aperto è stata effettuata solo per valutare la tolleranza all'erbicida, la resistenza agli insetti e le modifiche nel contenuto di lignina.

La valutazione dell'impatto ambientale determinato dal rilascio di alberi GM è resa difficile dai lunghi tempi di crescita degli alberi e dai limiti imposti dal trasferimento dei risultati ottenuti su piccoli appezzamenti di terreno alla scala più estesa delle coltivazioni boschive (296-312). Anche nel caso degli alberi, per stimare il flusso genico, è necessario valutare la velocità del vento, la concentrazione del polline e la sua velocità di deposizione sopra e sotto le impalcature vegetali eterogenee nonché la dispersione dei semi, soprattutto quando questi sono piccoli e possono essere trasportati a molti chilometri di distanza. Nel caso delle conifere, con questo processo di dispersione dei semi su grandi distanze (308, 309) è possibile prevedere (con una certezza del 100%) la presenza di semi transgenici a più di 1 km di distanza (310).

Studi condotti nel nord della Cina su una specie di pioppo (*Populus nigra*) reso resistente agli insetti con l'inserimento della tossina del *Bacillus thuringiensis*, hanno permesso di osservare che il flusso genico era del 3 per mille a 500 metri di distanza dai pioppi GM, ma i semi transgenici prodotti non sopravvivevano per più di due settimane nel suolo (307).

I problemi connessi con il rilascio degli alberi GM possono essere ridotti effettuando sperimentazioni su larga scala con PGM, quali il pioppo od il pino modificati per il diverso contenuto in lignina, che pongano pochi problemi in termine di dispersione dei geni e di impatto su organismi bersaglio (311, 312).

Gli alberi, inoltre, per quanto riguarda la valutazione del rischio, sono molto diversi dalle piante coltivate sia per la molteplicità degli ecosistemi in cui vivono che per la lunga durata della vita. Infatti, il tempo necessario per raggiungere la maturità è così lungo da rendere praticamente impossibile l'utilizzo delle tradizionali tecniche di incrocio per modificarne le caratteristiche; a questo scopo sono più adatte le modificazioni genetiche, per cui diventa necessario, come ha deciso di fare l'Europa, sviluppare nuovi strumenti conoscitivi per valutare la biosicurezza degli alberi transgenici.

### 9.3.12. Vite

Il polline della vite è piuttosto piccolo (diametro di 17-28  $\mu\text{m}$ ) come accade per le specie impollinate dal vento (313) e nelle quali le visite di insetti impollinatori sono un evento raro.

Nella vite il rilascio del polline dura circa 5 settimane, tra maggio e luglio, in base al clima della zona di coltivazione, ma la quantità di polline rilasciata è piuttosto bassa.

In Trentino, uno studio durato 5 anni, ha dimostrato che la somma annuale dei pollini rilasciati variava da 325 a 755 granuli per m<sup>3</sup> e che la produzione aumentava con l'aumentare del numero dei pollini (314). Osservazioni simili sono state fatte anche in Portogallo, dove la concentrazione del polline di *Vitis vinifera*, in una regione dedicata alla coltura della vite, era solo l'1,3-1,6% dei pollini totali presenti in un m<sup>3</sup> d'aria (315, 316).

Nella vite, il flusso genico è dell'ordine del 2% a 10 m di distanza dal maschio donatore di polline, anche se il polline può essere trovato anche a 150 m dalla pianta di origine (317, 318). Gli stessi risultati sono stati ottenuti quando il donatore di polline era una vite GM (319). Questi risultati non destano preoccupazione perché nella vite il flusso del transgene può essere evitato modificando geneticamente solamente il portainnesto che produce la proteina transgenica d'interesse e la distribuisce alla varietà innestata (320, 321).

### 9.3.13. Altre piante

Le misure di flusso genico nel melo hanno dato risposta positiva per l'1,6% di tutti i semi raccolti fino ad una distanza di 100 metri dalla pianta donatrice del polline (322).

In un altro esperimento, condotto in assenza di api, il flusso era invece limitato ad 1 m di distanza dalla sorgente (323). In questo caso, nel mettere a punto una strategia di contenimento, occorre però ricordare che la maggior parte delle varietà di melo coltivate ha la necessità di essere fecondata dal polline di una varietà diversa che abbia contemporaneità di fioritura. Questo fatto porta ad un frutto eterozigote e riduce la frequenza del flusso genico.

Nel caso del sorgo, in Sud Africa dove vi è presenza di piante selvatiche e infestanti compatibili, la probabilità di outcrossing è alta, anche se a distanze di 150 metri dal transgenico il flusso rilevato è solo dello 0,06% (324, 325).

Preoccupazioni simili sorgono con le piante di fagiolo in Mesoamerica (centro di provenienza e domesticazione); infatti in questa specie il flusso genico dal fagiolo coltivato a quello selvatico è tre volte più alto di quello che avviene in direzione contraria (28, 326).

In una pianta autogama come il miglio, la capacità di fecondare una pianta compatibile è stata osservata fino a 40 m di distanza (327). Interessanti sono i risultati ottenuti nel corso di studi sul flusso genico effettuati su piante di lampone ottenute con selezione tradizionale coltivate per 30 anni in campi sperimentali e per 21 anni in campi coltivati: in entrambi i casi i geni messi sotto osservazione non sono stati ritrovati né in aree limitrofe né in quelle lontane dalle coltivazioni (328).

Altre piante transgeniche coltivate commercialmente su scala ancora limitata sono la papaia, il pomodoro e la zuccina. Analisi sul flusso genico nella papaia (*Carica papaya*), modificata per la resistenza a virus, hanno dimostrato che il flusso era dovuto non al movimento del polline quanto alla presenza sul terreno di semi transgenici avventizi, confermando che questa pianta non ibrida naturalmente con le specie selvatiche (329-330).

Il pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), in campo aperto, non dà origine a flussi genici significativi (331-333) mentre la zuccina (*Cucurbita pepo*) può ibridare molto facilmente con le specie selvatiche (334-336), come si è visto negli USA dove la specie è coltivata in stretta prossimità delle varietà selvatiche *C. pepo* var. *ozarkana* e *C. pepo* var. *texana* (337).

### 9.3.14. Un caso particolare di flusso genico: transgeni nella varietà tradizionali di mais in Messico

Il caso esplose nel 2001, quando Quist e Chapela dell'Università di California a Berkeley, pubblicarono su *Nature* di aver individuato i geni provenienti da mais transgenico in quattro pannocchie di mais, raccolte nel 2000 nello Stato di Oaxaca, nel Messico, centro di origine del mais stesso (338).

Questa scoperta rappresentò una vera sorpresa poiché le autorità messicane avevano stabilito – fin dal 1998 – una moratoria sull'uso commerciale di mais GM. Questa situazione fu spiegata con l'uso illegale di semi PGM da parte degli agricoltori messicani. Ma ancora più preoccupante fu il fatto che Quist e Chapela non trovarono i transgeni posizionati come nel mais transgenico, ma in posizioni casuali sui cromosomi, dato che suggeriva che i transgeni potevano muoversi modificando il normale funzionamento degli altri geni. Questi dati vennero utilizzati da diversi gruppi ambientalisti, come Greenpeace, per chiedere il bando di tutte le PGM.

Una vera e propria controversia insorse quando alcuni biologi molecolari misero in discussione i risultati dello studio soprattutto per quanto riguardava la mobilità dei transgeni (339, 340) sostenendo che il metodo utilizzato poteva fornire falsi positivi. *Nature* di fronte a queste critiche chiese agli autori di presentare ulteriori dati usando tecniche analitiche differenti. I due autori lo fecero (341) senza però convincere gli editori, che dichiararono che il lavoro originale non doveva essere pubblicato:

“In our 29 November issue, we published the paper “Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico” by David Quist and Ignacio Chapela. Subsequently, we received several criticisms of the paper, to which we obtained responses from the authors and consulted referees over the exchanges. In the meantime, the authors agreed to obtain further data, on a timetable agreed with us, that might prove beyond reasonable doubt that transgenes have indeed become integrated into the maize genome. The authors have now obtained some additional data, but there is disagreement between them and a referee as to whether these results significantly bolster their argument. In light of these discussions and the diverse advice received, *Nature* has concluded that the evidence available is not sufficient to justify the publication of the original paper. As the authors nevertheless wish to stand by the available evidence for their conclusions, we feel it best simply to make these circumstances clear, to publish the criticisms, the authors' response and new data, and to allow our readers to judge the science for themselves” (nota alle referenze 339 e 340).

Nel frattempo, i ricercatori del CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*, che detiene una delle più larghe collezioni di varietà maidicole tradizionali messicane) avevano verificato che la loro collezione era priva di transgeni. Mentre i ricercatori dell'Istituto Nacional de Ecología di Mexico City presentavano i dati, da confermare, relativi alla presenza di un 5% di transgeni nelle varietà locali, raccolte ad Oaxaca nel 2000 e 2001 (342).

Per confermare questi risultati, gli stessi ricercatori raccolsero pannocchie e semi in 18 diverse località nel periodo novembre-dicembre 2003 e 2004. In ogni località furono campionati da uno ad otto campi, scegliendo casualmente 4/5 piante che non crescevano vicine. Nel 2004, furono selezionate piante “stressate”, assumendo che gli ibridi tra mais transgenico e varietà locali sarebbero stati meno adatti alle condizioni locali di coltivazione.

I semi raccolti sono stati analizzati da un laboratorio negli USA e uno in Messico, capaci di identificare un seme transgenico in un campione omogeneizzato di 10.000 semi: le analisi non hanno evidenziato traccia di transgeni in questi semi prelevati nello stato di Oaxaca (343). La discrepanza nei risultati può essere dovuta alle differenze nei metodi analitici impiegati, ad un campionamento eseguito in un'area geografica troppo ristretta (344) o alla dinamica del

movimento dei semi (345). Infatti, ricerche successive hanno evidenziato la presenza di transgeni nelle varietà tradizionali di mais sia in Oaxaca sia in altre aree del Messico (346, 347).

Quindi, nonostante i loro metodi fossero sbagliati, Quist e Chapela avevano avuto ragione proprio a causa delle pratiche messe in atto dai piccoli agricoltori messicani che scambiano abitualmente i loro semi migliori per ottenere le cultivar da ripiantare l'anno successivo.

Quest'abitudine porta ad un flusso costante di materiale genico tra comunità anche molto distanti tra loro (348). Negli anni le varietà locali sono state usate dagli agricoltori per generare nuove miscele varietali e materiali creolizzati, che sono incroci tra le varietà moderne migliorate e le varietà locali, generando così nuova biodiversità. Tuttavia, misure, effettuate nelle regioni messicane di coltivazione del mais, hanno dimostrato che il mais resistente agli insetti non presenta rischi ecologici significativi (349, 350).

## 9.4. Conclusioni

In generale, tutte le osservazioni sperimentali condotte finora, indicano che il livello di flusso genico decresce, non solo con la distanza, ma anche con la profondità del campo convenzionale e con l'aumento delle dimensioni del campo transgenico; tuttavia, nel caso del flusso genico mediato dal vento, giocherà un ruolo, la forma del Paesaggio e l'orientamento reciproco del campo convenzionale rispetto a quello transgenico, insieme alle variazioni d'intensità dei venti verticali (351-354). Altri fattori da considerare sono la presenza di altre sorgenti di polline transgenico e l'uso finale della pianta coltivata. Ad esempio, nel caso del mais per foraggio, la diluizione delle miscele impiegate ridurrà la presenza avventizia di transgenico e quindi le distanze d'isolamento necessarie per rispettare le soglie europee (355).

Le misure sperimentali effettuate e le coltivazioni su larga scala adottate da molti Paesi non confermano le ipotesi che i transgenici possano, attraverso i pollini o la dispersione dei semi, rendere le specie compatibili invasive o che i transgeni possano dall'ospite ricevente passare in seguito ad altre specie che, a loro volta, diventeranno invasive. Il flusso genico è continuo in natura ed è responsabile della creazione di nuove combinazioni di geni, tanto che l'ibridazione è stata proposta come un passo importante per l'evoluzione delle piante (356) e dell'insorgenza di proprietà infestanti (357). L'esame della letteratura disponibile non consente di stabilire criteri generali d'invasività, al contrario molti dati su questa caratteristica potrebbero non essere ripetibili se analizzati al di fuori delle condizioni sperimentali nelle quali sono stati ottenuti.

Non sembra, quindi, necessario che le caratteristiche transgeniche inserite (resistenza agli insetti, ai patogeni, tolleranza allo stress, resistenza agli erbicidi, resistenza a virus) debbano essere valutate in modo differente dalle stesse caratteristiche naturalmente presenti in piante estranee quando introdotte in un nuovo ambiente. Ad oggi, le piante transgeniche sono ottenute da piante che hanno una lunga storia di addomesticamento e che sono state selezionate per caratteristiche che potrebbero dimostrarsi svantaggiose qualora tali piante venissero abbandonate a se stesse in natura (358, 359).

Le linee guida sulla valutazione d'impatto ambientale dell'EFSA, tuttavia, richiedono una valutazione della capacità invasiva; valutazione che può essere basata sull'esperienza, sulla storia della coltivazione della specie in esame e sul suo areale geografico. Questi tre elementi ci dicono che la possibilità per una pianta coltivata di diventare "selvatica" sono molto improbabili (360). Tuttavia, non conosciamo quali sono gli stadi critici nel ciclo vitale della pianta che ne possono favorire la crescita al di fuori delle aree coltivate. L'incertezza scientifica, però, non è la stessa cosa della percezione di un eventuale rischio. In altre parole, è ragionevole concludere che l'osservazione empirica ci dice che le piante coltivate rimangono addomesticate e non diventano infestanti.

## Bibliografia

1. Rissler J, Mellon M. Perils amidst the promise. *Ecological risks of transgenic crops in a global market*. Cambridge, MA: Union of Concerned Scientists; 1993.
2. McNeely JA. The problems with invasive alien species, and implications for GMOs. In: Ministero dell'ambiente e della tutela del territorio, International Center For Genetic Engineering and Biotechnology (Ed.) *Collection of Biosafety Reviews vol. 2*. Trieste; 2005, p. 10-31.
3. Ellstrand NC, Prentice C, Hancock JF. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu Rev Ecol Syst* 1999;30: 539-63.
4. Raybould AF, Gray AJ. Genetically modified crops and hybridisation with wild relatives: a UK perspective. *J Appl Ecol* 1993;30(2):199-219.
5. De Vries FT, van der Meijden R, Brandenburg WA. Botanical files: a study of real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. *Gorteria Supplement*. 1992;1:1-100.
6. Warwick SI, Stewart CN. Crops come from wild plants - How domestication, transgenes, and linkage together shape fertility. In: Gressel J (Ed.). *Crop Fertility and Volunteerism*. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 9-30.
7. Holm LJ, Plunket DL, Pancho JV, Hershberger JP. *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. Honolulu: University Press of Hawaii; 1977.
8. Holm LJ, Doll J, Holm JV, Holm E, Pancho JV, Hershberger JP. *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. New York: John Wiley and Sons; 1997.
9. Jenczewski E, Ronfort J, Chèvre A-M. Crop-to-wild gene flow, introgression and possible fitness effects of transgenes. *Environ Biosafety Res* 2003;2(1):9-24.
10. Ramsey J, Schemske DW. Pathways, mechanisms and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Am Rev Ecol Syst* 1998;29:467-501.
11. Boudry P, Mörchen M, Saumitou-Laprade P, Vernet P, van Dijk H. The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets. *Theor Appl Genet* 1993;87(4): 471-8.
12. Metz PL, Jacobsen E, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ. The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in interspecific *B. rapa* x *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theor App Genet* 1997; 95(3):442-50.
13. Small E. Hybridisation in the domesticated-weed-wild complex. In: Grant WF (Ed.). *Plant Biosystematics*. Toronto: Academic Press; 1984. p. 195-210.
14. Hauser TP. Frost sensitivity of hybrids between wild and cultivated carrots. *Conservation Genetics* 2002;3(1):75-8.
15. Landbo L, Jørgensen RB. Seed germination in weedy *Brassica campestris* and its hybrids with *B. napus*: Implications for risk assessment of transgenic oilseed rape. *Euphytica* 1997;97(2):209-16.
16. Alexander HM, Cummings CL, Kahn L, Snow AA. Seed size variation and predation of seeds produced by wild and crop-wild sunflowers. *Am J Bot* 2001;88(4):623-7.
17. Snow AA, Moran-Palma P, Rieseberg LH, Wszelaki A, Seiler GJ. Fecundity, phenology, and seed dormancy of F<sub>1</sub> wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Am J Bot* 1998;85(6):794-801.
18. Burke JM, Rieseberg LH. Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 2003;300:1250.
19. Bartsch D, Lehnen M, Clegg J, Pohl-Orf M, Schuphan I, Ellstrand NC. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Mol Ecol* 1999;8(10):1733-41.

20. Areola PE, Ellstrand NC. Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: persistence of crop genes in wild populations. *Ecol Appl* 1997; 7(2):512-8.
21. Hauser TP, Jørgensen RB, Ostegard H. Fitness of backcross and F<sub>2</sub> hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 1998; 81(4):436-43.
22. Klinger T, Ellstrand NC. Engineered genes in wild populations – Fitness of weed-crop hybrids of *Raphanus sativus*. *Ecol Appl* 1994;4(1):117-20.
23. Dietz-Pfeilstetter A, Kirchner M. Analysis of gene inheritance and expression in hybrids between transgenic sugar beet and wild beets. *Mol Ecol* 1998;7(12):1693-700.
24. Chevre A-M, Eber F, Baranger A, Renard M. Gene flow from transgenic crops. *Nature* 1995;389:924.
25. Snow AA, Pilson D, Rieseberg LH, Paulsen MJ, Pleskac N, Reagon MR, Wolf DE, Selbo SM. A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecol Appl* 2003;13(12):279-86.
26. Spencer LJ, Snow AA. Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 2001;86(6):694-702.
27. Oard J, Cohn MA, Linscombe S, Gealy D, Gravois K. Field evaluation of seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed red rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci* 2000;157(1):13-22.
28. Papa R, Gepts P. Asymmetric gene flow and introgression between domesticates and wild populations. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004. p. 125-138.
29. Badr A, Muller K, Schafer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Mol Biol Evol* 2000;17(4):499-510.
30. Jenczewski E, Prosperi JM, Ronfort J. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. *Mol Ecol* 1999;8(8):1317-30.
31. Wilkes HG. Hybridization of maize and teosinte in Mexico and Guatemala and the improvement of maize. *Economic Botany* 1977; 31: 254-93.
32. Eastham K, Sweet J. *Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer*. Copenhagen: European Environment Agency; 2002.
33. Langevin SA, Clay K, Grace JB. The incidence and effects of hybridisation between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 1990;44(4):1000-8.
34. Chadoeuf R, Darmency H, Maillet J, Renard M. Survival of buried seeds of interspecific hybrids between oilseed rape, hoary mustard and wild radish. *Field Crop Res* 1998;58(3):197-204.
35. Darmency H, Lefgol E, Fleury A. Spontaneous hybridization between oilseed rape and wild radish. *Mol Ecol* 1998;7(11):1467-73.
36. Linder CR, Schmitt J. Potential persistence of escaped transgenes: performance of transgenic oil-modified *Brassica* seeds and seedlings. *Ecol App* 1995;5(4):1056-68.
37. Hauser TP, Shaw RG, Ostegard H. Fitness of F<sub>1</sub> hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 1998;81(4):429-35.
38. Baranger A, Chèvre AM, Eber F, Renard M. Effect of an oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species: an assessment of transgene dispersal. *Theor Appl Genet* 1995; 91(6-7): 956-63.
39. Williamson M, Fitter A. The varying success of invaders. *Ecology* 1996;77 (6):1661-6.
40. Williamson M. Invasions. *Ecography* 1999;22(1):5-12.



41. Crawley MJ, Brown, SL, Hails RS, Kohn DD, Rees M. Transgenic crops in natural habitats. *Nature* 2001;409:682-3.
42. Sukopp H, Sukopp U. Ecological long term effects of cultigens becoming feral and of naturalization of non native species. *Experientia* 1993;49(3): 210-8.
43. Wicock C, Neiland R. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends Plant Sci* 2002;7(6):270-7.
44. Vogler DW, Kalisz S. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. *Evolution* 2001;55(1):202-204.
45. Herrera CM. Components of pollinator "quality": comparative analysis of a diverse insect assemblage. *Oikos* 1987;50(1):79-89.
46. Chittka L, Thomson JD, Waser NM. Flower constancy, insect psychology and plant evolution. *Naturwissenschaften* 1999; (6): 361-77.
47. Goulson D, Ollerton J, Sluman C. Foraging strategies in the small skipper butterfly, *Thymelicus flavus*: when to switch? *Animal Behaviour* 1997; 53(5):1009-16.
48. Goulson D, Wright NP. Flower constancy in the hoverflies *Episyrphus balteatus* (Degeer) and *Syrphus ribesii* (L.) (Syrphidae). *Behavioral Ecol* 1998;9(3):213-219.
49. Beekman KP, Ratnieks FLW. Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecol* 2000; 14(4): 490-6.
50. Kunin WE. Sex and the single mustard: population density and pollinator behaviour effects on seed-set. *Ecology* 1993;74(7):2145-60.
51. Groom MJ. Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist* 1998;151(6):487-96.
52. Richards CM, Church S, McCauley DE. The influence of population size and isolation on gene flow by pollen in *Silene alba*. *Evolution* 1999;53(1): 63-73.
53. True R, Emberlin J. Pollen dispersal of the crops maize (*Zea mais*), oilseed rape (*Brassica napus*), potatoes (*Solanum tuberosum*), sugar beet (*Beta vulgaris* spp. *vulgaris*) and wheat (*Triticum aestivum*). Bristol: Soil Association; 2000.
54. Knox RB. *Pollen and allergy*. London: Edward Arnold; 1979.
55. Tackenberg O. Modeling long-distance dispersal of plant diaspores by wind. *Ecol Monographs* 2003;73(2):173-89.
56. Tackenberg O, Poschlod P, Bonn S. Assessment of wind dispersal potential in plant species. *Ecol Monographs* 2003;73(2):191-205.
57. Handel SN. Pollination ecology, plant population structure and gene flow. In: Real L (Ed.). *Pollination biology*. Orlando: Academic Press; 1983. p. 163-211.
58. Tyldesley JB. Long-range transmission of tree pollen to Shetland. *New Phytologist* 1973;72(1):175-81.
59. Bateman AJ. Contamination of seed crops I. Insect impollination. *J Genetics* 1947;48(2):257-72.
60. Rognli OA, Nilsson N-O, Nurminiemi M. Effects of distance and pollen competition on gene flow in the wind-pollinated *Festuca pratensis* Huds. *Heredity* 2000;85(2):550-60.
61. Bateman AJ. Contamination of seed crops II. Wind pollination. *Heredity* 1947;1(2):235-46.
62. Paterniani E, Stort AC. Effective maize pollen dispersal in the field. *Euphytica* 1974;23(1):129-34.
63. Klinger T, Arriola PE, Ellstrand NC. Crop-weed hybridization in radish (*Raphanus sativus*): effects of distance and population size. *Amer J Bot* 1992;79(12):1431-35.
64. Arias DM, Rieseberg LH. Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theor Appl Genetics* 1994;89(6):665-60.

65. Lavigne C, Devaux C, Deville A, Garnier A, Klein EK, Lecomte J, Pivard S, Gouyon PH. Potential and limits of modelling to predict the impact of transgenic crops in wild species. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004. p. 351-63.
66. Cresswell JE, Osborne JL, Bell SA. A model of pollinator-mediated gene flow between plant populations with numerical solutions for bumblebees pollinating oilseed rape. *Oikos* 2002;98(3):375-84.
67. Dowding P. Wind pollination mechanisms and aerobiology. *Intern Review Cytol* 1977;107:421-37.
68. Dafni A, Firmage D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst Evol* 2000;222(1-4):113-32.
69. Rodriguez-Riano T, Dafni A. A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reprod* 2000;12(4):242-44.
70. Pacini E. From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant Syst Evol* 2000; 222(1-4):19-43.
71. Nepi M, Franchi GG. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. *Plant Syst Evol* 2000; 222(1-4):45-62.
72. Pacini E. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reprod* 1996; 65(1): 11-6.
73. Hoekstra FA, Crowe LM, Crowe JH. Differential desiccation sensitivity of corn and pennisetum pollen linked to sucrose content. *Plant Cell Env* 1989; 12(1):83-91.
74. Lisci M, Tanda C, Pacini E. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae), an anemophilus species flowering all year round. *Ann Bot* 1994;74(2):125-35.
75. Pacini E, Viegi L. Total polysaccharide content of developing pollen in two angiosperm species. *Grana* 1995;34(4):237-41.
76. Speranza A, Calzoni GL, Pacini E. Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharides reserve in mature pollen grains. *Sexual Plant Reprod* 1997;10(2):110-5.
77. Harder LW, Wilson WG. Floral evolution and male reproductive success: optimal dispensing schedule for pollen dispersal by animal-pollinated plants. *Evol Ecol* 1994;8(5):542-59.
78. Pleasants JM, Hellmich RL, Dively GP, Sears M, Stanley-Horn DE, Mattila HR, Foster JE, Clark TL, Jones GD. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001;98(21):11919-924.
79. Goy PA, Duesing JH. Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Nature Biotech* 1996;14(1):39-40.
80. Mikkelsen TR, Andersen B, Jorgensen RB. The risk of crop transgene spread. *Nature* 1996; 380: 31.
81. Morris WF, Kareiva PM, Raymer PL. Do barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops? *Ecol Appl* 1994; 41(1): 157-65.
82. Reboud X. Effect of a gap on gene flow between otherwise adjacent transgenic *Brassica napus* crops. *Theor Appl Gen* 2003;106(6):1048-58.
83. Boehm MT, Aylor DE, Shields EJ. Maize pollen dispersal under convective conditions. *J Appl Metereol Climatol* 2008;47(1):291-307.
84. Hokanson SC, Grumet R, Hancock JF. Effect of border rows and trap/donor ratios on pollen mediated gene movement. *Ecol Appl* 1997; 7(3): 1075-81.
85. Ellstrand NC. Gene flow by pollen: Implications for plant conservation genetics. *Oikos* 1992;63(1):77-86.
86. Skogsmyr I. The effects of sexually selected traits on gene dispersal. *Field Crops Research* 1996;45(1-3):163-70.

87. Hokanson SC, Hancock JF, Grumet R. Direct comparison of pollen-mediated movement of native and engineered genes. *Euphytica* 1997;96(3): 397-403.
88. Snow AA, Palma P. Commercialization of transgenic plants: Potential ecological risks: Will evolutionary effects of engineered crops exacerbate weed and pest problems? *BioScience* 1997;47(2):86-96.
89. Hails RS. Genetically modified plants: the debate continues. *Trends Ecol Evol* 2000;15(1):14-8.
90. Ellstrand NC. When transgenes wander, should we worry? *Plant Physiol.* 2001;125(4):1543-5.
91. Smith-Kleefsman MW, Weissing FJ, Bijlsma R. Quantifying outcrossing probabilities of genetically modified plants. Development of a predictive model. *Commission on Genetic Modification Report CGM 2005-3*. Amsterdam; 2005. p. 1-54.
92. Lelley T, Balázs E, Tepfer M. Ecological impact of GMO dissemination in agro-ecosystems. Grossrussbach; OECD: 2002.
93. den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004.
94. Saeglitz C, Bartsch D. Plant gene flow consequences. *AgBiotechNet* 2002; 4(3):1-8.
95. Kawashima S, Matsuo K, Du M, Takahashi Y, Inoue S, Yonemura S. An algorithm for estimating potential deposition of corn pollen for environmental assessment. *Environ Biosafety Res* 2004;3(4):197-207.
96. Wang ZY, Ge YX, Scott M, Spangenberg G. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. *Am J Bot* 2004;91(4):523-30.
97. Armstrong TT, Fitzjohn RG, Newstrom LE, Wilton AD, Lee WG. Transgene escape. What potential for crop-wild hybridisation. *Mol Ecol* 2005;14(7):2111-32.
98. Messean A, Angevin F, Champolivier J, Colbach N. Impact of GMOs within cropping systems: toward a more systemic approach. *Aspects Appl Biol* 2005;74:191-6.
99. Hails RS, Morley K. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends Ecol Evol* 2005;20(5):245-52.
100. Johnson BR. Gene flow from crops to crops and from crops to wild relatives: does it matter ecologically? *Aspects Appl Biol* 2005;74:53-65.
101. Raybould AF. A decade of gene flow research: improved risk assessment or missed opportunities? *Aspects Appl Biol* 2005;74:27-33.
102. Flannery M-L, Meade C, Mullins E. Employing a composite gene-flow index to numerically quantify a crop's potential for gene flow: an irish perspective. *Environ Biosafety Res* 2005;4(1):29-43.
103. Di Fazio SP, Slavov GT, Burczyk J, Leonardi S, Strauss SH. Gene flow from tree plantations and implications for transgenic risk assessment. In: Walter C, Carson M (Ed.). *Forest biotechnology for the 21<sup>st</sup> century*. Trivandrum: Research Signpost; 2004. p. 405-22.
104. Andow DA, Zwahlen C. Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Lett* 2006;9(2):196-214.
105. Hanson DB, Mallory-Smith CA, Shafili B, Thill DC, Zemetra RS. Pollen-mediated gene flow from blue aleurone wheat to other wheat cultivars. *Crop Sci* 2005;45(4):1610-17.
106. Dorokhov D, Ignatov A, Deineko E, Serjapin A, Ala A, Skkryabin K. Potential of gene flow from herbicide-resistant GM soybeans to wild soya in the russian far east. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004. p. 151-61.
107. Linder CR, Taha I, Seiler GJ, Snow AA, Rieseberg LH. Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theor Appl Genetics* 1998;96(3-4):339-47.

108. Whitton J, Wolf DE, Arias DM, Snow AA, Rieseberg LH. The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theor Appl Gen* 1997;95(1-2):33-40.
109. Pilson D, Snow AA, Rieseberg LH, Alexander HM. A protocol for evaluating the ecological risks associated with gene flow from transgenic crops in their wild relatives: the case of cultivated sunflower and wild *Helianthus annuus*. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004, p. 219-33.
110. Giddings GD, Hamilton NRS, Hayward MD. The release of genetically modified grasses. Part 1: pollen dispersal to traps in *Lolium perenne*. *Theor Appl Genet* 1997;94(8):1000-6.
111. Giddings GD, Hamilton NRS, Hayward MD. The release of genetically modified grasses. Part 2: the influence of wind direction on pollen dispersal. *Theor Appl Genet* 1997;94(8):1007-14.
112. Giddings GD. Modelling the spread of pollen from *Lolium perenne*. The implications for the release of wind pollinated transgenics. *Theor Appl Genet* 2000;100(6):971-4.
113. De Marchis F, Bellucci M, Arcioni S. Measuring gene flow from two birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) field trials using transgenes as tracer markers. *Mol Ecol* 2003;12(6):1681-5.
114. Amand PCS, Skinner DZ, Peaden RN. Risk of alfalfa transgene dissemination and scale-dependent effects. *Theor Appl Genet* 2000; 101(1/2):107-14.
115. Wang Z, Lawrence R, Hopkins A, Bell J, Scott M. Pollen-mediated transgene flow in the wind-pollinated grass species tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) *Mol Breed* 2004;14(1):47-60.
116. Liem ASN, Groot J. Anthesis and pollen dispersal of *Holcus lanatus* L. and *Festuca rubra* L. in relation to climate factors. *Rev Paleobotany Palynology* 1973;15(1):3-16.
117. Watrud LS, Lee EH, Fairbrother A, Burdick C, Reichman JR, Bollman M, Storm M, King G, Van den Water PK. Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(40):14533-8.
118. Johnson PG, Larson SR, Anderson AL, Patterson JT, Cattani DJ, Nelson EK. Pollen-mediated gene flow from Kentucky bluegrass under cultivated field conditions. *Crop Sci* 2006;46(5):1990-7.
119. Reichman JR, Watrud LS, Lee EH, Burdick CA, Bollman MA, Storm MJ, King GA, Mallory-Smith C. Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L) in non agronomic habitats. *Mol Ecol* 2006;15(13):4243-55.
120. Jacot Y, Amman K, Rufener al Mazyad P, Chueca C, David J, Gressel J, Loureiro I, Wang H, Benavente E. Hybridization between wheat and wild relatives, and European Union programme. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004, p. 63-73.
121. Zaharieva M, Monneveux P. Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) 2006;46(2):512-27.
122. Waines JG, Hedge SG. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. *Crop Sci* 2003;43(2):451-63.
123. Hedge SG, Waines JG. Hybridization and introgression between bread wheat and wild and weedy relatives in North America. *Crop Sci* 2004;44(4): 1145-55.
124. Matus-Cadiz MA, Hucl P, Horak MJ, Blomquist LK. Gene flow in wheat at the field scale. *Crop Sci* 2004;44(3):718-27.
125. de Vries AP. Flowering biology of wheat, particularly in view of hybrids seed production – A review. *Euphytica* 1971;20(2):152-70.
126. de Vries AP. Some aspects of cross pollination in wheat (*Triticum aestivum* L). 4. Seed set on male sterile plants as influenced by distance from the pollen source, pollinator: Male sterile ratio and width of the male sterile strip. *Euphytica* 1974;23(3):601-22.

127. Loureiro I, Escorial MC, Garcia-Baudin JM, Chueca MC, Hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and the wild species *Aegilops geniculata* e *A. biuncialis* under experimental field conditions. *Agric Ecosys Environ* 2007;120(2-4):384-390.
128. Schoenenberger N, Guadagnolo R, Savova-Bianchi D, Kupfer P, Felber F. Molecular analysis, cytogenetics and fertility of introgression lines from transgenic wheat to *Aegilops cylindrica* host. *Genetics* 2006;174(4):2061-70.
129. Pogna NE, Redaelli R, Dachkevitch T, Curioni A, Dal Belin Peruffo A. Genetics of wheat quality and its improvement by conventional and biotechnological breeding. In: Bushuk W, Rasper VF (Ed.). *Wheat Production, Properties and Quality*. London: Blackie Academic & Professional; 1994, p. 205-21.
130. Guadagnuolo R, Savova-Bianchi D, Keller-Senften J, Felber F. Search for evidence of introgression of wheat (*Triticum aestivum* L.) traits into sea barley (*Hordeum marinum* s.str. Huds.) and bearded wheatgrass (*Elymus caninus* L.) in central and northern Europe, using isozymes, RADP and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 2001;103(2-3):191-6.
131. Wang ZN, Zemetra RS, Hansen J, Mallory-Smith CA. The fertility of wheat x jointed goatgrass hybrid and its backcross progenies. *Weed Sci* 2001; 49(3):340-5.
132. Hidayat, I, Baker J, Preston C. Pollen-mediated gene flow between paraquat-resistant and susceptible hare barley (*Hordeum leporinum*). *Weed Sci* 2006; 54(4):685-9.
133. Ritala A, Nuutila AM, Aikasalo R, Kauppinen V, Tammissola J. Risk assessment studies in the cultivation of transgenic barley. In: Simoinen T, Tenkanen M (Ed.). *2nd European Symposium on Enzymes in Grain Processing, ESEGP-2*, Helsinki, Finland, 8-10 December 1999. Espoo: Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus; 2000: p. 133-9.
134. Gatford KT, Basri Z, Edlington J, Lloyd J, Qureshi JA, Brettel R, Fincher GB. Gene flow from transgenic wheat and barley under field conditions. *Euphytica* 2006;151(3):383-91.
135. Westgate ME, Lizaso J, Batcherlor W. Quantitative relationship between pollen shed density and grain yield in maize. *Crop Sci* 2003; 43(3): 934-42.
136. Aylor DE. Settling speed of corn (*Zea mays*) pollen *J Aerosol Sci* 2002; 33(11):1601-7.
137. Sears MK, Stanley-Horn D. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations. In: Fairbairn C, Scoles G, McHughen A (Ed.). *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. Saskatoon: ISBR; 2000. p. 120-30.
138. Bannert M, Stamp P. Cross-pollination of maize at long distance. *Eur J Agron* 2007;27(1):44-51.
139. Raynor GS, Ogden EC, Janet VH. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agron J* 1972;64:420-27.
140. Luna VS, Figueroa JM, Baltazar BM, Gomez RL, Townsend R, Schoper JB. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Sci* 2001;41(5):1551-7.
141. Jemison JM Jr, Vayda ME. Cross pollination from genetically engineered corn: Wind transport and seed source. *AgBioforum* 2001;4(2):87-92.
142. Jarosz N, Loubert B, Durand B, McCartney A, Foueillassar X, Huber L. Field measurements of airborne concentration and deposition rate of maize pollen. *Agric Forest Meteor* 2003;119(1-2):37-51.
143. Aylor DE. Survival of maize (*Zea mays*) pollen exposed in the atmosphere. *Agric Forest Meteor* 2004;123(3-4):125-33.
144. Ma B, Subedi KD, Reid LM. Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighbouring transgenic hybrids. *Crop Sci* 2004;44(4):1273-82.
145. Jarosz N, Loubert B, Durand B, Foueillassar X, Huber L. Variations in maize pollen emission and deposition in relation to microclimate. *Environ Sci Technol* 2005;39(12):4377-84.

146. Chilcutt CF, Tabashnik BE. Contamination of refugees by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(20):7526-29.
147. Halsey ME, Remund KM, Davis CA, Qualls M, Eppard PJ, Berberich SA. Isolation of maize from pollen-mediated gene flow by time and distance. *Crop Sci* 2005;45(6):2172-85.
148. Weekes R, Allnut T, Boffey C, Morgan S, Bilton M, Daniels R, Henry C. A study of crop-to-crop gene flow using farm scale sites of fodder maize (*Zea mays* L.) in the UK. *Transgenic Res* 2007;16(2):203-11.
149. Pla M, la Paz JL, Penas G, Garcia N, Paludelmas M, Esteve T, Messeguer J, Mele E. Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated gene flow from GM to conventional maize in a field study. *Transgen Res* 2006;15(2):219-28.
150. Chèvre AN, Ammitzball, Breckling B, Dietz-Pfeilstetter A, Eber F, Fargue A, Gomez-Campo C, Jenczewski E, Jorgensen R, Lavigne C, Meier MS, den Nijs HCM, Pascher K, Seguin-Swartz G, Sweet J, Stewart CN Jr, Warwick S. A review on interspecific gene flow from oilseed rape to wild relatives. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004, p. 235-51.
151. Mikkelsen TR, Jensen J, Jorgensen RB. Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RADP markers in a backcross progeny with *Brassica campestris*. *Theor Appl Genet* 1996;92(3-4):492-7.
152. Metz PLJ, Jacobsen E, Stiekema WJ. Aspects of biosafety of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Acta Bot Neerl* 1997;46(1):51-67.
153. Tomiuk J, Hauser TP, Bagger-Jorgensen R. A- or C-chromosomes, does it matter for the transfer of transgenes from *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 2000;100(5):750-4.
154. Ammitzball H, Mikkelsen TN, Jorgensen RB. Transgene expression and fitness of hybrids between GM oilseed rape and *Brassica rapa*. *Environ Biosafety Res* 2005;4(1):3-12.
155. Mouemar AA, Darmency H. Lack of stable inheritance of introgressed transgene from oilseed rape in wild radish. *Environ Biosafety Res* 2004; 3(4):209-14.
156. Legere A. Risks and consequence of gene flow from herbicide-resistant crops: canola (*Brassica napus* L.) as a case study. *Pest Manag Sci* 2005; 61(3):292-300.
157. Hüsken A, Dietz-Pfeilstetter A. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape. *Transgenic Res* 2007;16(5):557-69.
158. Chèvre AM, Eber F, Baranger A, Hureau G, Barret P, Picault H, Renard M. Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F<sub>1</sub> interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal. *Theor Appl Genet* 1998;97(1-2):90-8.
159. Chèvre AM, Eber F, Darmency H, Fleury A, Picault H, Letanneur JC, Renard M. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 2000;100(8):1233-9.
160. Scheffler JA, Parkinson R, Dale PJ. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Res* 1993;2(6):356-64.
161. Scheffler JA, Parkinson R, Dale PJ. Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*Brassica napus*) using an herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breed* 1995;114(4):317-21.
162. Scott SE, Wilkinson MJ. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus* L.) into wild *Brassica rapa*. *Nature Biotechnol* 1999;17(4):390-2.
163. Ghoshdastidar N, Varma NS, Kapur A. Gene escape studies on transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). *Cruciferae Newsletter* 2000;22:27-8.

164. Halfhill DM, Zhu B, Warwick SI, Raymer PL, Millwood RJ, Weissinger AK, Stewart CN Jr. Hybridization and backcrossing between transgenic oilseed rape and two related weed species under field conditions. *Environ Biosafety Res* 2004;3(2):73-81.
165. Devaux C, Lavigne C, Falentin-Guyomarc'H H, Vautrin S, Lecomte J, Klein EK. High diversity of oilseed rape pollen clouds over an agro-ecosystem indicates long-distance dispersal. *Mol Ecol* 2005;14(8):2269-80.
166. Warwick SI, Simard MJ, Legere A, Beckie HJ, Braun L, Zhu B, Mason P, Seguin-Swartz G, Stewart CN Jr. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theor Appl Genet*. 2003;107(3):528-39.
167. Crawley MJ, Hails RS, Rees M, Kohn D, Buxton J. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 1993;363:620-3.
168. Lavigne C, Klein EK, Vallee P, Pierre J, Godelle B, Renard M. A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theor Appl Genet* 1998;96(6-7):886-96.
169. Thailman C, Guadagnuolo R, Felber F. Search for spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) in agricultural zones and evaluation of the genetic diversity of the wild species). *Bot Helv* 2001;111(1):107-19.
170. Hansen LB, Siegismund HR, Jorgensen RB. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Genet Resour Crop Evol* 2001;48(6):621-7.
171. Gueritain G, Sester M, Eber F, Chèvre AM, Darmency H. Fitness of backcross of six hybrids between transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanisrum*). *Mol. Ecol.* 2002; 11(8): 1419-26.
172. Pertl M, Hauser TP, Damgaard C, Jorgensen RB. Male fitness of oilseed rape (*Brassica napus*), weedy *B. rapa* and their F<sub>1</sub> hybrids when pollinating *B. rapa* seeds. *Heredity* 2002; 89(3): 212-8.
173. Gueritain G, Bazot S, Darmency H. Emergence and growth of hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanisrum*. *New Phytol* 2003; 158(3):561-7.
174. Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powles SB, Roush RT. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 2002; 296. 2386-88.
175. Funk T, Wenzel G, Schwarz G. Outcrossing frequencies and distribution of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) in the nearest neighbourhood. *Eur J Agron* 2006;24(1):26-34.
176. Allainguillaume J, Alexander M, Bullock JM, Saunders M, Allender CJ, King G, Ford CS, Wilkinson MJ. Fitness of hybrids between rapeseed (*Brassica napus*) and wild *Brassica rapa* in natural habitats. *Mol Ecol* 2006; 15(4):1175-84.
177. Johannessen MM, Andersen BA, Jorgensen RB. Competition affects gene flow from oilseed rape (female) to *Brassica rapa* (male). *Heredity* 2006; 96(5):360-7.
178. Pallet DW, Huang L, Cooper JL, Wang H. Within-population variation in hybridisation and transgenic transfer between wild *Brassica rapa* and *Brassica napus* in the UK. *Ann Appl Biol* 2006;148(2):147-56.
179. Simpson E, McRoberts N, Sweet J. Out-crossing between genetically modified herbicide-tolerant and other winter oilseed rape cultivars. *Plant Genet Resour* 2006;4(2):96-107.
180. Shen BC, Stewart CN Jr, Zhang MQ, Le YT, Tang ZX, Mi XC, Wei W, Ma KP. Correlated expression of gfp and Bt cry1Ac gene facilitates quantification of transgenic hybridization between Brassicas. *Plant Biol* 2006;8(5):723-30.
181. Ammitzboll H Jorgensen RB. Hybridisation between oilseed rape (*Brassica napus*) and different populations and species of *Raphanus*. *Environ Biosaf Res* 2006;5(1):3-13.

182. Moon HS, Halfhill MD, Hudson LC, Millwood RJ, Stewart CN Jr. Expression of green fluorescent protein in pollen of oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its utility for assessing pollen movement in the field. *Biotechnol J* 2006;1(10):1147-52.
183. Ford CS, Allainguillaume J, Grilli-Chantler P, Cuccato G, Allender CJ, Wilkinson MJ. Spontaneous gene flow from rapeseed (*Brassica napus*) to wild *Brassica oleracea*. *Proc Royal Soc London Series B* 2006;273(1605): 3111-5.
184. Simard MJ, Legere A, Warwick SI. Transgenic *Brassica napus* fields and *Brassica rapa* weeds in Quebec: sympatry and weed-crop in situ hybridization. *Can J Bot* 2006;84(12):1842-51.
185. Husken A, Dietz-Pfeilstetter A. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Res* 2007;16(5):557-69
186. Ceddia MG, Bartlett M, Perrings C. Landscape gene flow, coexistence and threshold effect: the case of genetically modified herbicide tolerant oilseed rape (*Brassica napus*). *Ecol Modelling* 2006;205(1/2):309-14.
187. FritzJohn RG, Armstrong TT, Nesstrom-Lloyd LE, Wilton AD, Cochrane M. Hybridisation within Brassica and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. *Euphytica* 2007;158(1/2):209-30.
188. Hoyle M, Hayter K, Cresswell JE. Effect of pollinator abundance on self-fertilization and gene flow: application to GM canola. *Ecol Appl* 2007; 17(7):2123-35.
189. Devos Y, De Schrijver A, Reheul D. Using an oilseed rape x wild /weedy relative gene flow index for the monitoring of transgenic oilseed rape. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2007;2(Suppl. 1):88-89.
190. Wilkinson MJ, Davenport IJ, Charters YM, Jones AE, Allainguillaume J, Butler HT, Mason DC, Raybould AF. A direct regional scale estimate of transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors. *Mol Ecol* 2000;9(7):983-91.
191. Wilkinson MJ, Elliot LJ, Allainguillaume J, Shaw MW, Norris C, Welters R, Alexander M, Cuccato G, Sweet J, Shaw M, Mason D. Prospects of a hybrid distribution map between GM *Brassica napus* and wild *B. rapa* across the UK. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004, p. 339-49.
192. Wilkinson MJ, Elliot LJ, Allainguillaume J, Shaw MW, Norris C, Welters R, Alexander M, Sweet J., Mason DC. Hybridization between *Brassica napus* and *B. rapa* on a national scale in the United Kingdom. *Science* 2003;302: 457-9.
193. Lefol E, Fleury A, Darmency H. Gene dispersal from transgenic crops. II. Hybridization between oilseed rape and the wild heavy mustard. *Sexual Plant Reprod* 1996;9(4):189-96.
194. Metz PLJ, Jacobsen E, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ. The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa* x *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theor Appl Genet* 1997;95(3):442-50.
195. Darmency H, Fleury A. Mating system in *Hirsfeldia incana* and hybridization to oilseed rape. *Weed Res.* 2000;40(2):231-8.
196. Gueritain G, Darmency H. Polymorphism for interspecific hybridisation within a population of wild radish (*Raphanus raphanistrum*) pollinated by oilseed rape (*Brassica napus*). *Sexual Plant Reprod* 2001;14(3):169-172.
197. Moyes CL, Lilley JM, Casais CA, Cole SG, Haeger PD, Dale PJ. Barriers to gene flow from oilseed rape (*Brassica napus*) into populations of *Synapis arvensis*. *Mol Ecol* 2002;11(1):103-12.
198. Klein EK, Lavigne C, Picault H, Renard M, Gouyon P-H. Pollen dispersal of oilseed rape: estimation of the dispersal function and effects of field dimension: *J Appl Ecol* 2006;43(1):141-51.



199. Zhu B, Lawrence JR, Warwick SI, Mason P, Braun L, Halfhill MD, Stewart CN Jr. Inheritance of GFP-Bt transgenes from *Brassica napus* in backcrosses with three wild *B. rapa* accessions. *Environ Biosafety Res* 2004; 3(1):45-54.
200. Zhu B, Lawrence JR, Warwick SI, Mason P, Braun L, Halfhill MD, Stewart CN Jr. Stable *Bacillus thuringiensis* Bt toxin content in interspecific F<sub>1</sub> and backcross populations of wild *Brassica rapa* after Bt gene transfer. *Mol Ecol* 2004;13(1):237-41.
201. Vacher C, Weis AE, Herman D, Kossler T, Young C, Hochberg ME. Impact of ecological factors on the initial invasion of Bt transgenes into wild populations of birdseed rape (*Brassica rapa*). *Theor Appl Genet* 2004; 109(4):806-14.
202. Halfhill MD, Sutherland JP, Moon HS, Poppy GM, Warwick SI, Weissinger AK, Ruffy TW, Rayner PL, Stewart CN Jr. Growth, productivity, and competitiveness of introgressed weedy *Brassica rapa* hybrids selected by the presence of Bt cry 1Ac and gfp transgenes. *Mol Ecol* 2005;14(10):3177-89.
203. Dale PJ. Spread of engineered genes to wild relatives. *Plant Physiol* 1992; 100(1):13-5.
204. Staniland BK, McVetty PBE, Friesen LF, Yarrow S, Freyssinet G, Freyssinet M. Effectiveness of border areas in confining the spread of transgenic *Brassica napus* pollen. *Can J Plant Sci* 2000;80(3):521-6.
205. Devos Y, Reheul D, de Schriver A, Cors F, Moens W. Management of herbicide-tolerant oilseed rape in Europe: a case study in minimizing vertical gene flow. *Environ Biosafety Res* 2004;3(3):135-48.
206. Damgaard C, Kjellsson G. Gene flow of oilseed rape (*Brassica napus*) according to isolation distance and buffer zone. *Agricult Ecosystems Environ* 2005;108(4):291-301.
207. Cresswell JE, Osborne JL. The effect of patch size and separation on bumblebee foraging in oilseed rape: implications for gene flow. *J Appl Ecol* 2004;41(3):539-46.
208. Cresswell JE. A method for quantifying the gene flow that results from a single bumblebee visit using transgenic oilseed rape, *Brassica napus* L. Cv Westar. *Transgen Res* 1994;3:134-7.
209. Pierre J, Pham-Delegue MH. How to study the impact of genetically modified colza on bees. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 2000; 7(4): 341-4
210. Pierre J. The role of honeybees (*Apis mellifera*) and other insect pollinators in gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*) *Acta Hort* 2001;561:47-52.
211. Hall L, Good A, Beckie HJ, Warwick SI. Gene flow in herbicide-resistant canola (*Brassica napus*): the Canadian experience. In: Lelley T, Balázs, Tepfer M (Ed.). *Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems*. Vienna: Facultas Verlags und Buchhandels AG; 2003, p. 57-66.
212. Knispel AL, McLachlan SM, van Acker RC, Friesen IF. Gene flow and multiple herbicide resistance in escaped canola populations. *Weed Sci* 2008; 56(1):72-80.
213. Rakow G, Woods D. Outcrossing in rape and mustard under Saskatchewan prairie conditions. *Can J Plant Sci* 1987;67(1):147-51.
214. Yoshimura Y, Beckie HJ, Matsuo K. Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in Western Canada. *Environ Biosafety Res* 2006;5(2):67-75.
215. Aone M, Wakiyama S, Nagatsu M, Nakajima N, Tamaoki M, Kubo A, Saji H. Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environ Biosafety Res* 2006;5(2):77-87.
216. Senior IJ, Moyes C, Dale PJ. Herbicide sensitivity of transgenic multiple herbicide-tolerant oilseed rape. *Pest Manag Sci* 2002;58(4):405-12.
217. Chamberlain AC. Cross pollination between fields of sugar beet. *Quart J Royal Meteor Soc* 1967;93(398):509-15.
218. Darmency H, Klein EK, Gestat De Garanbé T, Gouyon P-H, Richard-Molard M, Muchembled C. Pollen dispersal in sugar beet production fields. *Theor Appl Genet* 2009;118(6):1083-92.

219. Viard F, Bernard J, Desplanque B. Crop-weed interactions in the *Beta vulgaris* complex at a local scale: allelic diversity and gene flow within sugar beet fields. *Theor Appl Genet* 2002;104(4):688-97.
220. Bartsch D, Pohl-Orf M. Ecological aspects of transgenic sugar beet: transfer and expression herbicide resistance in hybrids with wild beets. *Euphytica* 1996;91(1):55-8.
221. Desplanque B, Boundry P, Broomberg K, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, van Dijk H. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 1999;98(8):1194-201.
222. Driessen S, Pohl-orf M, Bartsch D: RADP-PCR analysis of the genetic origin of sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) at Germany Baltic Sea coast. *Basic Appl Ecol* 2001;2849:341-9.
223. Pohl-Orf M, Brand U, Driessen S, Hesse PR, Lehnen M, Morak C, Mùcher T, Saeglitz C, von Soosten C, Bartsch D. Overwintering of genetically modified sugar beet, *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*, as a source for dispersal of transgenic pollen. *Euphytica* 1999;108(3):181-6.
224. Bartsch D, Schmidt M. Influence of sugar beet on populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* in Italy. *J Veget Sci* 1997;8(4):81-4.
225. Biancardi E. Il miglioramento genetico. In: Casarini B, Biancardi E, Ranalli P. (Ed.). *La barbabietola negli ambienti mediterranei*. Bologna: Edagricole; 1999, p. 57-145.
226. Bartsch D, Stevanato P, Lehnen M, Mainolfi A, Mùcher T, Moschella A, Driessen S, Mandolino G, Hoffmann A, De Biaggi M, Wehres U, Saeglitz C, Biancardi E. Biodiversity of sea beet in northern Italy. In: *Proceedings of the 65<sup>th</sup> International Institute for Beet Research Congress*. Bruxelles: IIBR; 2002, p. 171-80.
227. Cuguen J, Arnaud J-F, Delescluse M, Viard F. Crop-wild interaction within the *Beta vulgaris* complex: a comparative analysis of genetic diversity between sea beet and weed beet populations within the french sugarbeet production area. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004, p. 183-201.
228. Bartsch D, Hoffman A, Lehnen M, Wehres U. Ecological consequences of gene flow from cultivars to wild relatives: rhizomania resistance genes in the genus *Beta*. In: Lelley T, Balázs E, Tepfer M (Ed.). *Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems*. Vienna: Facultas Verlags und Buchhandels AG; 2003, p.115-30.
229. Santoni S, Bervillé A. Evidence for gene exchanges between sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and wild beets: consequences for transgenic sugar beets. *Plant Mol Biol* 1992;20(4):578-80.
230. Viard F, Arnaud JF, Delesclouse M, Cuguen J. Tracing back seed and pollen flow within the crop-wild *Beta vulgaris* complex: genetic distinctiveness vs. hot spots of hybridization over a regional scale. *Mol Ecol* 2004;13(6):1357-64.
231. Alibert B, Sellier H, Souvrè A. A combined method to study gene flow from cultivated sugar beet to ruderal beets in the glasshouse and open field. *Eur J Agron* 2005;23(2):195-208.
232. Andersen NS, Siegismund HR, Meyer V, Jorgensen RB. Low level of gene flow from cultivated beets (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) into danish populations of sea beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (L.) *maritima* Arcangeli). *Mol Ecol* 2005;14(5):1391-1405.
233. Slyvchenko O, Bartsch D. Introgression of cultivated beet genes to wild beet in the Ukraine. In: den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J. (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004, p. 173-82.
234. Darmency H, Vigouroux Y, Gestat de Garambé T, Richard-Molard M, Muchembled C. Transgene escape in sugar beet producing fields: data from six years of farm scale monitoring. *Environ Biosafety Res* 2007;6(3):197-206.
235. Desplanque B, Hautekèete N, van Dijk H. Transgenic weed beets: possible, probable, avoidable? *J Appl Ecol* 2002;39(4):561-71.

236. Sen MM, Adhikari A, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S. Airborne rice pollen and pollen allergen in an agricultural field: aerobiological and immunochemical evidence. *J Environ Monitor* 2003;5(6):959-62.
237. Messeguer J. Gene flow assessment in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2003;73(3):201-12.
238. Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfa V, Catala MM, Baldi G, Melé E. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistant gene as a trace marker. *Theor Appl Genet* 2001;103(8):1151-9.
239. Lu BR, Song ZP, Chen JK. Can transgenic rice cause ecological risks through transgene escape? *Prog Nat Sci* 2003;13(1):17-24.
240. Song ZP, Lu BR, Zhu YG, Chen J. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. *New Phytol* 2003;157(3):657-65.
241. Messeguer J, Marfà V, Català MM, Guiderdoni E, Melé E. A field study of pollen-mediated gene flow from mediterranean GM rice to conventional rice and red rice weed. *Mol Breed* 2004;13(1):103-12.
242. Khurram B, Tayyab H, Tahira F, Zakia L, Mehdi SA, Sheikh R. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica basmati rice. *Mol Breed* 2004;13(4):301-3.
243. Rong J, Song Z, Su J, Lu BR, Wang F. Low frequency of transgene flow from Bt/CpTi rice to its non-transgenic counterparts planted at close spacing. *New Phytol* 2005;168(3):559-66.
244. Rong J, Xia H, Zhu YY, Wang YY, Lu BR. Asymmetric gene flow between traditional and hybrid rice varieties (*Oryza sativa*) indicated by nuclear simple sequence repeats and implications for germplasm conservation. *New Phytol* 2004;163(2):439-45.
245. Song ZP, Lu BR, Chen J. Pollen flow of cultivated rice under experimental conditions. *Biodiv Conservat* 2004;13(3):579-90.
246. Chen LJ, Lee DS, Song ZP, Suh HS, Lu BR. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Ann Bot* 2004;93(1):67-73.
247. Song ZP, Lu BR, Wang B, Chen JK. Fitness estimation through performance comparison of F<sub>1</sub> hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Ann Bot* 2004;93(3):311-6.
248. Wang F, Yuan QH, Shin L, Qian Q, Liu WG, Kuang BG, Zeng DL, Liao YL, Bin C, Jia SR. A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). *Plant Biotechnol J* 2006;4(6):667-76.
249. Lu BR. Identifying possible environmental hazard from GM rice in China to inform biosafety assessment. In: *The 9<sup>th</sup> International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. Jeju Island 24-29 September. Korea 2006 p. 108-12.
250. Biasakh N, Sayda R, Mayank R, Oliva N, Tan J, Mackill DJ, Kush GS, Datta K, Datta SK. Marker-free (MFT) near-isogenic introgression lines (NILs) of "golden" indica rice (cv. IR64) with accumulation of provitamin A in the endosperm tissue. *Plant Biotechnol J* 2006;4(4):467-75.
251. Jia SR, Wang F, Lei S, Yuan QH, Liu W, liao YL, LI SG Jin WJ, Peng HP. Transgene flow to hybrid rice and its male-sterile lines. *Trangenic Res* 2007; 16(4):491-501.
252. Rong J, Lu BR, Song Z, Su J, Snow AA, Zhang X, Sun S, Chen R, Wang F. Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. *New Phytol* 2007;173(2):346-53.
253. Yuan QH, Shi L, Wang F, Cao B, Qian Q, Lei XM, Liao YL, Liu WG, Cheng L, Jia SR. Investigation of rice transgene flow in compass sectors by using male sterile line as a pollen detector. *Theor Appl Genet* 2007;115(4): 549-60.
254. Kumar V, Bellinder RR, Brainard DC, Malik RK, Gupta RK. Risks of herbicide-resistant rice in India: a review. *Crop Protect* 2008;27(3/5):320-9.

255. Noldin JA, Chandler JM, McCauley GN. Red rice (*Oryza sativa*) biology: I Characterization of red rice ecotypes. *Weed Technol* 1999;13(1):12-8.
256. Shivrain VK, Burgos NR, Anders MM, Rajguru SN, Moore J, Sales MA. Gene flow between Clearfield™ rice and red rice. *Crop Protect* 2007;26(3): 349-56.
257. Zhang NY, Linscombe S, Oard J. Out-crossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide-resistant rice and the weed, red rice. *Euphytica* 2003;103(1):35-45.
258. Gealy DV, Mitten DH J, Rutger JN. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): Implications for weed management. *Weed Technol* 2003;17(3):627-645.
259. Lu BR, Snow AA. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience* 2005;55(8):669-78.
260. Fryxell PA. The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae). College Station: Texas A&M University Press; 1979. p. 1-245.
261. Llewellyn D, Fitt G. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia *Mol Breed* 1996;2(2):157-66.
262. Brubaker CL, Brown AHD, Stewart JMD, Kilby MJ, Grace JP. Production of fertile hybrid germplasm with diploid Australian Gossypium species for cotton improvement. *Euphytica* 1999;108(3):199-213.
263. Rogers DJ, Reid RE, Rogers JJ, Addison SJ. Prediction of the naturalisation potential and weediness risk of transgenic cotton in Australia. *Agric Ecosys Environ* 2007;119(1/2):177-89.
264. Freire EC. Viabilidade de cruzamentos entre algodoeiros transgenicos e comerciais e silvestres do Brazil. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas* 2002; 6(1):465-70.
265. Freire EC. Fluxo genico entre algodoeiros convencionais e transgenicos. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas* 2002;6(1):471-82.
266. Hawkins JS, Pleasants J, Wendel JF. Identification of AFLP markers that discriminate between cultivated cotton and Hawaiian island endemic, *Gossypium tomentosum* Nuttall ex Seeman. *Gen Resources Crop Evol* 2005; 52(8):1069-78.
267. Umbeck PF, Barton KA, Nordheim EV, McCary JC, Parrot WL, Jenkins JN. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton, *J Econ Entomol* 1991;84(6):1943-50.
268. Zhang CQ, Lu QY, Wang ZX, Jia SR. Frequency of 2,4D resistant gene flow of transgenic cotton, *Scientia Agricultura Sinica* 1997;30(1):92-3.
269. Shen FF, Yu YJ, Zhang XK, Bi JJ, Yin CY. Bt gene flow of transgenic cotton. *Yi Chuan Xue Bao* 2001;28(6):562-7. (abstract)
270. Wang CY, Liu Y, Zhou J, Chen JQ, Qin P. Monitoring of pollen-mediated gene flow from transgenic Bt cotton. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 2007; 18(4):801-6. (chinese)
271. Zhang BH, Pan XP, Guo TL, Wang QL, Anderson TA. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Mol Biotechnol* 2005;31(1):11-20.
272. Llewellyn D, Tyson C, Constable G, Duggan B, Beale S, Steel P. Containment of regulated genetically modified cotton in the field. *Agric Ecosys Environ* 2007;121(4):419-29.
273. Conner AJ. Biosafety assessment of transgenic potatoes: environmental monitoring and food safety evaluation. In: Jones DD (Ed.). *The biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms*. Proceedings of the 3rd International Symposium, Monterey, California, USA, 13-16 November, 1994. Oakland: Division of Agriculture and Natural Resources, University of California; 1994. p. 254-62.
274. Mullins E, Milbourne D, Petti C, Doyle-Prestwich BM, Meade C. Potato in the age of biotechnology. *Trends Plant Sci* 2006;11(5):1360-85.
275. Conner AJ, Dale PJ. Reconsideration of pollen dispersal data from field trials of transgenic potatoes. *Theor Appl Genetics* 1996;92(5):505-8.

276. Petti C, Meade C, Downes M, Mullins E. Facilitating co-existence by tracking gene dispersal in conventional potato systems with microsatellite markers. *Environ Biosafety Res* 2007;6(4):223-35.
277. Celis C, Scurrah M, Cowgill S, Chumbiauca S, Green J, Franco J, Main G, Kiezerbrink D, Visser RGF, Atkinson HJ. Environmental biosafety and transgenic potato in a centre of diversity of this crop. *Nature* 2004;432:222-5.
278. Green J, Fearnough MT, Atkinson HJ. Development of biosafe genetically modified *Solanum tuberosum* (potato) cultivars for growth within a centre of origin of the crop. *Mol Breed* 2005;16(4):285-93.
279. Skogsmyr I. Gene dispersal from transgenic potatoes to conspecifics: a field trial. *Theor Appl Genetics* 1994;88(6/7):770-4.
280. Hanneman RE Jr. The testing of release of transgenic potatoes in the North America centre of diversity. In: Krattiger AF, Rosemarin A (Ed.). *Biosafety for sustainable agriculture: sharing biotechnology regulatory experience of the Western hemisphere*. Stockholm: International Service for Agri-Science Applications and Stockholm Environment Institute; 1994. p. 47-67.
281. Scurrah M, Celis C, Chumbiauca S, Salas A, Visser RGF: Hybridization between wild and cultivated potato species in the Peruvian Andes and biosafety implications for deployment of GM potatoes. In: Gosh K, Jepson PC (Ed.). *Genetically modified organisms in crop production and their effects on the environment: methodologies for monitoring and the way ahead*. Expert consultation report and selected papers, 18-20 January 2005. Rome: FAO; 2006. p. 104-8.
282. Eijlander R, Stiekema WJ. Biological containment of potato (*Solanum tuberosum*): outcrossing to the related wild species black nightshade (*Solanum nigrum*) and bittersweet (*Solanum dulcamara*). *Sexual Plant Reprod* 1994;7(1):29-40.
283. Conner AJ. Analysis of containment and food issue associated with the release of transgenic potatoes. In: Belknap WR, Vayda ME, Park WD (Ed.). *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*. Oxford: Oxford University Press; 1996. p. 245-64.
284. Strasburg JL, Rieseberg LH. Molecular demographic history of the annual sunflower *Helianthus annuus* and *H. pethiolaris*-large effective population sizes and rates of long-term gene flow. *Evolution* 2008;62(8):1936-50.
285. Whitton J, Wolf DE, Arias DM, Snow AA, Rieseberg LH. The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theor Appl Genet* 1997;95(1-2):33-40.
286. Baack EJ, Sapir Y, Chapman MA, Burke JM, Rieseberg LH. Selection on domestication traits and quantitative loci in crop-wild sunflower hybrids. *Mol Ecol* 2008;17(2):666-77.
287. Cummings CL, Alexander HM, Snow AA, Rieseberg LH, Kim MJ, Culley TM. Fecundity selection in a sunflower crop-wild study: can ecological data predict allele changes? *Ecol Appl* 2002;12(6):1661-71.
288. Cummings CL, Alexander HM. Population ecology of wild sunflowers: effects of seed density and post-dispersal vertebrate seed predators. *Oecologia* 2002;130(2):274-80.
289. Cantamutto M, Poverene M. Genetically modified sunflower release: opportunities and risks. *Field Crop Res* 2007;101(2):133-44.
290. Moody-Weis J, Alexander HM. The mechanisms and consequences of seed bank formation in wild sunflowers (*Helianthus annuus*) *J Ecol* 2007;95(4): 851-64.
291. Yoshimura Y, Matsuo K, Yasuda K. Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environ Biosafety Res* 2006;5(3):169-73.
292. Pereira WA, Giudice MP, Carneiro JE de Souza, Dias DCF dos Santos, Borém A. Fluxo genico em soja geneticamente modificada e metodo para sua detecção. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 2007;42(7):999-1006. (Riassunto in inglese)

293. Abud S, de Souza PIM, Vianna GR, Leonardecz E, Moreira CT, Faleiro FG, Monteiro PMFO, Rech EL, Aragao FJL. Gene flow from transgenic soybean plants in Cerrado region of Brazil. *Genetics Mol Res* 2007;6(2):345-52.
294. Schuster I, Vieira ESN, Santana H, Sinhorati D, Bezzerra R da Silva, Oliveira MA de Rott. Soybean gene flow in the Western Region of Parana. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 2007;42(4):515-20.
295. Chen Xin, Yan JiYong, Gao Bing, Srinives P. Gene flow from transgenic roundup-ready soybean to wild soybean. *Agric Sci Technol Human* 2006; 7(1):8-13.
296. Badea E, Rosca I, Sabau I, Ciocazanu I. Monitoring of Roundup Ready soybean in Romania. In: Romeis J, Meissle M (Ed.). Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "GMOs in integrated plant production", Lleida (Catalonia), Spain, 1-3 June 2005. *Bulletin OILB/SROP* 2006;29(5): 27-37.
297. van Frankenhuyzen K, Beardmore T, van Frankenhuyzen K. Current status and environmental impact of transgenic forest trees. *Can J Forest Res* 2004; 34(6):1163-80.
298. Brunner AM, Li JY, DiFazio SP, Shevchenko O, Montgomery BE, Mohamed R, Wei H, Ma C, Elias AA, VanWormer K, Strauss SH. Genetic containment of forest plantations. *Tree Genetics Genom* 2007;3(2):75-100.
299. Smouse PE, Robledo-Arnuncio JJ, Gonzalez-Martinez SC. Implications of natural propagule flow for containment of genetically modified forest trees. *Tree Genetics Genom* 2007;3(2):141-52.
300. Kuparinen A, Schurr FM. A flexible modelling framework linking the spatio-temporal dynamics of plant genotypes and populations: application to gene flow from transgenic forests. *Ecol Modelling* 2007;202(3/4):476-86.
301. Hoenicka H, Fladung M. Biosafety in populus ssp. and other forest trees: from non-native species to taxa derived from traditional breeding and genetic engineering. *Trees Structure and Function* 2006;20(2):131-44.
302. Smouse PE, Robledo-Arnuncio JJ, Gonzalez-Martinez SC. Implications of natural propagule flow for containment of genetically modified forest trees. *Tree Genetics Genom* 2007;3(2):141-52.
303. Li J, Meilan R, Ma C, Barish M, Strauss SH. Stability of herbicide resistance over 8 years of coppice in field-grown, genetically engineered poplars. *West J Appl Forestry* 2008;23(2):89-93.
304. Walter C. Genetic engineering in conifer forestry: technical and social considerations. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 2004; 40(5):434-41.
305. Slavov GT, Difazio SP, Strauss SH. Gene flow in forest trees: Gene migration patterns and landscape modelling of transgene dispersal in hybrid poplar. In: Bartsch D, den Nijis HCM, Sweet J (Ed.) *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Wallingford: CABI Publishing; 2004. p. 89-106.
306. Slavov GT, Leonardi S, Burczyk J, Adams WT, Strauss SH, Difazio SP. Extensive pollen flow in two ecologically contrasting populations of *Populus trichocarpa*. *Mol Ecol* 2009;18(2):357-73.
307. Ahuja MR. Transgene stability and dispersal in forest trees. *Trees-Structure and Function* 2009;23(6):1125-35.
308. Hu JianJun, Yang MinSheng, Lu MengZhu. Advances in biosafety studies on transgenic insect-resistant poplars in China. *Biod Sci* 2010;18(4):336-45.
309. Nathan R, Schurr FM, Spiegel O, Steinitz O, Trakhtenbrot A, Tsoar A. Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends Ecol Evol* 2008;23(11): 638-47.
310. Kuparinen A, Katul G, Nathan R, Schurr FM. Increases in air temperature can promote wind-driven dispersal and spread of plants. *Proc Royal Soc B Biol Sci* 2009;276(1870):3081-7.
311. Williams CG, LaDeau SL, Oren R, Katul GG. Modelling seed dispersal distances: implications for transgenic *Pinus taeda*. *Ecol Appl* 2006;16(1): 117-24.

312. Farnum P, Lucier A, Meilan R. Ecological and population genetics research imperative for transgenic trees. *Tree Genetics Genom* 2007;3(2):119-33.
313. Strauss SH, Tan H, Boerjan W, Sedjo R. Strangled at birth? Forest biotech and the Convention on Biological Diversity. *Nature Biotech* 2009;27(6): 519-527.
314. Di Collalto G, Pisani PL, Testi I. Ricerche sul trasporto del polline e sulla impollinazione incrociata della vite. *Riv Viticolt Enol* 1982;35:91-99.
315. Cristofolini F, Gottardini E. Concentration of airborne pollen of *Vitis vinifera* L. and yield forecast: a case study at S. Michele all'Adige, Trento, Italy. *Aerobiologia* 2000;16(1):125-9.
316. Ribeiro H, Cuhna M, Abreu I. Airborne pollen concentration in the region of Braga, Portugal, and its relationship with meteorological parameters. *Aerobiologia* 2003;19(1):21-7.
317. Ribeiro H, Abreu I, Cuhna M, Mota T, Castro R. Aeropalynological study of *Vitis vinifera* in the Braga region (1999-2003). *Aerobiologia* 2005;21(2): 131-8.
318. Harst M, Bornhoff BA, Topfer R. Investigations of pollen dispersal and out-crossing events using transgenic grapevines: a pilot study. *Acta Hort* 2006; 827:505-10.
319. Di Vecchi-Staraz M, Laucou V, Bruno G, Lacombe T, Gerber S, Bourse T, Boselli M, This P. Low level of pollen-mediated gene flow from cultivated to wild grapevine: consequences for the evolution of the endangered subspecies *Vitis vinifera* L. subsp. *silvestris*. *J Hered* 2009;100(1):66-75.
320. Harst M, Cobanov B-A, Hausmann L, Eibach R, Töpfer R. Evaluation of pollen dispersal and cross pollination using transgenic grapevine plants. *Environ Biosafety Res* 2009;8(2):87-99.
321. Dutt M, Li ZT, Kelley KT, Dhekney SA, van Aman M, Tattersall J, Gray DJ. Transgenic rootstock protein transmission in grapevines. *Acta Hort* 2005;730:749-53.
322. Reustle GM, Bucholz G. Recent trends in grapevine genetic engineering. In: Roubelakis-Angelakis KA (Ed.) *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology 2<sup>nd</sup> ed.* Dordrecht: Springer; 2009: p. 495-508.
323. ReimS, Falchowsky H, Michael M, Hanke MV. Assessing gene flow in apple using a descendant of *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* as an identifier for pollen dispersal. *Environ Biosafety Res* 2006;5(2):89-104.
324. Soejima J. Estimation of gene flow via pollen spread for the orchard layout prior to the field release of apple transformants. *Acta Hort* 2007;738:341-4.
325. Arriola PE, Ellstrand NC. Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (Poaceae): spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense* and crop sorghum, *S.bicolor*. *Am J Bot* 1996;83(9): 1153-9.
326. Schmidt M, Bothma G. Risk assessment for transgenic sorghum in Africa: crop-to-crop gene flow in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Crop Sci* 2006; 46(2):790-8.
327. Martinez-Castillo J, Zizumbo-Villareal D, Gepts P, Colunga-GarciaMarin P. Gene flow and genetic structure in the wild-weedy-domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its mesoamerican center of domestication and diversity. *Crop Sci* 2007;47(1):58-66.
328. Wang TY, Chen HB, Reboud X, Darmency H. Pollen-mediated gene flow in an autogamous crop: Foxtail millet (*Setaria italica*). *Plant Breed* 1997; 116(6):579-83.
329. Luby JJ, McNicol RJ. Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland: developing a basis for risk assessment for testing and deployment of transgenic cultivars. *Theor Appl Genet* 1995;90(7-8):1133-7.
330. Gonsalves D. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Ann Rev Phytopathol* 1998;36:415-37.
331. Manshardt RM, Mello CL, Lum SD, Ta L. Tracking papaya pollen movement with the GUS transgene marker. *Acta Hort* 2007;740:183-88.

332. Ilardi DV, Barba M. Assessment of functional transgene flow in tomato fields. *Mol Breeding* 2002;8(4):311-15.
333. Iwasaki M, Ito K, Kawabe K, Sugito T, Nitta T, Takigawa S, Ito K, Nakata T, Ogawa Y, Hayano Y, Fukumoto F. Evaluation of agronomic traits and environmental biosafety of a transgenic tomato plant expressing satellite RNA of Cucumber mosaic virus. *Research Bulletin of the National Agricultural Research Center for Hokkaido Region*. 2005;182(1):51-63.
334. Accotto GP, Nervo G, Acciari N, Tavella L, Vecchiati M, Schiavi M, Mason G, Vaira AM. Field evaluation of tomato hybrids engineered with Tomato spotted wilt virus sequences for virus resistance, agronomic performance, and pollen-mediated transgene flow. *Phytopathology*. 2005;95(7):800-7.
335. Tricoli DM, Carney KJ, Russel PF, McMaster JR, Groff, DW, Hadden KC, Himmel PT, Hubbard JP, Boeshore ML, Quemada HD. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to Cucumber mosaic virus, Watermelon mosaic virus 2 and Zucchini yellow mosaic virus. *Nature Biotech* 1995;13(12): 1458-65.
336. Spencer LJ, Snow AA. Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 2001;86(6):694-702.
337. Fuchs M, Chirco EM, Gonsalves D. Movement of coat protein genes from a commercial virus-resistant squash into a wild relative. *Environ Biosafety Res* 2004;3(1):5-16.
338. Warwick SI, Stewart CN Jr. Crops come from wild plants – How domestication, transgenes and linkage together shape fertility. In: Gressel J (Ed.). *Crop fertility and volunteerism*. Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 72-94.
339. Quist D, Chapela IN. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 2001;414:541-543.
340. Metz M, Fütterer J. Biodiversity (Communication arising). Suspect evidence of transgenic contamination (see editorial note) *Nature* 2002;416:600-1.
341. Kaplinsky N, Braun D, Lisch D, Hay A, Hake S, Freeling M. Biodiversity (Communications arising): Maize transgene results in Mexico are artefacts (see editorial footnote) *Nature* 2002;416:601-2.
342. Quist D, Chapela IN. Biodiversity (Communications arising (reply)): Suspect evidence of transgenic contamination/Maize transgene results in Mexico are artefacts (see editorial footnote) *Nature* 2002;416:602-3.
343. Ezcurra E, Mainero JS. Evidence of gene flow from transgenic maize to local varieties in Mexico. In: Roseland CR (Ed.) *LMO and the Environment: Proceedings of an International Conference*. Paris: OECD; 2001. p. 286-95.
344. Ortiz-Garcia S, Ezcurra E, Schoel B, Acevedo F, Soberon J, Snow AA. Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003-2004). *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(35):12338-43.
345. Cleveland DA, Soleri D, Aragón Cuevas F, Crossa J, Gepts P. Detecting (trans)gene flow to landraces in centres of crop origin: lessons from the case of maize in Mexico. *Environ Biosafety Res* 2005;4(4):197-208.
346. Dyer GA, Taylor JE. A crop population perspective on maize seed systems in Mexico. *Pro Natl Acad Sci USA* 2008;105(2):470-5.
347. Serratos-Hernández JA, Gómez-Olivares JL, Salinas-Arreortua N, Buendia-Rodríguez E, Islas-Guitérrez F, de-Ita A. Transgenic proteins in maize in the soil conservation area of Federal District, Mexico. *Front Ecol Env* 2007; 5(5):247-52.
348. Piñeyro-Nelson A, Van Heerwaarden J, Perales HR, Serratos-Hernández JA, Rangel A, Hufford MB, Gepts P, Garay-Arroyo A, Rivera Bustamante R, Álvarez-Buylla ER. Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Mol Ecol* 2009;18(4):750-61.



349. Dyer GA, Serratos-Hernández JA, Perales HR, Gepts P, Piñeyro-Nelson A, Chávez A, Salinas-Arreortua N, Yúnez-Naude A, Taylor JE, Alvarez-Buylla ER. Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. *PlosOne* 2009;5(4):1-9.
350. Raybould A, Higgins LS, Horak MJ, Layton RJ, Storer NP, De La Fuente JM, Herman RA. Assessing the ecological risks from the persistence and spread of feral populations of insect-resistant transgenic maize. *Transgenic Res* 2012;21(3):655-64.
351. Chung SM, Decker-Walters DS, Staub JE. Cultivar-to-wild population introgression in *Cucurbita pepo* subsp. *ovifera*. *J New Seeds* 2006;8(1):1-18.
352. Kuperinen A, Schurr F, Tackenberg O, O'Hara RB. Air-mediated pollen flow from genetically modified to conventional crops. *Ecol Appl* 2007; 17(2):431-40.
353. Hoyle M, Cresswell JE. The effect of wind direction on cross-pollination in wind-pollinated GM crops. *Ecol Appl* 2007;17(4):1234-43.
354. Kareiva PM, Morris WF, Jacobi CM. Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Mol Ecol* 1994;3(1):15-21.
355. Shaw MW, Harwood TD, Wilkinson MJ, Elliot L. Assembling spatially explicit landscape models of pollen and spore dispersal by wind for risk assessment. *Proc Royal Soc London Series B*. 2006;273(1594):1705-13.
356. Weekes R, Allnut T, Boffey C, Morgan S, Bilton M, Daniels R, Henry C. A study of crop-to-crop gene flow using farm scale sites of fodder maize (*Zea mays* L.) in the UK. *Transgenic Res* 2007;16(2):203-11.
357. Raven P. Hybridization and the nature of species in higher plants. *Can Bot Assoc Bull* 1980; S13: 3-10.
358. Ellstrand NC, Schierenbeck KA. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(13): 63-70.
359. Caley P. On invasiveness of transgenic plants: evaluating screening models and their predictions. *Ninth International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. Jeju Island, Korea: ISBR; 2006. p. 79-82.
360. Hails RS. The potential invasiveness of insect resistant transgenic plants. *Ninth International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. Jeju Island, Korea: ISBR; 2006. p. 83-87.

## 10. TOSSINA Bt E RESISTENZA AGLI INSETTI

Le piante coltivate più importanti per la produzione agricola sono state trasformate per resistere agli insetti utilizzando svariati geni come quelli che codificano per gli inibitori delle proteasi (1), per gli inibitori dell' $\alpha$ -amilasi (2) e per alcune lectine (3). Tuttavia l'applicazione più estesa, l'unica presente nelle piante attualmente in commercio, ha riguardato l'impiego  $\delta$ -endotossine (Bt) del *Bacillus thuringiensis*, un batterio molto diffuso nel suolo (4) in grado di formare endospore resistenti a condizioni ambientali avverse (5) e di possedere caratteristiche di tossicità per alcune specie di insetti. Non sono stati osservati effetti delle  $\delta$ -endotossine su uccelli, vertebrati acquatici, invertebrati, insetti come le api, mammiferi e sull'uomo (8, 9).

Questa famiglia di proteine tossiche è prodotta durante la sporulazione dal *B. thuringiensis* sotto forma d'inclusioni cristalline parasporali, adiacenti alla spora. I cristalli sono composti da uno o più polipeptidi denominati  $\delta$ -endotossine, codificate da geni (*cry*) appartenenti ad un'unica famiglia multigenica (6, 7). Quando la larva di un insetto suscettibile mangia una spora, il pH alcalino (>9,5) dello stomaco della larva scioglie l'inclusione cristallina nei suoi elementi proteici, liberando una forma inattiva, la protossina. Le protossine del tipo Cry1, Cry2 e Cry3 sono tagliate da enzimi simili alla tripsina nel dominio C-terminale, rilasciando, così, la tossina in forma attiva che consiste nel dominio N-terminale della proteina. Il dominio N-terminale legandosi a recettori specifici dell'epitelio intestinale dell'insetto s'inserisce nella membrana, dopodiché più complessi tossina-recettore si aggregano a formare dei pori. I pori distruggono l'equilibrio osmotico della cellula, che si rigonfia e scoppia (10). Altri processi possono poi entrare in gioco dopo il legame della tossina ai recettori come la setticemia, dovuta a batteri della specie *Enterobacter*, che colonizzano l'intestino delle larve (11). Nel caso dei coleotteri, che hanno pH intestinale neutro, la solubilizzazione iniziale della protossina Cry3 potrebbe essere dovuta all'azione degli enzimi proteolitici.

Miscele di batteri, spore e cristalli parasporali sono state usate, per più di 70 anni (il primo prodotto commerciale chiamato Sporeina è stato venduto in Francia a partire dal 1938), per controllare gli insetti bersaglio. Tali prodotti, però, erano attivi solo su alcune specie di Lepidotteri e davano spesso risultati inconsistenti. Nel 1970, fu isolata una nuova sottospecie, chiamata *kurstaki* HD, capace di produrre una tossina 200 volte più potente di quelle fino ad allora note. Una nuova sottospecie, denominata *israelensis*, si dimostrò essere tossica per molte specie dell'ordine dei Ditteri, e fu largamente impiegata nel controllo delle zanzare, vettori della malaria. Questa sottospecie è stata aggiunta direttamente ai contenitori usati per conservare l'acqua potabile, specialmente in Asia, senza che sia mai stato segnalato qualche problema sanitario (9). Successivamente fu isolata la sottospecie *tenebrionis*, che produceva una tossina simile al *kurstaki* HD, patogena per i Coleotteri e particolarmente per la famiglia Crisomelidae.

Quando vengono applicate come insetticida fogliare, le tossine del *B. thuringiensis* persistono per periodi molto brevi sulle piante (1-4 giorni) poiché sono degradate dai raggi UV. Le spore, invece, mantengono la persistenza nell'ambiente, in particolare sulle piante e nel suolo, per lunghi periodi di tempo, germinando in ospiti che non sono danneggiati dalla presenza del batterio. È possibile isolare il *B. thuringiensis* dalle feci di molti animali (12-14). Tra questi animali potrebbe essere compreso l'uomo, perché il batterio è un componente comune della flora microbica degli impianti di trattamento delle acque nere (15). Risultati simili sono stati ottenuti con alcuni invertebrati del suolo (5).

Fino ad oggi sono stati isolati circa 3000 ceppi differenti di *B. thuringiensis* distinguibili per le caratteristiche delle proteine cristalline, la sequenza dei geni che le esprimono (ad oggi ne sono noti circa 315) e lo spettro d'attività insetticida. Informazioni dettagliate in materia si

trovano nel sito [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/intro.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html); ultima consultazione 13/12/16).

I ceppi conosciuti contengono uno o più geni che esprimono tossine differenti. Alcuni ceppi, durante la crescita vegetativa, producono anche altre tossine ad attività citolitica indicate con il suffisso *Cit*, e in casi sporadici tossine non cristallizzate, indicate come *Vegetative Insecticidal Proteins (Vip)*(16), che hanno avuto un impiego minore. Le  $\delta$ -endotossine sono identificate dal suffisso *Cry* che indica la proteina cristallina e da un sistema di numeri e lettere che indicano le affinità nella tossicità e la specificità genetica. Le tossine *CryI* sono specifiche per i lepidotteri, le *CryII* per i lepidotteri e alcuni ditteri, le *CryIII* per i coleotteri e le *CryIV* per i ditteri (Tabella 19).

**Tabella 19. Spettro d'azione di alcune tossine del *Bacillus thuringiensis***

Sottospecie	Insetti bersaglio	Tossine coinvolte
<i>B. kurstaki</i> Hd	Lepidotteri, Ditteri	CryIA(a), CryIA(b), CryIa(c), CryIIS, CryIIB
<i>B. thuringiensis</i>	Lepidotteri	CryIA, CryIB
<i>B. aizawai</i>	Lepidotteri	CryIA(a), CryiA(b), CryIC, CryID
<i>B. tenebrionis</i>	Coleotteri	CryIIIA
<i>B. israelensis</i>	Ditteri	CryIVA, CryIVB, CryIVC, CryIVD

I primi tentativi di trasformazione delle piante con la protossina intera hanno evidenziato livelli di espressione inadeguata per un controllo effettivo degli insetti mentre oggi, vengono utilizzate piante GM contenenti la  $\delta$ -endotossina in forma troncata, consistente solamente della porzione attiva N-terminale.

I livelli di espressione anche con la tossina troncata sono comunque molto variabili. Tale variabilità dipende dal fatto che i geni *cry* sono molto ricchi in Adenina (A) e Timina (T), al contrario delle piante nelle quali le regioni ricche in questi nucleotidi sono presenti negli introni non codificanti od hanno un ruolo regolatorio nella poliadenilazione. Inoltre A o T in *B. thuringiensis* sono la terza base nelle triplette, mentre le piante preferiscono, come terza base Guanina o Citosina.

Un altro fattore importante è il promotore usato: il promotore costitutivo CaMV S35 induce l'espressione del prodotto genico sotto il suo controllo, ma tale espressione è molto limitata sia nel polline di mais (17) che nel polline del cotone (18), riducendo così il rischio del flusso genico. Altri promotori come CaMV 4AS1, usato dalla Monsanto per esprimere Cry3b nel mais MON 863, esprimono bene la tossina anche nel polline.

L'espressione della  $\delta$ -endotossina in una pianta transgenica fornisce una protezione che dura per l'intero periodo della crescita della pianta stessa: l'attività insetticida non è limitata nel tempo come quella fornita dalle preparazioni commerciali a base di Bt e inoltre, le piante GM agiscono anche su quei parassiti che attaccano le radici o quelli che rimangono all'interno dei tessuti della pianta, come la piralide (*Ostrinia nubilalis*) nel mais o il bruco del cotone (*Helicoverpa zea*, *H. armigera*).

Un altro vantaggio, rispetto ai consueti pesticidi chimici, è l'alta specificità delle  $\delta$ -endotossine verso le specie bersaglio mentre è svantaggiosa, rispetto agli spray fogliari, l'esposizione continua a concentrazioni relativamente elevate di tossine che potrebbe portare alla selezione d'insetti resistenti ad una o più tossine, diminuendone l'utilità.

Sono attualmente in fase di ricerca e sviluppo altre proteine capaci di controllare gli insetti nocivi come, ad esempio, le lectine del bucanave (*Galanthus nivalis*) e dell'aglio (*Allium sativum*), componenti naturali del sistema di difesa delle piante che però non mostrano la stessa

specificità delle proteine Cry e VIPs in quanto provocano in tutti gli insetti, una volta entrati in contatto con l'intestino, un mal assorbimento dei nutrienti.

Un altro potente sistema di difesa contro gli insetti potrebbe essere rappresentato dagli inibitori delle proteasi, attivi sia contro i lepidotteri che contro i coleotteri, ma le PGM contenenti queste proteine sono state finora poco studiate.

In base a quanto stabilito dalla direttiva comunitaria (Direttiva 2001/18/CE) per la valutazione ecotossicologica di una pianta transgenica, è necessario valutare anche l'impatto sugli artropodi che non sono bersaglio della tossina, comprese le api, i predatori e i parassitoidi.

Al fine di analizzare gli effetti della proteina insetticida su questi organismi si utilizza un approccio basato su tre livelli di approfondimento. La procedura prevede una prima fase di analisi di laboratorio (primo livello), seguita da prove analitiche eseguite in serra (secondo livello) e da una serie di test da effettuare in campo aperto (terzo livello). Tuttavia, è chiaro che i dati di campo forniscono il quadro più realistico rispetto alle condizioni artificiali create in laboratorio, per cui i risultati ottenuti da esperimenti di primo e secondo livello debbono essere sempre confermati in campo aperto.

## 10.1. Destino della tossina Bt

Le tossine Bt, usate come spray fogliari, sono innocue per molte specie di insetti e per i vertebrati e la loro azione nel suolo è transitoria, essendo degradate rapidamente nell'ambiente. Nel caso delle piante transgeniche, invece, i prodotti di degradazione, provenienti dalle coltivazioni, rilasciano la tossina troncata in forma attiva nel suolo. Stotzky ha, però, dimostrato, che la tossina, in forma troncata, si lega rapidamente alle particelle del suolo, in particolare alle argille; il legame protegge la tossina dall'attacco degli organismi presenti nel suolo, che conserva, perciò, le proprietà larvicide (19-23).

Nel caso degli spray commerciali di *B. thuringiensis* il legame della tossina, con le particelle del suolo, probabilmente a causa dell'alto peso molecolare, può essere limitato, l'accumulo nel terreno più lento e la degradazione più veloce. In alcuni terreni, sia con metodi immunologici sia con saggi biologici, basati sulle proprietà larvicide, è stata dimostrata la presenza di tossina, anni dopo il trattamento con preparati commerciali di Bt (24, 25). I risultati di Stotzky suggeriscono che il legame alle particelle del terreno rallenta la degradazione microbica della tossina. Tale protezione della tossina dalla degradazione non è, però, assoluta perché una certa degradazione avviene sempre e questa è più veloce nei terreni con pH da 5,8 a neutro e più lenta nei terreni con pH 4,9-5,0, a causa della maggior attività microbica a pH neutro (20).

Il mais non cresce bene a pH inferiori a 5,6, per cui i suoli dedicati alla sua coltivazione avranno, in genere, pH superiori, favorendo così la degradazione della tossina. Lo stesso avviene per il cotone che richiede come pH ottimale 6,0-6,5, mentre la patata preferisce suoli acidi nei quali la stabilità della tossina è più elevata perché in questi terreni l'attività microbica è ridotta. In questo caso però gli effetti sulla degradazione della tossina, nell'intervallo di pH 5,0-5,8, che si sovrappone alle condizioni ottimali di crescita, non sono stati analizzati.

La degradazione della tossina avviene in due fasi: una iniziale più veloce, con perdita dell'attività biologica, nelle prime settimane di rilascio e una successiva molto più lenta. Questo andamento bifasico è stato osservato da diversi autori (26-29). La tossina permane poi nel terreno per parecchi mesi (20, 30).

Questi esperimenti sulla verifica della persistenza nel terreno della tossina Bt vanno però interpretati con cautela, perché le concentrazioni iniziali di tossina utilizzate in laboratorio sono state più alte, rispetto a quelle espresse normalmente dalle PGM (19, 20). Poiché il saggio immunologico usato per determinare la tossina nel suolo è molto sensibile (è in grado di rilevare

da 5 a 10 parti per miliardo di tossina) negli esperimenti di Stotzky sono state necessarie diluizioni da  $10^3$  a  $10^5$  per ridurre la concentrazione della proteina Cry a livelli non rilevabili. In base a questo fatto non deve sorprendere che, in presenza di tali elevate concentrazioni artificiali, siano stati trovati tempi di persistenza molto lunghi.

La sola presenza della tossina nel suolo non basta a produrre una residua attività insetticida: infatti misurando l'inibizione della crescita in *O. nubilalis* (saggio biologico molto sensibile con limite di rilevamento di 0,03 µg/g di suolo) è stato osservato che utilizzando terreni, in cui era stato coltivato mais transgenico per 3 anni consecutivi, la tossina presente non aveva effetto sulle larve (31, 32).

Un altro aspetto da verificare è se le radici essudino la tossina Bt nel suolo. In genere, le proteine secrete nel suolo dalle radici delle piante sono poche e specializzate a tale scopo, poiché contengono segnali di trasporto (sotto forma di sequenza N-terminale corta, specifica che indirizza la proteina verso il lume del reticolo endoplasmatico) e altre sequenze specifiche che indirizzano la proteina all'apoplasto (33-36). Le proteine Cry, presenti nelle PGM, non dovrebbero essere secrete dalle radici perché prive di queste sequenze specifiche di secrezione (37). Stotzky, invece, ha trovato negli essudati delle radici del mais, la forma attiva di Bt che ha un peso molecolare di 66 kDa, indipendentemente dall'evento di trasformazione (38-40), in questo caso la quantità di proteina rilasciata era di circa 10 ng/g di suolo.

Altre piante studiate, come colza, cotone e tabacco rilasciano solo amminoacidi liberi e piccoli peptidi (al massimo tetrapeptidi). Anche la patata e il riso rilasciano la tossina dalle radici, con un meccanismo sconosciuto, mentre non lo fanno la colza, il cotone e il tabacco (41). Nel caso del mais e del riso il suolo risultava tossico per il lepidottero *Manduca sexta* e nel caso della patata per il coleottero *Leptinotarsa decemlineata*.

Nei terreni coltivati a colza, cotone e tabacco GM o con le controparti non GM di tutte le piante esaminate, non vi era alcuna attività larvicida. Le ragioni delle differenze tra specie nell'essudazione della tossina non sono note. Il fatto più importante era che, in questi esperimenti, non sono stati trovati effetti degli essudati su batteri, actinomiceti, funghi, protozoi, nematodi, vermi (*Lumbricus terrestris*) del suolo (40, 42).

Risultati preliminari sembrano indicare che alcune piante, come basilico, carota, ravizzone, oca (detto anche gombo), pastinaca, fagiolo americano, ravanella, lattuga e soia possono assorbire la tossina dal terreno, mentre altre come la barbabietola e gli spinaci non sono in grado di farlo (43). Gli autori di questo lavoro sono incerti se il risultato ottenuto sia la dimostrazione di un vero e proprio assorbimento o sia dovuto a falsi positivi causati dalla sensibilità dei metodi impiegati.

Nel caso delle coltivazioni GM, la presenza della proteina Cry nel suolo è dovuta al polline, ai residui della coltivazione e agli essudati delle radici che stimolano l'attività microbica (44-46). La maggior parte degli esperimenti descritti è stata eseguita su terreno completo o su singole componenti del suolo. Il terreno completo, in genere, non contiene una comunità microbica così alta come quella che si trova nella sola rizosfera (la zona del terreno in prossimità delle superfici radicali delle piante caratterizzata da un'intensa attività microbiologica) o che s'instaura quando i residui della coltivazione vengono incorporati nel suolo stesso: le popolazioni microbiche della rizosfera sono, infatti, 100 volte il numero di quelle presenti nel terreno completo (47). Per questo motivo la degradazione in campo aperto della tossina Bt, rilasciata dalle radici o dai residui della coltivazione, potrebbe essere molto più alta di quella osservata sul terreno completo utilizzato nelle sperimentazioni (48).

I risultati a oggi disponibili, relativi all'incorporazione di Bt nel suolo, come quella che si avrebbe alla fine della stagione di crescita, suggeriscono che l'emivita delle tossine Bt nel suolo vari da 1,6 a 22 giorni, a seconda delle caratteristiche del suolo stesso (49), mentre l'essudazione potrebbe provocare l'esposizione continua degli organismi del suolo alla proteina

Bt. È quindi importante valutare se le osservazioni di Stotzky corrispondano ad una secrezione attiva di Bt o ad un rilascio passivo dalle radici, perché il primo meccanismo avrebbe come risultato, rispetto al secondo, la deposizione nel suolo di una maggior quantità di tossina.

Le proteine Bt non contengono sequenze che ne governino il rilascio per cui la loro presenza negli essudati radicali resta ancora inspiegata. È stato osservato che la concentrazione della proteina Bt nelle radici del mais transgenico era di venti microgrammi per grammo di radice, mentre nel suolo circostante la concentrazione di proteina Bt era nell'ordine della decina di nanogrammi per grammo di suolo; in questo caso, non è stato stabilito se esistesse una correlazione diretta tra le due concentrazioni.

Una differenza osservata con mais, riso, tabacco, colza, cotone e patata, modificati per esprimere Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3A era la presenza di un minore livello di decomposizione nella biomassa residua nel suolo. Questi risultati non sembravano derivare da differenze nella microbiota del suolo, ma da un maggior contenuto in lignina delle piante GM rispetto alla controparte isogenica anche se le differenze osservate non erano del tutto significative (50).

A differenza delle altre, la tossina Cry3Bb1 non persiste nel suolo, sebbene sia rilasciata dagli essudati radicali (51). In campo aperto, la velocità di degradazione dei residui di coltivazione del mais Bt è identica a quella del mais non transgenico. In generale, in presenza di mais Bt, non si osservano particolari variazioni nelle popolazioni microbiche e nella loro attività, eventuali differenze sono transitorie e legate soprattutto alla localizzazione geografica, alla temperatura, alla varietà di pianta e alle caratteristiche del terreno di coltivazione (52-67).

La coltivazione di piante Bt comporta inevitabilmente il rilascio delle proteine Cry nel terreno sia durante il periodo vegetativo che anche dopo il raccolto poiché queste continuano ad essere rilasciate dalle radici e da altre parti della pianta. Studi di laboratorio hanno dimostrato che la proteina contenuta nelle foglie era degradata molto rapidamente, mentre in campo aperto la tossina è presente nelle foglie anche dopo il raccolto (59).

In un sito, nel quale il mais Bt era stato coltivato per 4 anni di seguito, la proteina Bt è stata rilevata nel suolo molti mesi dopo l'ultimo raccolto (60). È interessante notare che un'analisi della frazione particolata ha evidenziato che la presenza di proteina Bt era associata soprattutto al materiale organico, proveniente dalle radici o dal decadimento di alcune parti della pianta, in contrasto con quanto osservato da Stotzky sul legume preferenziale tra la tossina e le particelle argillose del terreno (19-25).

Nel caso del cotone, mentre la tossina non veniva ritrovata nel suolo intero, anche dopo sei anni di coltivazione continua di cotone Bt (68), questa era presente nella rizosfera senza che fosse evidente un impatto sulla comunità batterica (69-73). Non è stato osservato alcun effetto sulla rizosfera neppure nel caso del riso (74), per il quale bisogna tener in considerazione che nei terreni inondata la degradazione della proteina Bt è più rapida (75-78), né nel caso del pioppo (79, 80).

Sebbene non conosciamo, per le diverse piante coltivate, quanta proteina Bt si trovi nella rizosfera durante la coltivazione e quanta ne rimanga dopo il raccolto, gli studi finora condotti hanno dimostrato che la comunità microbica non è influenzata dalle caratteristiche della modificazione genetica (52-84) ed è importante sottolineare come le piante non GM non assorbano la tossina troncata dal terreno (85) su cui sono state coltivate piante Bt, anche 180 giorni dopo il rilascio, e non assorbano la tossina purificata da colture idroponiche (86).

### **10.1.1. Effetti della tossina Bt sugli organismi del suolo**

Durante la coltivazione delle piante, gli organismi del suolo sono esposti alle radici delle piante stesse e nel caso delle PGM anche al loro contenuto in endotossina. In particolare gli organismi, che si alimentano di radici vive, ingeriscono le proteine Cry per lunghi periodi di

tempo. Inoltre, una notevole quantità di tessuto radicale (11-72%) viene perduta durante la crescita con un 4-20% di materiale insolubile, derivato dalle radici, che si deposita nella rizosfera (87). Tuttavia, i livelli di espressione delle tossine Bt, pur variando, da evento ad evento, e da pianta a pianta (Tabella 20), sono molto al di sotto dei livelli (88) per i quali non sono stati osservati fenomeni di tossicità (vedi capitolo 5.1).

**Tabella 20. Livelli di espressione delle proteine Cry in µg/g\***

Evento	Proteina	Foglia	Radice	Polline	Seme	Pianta intera
Mais Bt11	Cry1Ab	3,3	2,2	<0,9 <sup>a</sup>	1,4	-
MON 810	Cry1Ab	10,4	-	<0,9 <sup>a</sup>	0,19-0,39	4,65
Mais TC1507	Cry1F	56,6-148,9	-	31-33	71,2-114,8	803-1507 <sup>b</sup>
Mais Mon 863	Cry3Bb1	30-93	3,2-6,6	-	49-86	13-54
Cotone	Cy1Ac	2,04	-	11,5	1,62	-
Patata	Cry3A	26,27	0,39	-	-	3,3

\* I dati sono stati ricavati dai documenti dell'EPA sui singoli eventi e dalla ref. 88

<sup>a</sup> Valore riferito al peso secco

<sup>b</sup> Valore riferito alle proteine totali

È possibile da questi dati, essendo noto il numero di piante coltivate per ettaro, calcolare la quantità di tossina che si potrebbe incorporare nel terreno se l'intera pianta venisse interrata (nel caso del mais MON 810 circa 70 ng/m<sup>2</sup>). È noto, invece, che, dopo il raccolto, la concentrazione di tossina si riduce notevolmente nelle radici degli stocchi residui (89).

Alcuni invertebrati del suolo che si cibano di detriti o di radici fresche, come i vermi, i collemboli e gli acari sono stati utilizzati per valutare la tossicità delle proteine Cry nel progetto europeo *ECOGEN: Soil ecological and economic evaluation of genetically modified crops*. In linea, generale non sono stati osservati effetti negativi su questi organismi non bersaglio da parte delle coltivazioni di piante Bt (90-95); effetti negativi sono stati invece riscontrati sulle coltivazioni in cui le piante sono state trattate con insetticidi convenzionali (96-106).

### 10.1.2. Effetti della tossina Bt sugli invertebrati acquatici

Poiché le tossine Bt e i cristalli parasporali sono innocui per i pesci e gli altri organismi acquatici, gli studi in questo settore hanno riguardato principalmente gli effetti sugli invertebrati. Acque superficiali, sedimenti e suolo sono stati campionati in un'area dove era coltivato mais GM contenente la tossina Cry1Ab e in un'area dove il mais coltivato era irrorato con i cristalli di Bt var. *kurstaki* (Biopesticide-Dipel®). Mentre la tossina Bt veniva degradata più rapidamente in acqua (dove mostrava un'emivita di 4 giorni) rispetto al suolo (emivita di 9 giorni), i cristalli del biopesticida erano invece più resistenti (66, 107).

Gli stessi autori hanno esaminato in laboratorio anche il comportamento in acqua del gene che esprime la tossina CryAb; aggiungendo il gene ad alta concentrazione a campioni di acque superficiali o di sedimenti, questo era ancora rilevabile, dopo 21 giorni, nelle acque e dopo 40 giorni nei sedimenti, quando questi ultimi erano ricchi in argille o sabbia. Anche campionando le acque di fiumi vicino alle coltivazioni di mais transgenico, il gene era più abbondante nei sedimenti che nelle acque (108). Questi lavori confermando la potenziale presenza di tossina Bt facevano pensare ad eventuali effetti dannosi per la fauna e la flora acquatiche (109).

L'invertebrato d'acqua dolce più esaminato negli studi di tossicità è la *Daphnia magna*, per il quale il NOAEL della proteina Cry1Ab è di 150 mg/L (88). In uno studio condotto con polline contenente Cry9C, a concentrazioni molto superiori a quelle osservate in campo aperto (soluzioni torbide o con polline depositato sul fondo), non sono stati osservati effetti negativi (88). In questi esperimenti, però, non è chiaro in che modo la *D. magna* sia stata esposta alla tossina perché questa specie ingerisce particelle con diametri da uno a 5 µm, mentre il polline di mais ha un diametro di circa 70 µm.

In un altro esperimento, a *D. magna* è stata somministrata farina ottenuta sia da mais Bt sia da mais non transgenico, sottoforma di sospensione (110); l'esposizione alla farina Bt aumentava la mortalità, induceva una riproduzione precoce e diminuiva la deposizione delle uova. Gli autori hanno interpretato questi risultati, pur in presenza di forti devianze nelle ripetizioni degli esperimenti, come derivanti dall'alimentazione contenente Bt. Tuttavia, il ritardo di maturazione della *Daphnia* e l'alta mortalità, osservate anche con la farina non transgenica, indicavano errori sperimentali connessi con una dieta troppo sbilanciata e una modalità innaturale di somministrazione. I mais (Bt e non Bt) impiegati nell'esperimento erano stati raccolti nelle Filippine, nel 2003, senza registrare le condizioni di coltivazione, i trattamenti sanitari e le infestazioni pertanto anche le condizioni sperimentali utilizzate non consentivano di trarre conclusioni significative.

Rosi-Marshall *et al.* hanno misurato la dispersione e il trasporto del polline e dei residui di coltivazione provenienti da campi Bt vicino a sorgenti e ruscelli (111), dimostrando che il polline e i detriti del mais Bt sono rilevabili nei ruscelli e vengono trasportati a valle. Tuttavia, in questi esperimenti, non sono state misurate le concentrazioni di tossina Bt presenti nei materiali dispersi nelle acque, anche se è possibile estrapolare dai dati pubblicati che la dispersione annuale di tossina varia dai 9 ai 90 µg/m<sup>2</sup>. Questi valori, molto bassi, possono essere considerati trascurabili per le larve della specie Tricotera, che sono invece sensibili ai residui acquatici di Bt (111). In laboratorio, infatti, le larve di *Lepidostoma ibla* (Tricoterae) (un insetto che si nutre di detriti) e le larve di un insetto filtrante *Hydropsyche borealis* (Tricoterae) sono state alimentate con polline e residui di coltivazione di mais Bt; questa alimentazione provocava una diminuzione nella velocità di crescita in *L.ilba* e ad un aumento della mortalità in *H. borealis*.

Tuttavia, in questi esperimenti, non era stata misurata la quantità di tossina somministrata mentre la quantità di polline, utilizzata per l'alimentazione, era da 2 a 3 volte la quantità massima, dispersa annualmente nelle acque. Per questi motivi il lavoro fu criticato da alcuni ricercatori (112, 113) e nella replica alle critiche, gli autori non escludono che gli effetti osservati potessero essere attribuiti alle varietà di mais utilizzate e non alla tossina Bt *di per sé* (114). L'intera vicenda è entrata a far parte del dibattito pubblico riguardante le PGM ed è stata analizzata da *Nature* (115). Un'analisi quantitativa del destino dei detriti di mais Bt nelle acque correnti, limitrofe ai campi di coltivazione, ha dimostrato che il mais Bt era decomposto dalla fauna microbica più velocemente del mais non Bt. Inoltre, i residui di mais Bt non influenzavano *L.ibla*, poiché le acque esaminate erano povere di tale specie (116).

È stato osservato che la tossina Cry3Bb1, che conferisce la resistenza ai coleotteri, aveva un tempo di dimezzamento di 3 giorni quando parti del mais MON863 venivano incubati sia con acqua di stagno che con la stessa acqua e il suo sedimento (117). Quando con la stessa tossina, estratta dalle radici del mais, venivano alimentate le larve del moscerino *Chironomus dilutus* (utilizzate negli studi di valutazione della tossicità delle sostanze chimiche sulla fauna dei sedimenti) vi era una diminuzione della sopravvivenza; nessun ulteriore effetto veniva osservato sulle larve esposte ad una concentrazione nominale di tossina di 30 ng/mL, a fronte del fatto che la quantità massima di tossina rilevabile in uno stagno a causa del dilavamento è di 144 µg/mL (88).



Al momento, questi esperimenti dimostrano che non vi sono rischi evidenti dovuti all'uso delle piante Bt per gli ambienti acquatici, come evidenziato anche da uno studio più recente condotto su due mais differenti: uno contenente la tossina Cry1Ab, e l'altro contenente entrambe le tossine Cry1Ab e Cry3Bb1; in entrambi i casi non è stato osservato alcun effetto sui tricotteri (118, 119).

## 10.2. Organismi bersaglio

Nel valutare l'impatto delle piante Bt sugli organismi bersaglio è necessario adottare due criteri: 1) il valore ecologico ed economico della presenza degli insetti, bersaglio della tossina; 2) la probabilità di esposizione dell'organismo bersaglio al transgene.

L'assenza di tossicità per le specie non-bersaglio fa della tossina Bt il pesticida d'elezione in agricoltura biologica, dove concentrazioni, modalità e tempi d'applicazione devono essere controllati. La supervisione propria dell'agricoltura biologica ha fatto sì che non siano comparse, fino a questo momento, forme di resistenza a Bt, analoghe a quelle insorte con l'uso di alcuni pesticidi chimici. Un controllo continuativo non è però fattibile nelle grandi estensioni dell'agricoltura industriale che non ha mai fatto un grande uso di insetticidi-Bt.

L'introduzione diretta di Bt nelle piante GM ha modificato questo scenario, esponendo la popolazione degli insetti bersaglio a Bt, non più per un periodo limitato, ma durante l'intera vita della pianta. Tale esposizione può quindi portare alla 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*, chiese al Ministro della Sanità di sospendere le prove sperimentali di mais Bt in Italia al fine di predisporre un adeguato piano di monitoraggio (Ordinanza del Ministro della Sanità del 4 marzo 1997 "Sospensione dell'attuazione in Italia della decisione della Commissione europea sul granturco Ciba Geigy Ltd del 23/1/97"). L'ordinanza vietò per tre mesi la coltivazione del mais Bt 176, in attesa che venisse elaborato un piano di monitoraggio per il controllo dell'eventuale insorgenza negli insetti di resistenza alle tossine Bt. A seguito dell'iniziativa italiana, anche la Commissione Europea, subordinò l'autorizzazione alla commercializzazione delle PGM alla presentazione di un idoneo piano di monitoraggio ambientale. Il piano, approvato anche dall'Unione Europea, fu attuato dal prof. Lozzia dell'Istituto di Entomologia Agraria della Università di Milano. Il piano aveva come scopo quello di misurare la suscettibilità di base della piralide (*Ostrinia nubilalis* Hb) esposta a mais-Bt, determinare se vi fossero cambiamenti nella suscettibilità nel corso del tempo e predire l'eventuale insorgenza di resistenza. La sorveglianza eseguita nel corso della sperimentazione non ha rilevato differenze tra insetto bersaglio e gli altri insetti normalmente presenti nei campi di mais (120-124).

La maggior parte dei danni alle coltivazioni di mais è causata dalla larva del lepidottero *Ostrinia nubilalis* (sensibile alle endotossine Cry1) che scava gallerie nello stocco e nelle pannocchie; i nemici naturali della piralide sono i tripidi (*Orius* sp.), le crisope (*Chrysoperla* sp.) e alcuni coleotteri. Altri danni alle piante di mais possono essere causati dai lepidotteri come le nottue *Heliothis armigera* e *Agrotis ipsilon*.

In Italia, negli ultimi anni, è stata decisa la lotta obbligatoria, per evitarne la diffusione, alla *Diabrotica virgifera virgifera*, un coleottero (le cui larve attaccano le radici del mais) introdotto accidentalmente, dagli Stati Uniti alla fine degli anni 90, nelle zone costiere del Veneto. La diabrotica è sensibile alla tossina Cry3Bb1, per cui il mais GM che la contiene è resistente al parassita.

La patata e la melanzana sono state trasformate con la tossina Cry per resistere alla dorifora (*Leptinotarsa decemlineata*) capace di defogliare l'intera pianta. Il bruco del cotone rosa, cioè la larva della tarma, *Pectinophora gossypiella*, e la larva di *Helicoverpa zea* sono anch'esse sensibili alle tossine Cry. Le larve di *H. zea* si nutrono anche di piante di mais e di pomodoro. A questa specie è strettamente correlata *H. armigera*, infestante del cotone in Asia. L'adulto di questi insetti depone le uova nella capsula del cotone e le larve che nascono masticano la filaccia per raggiungere i semi di cui si alimentano. La distruzione del tessuto protettivo intorno alla filaccia consente l'ingresso di altri insetti nocivi e dei funghi. Il cotone GM contenente la tossina Bt è resistente a questi insetti. La tossina Bt conferisce resistenza anche ai parassiti delle crucifere come le larve delle falene *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni* e alla cavolaia *Pieris rapae*.

## 10.3. Organismi non bersaglio

### 10.3.1. Insetti erbivori

Un organismo non bersaglio (*Non Target Organism*, NTO) può essere definito come qualunque organismo che, essendo non destinatario della modifica genetica, può essere esposto direttamente od indirettamente alla PGM o ai suoi prodotti rilasciati nell'agrosistema in cui la PGM è coltivata.

A differenza di molti pesticidi chimici che non sono specifici, le piante contenenti Bt sono specifiche per certi ordini d'insetti e inoltre, mentre nel caso dei pesticidi chimici l'interazione pesticida-cuticola può essere sufficiente per uccidere gli insetti nocivi e anche quelli non bersaglio, le tossine Bt sono espresse all'interno delle piante, per cui solo gli insetti che ingeriscono le tossine e i loro nemici naturali possono essere influenzati negativamente.

Ad esempio, i nemici naturali delle larve di *O. nubilalis* sono i tripidi (*Orius* sp.), le crisope (*Chrysoperla* sp.) e alcuni coleotteri; le larve possono essere parassitate anche dagli imenotteri, dagli icneumonidi *Sinphorus turionis* e *Eriborus terebrans* e dal braconide *Microgaster tibialis*. Importanti parassitoidi (per la definizione: <http://it.wikipedia.org/wiki/Parassitoide>; ultima consultazione 14/4/2014) sono anche i tricogrammatidi oofagi che distruggono dal 10 al 20% delle uova di *O. nubilalis* (119). Predatori delle larve di dorifora, sulle patate, sono gli imettori, i ditteri, le crisope, le vespe, i ragni e i nabidi. Le larve, le pre-pupe e le pupae di *Plutella xylostella*, sulle brassicacee, vengono uccise dai parassitoidi *Microplitis plutellae* (Muesbeck) (Hymenoptera: Braconidae), *Diadegma insulare* (Cresson) (Hymenoptera: Ichneumonidae), e *Diadromus subtilicornis* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae) mentre *Pieris rapae* è parassitato da *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae).

Pertanto, gli organismi non bersaglio possono essere esposti alle tossine Bt o direttamente perché si cibano di parti della pianta (erbivori) o indirettamente perché si cibano degli erbivori che hanno assunto la tossina.

Gli insetti erbivori che masticano le parti delle piante che contengono Bt, ingeriscono la tossina, mentre gli insetti che succhiano hanno un comportamento differente (Tabella 21), gli afidi, ad esempio, non ingeriscono la tossina, perché questa non è contenuta nel floema (125). Per tale motivo, gli afidi non sono influenzati dall'esposizione alle PGM contenenti proteine insetticide anche quando a tali proteine vengono esposti per molte generazioni (126-130). Gli acari rossi, i miridi e i tripidi, invece, nonostante si alimentino sul mesofillo, ingeriscono la tossina (131, 132), ma non mostrano danni provocati da tale assunzione (105, 133-144).

Tuttavia, l'esposizione non dipende solo dal modo di alimentarsi, ma anche dal sito e dal tempo di espressione della tossina nella pianta (145). L'attenzione dei ricercatori si è

concentrata soprattutto sugli afidi, perché questi insetti sono molto comuni sulle piante coltivate e perché costituiscono il cibo di molti artropodi entomofagi.

**Tabella 21. Principali artropodi erbivori del mais in Europa non bersaglio delle tossine Bt**

Erbivoro	Sito di alimentazione	Modalità di assunzione	Ingestione di Bt
Nottue	Stocco e foglie	Masticazione	Sì
Afidi	Linfa	Puntura e suzione	No
<i>Agriotes</i> sp.	Radici, stocco e foglie	Masticazione	Sì
<i>Oulema melanopa</i>	Foglie	Masticazione	Sì
<i>Tanymecus dilaticollis</i>	Foglie	Masticazione	Sì
<i>Oscinella frit</i>	Foglie	Scorticatura e suzione	Sì
<i>Frankliniella</i> sp.	Epidermide/Mesofillo	Puntura e suzione	Sì
<i>Tetranicus urticae</i>	Mesofillo	Puntura e suzione	Sì

Molte specie di afidi presenti nel cotone, nel mais e nella colza non assumono la tossina. Sebbene in alcuni casi si sia trovata la tossina Bt negli afidi, questo ritrovamento è stato attribuito a fenomeni di contaminazione (146, 147).

Ripetendo l'esposizione in esperimenti di laboratorio, era possibile recuperare la tossina Bt in alcuni afidi, ma ad una concentrazione del 98% inferiore a quella presente nella pianta (148). Le contaminazioni sono state attribuite alla presenza di frazioni minime di materiale vegetale, alla presenza di acari rossi o delle loro feci. Ad esempio, nelle feci dei tripidi che si alimentavano sul mais, contenente la tossina Cry1Ab, la concentrazione della tossina era dieci volte più alta di quella presente negli insetti alimentati su materiale vegetale fresco (138).

Molti predatori che si alimentano principalmente con polline, nettare e linfa sono erbivori facoltativi mentre i parassitoidi si alimentano con i nettari (149, 150). Le proteine Bt non sono state ritrovate nel nettare del cotone, mentre la loro espressione nel polline della stessa pianta varia al variare del promotore, del gene *Cry* usato e dell'evento di trasformazione. Molti predatori che rappresentano un importante sistema di controllo biologico, come la coccinella *Coleomegilla maculata* si alimentano attivamente con il polline, durante il periodo dell'antesi, piuttosto che con le prede (151, 152). Altri predatori come *Orius* sp. e *Chrysoperla carnea*, presenti nei campi di mais, durante l'antesi, assumono la tossina Bt dal materiale vegetale (153, 154).

Nel caso delle piante impollinate dal vento, gli erbivori non bersaglio, possono essere esposti al polline depositato sulle piante di cui si alimentano, come avviene nel caso delle larve di farfalla.

A differenza di quanto avviene per le piante Bt, le piante trasformate con lectine od inibitori delle proteasi, trasportano la proteina insetticida nella linfa. Quando gli afidi si alimentano su queste piante, le proteine insetticide possono essere presenti nella loro melata (155-157) poiché questi insetti hanno una bassa attività proteolitica nell'intestino. La melata (una secrezione zuccherina emessa da alcuni insetti che si nutrono della linfa delle piante) è un'importante fonte di cibo per molti artropodi inclusi i predatori, i parassitoidi, gli impollinatori e gli insetti erbivori adulti (158) e può essere, quindi, una fonte di esposizione alle proteine insetticide per molti organismi non bersaglio (159, 160).

### 10.3.2. Artropodi entomofagi-parassitoidi e predatori

Il 95% circa della popolazione degli insetti erbivori è mantenuto al disotto del numero necessario a causare danni sulle piante da un meccanismo di controllo naturale fornito da predatori e parassitoidi. Questo controllo naturale rappresenta la linea di base sulla quale si

approntano i piani agronomici di gestione degli insetti nocivi prima di considerare come misure correttive l'impiego d'insetticidi.

Un parassitoide è un organismo che trascorre una parte significativa della sua vita adeso o all'interno di un singolo organismo ospite, che finisce per uccidere (e spesso consumare). I parassitoidi sono simili ai parassiti che vivono con l'ospite senza causargli danni letali; in genere, il parassita ricava sufficienti nutrienti per vivere e non impedisce all'ospite di riprodursi. In una relazione parassitoide, invece, l'ospite di solito viene ucciso prima che possa produrre prole.

Predatori e parassitoidi sono importanti nemici naturali di molte specie di erbivori e sono spesso utilizzati nei programmi di lotta biologica e integrata. Le piante coltivate trasformate con la tossina Bt hanno elevati livelli di resistenza ad alcune specie di erbivori, cosa che potrebbe avere effetti negativi su predatori e parassitoidi specializzati su tali insetti. Una migliore comprensione dell'interazione tra piante transgeniche, predatori, parassitoidi e insetti erbivori è importante per limitare eventuali danni sul controllo biologico e per fornire conoscenze di base essenziali per l'attuazione di misure per la conservazione delle popolazioni di predatori e parassitoidi.

Gli artropodi entomofagi costituiscono un gruppo molto eterogeneo che comprende sia classi di Insetti che di Aracnidi in grado di assumere le tossine insetticide non solo direttamente, ma anche dalle prede di cui si nutrono. Tuttavia, la quantità di tossina presente negli insetti erbivori dipende, oltre che dal tempo di assunzione, anche dalla velocità di digestione ed escrezione. Ad esempio, insetti diversi che si alimentano sulle cellule del mesofillo della stessa pianta possono contenere quantità diverse di tossina; il ragnetto rosso (*Frankliniella* sp.) ha lo stesso contenuto in Bt delle foglie di mais di cui si alimenta, mentre i tripidi e le cicaline contengono rispettivamente solo 1/6 ed 1/30 di tale concentrazione (160). Una forte variabilità nella concentrazione di Bt è stata descritta anche per gli erbivori del cotone (161, 162). Anche all'interno della stessa specie la concentrazione di tossina può variare durante il ciclo vitale (138). Gli stadi immobili sono ovviamente più facile preda degli entomofagi, rispetto alle larve e agli adulti, e quindi i livelli di esposizione dei predatori può essere sovrastimato se si considera la concentrazione media di ogni stadio della preda (138). Infine la quantità di proteina insetticida presente in un insetto dipende anche dalla natura della proteina stessa. La larva di *C. carnea*, una specie che non produce feci allo stadio larvale, degrada la proteina Cry1Ab in pochi giorni, mentre la lectina del bucaneeve rimane indigerita (163).

Vi sono molti studi che hanno analizzato gli effetti delle piante Bt sui predatori in un sistema tritrofico pianta-erbivoro-predatore. Negli studi con larve di lepidotteri, che avevano ingerito prede, contenenti la tossina, non sono stati osservati effetti nocivi sulla mortalità, longevità e sviluppo dei predatori e dei parassitoidi (151-426). Tuttavia, anche usando prede suscettibili, non sempre si hanno effetti sui predatori. Infatti, bisogna valutare se il predatore ingerisce la tossina Bt quando mangia la preda e se è suscettibile alla stessa. Si può predire, con una certa accuratezza, se il predatore sarà esposto alla tossina basandosi sul suo modo di alimentarsi. I predatori con un apparato boccale adatto alla masticazione, come i coccinellidi, ingeriranno la tossina mangiando l'intestino (dove si concentra la maggior parte della tossina stessa) degli artropodi che a loro volta hanno mangiato Bt, mentre per i predatori con un apparato boccale per succhiare (Emitteri) la situazione è meno evidente perché potrebbero alimentarsi con parti del corpo che non contengono tossina.

Finora, solo alcuni studi hanno misurato con il metodo ELISA l'assunzione diretta di tossina da parte di predatori (147, 164) e almeno in un caso la quantità di tossina presente nella preda non era rilevabile neppure con questo metodo (205).

Anche altri predatori come *Nabis* sp., *Zelus renardii* (153, 178), *Coleomegilla maculata* (152), e *Orius majusculus* (137) non sono suscettibili a prede intossicate da Bt. Questi predatori,

non sono suscettibili alla tossina presente nelle loro prede che si alimentano succhiando la linfa delle PGM, nella quale le proteine Cry non sembrano essere presenti (148), mentre tracce delle proteine Cry sono state trovate nei mangiatori di linfa presenti in diversi eventi contenenti Bt nel mais (127, 133, 137) e nel cotone (130).

Alcuni predatori sono onnivori e possono alimentarsi in modo selettivo di alcuni tessuti della pianta. In differenti studi, vari predatori sono stati alimentati con polline, foglie e setole delle PGM in questi casi l'alimentazione diretta dei predatori non ha evidenziato effetti avversi, misurati in termini di sviluppo, fecondità e longevità (151-154).

Studi di laboratorio, condotti nello stesso periodo, avevano dimostrato effetti negativi della tossina Bt sulla crisopa *C. carnea* (insetto predatore benefico), aumentando così i dubbi sulla coltivazione delle piante Bt (164-166). Molti di questi effetti erano, però, dovuti alla somministrazione di prede parzialmente intossicate, morte o morenti e perciò di minor valore nutrizionale o disgustose per il predatore. I risultati negativi osservati sulla *C. carnea* non potevano essere interpretati come un effetto diretto della tossina Bt, poiché la membrana intestinale delle larve di questo insetto non è capace di legare le tossine Cry1A (167) infatti, la somministrazione diretta di due tossine Cry1Ac e Cry1Ab non ha mostrato effetti negativi a differenza di quanto accaduto con somministrazione dell'agglutinina del *Galanthus nivalis* e dell'avidina (168).

Gli adulti di crisopa sono erbivori e si alimentano di foglie e polline; gli adulti esposti al polline di mais contenente Cry1Ab o Cry3Bb1, o a diete artificiali contenenti le tossine a concentrazioni 10 volte superiori a quelle presenti nel polline non mostravano differenze nei parametri vitali rispetto agli adulti alimentati con polline delle linee isogeniche di mais, non transgenico (169).

Al momento della fioritura del mais, le femmine di crisopa erano più abbondanti nei campi per la presenza di polline fresco. Gli insetti, raccolti all'aperto, avevano una media di 5.000 granuli di polline nell'intestino; il 61% di tali granuli, nel caso di Cry1Ab e il 79%, nel caso di Cry3Bb1 veniva digerito (169). Anche nel caso di esperimenti, disegnati per far in modo che le larve di crisopa assumessero la tossina, non sono stati osservati effetti dannosi (131, 170-172). Tuttavia, questi studi di laboratorio non sono mai stati confermati da osservazioni fatte su colture in campo aperto anche perché le larve di *C. carnea* in natura si nutrono prevalentemente di afidi che non sono influenzati dalla tossina Bt (173, 174) Questo aspetto conferma il fatto che i risultati di laboratorio sono da ritenersi validi solo se confermati in campo aperto (175, 176).

L'approccio integrato adottato dal prof. Lozzia è stato successivamente esteso alle reti alimentari ecologiche di molte PGM di cui sono noti gli insetti nocivi più importanti e i loro predatori. Gli insetti nocivi e quelli che si alimentano di polline (imenotteri, parassitoidi, coleotteri, ditteri, sirfidi, neurotteri, crisopidi) sono esposti direttamente agli effetti della proteina transgenica mentre i loro nemici naturali vi sono esposti indirettamente, tramite il consumo delle loro prede.

Effetti negativi non sono stati osservati anche su altri predatori come *Orius* sp. (153, 177-184), *Coleomegilla maculata* (151, 185-190), *Leptinotarsa decemlineata* (dorifora della patata) (191-199), *Coccinella septempunctata* (coccinella comune) (180, 200-205), i coleotteri del suolo (206-208) e altri (209-213). Gli effetti delle piante Bt sui parassitoidi, studiati per lo più in laboratorio e quindi con gli stessi limiti individuati per i predatori, dipendono molto dalle interazioni parassita/parassitoide considerate; ad esempio nel mais, il parassitoide *Parallorhogas pyralophagus* (Marsh), che vive in simbiosi con un erbivoro delle aree subtropicali: l'*Eoreuma loftini* (Dyar), aveva un tempo di sviluppo più lungo se quest'ultimo era alimentato con foglie di mais Bt (214), mentre il parassitoide della piralide *Lydella thompsoni* (Herting), sia in laboratorio sia in campo aperto, non era influenzato dal mais transgenico (215).

In laboratorio, effetti negativi sono stati osservati anche per altre combinazioni parassita/parassitoide (216-219), mentre alcuni parassitoidi non vengono influenzati dall'alimentazione del parassita ospite (220-223); in alcuni casi è stato addirittura osservato un effetto benefico inserendo nell'alimentazione ospiti alimentati con mais Bt (224, 225). Nel caso della patata Bt, non sono stati osservati effetti negativi sulla crescita e la riproduzione di parassitoidi (226, 227).

La falena *P. xylostella* è normalmente molto sensibile ad alcune tossine Bt. Tuttavia, l'uso di batteri Bt, sotto forma di spray, ha portato alla selezione di resistenza da parte di questo erbivoro, le cui larve vengono parassitate da *Cotesia plutellae*. Sebbene incapace di sopravvivere sulle larve dell'erbivoro suscettibile a Bt, quando questo è allevato su colza Bt *C. plutellae* è in grado di completare il suo sviluppo larvale nelle larve di *Plutella xylostella* a loro volta resistenti a Bt. Esperimenti sul volo e il comportamento alimentare di questo parassitoide hanno dimostrato che esso non è in grado di distinguere tra colza Bt e colza non Bt; le femmine adulte di *C. plutellae* sono più attratte dalle piante Bt danneggiate dall'ospite *P. xylostella*, Bt resistente, rispetto all'ospite suscettibile. Questi esperimenti, con miscele di piante Bt e non Bt, hanno dimostrato che il parassitoide è efficace nel controllare le larve di *P. xylostella*, resistente a Bt, sia sulle piante Bt sia sulle piante non Bt (228, 229). Nessun effetto particolare è stato invece rilevato in un'altra specie di *Cotesia*, *C. vestalis* (172) e un altro parassitoide *Diadegma insulare* (230, 231).

Nel caso di erbivori non bersaglio allevati su brassicacee, il parassitoide *Microplitis mediator* cresceva regolarmente nell'erbivoro *Mamestra brassicae* (232). Al contrario, il parassitoide *Pteromalus puparum* cresceva con difficoltà nell'erbivoro *P. rapae*, a causa della cattiva qualità delle larve dell'ospite che a loro volta crescevano male su broccoli contenenti la tossina, mostrando un comportamento diverso tra le diverse piante transgeniche: Cry1Ac > Cry1Ac+Cry1C > Cry1C (233). In tutti i casi sia gli erbivori sia i parassitoidi non contenevano tossina Bt.

Gli erbivori del cotone alimentati con piante Bt influenzavano negativamente la crescita dei parassitoidi sia nel caso dell'organismo bersaglio *H. armigera* parassitato da *Campoletis chlorideae* (234) che da *Sylepta derogata*, le cui larve, parassitate da *Apanteles ruficrus* (235) uniscono le foglie per farne un rifugio alimentandosi con la parte superiore del rifugio stesso. Invece, nelle risaie, il gruppo di parassitoidi che attaccano la specie bersaglio del riso Bt, *Cnaphalocrocis medinalis*, non mostrava alcun effetto funzionale (236). Il geometride *Pseudocoremia suavis*, infestante dei pini in Nuova Zelanda, è controllato dai pini Bt ma non influenza il suo parassitoide *Meteorus pulchricornis* (237).

L'impatto delle piante Bt è stato valutato in molti altri esperimenti condotti sia in laboratorio che in campo aperto su mais (220, 238-330), cotone (331-360), riso (361-382), patata (203, 383-398), melanzana (399-404), brassicacee (229, 405-417), tabacco (419-421) e pioppo (422-427), esprimendo le proteine Cry1Ab, Cry3Bb, Cry1Ac, Cry1aB+VIP3A, Cry1Ac/Cry2Ab. Questi studi hanno reso evidente solo effetti transeunti o inconsistenti sull'entomofauna delle piante Bt paragonate con quelle di controllo non Bt. L'unica eccezione è rappresentata dai predatori e parassitoidi specialisti per gli insetti bersaglio, virtualmente assenti dai campi Bt per mancanza di prede o ospiti bersaglio. Per lo stesso motivo, riduzioni consistenti sono state osservate anche per i predatori generalisti.

In alcuni studi le piante Bt sono state paragonate a piante non Bt, trattate con insetticida. Sebbene questi studi non abbiano significato statistico, indicano tutti che gli effetti delle coltivazioni Bt sugli organismi non-bersaglio sono minori di quelli dei pesticidi. Inoltre, non si sono osservate, nei campi coltivati con piante Bt, infestazioni secondarie che richiedessero l'uso d'insetticidi. Questo fatto conferma che la funzione di controllo biologico complessiva non è influenzata dalla presenza delle piante Bt, si ritiene, anzi, che tale funzione sia aumentata, in

assenza di trattamenti con insetticida, quando si osserva una diminuzione nelle popolazioni di afidi.

La situazione, sopra descritta può essere rappresentata, nel caso del mais, dalla Figura 3 (rielaborata da 276) che descrive sinteticamente i rapporti alimentari tra gli insetti presenti nelle coltivazioni. La figura organizza gli insetti nocivi più importanti, i loro nemici naturali (predatori e parassitoidi), gli insetti che si alimentano di polline e/o nettare, organismi del suolo per gruppi ecologici e non include gli insetti erbivori che si nutrono della pianta senza causare danni particolarmente significativi.

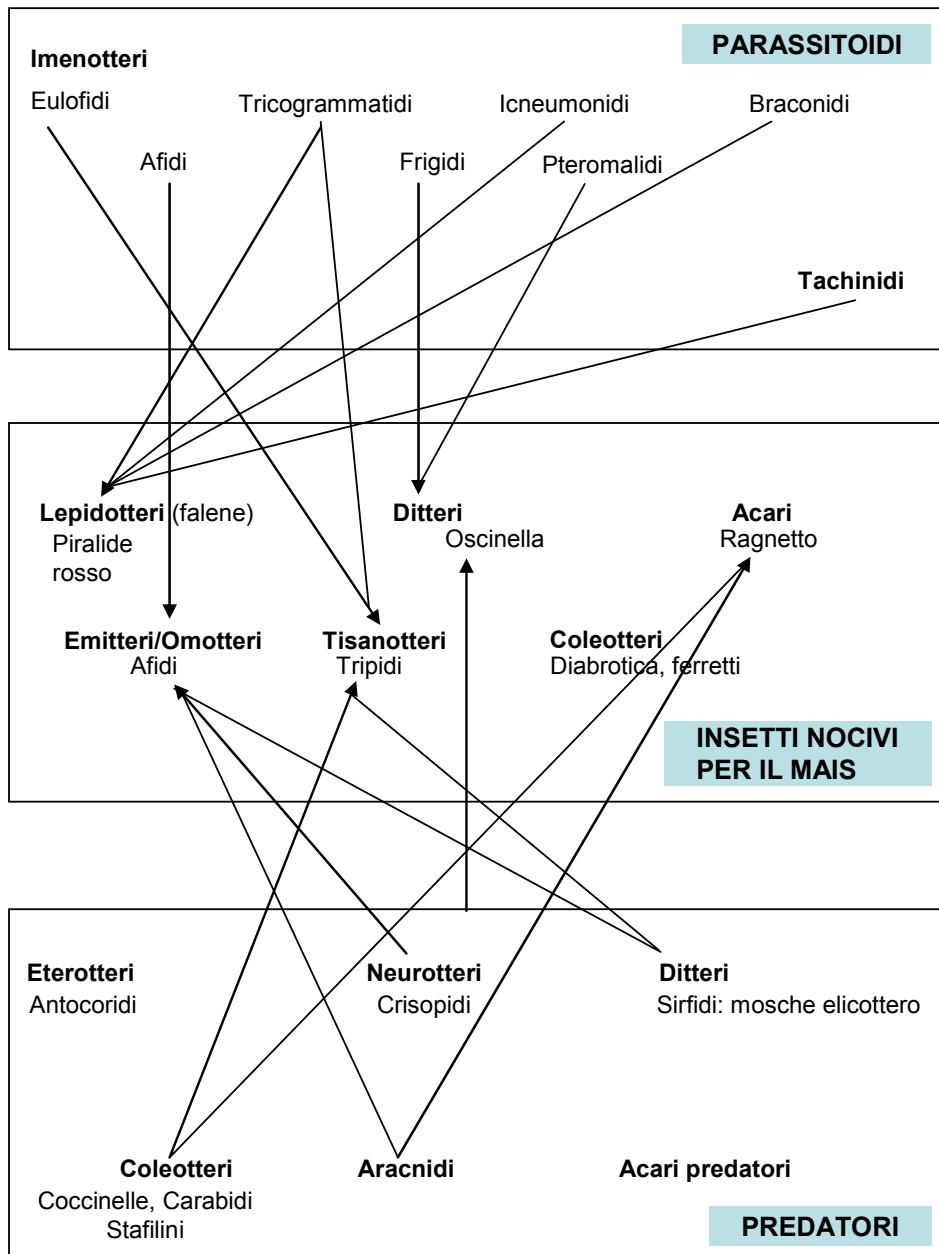


Figura 3. Esempio di rete alimentare degli insetti presenti in un campo di mais

Occorre, comunque, sottolineare che la figura è una semplificazione della situazione reale poiché negli ecosistemi naturali esiste una grande diversità di specie con interazioni molto complesse: basti pensare che nei margini erbosi dei terreni arabili sono state trovate fino a 343 specie differenti di coleotteri (428). Inoltre, la ricchezza di una specie e la sua composizione variano con le stagioni e nel tempo (429) e molte delle famiglie descritte comprendono migliaia di specie diverse, come gli afidi o i pidocchi delle piante di cui si conoscono 2250 specie; le stesse interazioni sono influenzate anche dall'eventuale presenza di colture limitrofe e di aree non coltivate.

Particolarmente dannose per le colture dei cereali sono le specie di *Oscinella* (dell'ordine dei ditteri) dette anche parassiti dei prati; piccole farfalle, le cui larve si sviluppano all'interno delle spighe e degli stocchi. Dannosi per le colture sono anche gli elateridi (noti come ferretti o scarabei a scatto) le cui larve attaccano le piantine giovani distruggendo lo stelo, mentre gli adulti si nutrono di polline. Ubiquitari sono gli acari che riducendo il contenuto cellulare provocano una diminuzione dell'attività fotosintetica.

Nel caso del mais Bt solo una piccola parte degli artropodi presenti nelle coltivazioni sono insetti nocivi, tutti gli altri possono essere considerati come organismi non-bersaglio. Tra questi né ragni né insetti saprofiti sono disturbati dalle piante Bt (430-433); la maggior parte dei danni è causata dalla piralide *Ostrinia nubilalis* che può attirare dei nemici naturali come *Orius* sp. e *Crhrysoperla* sp., predatori che eliminano dal 10 al 20% delle uova di piralide.

### 10.3.3. Api e impollinatori

La preoccupazione che il polline transgenico potesse avere degli effetti sulle api ha stimolato molti studi sia sulle api sociali sia su quelle solitarie (434-476). Arpaia, nel 1996, aveva potuto dimostrare in laboratorio che la tossina Bt somministrata con lo sciroppo a colonie di *Apis mellifera* non aveva alcun effetto sulle colonie stesse (434). In altri esperimenti era stato osservato che la tossina non ha effetto sulla sopravvivenza delle operaie adulte e non alterava lo sviluppo delle ghiandole ipofaringee che producono la gelatina reale necessaria al nutrimento e alla crescita della covata; test ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Assay*) non hanno evidenziato presenza della tossina Cry1Ab nella gelatina stessa (435). Sottoponendo ad analisi statistica 25 studi di laboratorio non sono stati dimostrati, ad oggi, effetti sulle larve o sugli adulti (455).

Questi studi sono stati criticati perché non mimavano il modo in cui il polline viene naturalmente assunto dalle larve (458); di conseguenza, Baendreier *et al.*, dopo aver misurato la quantità media di polline assunta per larva, hanno potuto confermare, usando la concentrazione fisiologica di polline, che il polline Bt non aveva alcun effetto sullo sviluppo della ghiandola ipofaringea e sulla capacità delle api nutrici di originare il cibo per le larve (447, 457). Analogamente la tossina Bt non aveva alcun effetto sulla comunità batterica (un indicatore della corretta funzionalità intestinale) presente nell'intestino delle api (452). Sia gli studi condotti in ambiente parzialmente confinato, sia quelli condotti in campo aperto hanno confermato la non tossicità di Bt per le api. Particolarmente significativi sono stati i lavori che hanno valutato il comportamento delle api per il quale non sono state riscontrate alterazioni; differenze sulle modalità di ricerca del polline, l'orientamento e la comunicazione avrebbero, infatti, evidenziato eventuali effetti della tossina Bt (444-446, 459).

Oltre all'ape mellifera vi sono le api solitarie, che contribuiscono in modo efficace all'impollinazione, come il bombo (*Bombus* sp.), l'osmia, (*Osmia* sp.), l'ape legnaiola (*Xylocopa* sp.), spesso chiamata erroneamente calabrone, e il moscone blu (*Calliphora vomitoria*). Tra questi impollinatori alternativi, sono stati studiati solo il bombo e l'osmia, senza che sia stato osservato alcun effetto del polline Bt (436). Non sono stati studiati effetti di piante transgeniche, che esprimevano proteine insetticide diverse da Bt, su ape mellifera o su bombo. Nel caso dell'ape mellifera l'esposizione è indiretta per le larve, il cui nutrimento è composto in larga misura dalla



secrezione ghiandolare delle api adulte, mentre è diretta per le operaie adulte che consumano una grande quantità di polline, specialmente nella prima settimana dopo la nascita. Al contrario, i bombi, nella vita adulta, consumano una quantità costante di polline e nutrono le larve direttamente con il polline, che depositano anche nelle cellette di allevamento delle larve.

Una pianta transgenica rappresenterà un rischio per un impollinatore solo se vi è esposizione reale; in altre parole, deve essere presente una sovrapposizione spaziale e temporale tra l'espressione del transgene nel polline della pianta e la presenza di una popolazione d'impollinatori. L'impollinatore visita i fiori della pianta, assumendo polline o nettare dagli stessi, ma normalmente non li usa come rifugio o sito di ovodeposizione o per altri scopi che portino ad un'esposizione indiretta. L'impollinatore, perciò, è esposto solo a quelle caratteristiche transgeniche che sono espresse nei fiori; una pianta transgenica che esprima la tossina solo nelle foglie e nelle radici non rappresenta ovviamente un rischio per l'impollinatore stesso.

La valutazione del rischio per le api esposte a polline transgenico dovrebbe dipendere dalla concentrazione della proteina transgenica presente nel polline stesso: essendo tale concentrazione molto bassa (Tabella 22) è difficile che il polline possa rappresentare un rischio significativo. Ancora più difficilmente il rischio potrà essere associato al consumo di nettare trattandosi di una secrezione non contenente proteine, ma composto principalmente da zuccheri e talvolta da amminoacidi. Le uniche eccezioni note sono il nettare del tabacco che ha una concentrazione proteica dello 0,024% (461) e quello del porro con una concentrazione proteica dello 0,022% (462). Nel nettare della colza e del cotone transgenico non è stata rilevata l'espressione di proteine trasgeniche (463-465).

**Tabella 22. Espressione delle proteine transgeniche nel polline**

Pianta	Proteina	Promotore	Proteina nel polline	Rif.
Mais	Bt Cry1Ab	Isolati dal mais specifici per polline e foglie	260-418 ng/mg proteine totali solubili	466
			1100-2400 ng/g peso fresco	
		CaMV 35S*	0	
Mais Bt 176	Bt Cry1Ab	Isolati dal mais specifici per polline e foglie	<7 µg/g polline	467
Mais Bt 11	Bt Cry1Ab	CaMV 35S*	<90 ng/g peso secco	468
Mais MON810	Bt Cry1Ab	CaMV 35S*	<90 ng/g peso secco	468
Mais Starlink	Bt Cry9C	CaMV 35S*	0,24 µg/g peso fresco	468
Mais TC 1507	Bt Cry1F	Poliubiquitina del mais	32 ng/mg peso secco	468
Mais MON863	Bt Cry3Bb1	CaMV 35S*	82 µg/g peso fresco	468
Mais MON810xMON84006	Bt Cry1Ab	CaMV 35S*	<0,08 µg/g peso fresco	469
	Cry2Ab2		0,06-0,12 µg/g peso fresco	
Cotone	Bt Cry1Ac	CaMV 35S*	0,6 µg/g peso fresco	470
			11 ng/g peso fresco	468
Cotone	VIP3A(a)	Promotore dell'actina da <i>Arabidopsis thaliana</i>	1,1 µg/g peso secco	463
Riso	Cry1Ac e Cry1b fuse	Promotore dell'actina dal riso	7,24 µg/g	471
Colza	Orizacistatina	CaMV 35S*	0	473
	Inibitore tripsina		0	472

\*Promotore del virus del mosaico del cavolfiore

I promotori “costitutivi” come quelli dell’ubiquitina del mais e dell’actina, ottenuti da diversi tipi di piante, come pure quello del virus del mosaico del cavolfiore 35S esercitano un’azione promotrice molto debole, se non del tutto nulla, nel caso del polline, rispetto a quanto osservato nelle foglie delle piante. Tuttavia, altri tipi di transgeni, contenenti ad esempio lectine o inibitori delle proteasi seriniche potrebbero influenzare negativamente gli impollinatori in base alla concentrazione delle proteine insetticide nel polline e alla quantità di polline ingerita nei diversi stadi di sviluppo.

Nel 2007, negli USA e in Europa, molti apicoltori trovarono le arnie prive di api operaie. In assenza di una causa nota fu coniato il termine *Colony collapse disorder*; nonostante che le modificazioni genetiche non avessero alcun effetto sulle api, immediatamente i gruppi ambientalisti attribuiscono il fenomeno alla coltivazione delle piante transgeniche. Ad oggi, non è stata identificata una singola causa delle perdite degli alveari e tutte le ricerche effettuate hanno escluso il ruolo dei transgeni nel fenomeno, che è stato attribuito invece ad una combinazione di fattori quali antiparassitari, insetti nocivi e patogeni (477-479). Lo *United States Department of Agriculture* ha trovato un maggior numero di patogeni negli alveari colpiti rispetto a quelli sani; patogeni che indebolendo le difese naturali delle api le rendono suscettibili ad altri agenti.

Recentemente, l’analisi delle particelle di polline raccolte sia dalle api che da altri insetti impollinatori quali i bombi, le api solitarie e alcune vespe ha dimostrato la presenza nel polline di tre virus a RNA: DWV (virus dell’ala deforme), BQCV (virus delle cellule nere della regina) e il virus che causa un accumulo di fluido sotto la pelle delle larve (*Sacbrood virus*, SBV). Il polline che si trova in natura è perciò un potenziale serbatoio di virus; nel caso in esame, il polline e il miele conservati nelle arnie erano infettivi e quando venivano trasferiti in un’arnia sana causavano l’infezione della regina che deponeva uova infette. Questi risultati sono stati importanti per il controllo del *Colony collapse disorder*, perché il polline viene importato ed esportato liberamente per alimentare le api usate in agricoltura come impollinatori (480).

## 10.4. Resistenza agli insetti e zone rifugio

L’uso in campo aperto, per più di 50 anni, delle preparazioni commerciali a base di tossina Bt, in assenza di una qualsivoglia comparsa di resistenze nelle popolazioni d’insetti ha portato a considerare improbabile l’evoluzione delle resistenze stesse. Infatti, tra i ditteri, non hanno sviluppato resistenze *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Musca domestica* sia in campo aperto sia in prove di laboratorio; al contrario, in Asia, nelle Hawaii e negli USA continentali, in campo aperto, è stata osservata l’insorgenza di resistenza al Bt di *P. xylostella* (481).

Studi di laboratorio hanno dimostrato come anche l’esposizione a preparati commerciali abbia permesso la selezione di insetti resistenti; tra i lepidotteri hanno sviluppato resistenze *Trichoplusia ni* e *P. xylostella* (parassiti delle brassicacee), *Heliothis virescens* (parassita del cotone), *Spodoptera exigua* (parassita della barbabietola) e *Plodia interpunctella* (infestante delle farine). Frequenze di resistenze molto minori sono state osservate anche con *Anagasta kuehniella* (infestante della farina), *Cadra cautella* (parassita del mandorlo), *Choristoneura fumiferana* (parassita dell’abete), *Homoeosoma electellum* (parassita della patata dolce) e *Spodoptera littoralis* (parassita di circa 40 famiglie di piante) (482). Anche alcune specie di coleotteri quali *Leptinotarsa decemlineata* (parassita della patata) e *Chrysomela scripta* (parassita delle foglie del cotone), esposte in laboratorio alla tossina Bt, hanno sviluppato resistenze.

Le prove di laboratorio suggerivano che l’esposizione prolungata degli organismi bersaglio e quelli non bersaglio al transgene Bt, espresso per tutta la durata del ciclo biologico della pianta,

potessero indurre resistenze rendendo vana la tecnologia e aprendo la strada ad un ulteriore impiego di pesticidi chimici. Per evitare questo fenomeno è stato sviluppato il modello delle “zone rifugio”, cioè zone coltivate con piante convenzionali adiacenti a quelle coltivate con PGM.

Poiché la resistenza ad un insetticida, in molti casi, può essere causata dalla mutazione di un gene dell'insetto, la teoria alla base dell'uso delle zone rifugio può essere spiegata con un modello semplificato della base genetica di insorgenza di resistenza. Assumendo, pertanto, che la resistenza sia controllata da un singolo locus con due alleli  $r$  (l'allele mutante che conferisce la resistenza) ed  $s$  (l'allele normale che conferisce la suscettibilità), esistono in natura tre tipi (genotipi) d'insetti:  $ss$ ,  $sr$  e  $rr$ . La risposta all'insetticida degli insetti  $rs$  sarà intermedia tra quella degli insetti suscettibili  $ss$  e quella degli insetti resistenti  $rr$ , perché, nella maggior parte dei casi di resistenza alla tossina Bt, l'allele  $r$  è parzialmente recessivo (483-487).

I meccanismi biochimici e molecolari della resistenza possono essere quindi molteplici, poiché possono intervenire in ogni singolo passaggio del meccanismo d'azione della tossina (488).

Nel caso dei lepidotteri, il principale bersaglio delle piante Bt, si osservano una forte resistenza alle tossine della famiglia Cry1Ab e una resistenza limitata alle tossine della famiglia CryAc (488). Questo tipo di resistenza è stato osservato, in laboratorio, in sei tipi d'insetti: due parassiti delle brassicacee, *T. ni* e *P. xylostella*, la falena del farro *P. interpunctella*, il verme del tabacco *Heliothis virescens*, il verme rosa del cotone *Pectinophora gossypiella* e il verme della capsula del cotone *Helicoverpa armigera* (488, 489-496). Le basi molecolari della resistenza sono state descritte solo per le ultime tre specie ed è dovuta a mutazioni sul gene, che codifica per la caderina, che impediscono la sintesi della sequenza completa della proteina (492, 493-496) e nel caso dell'*H. virescens*, la mutazione inibisce il legame della tossina Bt (497). Sebbene la localizzazione della mutazione nel gene della caderina sia una caratteristica di ciascuna delle tre specie, in ciascuna specie è presente almeno una mutazione che introduce prematuramente un codone di stop. È, comunque, possibile modificare le tossine Cr1Ab e Cr1Ac in modo da renderle di nuovo efficaci contro gli insetti del cotone divenuti resistenti (498).

Un altro caso di resistenza, correlato con un possibile sito di legame, è dovuto alla mancata espressione di una N-amminopeptidasi nell'insetto *Spodoptera exigua*, resistente alla tossina Cry1C (499); nel caso della piralide invece la resistenza è dovuta ad una ridotta attività della proteasi che trasforma la protossina Bt in tossina attiva (500).

Gli esperimenti di laboratorio, descritti, insieme ad esperimenti condotti su piccola scala con la falena del cavolo, *P. xylostella* (501, 502) insieme ad altri modelli teorici (503-506) hanno portato allo sviluppo della strategia dei rifugi al fine di: 1) avere piante non-Bt sulle quali potessero crescere adulti suscettibili; 2) favorire l'accoppiamento tra insetti resistenti e suscettibili; 3) diminuire la dominanza della resistenza; tutto questo perché nella coltivazione in campo aperto delle piante Bt gli insetti bersaglio sono esposti continuamente alla tossina presente nella pianta, a differenza di quanto avviene con l'applicazione di insetticidi spray a base di Bt.

Per evitare, quindi, che gli insetti bersaglio sviluppino delle resistenze alla tossina, cosa che renderebbe anche inutile l'uso di PGM, la *Environmental Protection Agency* statunitense (EPA), nel 1996, ha adottato la strategia cosiddetta “dell'alta dose/rifugio”, basata su modelli matematici, che indicano come necessaria, al fine di diluire gli alleli resistenti in modo tale da mantenere intatta la suscettibilità, la presenza di almeno 500 individui suscettibili per ogni individuo resistente (507). Per realizzare questa strategia, la concentrazione della tossina Bt nelle PGM deve essere pari a 25 volte la dose necessaria ad uccidere tutti gli insetti  $rs$  suscettibili, in modo da rendere improbabile la comparsa di resistenze, che emergono

generalmente quando gli insetti vengono esposti ripetutamente a basse dosi di insetticida. I rifugi sono delle aree contenenti piante convenzionali geneticamente simili a quelle transgeniche che vengono coltivate nello stesso campo al fine di mantenere gli insetti suscettibili nella popolazione. I rifugi possono essere realizzati sia all'interno dei campi Bt che all'esterno. Gli insetti con il genotipo *ss*, che sopravvivono nei rifugi, si possono accoppiare con i pochi insetti *rr* che sopravvivono sulle piante Bt, per dare origine agli insetti *rs* che saranno uccisi dall'alta dose di tossina. Dimensioni e posizione dei rifugi dipenderanno, caso per caso, dal tipo d'insetto bersaglio, dai suoi movimenti, dalle modalità di ovodeposizione, dai comportamenti riproduttivi e dalla sua distribuzione a livello locale. Solo una piccola parte dell'entomofauna è stata finora esposta a Bt e per questa ragione sono necessari molti studi per valutare a pieno gli effetti delle piante Bt nei nostri habitat.

Il primo regolamento EPA si applicava al cotone e prevedeva un'area rifugio pari al 4% dell'area totale coltivata, in assenza di trattamenti e del 20% in caso di trattamento con insetticida (508). Questa scelta derivava dal fatto che i pesticidi convenzionali uccidono circa l'80% degli insetti, per cui i due tipi di rifugio avrebbero prodotto lo stesso numero d'insetti suscettibili. Sebbene sia le osservazioni di laboratorio che quelle condotte in campo aperto in varie parti del mondo avessero dimostrato che la frequenza naturale della resistenza a Bt nelle popolazioni dei diversi parassiti fosse piuttosto bassa ( $<10^{-3}$ ) e tale da giustificare la strategia dei rifugi (509-513), ricercatori (514), ambientalisti (515) e l'industria (516) chiesero un aumento delle superfici dedicate a rifugio. Così, nel 2001, l'EPA stabilì che nelle aree coltivate a mais Bt, le aree rifugio dovevano essere il 20%, mentre in presenza di cotone Bt, tali aree dovevano aumentare al 50%.

L'unico modo per verificare l'adeguatezza della strategia "alta dose/rifugio" è quella di applicarla su larga scala, in parallelo ad aree di controllo che non la utilizzano. Naturalmente considerazioni etiche ed economiche rendono impossibile questo tipo di esperimenti, che implicherebbero il rilascio e l'osservazione del comportamento nel tempo di insetti con alleli resistenti.

Shelton e collaboratori hanno aggirato questo problema, analizzando il comportamento in campo aperto di *Plutella xylostella* su broccoli Bt, coltivati nella parte nord dello Stato di New York, dove l'insetto non sopravvive durante l'inverno (517). In questo esperimento furono rilasciati insetti con una frequenza elevata di resistenza. Sebbene non sia stato possibile analizzare la strategia dei rifugi nel suo complesso, è stato possibile esaminare alcuni aspetti pratici coinvolti nella realizzazione del rifugio. In particolare è stato osservato che il rifugio non può essere preparato utilizzando una miscela di semi Bt e non-Bt perché le larve si spostano da una pianta all'altra diminuendo il numero di larve che sfuggono all'impatto selettivo della tossina. Questo approccio può essere adottato solo per *Pectinophora gossypiella*, le cui larve non si muovono da una pianta di cotone ad un'altra, ma non per la piralide. Un altro importante risultato di questo esperimento è stato la comparazione tra rifugi trattati con insetticida e non trattati, entrambi con una superficie pari al 20% dell'area coltivata. I risultati ottenuti indicano che i rifugi non trattati provocano un adattamento più rapido dell'insetto a Bt, rispetto ai rifugi trattati.

L'Unione Europea ha adottato un protocollo per la sorveglianza della comparsa delle resistenze nella piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*), diffusa nell'Italia settentrionale e centrale, e nella *Sesamia nonagrioides*, diffusa nell'Italia centrale e meridionale (518). L'EPA ha pubblicato le specifiche cui devono rispondere i rifugi strutturati per mais e cotone (519). L'*International Rice Research Institute* (IRRI) ha raccomandato l'uso di questa strategia anche per le coltivazioni di riso (520).

Per quanto riguarda le falene, il livello di danno nei campi non-Bt rimarrebbe invariato, o diminuirebbe, dopo l'introduzione di campi della stessa cultivar Bt. Infatti, questi insetti non hanno preferenze su dove depositare le loro uova (non vi è evidenza che sappiano distinguere

una pianta Bt da una non-Bt) (521, 522) mentre, in alcuni casi, dopo l'inizio dell'alimentazione, le larve si allontanano dalle piante Bt più rapidamente che dalle piante non-Bt (523), anche se poche larve sono in grado di spostarsi da un campo ad un altro (524). Le falene adulte sono invece buone volatrici e capaci di muoversi da un campo all'altro; molte di quelle che emergono da un campo non-Bt si disperderanno, deponendo le loro uova, anche sui campi Bt. Al contrario, poche falene emergeranno dai campi Bt e si sposteranno verso i campi non-Bt. Come conseguenza di questo fenomeno, la quantità di danni nei campi non-Bt diminuirà se la maggior parte dei campi saranno seminati con piante Bt. Questa diminuzione del danno nei rifugi, definita "effetto alone", è stata osservata sia sui cavoli (521) che sul mais (525). In Cina, la presenza di cotone Bt ha portato ad una minore infestazione delle altre piante non transgeniche coltivate vicino (526). L'effetto alone è stato confermato anche dall'osservazione degli stessi insetti che esposti in serra a Bt sviluppano notevoli resistenze (527-531).

Nel 2007, l'EPA, ha cambiato di nuovo strategia per quanto riguardava i rifugi da utilizzare nei campi di cotone GM, che esprimeva le due tossine Cry2Ab e Cry1Ac (532), combinazione particolarmente efficace perché le piante che producono Cry2Ab uccidono anche gli insetti resistenti a Cry1Ac (533, 534). Nel 2006 nel Sud Est degli Stati Uniti e in parte del Texas, il cotone Monsanto, esprime le due tossine era coltivato, su più di un milione di ettari. Mentre per il cotone che esprimeva solo la tossina Cry1Ac veniva mantenuta la prescrizione di co-coltivare zone rifugio di cotone non transgenico, per il cotone esprime le due tossine, l'EPA accettò la proposta di Monsanto di coltivare nel campo altre piante o infestanti, diverse dal cotone, che fornivano rifugi sufficienti a rallentare la comparsa di resistenze. Infatti, era stato dimostrato che nei campi coltivati con mais non-Bt, vicini a campi coltivati con mais Bt l'infestazione di larve di piralide diminuiva di circa il 50% se paragonata a quella presente in campi lontani dal mais Bt (535).

La strategia dei rifugi si è dimostrata efficace perché, dieci anni dopo la commercializzazione del cotone e del mais Bt, uno studio su 11 lepidotteri ha dimostrato che questi rimangono largamente suscettibili alla tossina (536). In campo aperto è stato, invece, riscontrato l'evolversi di resistenza per tre specie di falene: *Spodoptera frugiperda*, resistente alla tossina Cry1F del mais Bt, in Porto Rico; *Busseola fusca*, alla tossina Cry1Ab del mais Bt, in Sud Africa; *Helicoverpa zea*, alle tossine Cry1Ac e Cry2Ab del cotone Bt, nel sud est degli USA. I risultati di campo, coerenti con le previsioni teoriche, suggeriscono che la resistenza sia recessiva e che i rifugi di grandi dimensioni possono essere forniti dalle coltivazioni di piante non Bt limitrofe.

Il monitoraggio costante insieme all'adozione di appropriate tecniche di gestione aumenteranno sicuramente la durata delle piante insetticida, tuttavia, il limite di questa strategia è la volontà dell'agricoltore di conformarsi alle prescrizioni per la realizzazione dei rifugi stessi.

Per superare questo limite è stata messa a punto una strategia alternativa utilizzando insetti, resi sterili, rilasciati nei campi in assenza di rifugi. Simulazioni al computer mostrano che questo approccio funziona in linea di principio sia contro i parassiti con alleli di resistenza recessivi sia contro quelli con alleli dominanti. In Arizona, una distribuzione in campo aperto e su larga scala, durata quattro anni, d'insetti sterili ha lasciato invariata la resistenza a Bt del verme rosa del cotone (*Pectinophora gossypiella*) riducendo questa popolazione del >99%, eliminando così la necessità di usare zone rifugio spruzzate con insetticida (537).

#### 10.4.1. Il caso della farfalla monarca

La farfalla monarca (*Danaus plexippus*) è molto popolare negli USA, per la sua bellezza, per la facilità di allevarla in casa o in ambienti scolastici e per le sue notevoli capacità migratorie (per ulteriori approfondimenti consultare: <http://www.monarch-butterfly.com>). È probabilmente la farfalla più conosciuta di tutto il Nord America è l'insetto nazionale degli Stati dell'Alabama,

Idaho, Illinois, Texas ed è la farfalla nazionale del Minnesota, Vermont e West Virginia. Nel 1989, è stata nominata “insetto nazionale” degli Stati Uniti d’America e “insetto nazionale” del Canada.

Questa farfalla non resiste alle temperature invernali delle pianure degli Stati Uniti per cui l’ultima generazione (variano da 4 a 5 durante la stagione estiva) ad ottobre, migra per svernare in Messico, compiendo un tragitto di circa 4000 km.

Una volta raggiunto il Messico, la farfalla sverna nelle foreste di *Abies religiosa* (Abete sacro) presenti per la maggior parte nello Stato di Veracruz ad un’altitudine di 2000-4000 m, dove si concentrano oltre 14 milioni di farfalle in un ettaro e mezzo di superficie. Le farfalle degli Stati Uniti occidentali raggiungono alcune zone montuose della California tra San Francisco e Los Angeles, dove trascorrono l’inverno in uno stato di semi-ibernazione aggrappate a decine di migliaia ai tronchi e ai rami degli alberi di eucalipto.

Nella primavera successiva, dopo gli accoppiamenti, gli individui di entrambi i sessi iniziano il viaggio di ritorno, durante il quale alcune femmine si fermano a deporre le uova; in alcuni casi è la generazione successiva a completare il viaggio, ricolonizzando le regioni più settentrionali. Le farfalle che hanno svernato devono tornare indietro, perché in Messico non nasce la *Asclepias syriaca* che è l’unico alimento delle larve. *D. plexippus* non è presente in Italia, ma in Sicilia sono state osservate alcune colonie di farfalla monarca africana, *D. chrysippus*.

John Losey, entomologo della Cornell University, scatenò una controversia mondiale con la pubblicazione di una breve nota sulla morte di alcune larve di farfalla monarca alimentate con foglie di *Asclepias syriaca*, impolverate con polline di mais Bt (538). Questo lavoro diede origine ad una copertura mediatica internazionale senza precedenti che trasformò la farfalla monarca nel simbolo drammatico dei rischi posti dalle piante transgeniche.

Le larve di farfalla monarca si alimentano normalmente con le foglie di *A. syriaca* (in italiano erba bambagia, in inglese *milkweed*) che cresce spontaneamente ai margini dei campi di mais: foglie rifiutate invece dalle larve di piralide. *A. syriaca* è tossica perché le foglie contengono alcaloidi della famiglia della stricnina, tanto che gli Indiani americani ne ricavano il veleno per le punte delle frecce. Losey, dopo aver bagnato le foglie, le spruzzò con il polline di due mais uno Bt (Novartis N4640) e l’altro un ibrido non modificato, in modo da ottenere ± la densità del polline, osservata in campo aperto; depose, poi, 5 larve di farfalla monarca su ciascuna foglia della pianta e osservò che un po’ meno della metà delle larve alimentate con le foglie spruzzate con il polline Bt moriva dopo 4 giorni, a differenza di quelle esposte al polline dell’ibrido non transgenico.

Contemporaneamente in un altro esperimento, Jesse e Obrycki misero nei vasi contenenti delle piante di *A. syriaca* all’interno di campi di mais GM, nel periodo di rilascio del polline e, dopo l’esposizione le trasportarono in laboratorio con il polline depositato naturalmente; anche in questo caso osservarono un effetto letale sulle larve di monarca (539).

Non appena fu a conoscenza dei risultati di questi lavori, la *Union of Concerned Scientist* (UCS) iniziò a rilasciare comunicati stampa fino a quando tutti i gruppi ambientalisti si unirono al coro di proteste contro il mais Bt per l’alto rischio che la sua coltivazione rappresentava per le farfalle monarca.

In questo caso, l’informazione dell’UCS creò una forte sensibilizzazione e fece sì che la notizia della morte della farfalla monarca facesse rapidamente il giro del mondo. La verifica dei risultati, ottenuti da Losey e Obrycki, fu particolarmente urgente perché stava per scadere il permesso quinquennale rilasciato dall’*Environmental Protection Agency* (EPA) per la coltivazione negli USA di alcuni mais Bt.

L’EPA chiese all’industria di fornire i dati necessari per verificare in campo aperto i risultati ottenuti in laboratorio. Sotto gli auspici dello *United States Department of Agriculture* fu creato un consorzio pubblico/privato, composto da membri delle Università, dell’industria e dei gruppi

ambientalisti come l'UCS, per definire le ricerche da fare. Il consorzio identificò 5 obiettivi di ricerca a breve termine:

- determinare se i campi di mais erano necessari per la sopravvivenza delle popolazioni di farfalla monarca;
- definire come le larve reagivano a differenti concentrazioni di polline Bt;
- determinare la distribuzione e l'abbondanza di *A. syriaca*;
- determinare la distribuzione geografica della farfalla, la sua numerosità e la sua sopravvivenza in campi di mais Bt e non Bt;
- verificare se i fenomeni osservati in laboratorio fossero presenti anche in campo aperto.

Nell'estate del 2000, una squadra di 26 scienziati, compresi Losey e Obrycki, condusse le ricerche previste e al loro completamento, il consorzio si riunì per valutare e interpretare i dati decidendo di pubblicare sei lavori nella rivista *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS), in modo che i risultati fossero esaminati da valutatori indipendenti. Gli scienziati, proprio per non precludersi la possibilità di pubblicare i risultati ottenuti, acconsentirono a che l'industria presentasse per prima i risultati all'EPA; tuttavia l'industria li presentò come *Confidential Business Information* (CBI), in modo tale che i risultati erano protetti dalla legge che vieta la possibilità di renderli pubblici. Questa richiesta originò subito un conflitto perché l'EPA prima di prendere qualunque posizione avrebbe dovuto comunque consultare il pubblico. Fu raggiunto pertanto un compromesso in base al quale, a partire dal 24 agosto 2001, la documentazione, fornita dall'industria, fu resa disponibile in 10 sale di lettura distribuite nel Paese e il pubblico fu invitato a consultare i dati e a commentarli, senza rimuovere il materiale dalle sale di lettura.

È interessante notare come pochissimi si avvalsero di tale facoltà, solo Greenpeace e l'*Hudson Institute* ("a nonpartisan policy research organization dedicated to innovative research and analysis that promotes global security, prosperity, and freedom") frequentarono le sale di lettura.

Contemporaneamente l'EPA chiese a PNAS di accelerare la pubblicazione dei risultati, cosa che PNAS fece sul proprio sito web il 14 settembre 2001.

I sei studi pubblicati dimostrarono che non vi erano in concreto rischi per le larve di farfalla monarca perché il polline non è tossico alle concentrazioni presenti in campo aperto (540-545). Solo il polline dell'evento 176 della Novartis (oggi Syngenta) danneggiava alcune larve a causa della concentrazione di tossina nel polline. Questo tipo di mais, tuttavia, fu ritirato dal commercio perché la quantità di tossina espressa nel gambo e nelle foglie della pianta non era sufficiente a contrastare le larve di piralide.

Nel caso dell'altro evento studiato il Bt 11, 1.000 granuli di polline per cm<sup>2</sup> di foglia di *A. syriaca* non causavano alcuna mortalità; a concentrazioni più alte pari a 4000 granuli per cm<sup>2</sup> la superficie delle foglie trattate era così polverosa che le larve non mangiavano. Inoltre, in campo aperto, il numero medio di granuli di polline trovato variava da un minimo di 150 granuli/cm<sup>2</sup> ad un massimo di 1500 granuli/cm<sup>2</sup>. La percentuale di larve che può incontrare foglie con densità di granuli di polline superiore a 1.000 per cm<sup>2</sup> è solo dello 0,007%.

Questi risultati furono poi ignorati dai mezzi di comunicazione di massa, a seguito dell'attacco alle Torri gemelle di New York avvenuto l'11 settembre 2001 e vennero commentati solo dai ricercatori interessati a questi studi (546-549).

Un altro interrogativo venne successivamente sollevato da Oberhauser, Obrycki, Losey e Jesse in una lettera all'EPA nella quale veniva formulato un possibile effetto delle antere sulle larve di monarca, ed effettuata la richiesta di ri-autorizzare il mais Bt, solo per un anno, per eseguire ulteriori ricerche. L'antera, parte terminale degli stami che producono il polline, è più tossica del polline stesso ed era noto che alcune larve di monarca sono in grado di cibarsene,

così l'EPA, il 16 ottobre 2001, autorizzò la coltivazione di 5 mais Bt per soli 5 anni, mentre l'autorizzazione precedente era a tempo indeterminato.

Le verifiche in campo aperto dimostrarono che la presenza di antere tossiche sulle foglie di *A. syriaca* è poco comune, sia all'interno dei campi di mais che nelle loro vicinanze (in media è possibile trovare da 3 a 5 antere per foglia). L'esposizione forzata, in laboratorio, delle larve a 5 antere per foglia non aveva alcun effetto sulla crescita sviluppo e sopravvivenza delle larve (550). L'esposizione a lungo termine era associata ad un aumento della mortalità dello 0,6% (551). Inoltre, sia uno studio che combinava l'esposizione delle antere tossiche con il polline Bt, sia uno studio sul comportamento delle larve in presenza di antere Bt, dimostrarono che le larve si spostavano in modo da evitare le antere, per cui mangiavano meno e si sviluppavano in ritardo (552, 553). Gli autori di questo complesso di studi concordarono sul fatto che il mais Bt non rappresentava un rischio significativo per la farfalla monarca.

#### 10.4.2. Il caso del cotone indiano

Il caso del cotone Bt indiano merita un commento particolare perché fin dall'approvazione alla coltivazione (nel 2002) da parte del Governo, questa pianta è stata accompagnata dalla diceria che avrebbe fatto aumentare il numero dei suicidi tra gli agricoltori indiani. La stessa Vandana Shiva, nota ambientalista indiana, il 4 marzo 2010, dichiarava a *La Stampa* che il risultato della coltivazione di PGM aveva contribuito a circa 200.000 suicidi in 10 anni. Eppure fin dal 2008, uno studio dell'*International Food Policy Research Institute* aveva dimostrato che l'introduzione del cotone Bt non aveva avuto alcuna influenza sui suicidi degli agricoltori indiani (554). Nella realtà, infatti, i suicidi sono molto frequenti ma legati alle condizioni socio-economiche degli agricoltori. Il 60% delle famiglie di agricoltori, che sono 90 milioni, possiede meno di 1 ettaro di terreno coltivabile e solo il 5% possiede più di 5 ettari (555), ed è in grado di ricavare più delle spese di coltivazione. Il 95% delle famiglie agricole, quindi, non ricava dalla terra di che vivere. A questa situazione di stress economico si aggiunse il comportamento disonesto dei rivenditori locali di semi. I semi transgenici costavano cinque volte di più dei semi convenzionali, il che indusse i distributori locali a vendere miscele di semi transgenici e convenzionali a prezzi più bassi. Questo fatto e la mancanza di informazioni su come usare i nuovi semi ha portato a perdite di raccolto; fenomeno che ha aggiunto nuovo stress agli agricoltori che già sono vittime di pratiche di prestiti esosi.

Più recentemente è circolata sul web la notizia che nello stato indiano dell'Andra Pradesh, le pecore, che brucavano i residui delle coltivazioni di cotone Bt, morivano. Un'indagine condotta per conto del Governo dal *Centre for Animal Disease Research and Diagnosis* e dal *Genetic Engineering Approval Committee* non ha trovato alcuna evidenza che la tossina Bt fosse responsabile della mortalità delle pecore, probabilmente dovuta a qualche agente infettivo. Infatti, assumendo per la tossina Cry1A, espressa nel cotone indiano, come limite di sicurezza il NOAEL, che è di 4.200 mg/kg di peso corporeo (capitolo 5 sulla tossicità), una pecora del peso di 15 kg dovrebbe mangiare per raggiungere tale livello di esposizione ben 24.329 kg di foglie o 50.300 kg di fiocco di cotone, secondo le concentrazioni medie di tossina misurate (348, 556).

Nonostante le evidenze scientifiche contrarie, queste due notizie continuano ad essere ripetute acriticamente nei media e a circolare nel web.

In India, invece, dalla prima approvazione di tre eventi di cotone Bt e la coltivazione di circa 30.000 ettari nel 2002 si è passati all'autorizzazione di 6 eventi e alla coltivazione di 8,4 milioni di ettari (81% della superficie coltivata a cotone) nel 2008 (556), e al 90% nel 2010 (555). È interessante notare che due di questi eventi sono frutto della ricerca indiana, il primo, denominato *Bikaneri Nerma*, è stato realizzato da un'istituzione pubblica il *Central Institute for Cotton Research*, il secondo, denominato NHHH-44 da un'impresa indiana la *Metahelix Life*



*Sciences*. Questo aumento nell'uso di ibridi Bt dimostra che questi geni sono stati inseriti in molte linee diverse di germoplasma, rendendo così insignificante l'erosione della biodiversità e che gli agricoltori indiani sono consapevoli dei benefici derivanti dall'impiego del cotone Bt.

## 10.5. Conclusioni

Gli insetticidi Bt, se paragonati con gli insetticidi chimici, sono più vantaggiosi in termini di sicurezza, specificità, potenza e biodegradabilità (557). Questi vantaggi sono effettivi solo quando la tossina è presente sugli organi delle piante di cui si cibano gli insetti dannosi. In generale, gli spray, a base di Bt, si applicano quando compaiono le prime larve, perché le larve più vecchie sono più tolleranti alla tossina. Gli spray persistono solo per pochi giorni sulla superficie delle foglie perché gli UV, il clima e l'ambiente chimico della foglia portano alla degradazione delle proteine Cry. È notevole il fatto che in più di 50 anni d'impiego, la tossina Bt si sia rivelata il prodotto microbiologico più sicuro, tanto che è stato descritto soltanto un caso di danno, con l'identificazione di spore Bt nell'ulcera corneale di un agricoltore la cui faccia era stata spruzzata con il preparato commerciale Dipel (558).

La sicurezza d'uso delle tossine Bt è anche documentata dalle prove sugli animali. I topi di laboratorio sopravvivono a iniezioni sottocutanee di  $10^6$  spore e alla somministrazione intranasale di  $10^7$  spore, via di somministrazione in cui si osserva una minima mortalità con una dose di  $10^8$  spore (559). Queste dosi, rapportate al peso corporeo, corrisponderebbero a  $10^{12}$  spore nel caso dell'uomo, un miliardo di volte la concentrazione che si osserva in campo aperto dopo l'irrorazione con preparati Bt.

La soluzione al problema della degradabilità della tossina in campo aperto è stata data dallo sviluppo di piante transgeniche che la contenevano. In più di 20 anni di rilasci sperimentali e 10 anni di commercializzazione dei mais Bt non sono ancora stati osservati effetti nocivi a lungo termine, ciò nonostante vi è ancora un vivace dibattito tra gli scienziati su quali tipi di esperimenti diano una più accurata valutazione d'impatto ambientale (560-568), tanto che l'EFSA ha rivisto le linee guida per la valutazione dell'impatto delle PGM sugli organismi non bersaglio (569).

Va ricordato, a questo proposito, che una meta-analisi condotta su osservazioni sperimentali in campo ha dimostrato che gli effetti degli insetticidi chimici sono molto più significativi di quelli delle piante Bt (567) e che la coltivazione di cotone resistente agli insetti induce le femmine di falena a deporre le uova su altre piante (570). La maggioranza delle falene avrà, come conseguenza, una composizione genetica che le indurrà ad evitare di deporre le uova sul cotone. Il cotone resterà così libero dagli insetti che non svilupperanno resistenze, andando a vivere altrove.

Tutti gli insetticidi creano una pressione selettiva sulle popolazioni bersaglio e il meccanismo d'azione della tossina, cioè il legame ad un recettore delle cellule epiteliali intestinali, rappresenta un'opportunità per gli insetti bersaglio di sviluppare resistenze. La prima osservazione in materia è stata fatta nelle Hawaii, dove dal 1963, spruzzato ripetutamente con Bt, è stato isolato il lepidottero resistente *Plutella xylostella* (501).

Esperimenti di laboratorio hanno prodotto molte specie resistenti a Bt, il che suggerisce che l'uso intensivo di una singola proteina Cry possa portare all'evoluzione di resistenze, considerato che le stesse specie non avevano mostrato tale evoluzione della resistenza in campo aperto (571). Tuttavia, lo studio di popolazioni di insetti in USA, Australia, Cina ed Europa, effettuato nelle aree di coltivazione di piante Bt, ha portato all'isolamento di una sola specie resistente (*Helicoverpa zea*) identificata in un numero limitato di siti in Arkansas e Mississippi (572).

L'efficacia prolungata della prima generazione di piante Bt per più di 15 anni contro tutte le popolazioni bersaglio, ha superato anche le aspettative dei ricercatori che lavorano sulla genetica di tali popolazioni (573). Sebbene questo risultato sia anche frutto dell'adozione della strategia dei rifugi, l'assenza di popolazioni resistenti, in natura, suggerisce che la resistenza stessa penalizzi la numerosità dell'insetto in assenza della tossina (574).

Tuttavia, nella gestione di campi di piante resistenti agli insetti bisogna controllare anche l'effetto di sostituzione, poiché è possibile che l'insetto bersaglio venga sostituito da una specie che normalmente causa effetti minori. In Cina, dopo 10 anni di coltivazione del cotone resistente a parassiti maggiori come la *Helicoverpa armigera*, nei campi di cotone transgenico si è osservato un incremento nella popolazione dei miridi, un parassita occasionale del cotone stesso (575). Prima dell'adozione del cotone transgenico, i pesticidi, usati per controllare il verme rosa, uccidevano anche i miridi. L'infestazione dei miridi è cresciuta in parallelo con l'incremento della superficie coltivata a cotone Bt, per cui gli agricoltori hanno dovuto usare i pesticidi sul cotone transgenico per controllare i miridi. I miridi sono diventati un parassita maggiore ed hanno attaccato anche i datteri cinesi, la vite, le pesche e le pere.

Il calo nell'uso dei pesticidi sul cotone Bt porta ad un rovesciamento del ruolo ecologico del cotone, da trappola dei miridi nei sistemi convenzionali, a responsabile dell'infestazione nei campi di cotone Bt. Il monitoraggio successivo ha dimostrato, negli anni 2004-2006, che l'aumento nel numero dei miridi era limitato alla metà dei campi sorvegliati e strettamente legato alle condizioni locali di temperatura e piovosità (576). Anche le ricerche condotte in Europa e in Nord Africa hanno portato alla conclusione che i danni, provocati dalla fitofagia secondaria dei miridi predatori, sono in termini statistico-probabilistici poco significativi, a fronte dei benefici che invece possono derivare dalla predazione (577). È interessante rilevare che l'osservazione sui miridi è stata fatta nella provincia Hebei nel nord della Cina, dove è stato raccomandato l'uso dei rifugi non Bt, perché il cotone è l'unico ospite del parassita del cotone *Pectinophora gossypiella*, prevalente in tale provincia, mentrenelle altre regioni, in cui si coltiva il cotone transgenico, altre piante coltivate possono costituire rifugio per il parassita maggiore *Helicoverpa armigera*, il che semplifica la gestione dei campi coltivati a cotone Bt che vede coinvolti circa 10 milioni di agricoltori (578). In queste ultime province, dopo 10 anni di monitoraggio non si è riscontrata l'insorgenza di resistenza dovuta al cotone Bt (579).

I risultati cinesi suggeriscono di integrare la tecnologia delle piante Bt con altre tattiche di controllo degli insetti, come il controllo biologico, che insieme ai metodi colturali e a quelli tradizionali di controllo degli insetti nocivi può giocare un ruolo importante nel conservare la suscettibilità degli insetti alle piante transgeniche (580-582), specialmente se l'adozione delle pratiche di lotta non sono adottate campo per campo ma a livello di territorio (583).

Ad esempio, in Australia, il controllo di *Helicoverpa armigera* ottenuto dal cotone Bt è accompagnato dall'aratura per distruggere le pupe dell'insetto che hanno svernato e dall'adozione di una finestra di semina molto stretta per evitare il numero di generazioni successive possibili (581). In Arizona, insetti nocivi per la produzione di cotone, che non sono influenzati dalla tossina Bt, sono controllati con l'uso di pesticidi a spettro ridotto, che consentono la conservazione degli insetti benefici, mentre i miridi, come *Lygus hesperus*, sono controllati con un inibitore dell'alimentazione (584).

Le piante transgeniche possono essere usate anche come trappole, quando si coltivano piante non transgeniche (585). Inoltre, vi sono casi in cui la pianta transgenica, come ad esempio la senape (*Brassica juncea*) Bt, è preferita dalla *Plutella xylostella* per l'ovideposizione rispetto al cavolo e alle verdure a foglia verde, sebbene la pianta transgenica impedisca successivamente la sopravvivenza delle larve (586). Questo sistema potrebbe essere molto vantaggioso nel Sud Est Asiatico, dove sono coltivate circa 50 tipi di crucifere in aree compatte dove sono presenti centinaia di piccole fattorie (0,5-2 ha).

L'adozione di piante Bt favorisce anche gli agricoltori che non le usano, perché sopprimendo il parassita principale, come è avvenuto negli USA per quanto riguarda la piralide, riducono l'infestazione. Analizzando la popolazione di piralide in 5 Stati si è, infatti, passati da una media di 59 larve per 100 piante, prima dell'adozione del mais Bt, a 16 larve per 100 piante, dopo che la superficie coltivata a mais Bt aveva raggiunto il 40% del totale (587).

Appare evidente come una gestione appropriata delle piante Bt debba essere assicurata dall'autorità pubblica o dalla comunità e non dal singolo agricoltore, dovendo essere effettuata a livello di territorio e non di singolo campo (588-593). Questo approccio è indispensabile nei Paesi in via di sviluppo, dove gli agricoltori coltivano poca terra e non hanno la flessibilità economica necessaria per gestire individualmente la strategia dei rifugi (594).

Negli agrosistemi, funzioni chiave come l'impollinazione, il controllo dei parassiti erbivori e la fertilità del suolo sono dovuti agli organismi non bersaglio. È, perciò, necessario che i gruppi funzionali principali responsabili di tali eventi siano accuratamente studiati prima di fornire l'autorizzazione alla coltivazione di piante GM (588-594).

L'insorgenza delle resistenze, oltre che con i rifugi, può essere controllata facendo ricorso a tossine geneticamente modificate (595). A favore dell'impiego della tossina Bt, sia come tale sia inserita nella pianta, vi è il fatto che questa è 300 volte più potente, su base molecolare, dei piretroidi sintetici e 80.000 volte più potente degli organofosfati. Per i primi vengono applicate circa  $1,2 \times 10^{22}$  molecole per ettaro, per i secondi l'applicazione è di circa  $1,6 \times 10^{24}$  molecole per ettaro, mentre per l'applicazione della tossina sono sufficienti  $10^{20}$  molecole per ettaro.

L'impiego di mais Bt da parte dell'agricoltura italiana, adottando le misure descritte, potrebbe avere effetti positivi sia per quanto riguarda la resa produttiva (596) che la qualità del prodotto più salubre per la salute umana in quelle zone nelle quali il consumo di mais è associato ai tumori oro-faringei (597, 598).

## Bibliografia

1. Xu D, Xue Q, McElroy D, Mawai Y, Vaughan A, Hilder A, Wu R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. *Mol Breeding* 1996;2(2):167-73.
2. Ishimoto M, Sato T, Chrispeels MJ, Kitamura K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha-amylase inhibitor of common bean. *Entomol Exp Appl* 1996;79(3):309-15.
3. Bell HA, Fitches EC, Down RE, Marris GC, Edwards JP, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. The effect of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Insect Physiol* 1999;45(11):983-991.
4. DeLucca AJ, Simonson JG, Larson AD. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can J Microbiol* 1981;27(9):865-70.
5. Hendriksen NB, Hansen BM Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Can J Microbiol* 2002; 48(3):256-61.
6. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(3):775-806.
7. Crickmore N. The diversity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. In: Charles J-F, Delécluse A, Nielsen-Le Roux C (Ed.). *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 65-79.
8. Mc Clintock JT, Schaffer CD, Sjoblad RD. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis* based pesticides. *Pesticide Sci* 1995;45(2):95-105.

9. Klier A. *Bacillus thuringiensis*: risk assessment. In: Charles J-F, Delécluse A, Nielsen-Le Roux C (Ed.). *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher; 2000. p. 485-504.
10. Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(41):15196-9.
11. Walters FS, Slatin SL, Kulesze CA, English LH. Ion channel activity of N-terminal fragments from the Cry1A(c) delta-endotoxin. *Biochem Biophys Res Comm* 1993;196(2):921-6.
12. Swiecicka I, Fiedoruk K, Bednarz G. The occurrence and properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from free-living animals. *Lett Appl Microbiol* 2002;34(3):194-8.
13. Swiecicka I, De Vos P. Properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from bank voles. *J Appl Microbiol* 2003;94(1):60-4.
14. Lee DH, Cha IH, Woo DS, Ohba M. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*: Fecal populations recovered from wildlife in Korea. *Can J Microbiol* 2003;49(7):465-71.
15. Mizuki E, Maeda M, Tanaka R, Lee DE, Hara M, Akao T, Yamashita S, Kim HS, Ichimatsu T, Ohba M. *Bacillus thuringiensis*: a common member of microflora in activated sludges of a sewage treatment plant. *Curr Microbiol* 2001;42(6):422-5.
16. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(3):807-13.
17. Koziel GM, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji HR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnol* 1993;11(2):194-200.
18. Greenplate JT. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit and terminals. *J Econ Entomol* 1999;92(6):1377-83.
19. Tapp H, Calamai L, Stotzky G. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biol Biochem* 1994; 26(6): 663-79.
20. Tapp H, Stotzky G. Insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound to pure and soil clays. *Appl Environ Microbiol* 1995;6(5):1786-90.
21. Koskella J, Stotzky G. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(9):3561-8.
22. Crecchio C, Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acid from soil. *Soil Biol Biochem* 1998;30(4):463-70.
23. Tapp H, Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biol Biochem* 1998;30(4):471-6.
24. Lee L, Saxena D, Stotzky G. Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(7):4111-5.
25. Vettori D, Paffetti D, Saxena D, Stotzky G, Giannini R. Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* introduced in sprays in Sardinia soils. *Soil Biol Biochem* 2003;35(12):1635-42.
26. Palm CJ, Donegan KK, Harris D, Seidler RJ. Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin from transgenic plants. *Mol Ecol* 1994;3(2):145-51.

27. Palm CJ, Schaller DL, Donegan KK, Seidler RJ. Persistence in soil of transgenic plant-produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin. *Can J Microbiol* 1996;42(12):1258-62.
28. Sims SR, Reams JE. Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* CryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory microcosm and field studies. *J Agr Food Chem* 1997;45(4):1502-5.
29. Herman RA, Wolt JD, Halliday WR. Rapid degradation of the Cry1F insecticidal crystal protein in soil. *J Agr Food Chem* 2002;50(24):7076-8.
30. Zwahlen C, Hillbeck A, Gugerli P, Netwing W. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Mol Ecol* 2003;12(3):765-75.
31. Dubelman S, Ayden BR, Bader BM, Brown CR, Jiang CJ, Vlachos D. Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use. *Env Entomol* 2005;34(4):915-21.
32. Shan G, Embrey Herman RA, McCormick R. Cry1F protein not detected in soil after three years of transgenic corn (1507 corn) use. *Environ Entomol* 2008;37(1):255-62.
33. Denecke J, Botterman J, Deblaere R. Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell* 1990;2(1):51-9.
34. Vitale A, Chrispeels MJ. Sorting of proteins to the vacuoles of plant cells. *BioEssays* 1992;14(3):151-60.
35. Rusch SL, Kendall DA. Protein transport via amino-terminal targeting sequences: common themes in diverse systems. *Mol Membrane Biol* 1995; 12(4):295-307.
36. Borisjuk NV, Borisjuk LG, Logendra S, Petersen F, Gleba Y, Raskin I. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnol* 1999;17(5):466-9.
37. Kostichka K, Warren GW, Mullins M, Mullins AD, Craig JA, Koziel MG, Estruch JJ. Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. *J Bacteriol* 1996;178(7):2141-4.
38. Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiol Ecol* 2000;33:35-9.
39. Saxena D, Flores S, Stotzky G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biol Biochem* 2002;34(1):133-7.
40. Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria and fungi in soil. *Soil Biol Biochem* 2001; 33(9):1225-30.
41. Saxena D, Stewart CN, Altosaar I, Shu Q, Stotzky G. Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. *Plant Physiol Biochem* 2004;42(5):383-7.
42. Koskella J, Stotzky G. Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *morrisoni* (strain *tenebrionis*), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi and algae in vitro. *Can J Microbiol* 2002;48(3):262-7.
43. Icoz I, Andow D, Zwahlen C, Stotzky G. Is the CryAb protein from *Bacillus thuringiensis* (Bt) taken up by plants from soils previously planted with Bt corn and by carrot from hydroponic culture? *Bull Environ Contam Toxicol* 2009;83(1):48-58.
44. Jensen LS, Soerensen J. Microscale fumigation-extraction and substrate induced respiration methods for measuring microbial biomass in barley rhizosphere. *Plant Soil* 1994;162(2):151-61.
45. Meharg AA. A critical review of labelling techniques used to quantify rhizosphere carbon flow. *Plant Soil* 1994;166(1):55-62.
46. Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, Dobson G. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem* 1999; 31:145-53.

47. Atlas RM, Bartha R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications, Third Ed.* Menlo Park: Benjamin/Cummings; 1993. p. 1-561.
48. Sims SR, Holden LR. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry 1Ab protein in corn tissue. *Environ Entomol* 1996;25(6):659-64.
49. Palm, CJ, Seidler RJ, Schaller CL, Donegan KK. Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin. *Can J Microbiol* 1996;42(12):1258-62.
50. Flores S, Saxena D, Stotzky G. Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. *Soil Biol Biochem* 2005;37(6):1073-82.
51. Icoz I, Stotzky G. Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn does not persist in soil. *Transgenic Res* 2008;17(4):609-20.
52. Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucuo LQ, Seidler RJ. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Appl Soil Ecol* 1995;2(2):114-24.
53. Donegan KK, Schaller DL, Stone JK, Ganio LM, Reed G, Hamm PB, Seidler RJ. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogens levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. *Transgenic Res* 1996;5(1):25-35.
54. Daudu CK, Muchaonyerwa P, Minkeni PNS. Litterbag decomposition of genetically modified maize residues and their constituent *Bacillus thuringiensis* protein (Cry1Ab) under field conditions in the central region of the Eastern Cape, South Africa. *Agric Ecosys Env* 2009;134(3-4):153-8.
55. Blackwood CB, Buyer JS. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. *J Environ Qual* 2004;33(3):832-6
56. Castaldini M, Turrini A, Sbrana C, Benedetti A, Marchionni M, Mocali S, Fabiani A, Landi S, Santomassimo F, Pietrangeli B, Nuti MP, Niclaus N, Giovannetti A. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(11):6719-29.
57. Biro B, Villanyi I, Fuzy A, Naar Z. Bacterial and fungal colonization in the rhizosphere of genetically modified (Bt) and isogenic control maize. *Agrokemia es Talajtan* 2005;54(1/2):189-202.
58. Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch ANE, Scrimgeour C, Andersen MN, Cortet J, Messean A, Sausse C, Lacroix B, Kogh PH. A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant Soil* 2005;275(1/2):135-46.
59. Cortet J, Andersen MN, Caul S, Griffiths B. Decomposition processes under Bt (*Bacillus thuringiensis*) maize: results of a multisite experiment. *Soil Biol Biochem* 2006;38(1):195-9.
60. Villanyi I, Fuzy A, Biro B. Non-target microorganisms affected in the rhizosphere of the transgenic Bt corn. *Cereal Res Comm* 2006;34(1):105-8.
61. Devare M, Londono RLM, Thies JE. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affects soil microbial activity or biomass: a 3-year field analysis. *Soil Biol Biochem* 2007;39(8):2038-47.
62. Oliveira AP, Pampulha ME, Bennet JP. A two-year field study with transgenic *Bacillus thuringiensis* maize: effects on soil microorganisms. *Sci Total Environ* 2008;405(1/3):351-7.
63. Hopkins DW, Gregorich EG. Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *Eur J Soil Sci* 2003; 54(4):793-800.
64. Baumgarte S, Tebbe CC. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Mol Ecol* 2005;14(8):2539-51.

65. Icoz I, Saxena D, Andow DA, Zwahlen C, Stotzky G. Microbial populations and enzyme activities in soil *in situ* under transgenic corn expressing cry proteins from *Bacillus thuringiensis*. *J Environ Qual* 2008;37(2):647-62.
66. Douville M, Gagné F, Masson L, McKay J, Blaise C. Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab endotoxin in the environment. *Biochem Systematics Ecol* 2005;33(3):219-232.
67. Icoz I, Stotzky G. Fate and effects of insect resistant Bt crops in soil ecosystems. *Soil Biol Biochem* 2008;40(3):559-86.
68. Head G, Surber JB, Watson JA, Martin JW, Duan JJ. No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (Bollgard) use. *Environ Entomol* 2002;31(1):30-6.
69. Rui YuKui, Yi GuoXiang, Zhao Jing, Wang BaoMin, li ZhaoHu, Zhai ZhiXi, He ZhongPei, Li QX. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2005;21(6/7):1279-84.
70. Shen RenFang, Cai Hong, Gong WanHe. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. *Plant Soil* 2006;285(12):149-59.
71. Rui YuKui, Yi GuoXiang, Guo Jing, Guo Xiao, Luo UnBo, Wang BaoMin, Li ZhaoHu. Transgenic cotton could safely be grown since CpTi toxin rapidly degrades in the rhizosphere soil. *Acta Agric Scand* 2007;57(2):122-5.
72. Zhang Meijun, Yang WuDe, Li YanE. Effects of Bt transgenic cottons planting on rhizosphere soil microorganisms at different growth stages. *J Plant Ecol (Chinese version)* 2008;32(1):197-203.
73. Balachandar D, Raja P, Nirmala K, Rithyl TR, Sundaram SP. Pink-pigmented facultative methylotrophs (PPFMs) are one of the beneficial proteobacteria commonly found in phyllosphere, rhizosphere and as endophytes in cotton. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;24(10):2087-95.
74. Wu WeiXiang, liu Wei, Lu HaoHao, Chen Yingxu, Devare M, Thies J. Use of <sup>13</sup>C labelling to assess carbon partitioning in transgenic and nontransgenic (parental) rice and their rhizosphere soil microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;67(1):93-102.
75. Bai YaYu, Jiang MingXing, Cheng JiaAn, Shen HuMei, Yang Pu, Chen ZhengXian, Jiang YongHou, Shu QingYao. Degradation of Cry1Ab toxin protein expressed by Bt transgenic rice in paddy soils. *Chinese Journal of Rice Science* 2004;18(3):255-61.
76. Wu WeiXiang, Ye QingFu, Min Hanga, Duan XueJuna, Jin WenMinga. Bt-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in flooded paddy soil. *Soil Biol Biochem* 2004; 36(2):289-95.
77. Bai YaoYu, Jiang MingXing, Cheng JiaAn. Impacts of environmental factors on degradation of Cry1Ab insecticidal protein in leaves of Bt rice. *Scientia Agricultura Sinica* 2006;39(4):72-7.
78. Wang HaiYan, Ye QingFu, Gan j, Wu LiCheng. Biodegradation of Cry1Ab protein from Bt transgenic rice in aerobic and flooded paddy soils. *J Agric Food Chem* 2007;55(5):1900-4.
79. Hu JianJun, Zhang YunZhe, Lu MengZhu, Zhang JianGuo, Zhang ShouGong. Transgene stability of transgenic *Populus nigra* and its effects on soil microorganisms. *Scientia Silvae Sinicae* 2004;40(5):105-7.
80. Lamarche J, Hamelin RC. No evidence of an impact on the rhizosphere diazotroph community by the expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin by Bt white spruce. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(20): 6577-83.
81. Dunfield KE, Germida JJ. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. *J Environ Qual* 2004;33(3):806-15.
82. Daffonchio D, Borin S, Bruseti L, Rizzi A, Sorlini C, Zanardini E, Zucchi M. Effetti delle piante transgeniche sui microrganismi della rizosfera: biodiversità e scambio genico orizzontale. In: Sorlini C (Ed.). *Biodiversità e organismi geneticamente modificati. Accordo di programma Ministero*

- dell'ambiente e della tutela del territorio e Consiglio Nazionale delle Ricerche. Roma: Rotografica; 2004. p. 93-105.
83. Ernst D, Rosenbrock-Krestel H, Kirchhof G, Bieber E, Giunaschwili N, Muller R, Fischbeck G, Wagner T, Sandermann H, Hartmann A. Molecular investigations of the soil, rhizosphere and transgenic glufosinate-resistant rape and maize plants in combination with herbicide (Basta) application under field conditions. *Z Naturforsch C* 2008;63(11-12):864-72.
  84. Liu W. Do genetically modified plants impact arbuscular mycorrhizal fungi? *Ecotoxicology* 2009;19(2):229-38.
  85. Saxena D, Stotzky G. Bt toxin uptake from soil by plants. *Nature Biotechnol* 2001;19(3):199.
  86. Saxena D, Stotzky G. Bt toxin is not taken up from soil or hydroponic culture by corn, carrot, radish or turnip. *Plant Soil* 2002;239(2):165-72.
  87. Newman EI. The rhizosphere: carbon sources and microbial populations. *Special Publication Series of the British Ecological Society Vol. 4*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1985. p. 107-21.
  88. Clark BW, Philips TA, Coats JR. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review. *J Agric Food Chem* 2005;53:4643-53.
  89. Nguyen HT, Jehle JA. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON810. *J Plant Dis Protect* 2007;114(2):82-7.
  90. Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch ANE, Cortet J, Andersen MN, Krogh PH. Microbial and microfaunal community structure in cropping systems. *Pedobiologia* 2007;51(3):195-206.
  91. Cortet J, Griffiths BS, Bohanec M, Demsar D, Andersen MN, Caul S, Birch ANE, Pernin C, Tabone E, de Vaufleury A, Ke Xin, Krogh PH. Evaluation effects of transgenic Bt maize on microarthropods in an European multi-site experiment. *Pedobiologia* 2007;51(3):207-18.
  92. Krogh PH, Griffiths B, Demsar D, Bohanec M, Debeljak M, Andersen MN, Sausse C, Birch ANE, Caul S, Holmstrup M, Heckmann LH, Cortet J. Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and Bt maize cropping systems. *Pedobiologia* 2007;51(3):219-27.
  93. Debeljak M, Cortet J, Demsar D, Krogh PH, Dzeroski S. Hierarchical classification of environmental factors and agricultural practices affecting soil fauna under cropping systems using Bt maize. *Pedobiologia* 2007; 51(3):229-38.
  94. Bohanec M, Cortet J, Griffiths B, Znidarsic M, Debeljak M, Caul S, Thompson J, Krogh PH. A qualitative multi-attribute model for assessing the impact of cropping systems on soil quality. *Pedobiologia* 2007;51(3):239-50.
  95. Birch ANE, Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Heckmann LH, Krogh PH, Cortet J. The role of laboratory, glasshouse and field scale experiments in understanding the interactions between genetically modified crops and soil ecosystems: a review of the ECOGEN project. *Pedobiologia* 2007;51(3): 251-60.
  96. Yu L, Berry RE, Croft BA. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatidae) *J Econ Entomol* 1997;90(1):113-8.
  97. Obrycki JJ, Losey JE, Taylor OR, Jesse LCH. Transgenic insecticidal corn: beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *BioScience* 2001; 51(5):353-61.
  98. Wandeler H, Bahylova J, Nentwig W. Consumption of two Bt and six non-Bt corn varieties by the woodlouse *Porcellio scaber*. *Basic Appl Ecol* 2002; 3(4):357-65.
  99. Romeis J, Battini M, Bigler F. Transgenic wheat with enhanced fungal resistance causes no effects on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). *Pedobiologia* 2003;47(2):141-7.
  100. Zwahlen C, Hilbeck A, Howald R, Nentwig W. Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Mol Ecol* 2003;12(4):1077-86.



101. Bakonyi G, Szira F, Kiss I, Villanyi I, Seres A, Szekacs A. Preference tests with collembolas on isogenic and Bt-maize. *Eur J Soil Biol* 2006;42(Suppl. 1):S132-S135.
102. Clark BW, Coats JR. Subacute effects of Cry1Ab Bt corn litter on the earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*. *Env Entomol* 2006;35(4):1121-9.
103. Vercesi ML, Krogh PH, Holmstrup M. Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Appl Soil Ecol* 2006;32(2):180-7.
104. Ahmad A, Wilde GE, Zhu KY. Evaluation of effects of coleopteran-specific Cry3Bb1 protein on earthworms exposed to soil containing corn roots or biomass. *Env Entomol* 2006;35(4):976-85.
105. Romeis J, Waldburger M, Bigler F. Assessing the performance and nontarget effects of wheat engineered with the kp4 gene to mediate smut resistance under semi-field conditions. *Bull OILB/SROP* 2006;29(5):129-36.
106. Schrader S, Munchenberg T, Baumgarte S, Tebbe CC. Earthworms of different functional groups affect the fate of the Bt-toxin Cry1Ab from transgenic maize in soil. *Eur J Soil Biol* 2008;44(3):283-9.
107. Benz G, Altwegg A. Safety of *Bacillus thuringiensis* for earthworms. *J Invertebr Pathol* 1975;26(1):125-6.
108. Douville M, Gagné F, Blaise C, André C. Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn cry1Ab gene from an aquatic environment. *Ecotox Environ Safety* 2007;66(2):195-203.
109. Tall L, Methot G, Armellin A, Pinel-Alloul B. Bioassessment of benthic macroinvertebrates in wetland habitats of Lake Saint-Pierre (St. Lawrence River). *J Great Lakes Res* 2008;34(4):599-614.
110. Bohn TT, Primicerio R, Hessen DO, Traavik T. Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a Bt-transgenic maize variety. *Arch Environ Contam Toxicol* 2008;55(4):584-92.
111. Rosi-Marshall EJ, Tank JL, Royer TV, Whiles MR, Evans-White M, Chambers C, Griffiths NA, Pokelsek J, Stephen ML. Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(41):16204-8.
112. Beachy RN, Fedoroff NV, Goldberg RB, McHughen A. The burden of proof: A response to Rosi-Marshall *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(7):E9.
113. Parrot W. Study of Bt impact on caddisflies overstates its conclusions: Response to Rosi-Marshall *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(7):E10.
114. Rosi-Marshall EJ, Tank JL, Royer TV, Whiles MR. Reply to Beachy *et al.* and Parrot: Study indicates Bt corn may affect caddisflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(7):E11.
115. Waltz E. Gm crops: battlefield. *Nature* 2009;461:27-32.
116. Griffiths NA, Tank JL, Royer TV, Rosi-Marshall EJ, Whiles MR, Chambers CP, Frauendorf TC, Evans-White MA. Rapid decomposition of maize detritus in agricultural headwater streams. *Ecol Appl* 2009;19(1):133-42.
117. Prihoda KR, Coats JR. Aquatic fate and effects of *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein: toward risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 2008; 27(4):793-8.
118. Jensen PD, Dively GP, Swan CM, Lamp WO. Exposure and nontarget effects of transgenic Bt corn debris in streams. *Environ Entomol* 2010; 39(2):7070-4.
119. OECD. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, number 42. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus Thuringiensis*-Derived Insect Control Protein. Parigi; 2007 ENV/JM/MONO(2007)14.
120. Lozzia GC, Rigamonti LE. 1996. Behaviour of the European corn Borer, *Ostrinia nubilalis* Hb on transgenic corn. *Boll Zool agr Bachic* 1996;25(1): 51-69.

121. Süss L, Lozzia GC. Effetti di mais transgenico sulla biologia di *Ostrinia nubilalis* (Hb.) (Lepidoptera: Pyraustidae). *Atti del Convegno Le Agrobiotecnologie*. Bologna: Università degli Studi, Facoltà di Agraria; 1996: p. 1-8.
122. Lozzia GC, Rigamonti IE. Prime osservazioni sull'artropodofauna presente in campi di mais transgenico. *Atti Giornate Fitopatologiche* 1998, p. 223-8.
123. Lozzia GC, Rigamonti IE, Agosti M. Metodi di valutazione degli effetti di mais transgenico sugli artropodi non bersaglio. *Notiziario sulla protezione delle piante* 1998;8(1):27-39.
124. Lozzia GC. Biodiversity and structure of ground beetle assemblages (Coleoptera: Carabidae) in Bt corn and its effects on non target insects. *Boll Zool agr Bachic* 1999;31(1):37-58.
125. Raps A, Kehr J, Gugerli P, Moar WJ, Bigler F, Hilbeck A. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol Ecol* 2001;10(2):525-33.
126. Cowgill SE, Wright C, Atkinson HJ. Transgenic potatoes with enhanced levels of nematode resistance do not have altered susceptibility to nontarget aphids. *Mol Ecol* 2002;11(4):821-7.
127. Lumbierres B, Albajes R, Pons X. Transgenic Bt maize and *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae) performance. *Ecol Entomol* 2004;29(3):309-17.
128. Xue Kun, Deng Su, Wang RongJiang, Yan FengMing, Xu ChongRen. Leaf surface factors of transgenic Bt cotton associated with the feeding behaviors of cotton aphids: a case study on non-target effects. *Science in China Series C – Life Sciences*. 2008;51(2):145-56.
129. Xue Kun, Wang XiaoYing, Huang CuiHong, Wang RongJiang, Liu Biao, Yan FengMing, Xu ChongRen. Stylet penetration behaviors of the cotton aphid *Aphis gossypii* on transgenic Bt cotton. *Insect Sci* 2009;16(2):137-46.
130. Lawo NC, Wackers FL, Romeis J. Indian Bt cotton varieties do not affect the performance of cotton aphids. *Plos One* 2009. p. e4804.
131. Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol Entomol* 2002;27(4):441-7.
132. Obrist LB, Klein H, Dutton A, Bigler F. Assessing the effects of Bt maize on the predatory mite *Neoseiulus cucumeris*. *Exp Appl Acarol*. 2006;38(2/3): 125-39.
133. Head G, Brown CR, Groth ME, Duan JJ. Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomol Exp Appl* 2001;99(1):37-45.
134. Bourguet D, Chaufaux J, Micoud A, Delos M, Naibo B, Bombarde F, Marque G, Eychenne N, Pagliari C. *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). *Environ Biosafety Res* 2002;1(1):49-60.
135. Graham J, Gordon SC, Smith K, McNicol RJ, McNicol JW. The effect of the Cowpea trypsin inhibitor in strawberry on damage by vine weevil under field conditions. *J Hort Sci Biotech* 2002;77(1):33-40.
136. Eckert J, Gathmann A, Schuphan I. Impact of growing Bt-maize on non target organisms: thrips and their antagonists. (original: Auswirkungen des Anbaus von Bt-Mais auf Nichtzielorganismen: Thripse und ihre Gegenspieler.) *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 2003;1481/6:439-42.
137. Pons X, Lumbierres B, Lopez C, Albajes R. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: a farm scale study. *Eur J Entomol* 2005;102(1):73-9
138. Whitehouse MEA, Wilson LJ, Fitt GP. A comparison of arthropod communities in transgenic Bt and conventional cotton in Australia. *Environ Entomol* 2005;34(5):1224-41.

139. Obrist LB, Klein H, Dutton A, Bigler F. Effects of Bt maize on *Frankliniella tenuicornis* and exposure of thrips predators to prey-mediated Bt toxin. *Entomol Exp Appl* 2005;115(3):409-16.
140. Habustova O, Turanli F, Dolezal P, Ruzicka V, Spitzer L, Hussein HM. Environmental impact of Bt maize-three years of experience. *Bull OILB/SROP* 2006;29(5):57-63.
141. Schorling M, Freier B. Six-year monitoring of non-target arthropods in Bt maize (Cry 1Ab) in the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) infestation area Oderbruch (Germany). *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2006;1(S1):106-8.
142. Dhillon MK, Sharma HC. Impact of Bt-engineered cotton on target and non-target arthropods, toxin flow through different trophic levels and seed cotton yield. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*. 2009;22(3):462-66.
143. Mann RS, Gill RS, Dhawan AK, Shera PS. Relative abundance and damage by target and non-target insects on Bollgard and Bollgard II cotton cultivars. *Crop Prot* 2010;29(8):793-801.
144. Akhtar ZR, Tian JC, Chen Y, Fang Q, Hu C, Chen M, Peng YF, Ye GY. Impacts of six Bt rice lines on nontarget rice feeding thrips under laboratory and field conditions. *Environ Entomol* 2010;39(2):715-26.
145. Dutton A, Romeis J, Bigler F. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. *BioControl* 2003;48:611-3.
146. Zhang Gui-fen, Wan Fang-hao. Lövei GL, Liu Wan-xue. Guo, Jian-ying. Transmission of Bt toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feeding on transgenic Bt cotton. *Environ Entomol* 2006;35(1):143-50.
147. Burgio G, Lanzoni A, Accinelli G, Dinelli G, Bonetti A, Marotti I, Ramilli F. Evaluation of Bt-toxin uptake by the non-target herbivore *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) feeding on transgenic oilseed rape. *Bull Entomol Res* 2007;97:211-5.
148. Burgio G, Dinelli G, Marotti I, Zurla M, Bosi S, Lanzoni A. Bt-toxin uptake by the non-target herbivore, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), feeding on transgenic oilseed rape in laboratory conditions. *Bull Entomol Res* 2011; 101(2); 241-7.
149. Coll M, Guershon M. Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. *Ann Rev Entomol* 2002;47:267-97.
150. Wäckers FL. Suitability of (extra-) floral nectar pollen and honeydew as insect food sources. In: Wäckers FL, van Rijn PCJ, Bruin J (Ed.). *Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications*. Cambridge University Press. Cambridge 2005 p. 17-74.
151. Duan JJ, Head G, McKee MJ, Nickson TE, Martin JW, Sayegh FS. Evaluation of dietary effects of transgenic corn pollen expressing Cry3Bb1 protein on a non-target ladybird beetle, *Coleomegilla maculata*. *Entomol Exp Appl* 2002;104(2/3):271-80.
152. Lundgren JG, Razzak AA, Wiedenmann RN. Population responses and food consumption by predators *Coleomegilla maculata* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) during anthesis in an Illinois cornfield. *Environ Entomol* 2004;33(4):958-63.
153. Obrist LB, Dutton A, Albajes R, Bigler F. Exposure of arthropod predators to Cry1Ab toxin in Bt-maize fields. *Ecol Entomol* 2006;31(2):143-54.
154. Li Y, Meissle M, Romeis J. Consumption of Bt maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 does not harm adult green Lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) *PlosOne* 2008;3(8):e2909.
155. Shi Y, Wang MB, Powell KS, van Damme E, Hilder VA, Gatehouse AMR, Boulter D, Gatehouse A. Use of the rice sucrose synthase-1 promoter to direct phloem-specific expression of  $\beta$ -glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants. *J Exp Botany* 1994;45(5):623-31.
156. Kanrar S, Venkateswari J, Kirti PB, Chopra VL. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) with resistance to the mustard aphid (*Lipaphis erysimi* Kalt.) *Plant Cell Rep* 2002;20(10):976-81.

157. Rahbè Y, Deraison C, Bonadè-Bottino M, Girard C, Nardon C, Jouanin L. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduce performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Sci* 2003;164(4):441-50.
158. Konrad R, Wäckers FL, Romeis J, Babendreier D. Honeydew feeding in the solitary bee *Osmia bicornis* as affected by aphid species and nectar availability. *J Insect Physiol* 2009;55(12):1158-66.
159. Hogervorst PAM, Wäckers FL, Woodring J, Romeis J. Snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin) in aphid honeydew negatively affects survival of a honeydew consuming parasitoid. *Agric Forest Entomol* 2009;11(1): 161-73.
160. Dutton A, Obrist L, D'Alessandro M, Diener L, Müller M, Romeis J, Bigler F. Tracking Bt toxin in transgenic maize for risk assessment of non target arthropods. *IOBC/WPRS Bulletin* 2004;27(3):57-63.
161. Torres JB, Ruberson JR, Adang MJ. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agric Forest Entomol* 2006; 8(3): 191-202.
162. Torres JB, Ruberson JR. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. *Transgenic Res* 2008;17(3):345-54.
163. Hogervorst PAM, Ferry N, Gatehouse AMR, Wäckers FL, Romeis J. Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. *J Insect Physiol* 2006;52(6):614-24.
164. Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, Filippini A, Bigler F. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ Entomol* 1998;27(5):1255-63.
165. Hilbeck A, Baumgartner M, Fried PM, Bigler F. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ Entomol* 1998;27(2):480-87.
166. Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, Filippini A, Bigler F. Prey-mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin on the predator *Chrysoperla carnea*. *Entomol Exper Appl* 1999;91:305-16.
167. Romeis J, Dutton A, Bigler F. *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stevens) (Neuroptera: Chrysopidae) *J Insect Physiol* 2004;50(2/3):175-183.
168. Li YunHe, Romeis J. Impact of snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) on adults of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. *J Insect Physiol* 2009;55(2):135-42.
169. Li YunHe, Meissle M, Romeis J. Consumption of Bt maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 does not harm adult green lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *PlosOne* 2008;e:2909.
170. Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol Entomol* 2002;27(4):441-7.
171. Obrist LB, Dutton A, Romeis J, Bigler F. Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. *BioControl* 2006;51(1):31-48.
172. Wei W, Schuler TH, Clark SJ, Stewart CN. Jr, Poppy GM. Movement of transgenic plant-expressed Bt Cry1Ac proteins through high trophic levels. *J Appl Entomol* 2008; 132(1): 1-11.
173. Lozzia GC, Furlanis C, Manachini B, Rigamonti IE. Effects of Bt corn on *Rhopalosiphum padi* L. (Rhyncota Aphididae) and on its predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) *Boll Zool agr Bachic* 1998;30:153-64.
174. Pilcher CD, Rice ME, Obrycki JJ, Lewis LC. Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 1997;90:669-78.

175. Orr DB, Landis DA. Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *J Econ Entomol* 1997;90:905-9.
176. Amman K. The environmental implications of genetically modified plants with insect resistance genes. *ESF/AIGM Workshop*. Bern: Botanischer Garten der Universität Bern; 2000.
177. Zwahlen C, Nentwig W, Bigler F, Hilbeck A. Tritrophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Environ Entomol* 2000;29(4):846-50.
178. Ponsard S, Gutierrez AP, Mills NJ. Effect of Bt-toxin (Cry1Ac) in transgenic cotton on the adult longevity of four heteropteran predators. *Environ Entomol* 2002;31(6):1197-205.
179. Pons X, Lumbierres B, Lopez C, Albajes R. No effects of Bt maize on the development of *Orius majusculus*. *Bull OILB/SROP* 2004;27(3):131-6.
180. Stacey D, Graser G, Mead-Briggs M, Raybould A. Testing the impact on nontarget organisms of insecticidal proteins expressed in transgenic crops. *Bull OILB/SROP* 2005;29(5):165-72.
181. Pilcher CD, Rice ME, Obrycki JJ. Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five nontarget arthropods. *Environ Entomol* 2005;34(5):1302-16.
182. Guo JianYing, Zhou HongXu, Wan FangHao, Han ZhaoJun. Community structure of arthropods in transgenic cotton fields and their seasonal dynamics. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* 2007;22(6):183-9.
183. Duan JJ, Teixeira D, Huesing JE, Jiang CJ. Assessing the risk to nontarget organisms from Bt corn resistant to corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae): Tier-I testing with *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Environ Entomol* 2008;37(3):838-44.
184. Zhang GuiFen, Wan FangHao, Murphy ST, Guo JianYing, Liu WanXue. Reproductive biology of two nontarget insect species, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) and *Orius sauteri* (Hemiptera: Anthocoridae), on Bt and non-Bt cotton cultivars. *Environ Entomol* 2008;37(4):1035-42.
185. Arpaia S, Gould F, Kennedy G. Potential impact of *Coleomegilla maculata* predation on adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* to Bt-transgenic potatoes. *Entomol Exp Appl* 1997;82(1):91-100.
186. Lundgren JG, Wiedenmann RN. Coleopteran-specific Cry3Bb toxin from transgenic corn pollen does not affect the fitness of a nontarget species, *Coleomegilla maculata* DeGeer (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ Entomol* 2002;31(6):1213-8.
187. Lundgren JG, Razzak AA, Wiedenmann RN. Population responses and food consumption by predators *Coleomegilla maculata* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) during anthesis in an Illinois cornfield. *Environ Entomol* 2004;33(4):958-63.
188. Lundgren JG, Wiedenmann RN. Tritrophic interactions among Bt (Cry3Bb1) corn, aphid prey, and the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ Entomol* 2005;34(6):1621-5.
189. Lundgren JG, Huber A, Wiedenmann RN. Quantification of consumption of corn pollen by the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) during anthesis in an Illinois cornfield. *Agric Forest Entomol* 2005;7(1):53-60.
190. Moser SE, Harwood JD, Obrycki JJ. Larval feeding on Bt hybrid and non-Bt corn seedlings by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ Entomol* 2008; 37(2):525-33.
191. Arpaia S, de Marzo L, di Leo GM, Santoro ME, Mennella G, van Loon JJA. Feeding behaviour and reproductive biology of Colorado potato beetle adults fed transgenic potatoes expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry3B endotoxin. *Entomol Exp Appl* 2000;95(1):31-7.
192. Riddick EW, Barbosa P. Cry3A-intoxicated *Leptinotarsa decemlineata* (Say) are palatable prey for *Lebia grandis* Hentz. *J Entomol Sci.* 2000; 35(3):342-6.

193. Ashouri A, Michaud D, Cloutier C. Recombinant and classically selected factors of potato plant resistance to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, variously affect the potato aphid parasitoid *Aphidius nigripes*. *BioControl* 2001;46(4):401-8.
194. Ashouri A, Askary H. Interactions of genetically engineered potato resistance to Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* and nontarget organisms: effects on the biology of potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* and its parasitoid, *Aphidius nigripes*. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 2003;34(2):247-56.
195. Ashouri A. Transgenic-Bt potato plant resistance to the Colorado potato beetle affect the aphid parasitoid *Aphidius nigripes*. *Comm Agricult Appl Biol Sci* 2004;69(3):185-9.
196. Ashouri A. Seasonal occurrence and relative abundance of aphids on potato plants with classical and transgenic characters of resistance to Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Comm Agricult Appl Biol Sci* 2004;69(3):273-80.
197. Ashouri A. Interactions of transgenic Bt-potato resistance to Colorado potato beetle with the fitness and behaviour of the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae*. *J Agricult Sci Technol* 2007;9(3):219-26.
198. Arpaia S, di Leo GM, Fiore MC, Schmidt JEU, Scardi M. Composition of arthropod species assemblages in Bt-expressing and near isogenic eggplants in experimental fields. *Environ Entomol* 2007;36(1):213-27.
199. Meissle M, Romeis J. Insecticidal activity of Cry3Bb1 expressed in Bt maize on larvae of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol Exp Appl* 2009;131(3):308-19.
200. Wold SJ, Burkness EC, Hutchison WD, Venette RC. In-field monitoring of beneficial insect populations in transgenic corn expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J Entomol Sci* 2001;36(2):177-87.
201. Brodsgaard HF, Enkegaard A, Lovei GL, Felkl G, Hansen LM. Developing a test system for evaluating environmental risks of transgenic plants: the specialist predator module. (originale: Udvikling af et testsystem til evaluering af økologiske risici ved gensplejsede planter: specifikke prædatorer.) *DJF Rapport*, Markbrug, 18th Danish Plant Protection Conference. Danmarks Jordbrugs Forskning, Tjele, Denmark; 2001, p. 37-8.
202. Chaufaux J, Micoud A, Delos M, Naibo B, Bombarde F, Eychennes N, Pagliari C, Marque G, Bourguet D. Transgenic maize and non target insects: what effects? (originale: Impact du maïs transgénique Bt sur l'entomofaune non cible.) *Phytoma* 2002;555:13-6.
203. Kalushkov P, Nedved O. Genetically modified potatoes expressing Cry 3A protein do not affect aphidophagous coccinellids. *J Appl Entomol* 2005; 129(8):401-6.
204. Eckert J, Schuphan I, Hothorn LA, Gathmann A. Arthropods on maize ears for detecting impacts of Bt maize on nontarget organisms. *Environ Entomol* 2006;35(2):554-60.
205. Harwood JD, Samson RA, Obrycki JJ. Temporal detection of Cry1Ab-endotoxins in coccinellid predators from fields of *Bacillus thuringiensis* corn. *Bull Entomol Res* 2007;97(6):643-8.
206. Zwahlen C, Andow DA. Field evidence for the exposure of ground beetles to Cry1Ab from transgenic corn. *Environ Biosafety Res* 2005;4(2):113-7.
207. Mullin CA, Saunders MC I, Leslie TW, Biddinger DJ, Fleischer SJ. Toxic and behavioural effects to carabidae of seed treatments used on Cry3Bb1- and Cry1Ab/c-protected corn. *Environ Entomol* 2005;34(6):1626-36.
208. Bourassa S, Carcamo HA, Spence JR, Blackshaw RE, Floate K. Effects of crop rotation and genetically modified herbicide-tolerant corn on ground beetle diversity, community structure, and activity density. *Canadian Entomol* 2010;142(2):143-59.
209. Sun ChangGui, Zhang QingWen, Xu Jing, Wang YinXia, Liu JunLi. Effects of transgenic Bt cotton and transgenic Bt+CpTI cotton on the population dynamics of main cotton pests and their natural enemies. *Acta Entomologica Sinica* 2003;46(6):705-12.

210. Zhang GuiFen, Wan FangHao, Lovei GL, Liu WanXue, Guo JianYing. Transmission of Bt toxin to the predator *Propylea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feeding on transgenic Bt cotton. *Environ Entomol* 2006;35(1):143-50.
211. Sharma HC, Richa Arora, Gurulingappa Pampapathy. Influence of transgenic cottons with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene on the natural enemies of *Helicoverpa armigera*. *BioControl* 2007;52(4):469-89.
212. Asha T, Babita Chaudhary, Jagmail Singh, Ramamurthy VV. Preliminary observations on the non-target insect communities in Bt cotton. *Indian J Entomol* 2008;70(4):400-2.
213. Dhillon MK, Sharma HC. Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins Cry1Ab and Cry1Ac on the coccinellid beetle, *Cheilomenes sexmaculatus* (Coleoptera, Coccinellidae) under direct and indirect exposure conditions. *BioControl* 2009;19(4):407-20.
214. Bernal JS, Griset JG, Gillogly PO. Impacts of developing on Bt maize-intoxicated hosts on fitness parameters of a stem borer parasitoid. *J Entomol Sci* 2002;37(1):27-40.
215. Manachini B. Effects of transgenic corn on *Lydella thompsoni* Herting (Diptera Tachinidae) parasitoid of *Ostrinia nubilalis* Hb. (Lepidoptera Crambidae). *Boll Zool Agr Bachic* 2003;35(2):111-25.
216. Prutz G, Dettner K. Effect of Bt corn leaf suspension on food consumption by *Chilo partellus* and life history parameters of its parasitoid *Cotesia flavipes* under laboratory conditions. *Entomol Exp Appl* 2004;111(3):179-87.
217. Meissle M, Vojtech E, Poppy GM. Implications for the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) when developing in Bt maize-fed *Spodoptera littoralis* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull OILB/SROP* 2004;27(3):117-23.
218. Brink A, Prutz G Dettner K. Bioassays on the effects of insect-resistant *Bacillus thuringiensis*-maize on the pupal hyperparasitoid *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae). (originale: Biotests zur Wirkung von insektenresistentem *Bacillus thuringiensis*-Mais auf den pupalen Hyperparasitoiden *Tetrastichus howardi* (Hymenoptera: Eulophidae).) *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 2004;14(1/6):411-4.
219. Pilcher CD, Rice ME, Obrycki JJ. Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five non-target arthropods. *Environ Entomol* 2005;34(5):1302-16.
220. Zimmermann O, Zhang GuRen, Hassan SA. Risk assessment of culturing transgenic crops: testing of side effects of Bt corn on *Microhymenoptera* of the genus *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae). (Originale: Sicherheitsforschung zum Anbau von transgenen Pflanzen: Prüfung der Nebenwirkungen von Bt-Mais auf Mikrohymenopteren der Gattung *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae).) *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 2004;14(1/6): 431-4.
221. Sanders CJ, Pell JK, Poppy GM, Raybould A, Garcia-Alonso M, Schuler TH. Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *BioControl* 2007; 40(3):362-9.
222. Ramirez-Romero R, Bernal JS, Chaufaux J, Kaiser L. Impact assessment of Bt-maize on a moth parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae), via host exposure to purified Cry1Ab protein or Bt-plants. *Crop Prot* 2007;26(7):953-62.
223. Vojtech E, Meissle M, Poppy GM. Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Transgenic Res* 2005;14(2): 133-44.
224. Gorecka J, Godzina M, Dabrowski ZT. Effect of Bt maize MON 810 expressing Cry 1Ab toxin on *Aphidius colemani* in tritrophic plant-herbivore-parasitoid system. *J Plant Protect Res* 2008;48(1):129-36.

225. Faria CA, Wäckers FL, Pritchard J, Barret DA, Turlings TCJ. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids lepidopteran pests. *Plos One* 2007; doi:10.1371/journal.pone.0000600.
226. Davidson MM, Butler RC, Wratten SD, Conner AJ. Impacts of insect-resistant transgenic potatoes on the survival and fecundity of a parasitoid and an insect predator. *BioControl* 2006;37(2):224-30.
227. Cowgill SE, Danks C, Atkinson HJ. Multitrophic interactions involving genetically modified potatoes, nontarget aphids, natural enemies and hyperparasitoids. *Molecular Ecol* 2004;13(3):639-47.
228. Schuler TH, Potting RPJ, Denholm I, Clark SJ, Clark AJ, Stewart CN, Poppy GM. Tritrophic choice experiments with Bt plants, the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and the parasitoid *Cotesia plutellae*. *Transgenic Res* 2003;12(3):351-61.
229. Schuler TH, Denholm I, Clark SJ, Stewart CN, Poppy GM. Effects of Bt plants on the development and survival of the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) in susceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J Insect Physiol* 2004;50(5):435-43.
230. Ulpah S, Kok LT. Interrelationship of *Bacillus thuringiensis* Berliner to the diamondback moth (Lepidoptera: Noctuidae) and its primary parasitoid, *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J Entomol Sci* 1996; 31(4):371-7.
231. Chen M, Zhao JZ, Collins HL, Earle ED, Cao J, Shelton AM. A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *PlosOne* 2008; p. e2284.
232. Kim YoungHo, Kang JaeSoon, Kim Jull, Kwon Min, Lee SeungHwan, Cho HyunSok, Lee SiHyeock. Effects of Bt transgenic Chinese cabbage on the herbivore *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoid *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *J Econ Entomol* 2008; 101(4):1134-9.
233. Chen M, Zhao JZ, Shelton AM, Cao J, Earle ED. Impact of single-gene and dual-gene Bt broccoli on the herbivore *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and its pupal endoparasitoid *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Transgenic Res* 2008;17(4):545-55.
234. Liu XiaoXia, Sun ChangGui, Zhang QingWen, Effects of transgenic Cry1A+CpTI cotton and Cry1Ac toxin on the parasitoid, *Campoletis chloridae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Insect Sci* 2005;12(2):101-7.
235. Zhang Hui, Wang ChangYong, Chen JianQun. Effects of transgenic Bt cottons on the parasitoid in tri-trophic system. *Rural Eco-Environment* 2003; 19(2):55-7.
236. Liu YuFang, He Ling, Wang Qiong, Hu SiQin, Liu WenHai, Chen KangGui, You MinSheng. Evaluation of the effects of insect-resistant cry1Ac/sck transgenic rice on the parasitoid communities in paddy fields. *Acta Entomologica Sinica* 2006;49(6):955-62.
237. Barraclough EI, Burgess EPJ, Philip BA, Wohlers MW, Malone LA. Tritrophic impacts of Bt-expressing transgenic pine on the parasitoid *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae) via its host *Pseudocoremia suavis* (Lepidoptera: Geometridae). *BioControl* 2009;49(2): 192-9.
238. Dowd PF. Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and field conditions: utility and limitations. *J Econ Entomol* 2000;93(6):1669-79.
239. Siegfried BD, Zoerb AC, Spencer T, Development of European corn borer larvae on event 176 Bt corn: influence on survival and fitness. *Entomol Exp Appl* 2001;100(1):15-20.
240. Dowd PF. Dusky sap beetles (Coleoptera: Nitidulidae) and other kernel damaging insects in Bt and non-Bt sweet corn in Illinois. *J Econ Entomol* 2000;93(6):1714-20.
241. Rott AS, Godfray HCJ. The structure of leafminer-parasitoid community. *J Animal Ecol* 2000;69(2):274-89.



242. Zwhalen C, Nentwig W, Bigler F, Hilbeck A. Tritrophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Environ Entomol* 2000;29(4):846-50.
243. Schuler TH, Denholm I, Jouanin L, Clark SJ, Clark AJ, Poppy GM. Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on nontarget insects. *Mol Ecol* 2001;10(7):1845-53.
244. Raps A, Kehr J, Gugerli P, Moar WJ, Bigler F, Hilbeck A. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphumpadi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol Ecol* 2001;10(2):525-33.
245. Al-Deeb MA, Wilde GE, Higgins RA. No effect of *Bacillus thuringiensis* corn and *Bacillus thuringiensis* on the predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environ Entomol* 2001;30:625-9.
246. Ruiz P, Novillo C, Fernandez-Anero J, Campos, M. Soil arthropods in glyphosate tolerant and isogenic maize lines under different soil/weed management practices. In: Garcia-Torres L, Benites J, Martinez-Vilela A (Ed.). *First World Congress on Conservation Agriculture Vol. 2*. Madrid (Spain) October 1-5, 2001. Cordoba: XUL; 2001. p. 1-7.
247. Hassell RL, Shepard BM. Insect populations on *Bacillus thuringiensis* transgenic sweet corn. *J Entomol Sci* 2002;37(4):285-92.
248. Jesse LCH, Obrycki JJ. Assessment of the non-target effects of transgenic Bt corn pollen and anthers on the milkweed tiger moth, *Euchatias egle* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). *J Kansas Entomol Soc* 2002;75(1):55-8.
249. Lundgren JG, Wiedenmann RN. Coleopteran-specific Cry3Bb toxin from transgenic corn pollen does not affect the fitness of a non-target species *Coleomegilla maculata* De Geer (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ Entomol* 2002;31(6):1213-8.
250. Bourguet D, Chaufaux J, Micoud A, Delos M, Naibo B, Bombarde F, Marque G, Eychenne N, Pagliari C. *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). *Environ Biosafety Res* 2002;1(1):49-60.
251. Felke M, Lorenz N, Langenbruch GA. Laboratory studies on the effects of pollen from Bt-maize on larvae of some butterfly species. *J Appl Entomol* 2002;126(6):320-5.
252. Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F. Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Crhysoperla carnea* in maize. *Biol Control* 2003;26(2):209-15.
253. Musser FR, Shelton AM. Bt sweet corn and selective insecticides: Impacts on pests and predators. *J Econ Entomol* 2003;96(1):71-80.
254. Al-Deeb, MA, Wilde GE, Blair JM, Todd TC. Effect of Bt corn for corn rootworm control on nontarget soil microarthropods and nematodes. *Env Entomol* 2003;32(4):859-65.
255. Al-Deeb MA, Wilde GE. Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin for corn rootworm control on aboveground nontarget arthropods. *Env Entomol* 2003;32(5):1164-70.
256. Jasinski JR, Eislely JB, Young CE, Kovach J, Wilson H. Select nontarget arthropod abundance in transgenic and nontransgenic field crops in Ohio. *Environ Entomol* 2003;32(2):407-13.
257. Pons X, Stary P. Spring aphid-parasitoid (Hom., Aphididae, Hym., Braconidae) associations and interactions in a Mediterranean arable crop ecosystem, including Bt maize. *Anzeiger für Schaudlingskunde* 2003;76(5): 133-8.
258. Al-Deeb MA, Wilde GE. Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin for corn rootworm control on aboveground non-target arthropods. *Environ Entomol* 2003;32(4):1164-70.
259. Novillo C, Fernandez-Anero FJ, Costa J. Performance of insect-protected corn varieties derived from Bt line MON810 in Spain. *Boletin de Sanidad Vegetal* 2003;29(3):427-9.

260. Manna RS, Gill RS, Dhawan AK, Shera PS. Relative abundance and damage by target and non-target insects on Bollgard and Bollgard II cotton cultivars. *Crop Prot* 2010;29(8):793-801.
261. Ludy C, Lang, A, Meissle M. Monitoring of Bt maize and effects on beneficial populations using spiders as an example. (Originale: Monitoring von Bt-Mais und Effekte auf Nutzlingspopulationen am Beispiel von Spinnen). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 2003;17(1):12.
262. Arpas K, Toth F, Kiss J. Analysis of web content of *Theridion impressum* L. Koch (Araneae: Theridiidae) in Bt (DK 440 BTY, MON 810, Cry1Ab) and isogenic (DK 440) maize. In: Romeis J, Bigler F (Ed.) *GMOs in Integrated Production, entitled Ecological Impact of Genetically Modified Organisms*. Proceedings of the meeting of the IOBC/WPRS Working Group. Prague (Czech Republic), November 26-29, 2003. Bulletin OILB/SROP; 2004. p. 23-9.
263. Volkmar C, Freier B. Spider communities in Bt maize and not genetically modified maize fields (Originale: Spinnenzonosen in Bt-Mais und nicht gentechnisch veränderten Maisfeldern). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz* 2003;110(6):572-82.
264. Arpas K, Toth F, Kiss J. Analysis of web content of *Theridion impressum* L. Koch (Araneae: Theridiidae) in Bt and isogenic corn. *Novenyvedelem* 2004;40(2):61-5.
265. Darvas B, Csoti A, Adel G, Peregovits L, Ronkay L, Lauber E, Polgar AL. Some data on the risk analysis of Bt-corn pollen and protected Lepidoptera species in Hungary. *Novenyvedelem* 2004;40(9):441-9.
266. Toth F, Arpas K, Szekeres D, Kadar F, Szentkiralyi F, Szenasi A, Kiss J. Spider web survey or whole plant visual sampling. Impact assessment of Bt corn on non-target predatory insects with two concurrent methods. *Environ Biosafety Res* 2004;3(4):225-31.
267. Candolfi MP, Brown K, Grimm C, Reber B, Schmidli H. A faunistic approach to assess potential side effects of genetically modified Bt-corn on non-target arthropods under field conditions. *Biocontrol Sci Technol* 2004; 14(2):129-70.
268. Lundgren JG, Wiedenmann RN. Nutritional suitability of corn pollen for the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J Insect Physiol* 2004;50(6):567-75.
269. Eckert J, Gathmann A, Schuphan I. Impact of growing Bt-maize on non target organisms: thrips and their antagonists. (originale: Auswirkungen des Anbaus von Bt-Mais auf Nichtzielorganismen: Thripse und ihre Gegenspieler.) *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie*. 2004;14(1-6):439-42.
270. Asteraki EJ, Hart BJ, Ings TC, Manley WJ. Factors influencing the plant and invertebrate diversity of arable field margins. *Agric Ecosystems Environ* 2004;102(2):219-31.
271. Prütz G, Dettner K. Effect of Bt corn leaf suspension on food consumption by *Chilo partellus* and life history parameters to its parasitoid *Cotesia flavipes* under laboratory conditions. *Entomol Exp Appl* 2004;111(3):179-87.
272. Meissle M, Vojtech E, Poppy GM. Implications for the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) when developing in Bt maize-fed *Spodoptera littoralis* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *IOBC WPRS Bull* 2004;27(3):117-23.
273. Lang A. Monitoring the impact of Bt maize on butterflies in the field: estimation of required sample sizes. *Env Biosafety Res* 2004; 3(1): 55-66.
274. Carter ME, Villani MG, Allee LL, Losey JE. Absence of non-target effects of two *Bacillus thuringiensis* coleopteran active  $\delta$ -endotoxins on the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Claparedeae) (Acari, Acaridae). *J Appl Entomol* 2004;128(1):56-63.
275. Wolt JD, Conlan CA, Majima K. An ecological risk assessment of Cry1F maize pollen impact to pale grass blue butterfly. *Environ Biosafety Res* 2005;4(4):243-51.

276. Scholte E-J, Dicke M. Effects of insect-resistant transgenic crops on non-target arthropods: first step in pre-market risk assessment studies. Bilthoven: Commissie Genetische Modificatie; 2005; p. 1-57.
277. Ramkumar S, Channappa RK, Farah D, Nagaraj NJ, Sukavaneaswaran MK. Tolerance of Bt-corn (MON810) to maize stem borer, *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Plant Cell Rep* 2005;24(9):556-60.
278. Zhang YongJun, Sun Yi, Yuan HaiBin, Wu KongMing, Peng YuFa, Guo YuYuan. Effects of transgenic Bt-cry1Ab corn pollen on the growth and development and the activity of three metabolic enzymes in *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomologica Sinica* 2005;48(6):898-902.
279. Daly T, Buntin GD. Effects of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for lepidopteran control on non-target arthropods. *Environ Entomol* 2005;34(5): 1292-301.
280. Bhatti MA, Duan JJ, Head G, Jiang CJ, McKee MJ, Nickson TE, Pilcher CL, Pilcher CD. Field evaluation of the impact of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-protected Bt corn on ground-dwelling invertebrates. *Env Entomol* 2005;34(5):1325-35.
281. Bitzer RJ, Rice ME, Pilcher CD, Pilcher CL, Lam WKF. Biodiversity and community structure of epedaphic and euedaphic springtails (Collembola) in transgenic rootworm Bt corn. *Env Entomol* 2005;34(5):1346-76.
282. Liu YuFang, Su Jun, You MinSheng, Wang Qiong, Hu SiQin, Liu WenHai, Zhao ShiXi, Wang Feng. Effect of transgenic pest-resistant rice on pest insect communities in paddy fields. *Acta Entomologica Sinica* 2005;48(4): 544-53.
283. Meissle M, Vojtech E, Poppy GM. Effects of Bt-maize fed prey on the generalist predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Transgenic Res* 2005;14(2):123-32.
284. Kalushkov P, Hodek I. The effects of six species of aphids on some life history parameters of the ladybird *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) *Eur J Entomol* 2005;102(3):449-52.
285. Schuler TH, Clark AJ, Clark SJ, Poppy GM, Stewart CN Jr, Denholm I. Laboratory studies of the effects of reduced prey choice caused by Bt plants on a predatory insect. *Bull Entomol Res* 2005;95(3):243-7.
286. Bhatti MA, Muhammad A, Duan J, Head GP, Jiang C, McKee MJ, Nickson TE, Pilcher CL, Pilcher CD. Field evaluation of the impact of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) protected Bt corn on ground-dwelling invertebrates. *Environ Entomol* 2005;34(5):1325-35.
287. Meissle M, Lang A. Comparing methods to evaluate the effects of Bt maize and insecticide on spider assemblages. *Agric Ecosyst Environ* 2005;107(4): 359-70.
288. Bhatti MA, Muhammad A, Duan J, Head GP, Jiang C, McKee MJ, Nickson TE, Pilcher CL, Pilcher CD. Field evaluation of the impact of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-protected Bt corn on foliage-dwelling invertebrates. *Environ Entomol* 2005;34(5):1336-45.
289. de la Poza M, Pons X, Farinós GP Lopez C, Ortego F, Eizaguirre M, Castañera P, Albajes R. Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Prot* 2005;24(7):677-84.
290. Ahmad A, Wilde GE, Kun YZ. Detectability of coleopteran-specific Cry3Bb1 protein in soil and its effect on nontarget surface and belowground arthropods. *Environ Entomol* 2005;34(2):385-94.
291. Dively GP. Impact of transgenic VIP3A x Cry1Ab lepidopteran-resistant field corn on the non-target arthropod community. *Environ Entomol* 2005; 34(5):1267-91.
292. Mattila HR, Sears MK, Duan JJ. Response of *Danaus plexippus* to pollen of two new Bt corn events via laboratory bioassay. *Entomol Exper Appl* 2005; 116(1):31-41.
293. Shirai Y, Takahashi M. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. *Appl Entomol Zool* 2005;40(1): 151-9.

294. Harwood JD, Wallin WG, Obricky JJ. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Mol Ecol* 2005;14(9):2815-23.
295. Spitzer L, Ruzicka V, Hussein HM, Habustova O, Sehnal F. Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin in maize does not affect epigeic communities of carabids and spiders. *Acta Phytotechnica et Zootechnica* 2004;4:110-2.
296. Rodrigo-Simón A, de Maagd RA, Avilla C, Bakker PL, Molthoff J, González-Zamora JE, Ferré J. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological and biochemical analysis. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(2):1595-603.
297. Weber M, Nentwig W. Impact of Bt corn on the diplopod *Allajus latestriatus*. *Pedobiologia* 2006;50(4):357-68.
298. Cantagui MA, Berg RK. Western bean cutworm, *Striacosta albicosta* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), as a potential pest from transgenic Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* corn hybrids in South Dakota. *Env Entomol* 2006;35(5):1439-52.
299. Duan JJ, Paradise MS, Lundgren JG, Bookout J, Jiang CJ, Wiedenmann RN. Assessing nontarget impacts of Bt corn resistant to corn rootworms: tier-1 testing with larvae of *Poecilus chalcites* (Coleoptera: Carabidae). *Env Entomol* 2006;35(1):135-42.
300. Gathmann A, Wirooks L, Eckert J, Schuphan I. Spatial distribution of *Aglais urticae* (L.) and its host plant *Urtica dioica* (L.) in an agricultural landscape: implications for Bt maize risk assessment and post-market monitoring. *Env Biosafety Res* 2006;5(1):7-36.
301. Ludy C, Lang A. A 3-year field-scale monitoring of foliage-dwelling spiders (Araneae) in transgenic Bt maize fields and adjacent field margins. *BiolControl* 2006;38(3):314-24.
302. Ludy C, Lang A. Bt maize pollen exposure and impact on the garden spider, *Araneus diadematus*. *Entomol Exper Appl* 2006;118(2):145-56.
303. Shirai Y. Laboratory evaluation of effects of transgenic Bt corn pollen on two non-target herbivorous beetles, *Epilachna vigintioctopunctata* (Coccinellidae) and *Galerucella vittaticollis* (Chrysomelidae). *Appl Entomol Zool* 2006;41(4):607-11.
304. Eizaguirre M, Albajes R, Lopez C, Eras J, Baraibar B, Lumbierres B, Pons X. Transgenic Bt maize: main results of a six-year study on nontarget effects. In: Romeis J, Meissle M (Ed.) *Ecological impact of genetically modified organisms*. Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "GMOs in integrated plant production", Lleida (Catalonia), Spain, June 1-3, 2005. *Bulletin OILB/SROP* 2006;29(5):49-55.
305. Ahmad A, Wilde GE, Whitworth RJ, Zolnerowich G. Effect of corn hybrids expressing the coleopteran-specific Cry3Bb1 protein for corn rootworm control on aboveground insect predators. *J Econ Entomol* 2006;99(4):1085-95.
306. Duan JJ, Jiang CJ, Head GP, Bhatti MA, Ward DP, Levine SL, Nickson TE, Nemeth MA. Statistical power analysis of a 2-year field study and design of experiments to evaluate non-target effects of genetically modified *Bacillus thuringiensis* corn. *Ecol Entomol* 2006;31(5):521-31.
307. Heckmann LH, Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Pusztai-Carey M, Moar WJ, Andersen MN, Krogh PH. Consequences for *Protaphorura armata* (Collembola: Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize. *Env Pollution* 2006; 142(2):212-6.
308. Eizaguirre M, Albajes R, Lopez C, Eras J, Lumbierres B, Pons X. Six years after the commercial introduction of Bt maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. *Transgenic Res* 2006;15(1):1-12.

309. Naef A, Zesiger T, Defago G. Impact of transgenic Bt maize residues on the mycotoxigenic plant pathogen *Fusarium graminearum* and the biocontrol agent *Trichoderma atroviride*. *J Env Qual* 2006;35(4):1001-9.
310. Gathmann A, Wirooks L, Horthorn LA, Bartsch D, Schuphan I. Impact of Bt maize pollen (MON810) on lepidopteran larvae living on accompanying weeds. *Mol Ecol* 2006;15(9):2677-85.
311. Szekeres D, Kadar F, Kiss J. Activity, density, diversity and seasonal dynamics of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in Bt (MON810) and in isogenic maize stands. *Entomologica Fennica* 2006;17(3):269-75.
312. van den Berg J, van Wyk A. The effect of Bt maize on *Sesamia calamistis* in South Africa. *Entomol Exp Appl* 2007;122(1):45-51.
313. Krogh PH, Griffiths B, Demsa D, Bohanec M, Debeljak M, Andersen MN, Sausse C, Birch ANE, Caul S, Holmstrup M, Heckmann LH, Cortet J. Responses by earthworms to reduced tillage in herbicide tolerant maize and Bt maize cropping systems. *Pedobiologia* 2007;51(3):219-27.
314. Shirai Y. Nontarget effect of transgenic insecticidal crops: overview to date and future challenges. *Japan J Appl Entomol Zool* 2007;51(3):165-86.
315. Chang Xue, Chang XueYan, He Kanglai, Wang ZhenYiing. Resistance evaluation of transgenic Bt-maize to oriental armyworm. *Acta Phytophylacica Sinica* 2007;34(3):225-8.
316. Wang ZhenYing, Wu Yan, He KangLai, Bai ShuXiong. Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostrinae* in laboratory conditions. *Bull Insectology* 2007;60(1):49-55.
317. Harwood JD, Samson RA, Obrycki JJ. Temporal detection of Cry1Ab-endotoxins in coccinellid predators from fields of *Bacillus thuringiensis* corn. *Bull Entomol Res* 2007;97(6):643-8.
318. van Wyk A, van den Berg J, van Hamburg. Selection of non-target Lepidoptera species for ecological risk assessment of Bt maize in South Africa. *African Entomol* 2007;15(2):356-66.
319. Wu Yan, Wang ZhenYing; HeKangLai, Bai ShuXiong; Zhao ChangShan. Effect of transgenic Bt corn (event Bt11) pollen expressing cry1Ab toxin on longevity and fecundity of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in the laboratory. *Acta Entomologica Sinica* 2008; 51(2):227-33.
320. Rauschen S, Eckert J, Schaarschmidt F, Schuphan I, Gathmann A. An evaluation of methods for assessing the impacts of Bt-maize MON810 cultivation and pyrethroid insecticide use on *Auchenorrhyncha* (planthoppers and leafhoppers). *Agric Forest Entomol* 2008;10(4):331-9.
321. Farinòs GP, de la Poza M, Hernandez-Crespo P, Ortego F, Castanera P. Diversity and seasonal phenology of aboveground arthropods in conventional and transgenic maize crops in Central Spain. *Biol Control* 2008;44(3):362-71.
322. Lawo NC, Romeis J. Assessing the utilization of a carbohydrate food source and the impact of insecticidal proteins on larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. *Biol Control* 2008;44(3):389-38.
323. van Wyk A, van den Berg J, van Hamburg H. Diversity and comparative phenology of Lepidoptera on Bt and non-Bt maize in South Africa. *Int J Pest Manag* 2008;54(1):77-87.
324. Gorecka, J, Godzina M, Dabrowski ZT. Effect of Bt maize MON810 expressing Cry1Ab toxin on *Aphidius colemani* in tritrophic plant-herbivore-parasitoid system. *J Plant Protection Res* 2008;48(1):129-36.
325. Alvarez-Alfageme F, Ferry N, Castanera P, Ortego F, Gatehouse AMR. Prey mediated effects of Bt maize on fitness and digestive physiology of the red spider mite predator *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). *Transgenic Res* 2008;17(5):943-54.

326. Rauschen S, Schultheis E, Pagel-Wieder S, Schuphan I, Eber S. Impact of Bt-corn MON88017 in comparison to three conventional lines on *Trigonotylus caelestialum* (Kirkaldy) (Heteroptera: Miridae) field densities. *Transgenic Res* 2009;18(2):203-14.
327. Li Y, Meissle M, Romeis J. Use of maize pollen by adult *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) and fate of Cry proteins in Bt-transgenic variety. *J Insect Physiol* 2010;56(2):157-64.
328. Honemann L, Nentwig W. Are survival and reproduction of *Enchytraeus albidus* (Annelida: Enchytraeidae) at risk by feeding on Bt-maize litter? *Eur J Soil Biol* 2009; 45(4): 351-5.
329. Alvarez-Alfageme F, Ortego F, Castanera P. Bt maize fed-prey mediated effect on fitness and digestive physiology of the ground predator *Poecilus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *J Insect Physiol* 2009;55(2):143-9.
330. Higgins LS, Babcock J, Neese P, Layton RJ, Moellenbeck J, Storer N. Three-year field monitoring of Cry1F, event DAS-Ø15Ø7-1, maize hybrids for nontarget arthropod effects. *Env Entomol* 2009;38(1):281-92.
331. Baur ME, Boethel DJ. Effect of Bt-cotton expressing Cry1A on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biol Control* 2003;26(3):325-32.
332. Fitt GP, Mares CL, Llewellyn DJ. Field-evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia. *Biocontrol Sci Technol* 1994;4(4):535-48.
333. Bambawale OM, Singh A, Sharma OP, Bhosle BB, Lavekar RC, Dhandapani A, Kanwar A, Tanwar RK, Rathod KS, Patange NR, Pawar VM. Performance of Bt-cotton (MECH-162) under integrated pest management in farmer's participatory field trial in Nanded district, Central India. *Curr Sci (Bangalore)* 2004;86(12):1628-33.
334. Hardee DD, Bryan WW. Influence of *Bacillus thuringiensis*-transgenic and nectariless cotton on insect populations with emphasis on the tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae) *J Econ Entomol* 1997;90:663-68.
335. Hagerty AM, Kilpppatrick AL, Turnipseed SG, Sullivan MJ, Bridges WC. Predaceous arthropods and lepidopteran pests on conventional, Bollgard, and Bollgard II cotton under untreated and disrupted conditions. *Environ Entomol* 2005;34:105-14.
336. Mellet MA, Schoeman AS, Broodryk SW, Hofs JL. Bollworm (*Helicoverpa armigera* Hubner), (Lepidoptera: Noctuidae) occurrences in Bt- and non-Bt-cotton fields, Marble Hall, Mpulamanga, South Africa. *African Entomol* 2004;12(1):107-15.
337. Men XY, Ge F, Edwards CA, Yardim EN. Influence of pesticide applications on pest and predatory arthropods associated with transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton plants. *Phytoparasitica* 2004;32(3):246-54.
338. Naranjo SE. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of non-traget arthropod natural enemies. *Environ Entomol* 2005;34(5):1193-210.
339. Naranjo SE. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the function of natural enemy community. *Environ Entomol* 2005;34(5): 1211-23.
340. Sisterson MS, Biggs RW, Olson C, Carrière Y, Dennehy TJ, Tabashnik BE. Arthropod abundance and diversity in Bt and non-Bt cotton fields. *Environ Entomol* 2004;33(4):921-9.
341. Wu KM, Guo YY. Influences of *Bacillus thuringiensis* Berliner cotton planting on population dynamics of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, in northern China. *Environ Entomol* 2003;32(2):312-8.
342. Men XingYuan, Ge Feng Liu, XiangHui, Yardim EN. Diversity of arthropod communities in transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton agroecosystems. *Env Entomol* 2003;32(2):270-5.
343. Schuler TH, Poppy GM, Potting RPJ, Denholm I, Kerry BR. Interactions between insects tolerant genetically modified plants and natural enemies. *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic*

- crops.Proceedings of a symposium held at Keele, UK on 12-14 April 1999*. Farnham, UK: British Crop Protection Council; 1999. p. 197-202.
344. Men XingYuan, Ge Feng, Edwards CA, Yardim EN. Influence of pesticide applications on pest and predatory arthropods associated with transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton plants. *Phytoparasitica* 2004;32(3):246-54.
  345. Kranthi KR, Naidu S, Dhawad CS, Tatwawadi A, Mate K, Patil E, Bharose AA, Behere GT, Wadaskar RM, Kranthi S. Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in Bt-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Current Sci* 2005;89(2):291-8.
  346. Sharma HC, Dhilon MK, Arora R. Effects of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin-fed *Helicoverpa armigera* on the survival and development of the parasitoid *Campoletis chloridae*. *Entomol Exp Appl* 2008; 126(1): 1-8.
  347. Torres JB, Ruberson JR. Canopy- and ground-dwelling predatory arthropods in commercial Bt and non-Bt cotton fields. *Environ Entomol* 2005;34(5): 1242-56.
  348. Head, G, Moar W, Eubanks M, Freeman B, Ruberson J, Hagerty A, Turnipseed SA. Multiyear, large-scale comparison of arthropod populations on commercially managed Bt and non-Bt cotton fields. *Environ Entomol* 2005;34(10):1257-66.
  349. Cattaneo MG, Yafuso C, Schmidt C, Huang C, Rahman M, Olson C, Ellers-Kirk C, Orr BJ, Marsh SE, Antilla L, Dutilleul P, Carrière Y. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(20):7571-6.
  350. Li YX, Greenberg SM, Liu TX. Effects of Bt cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab and non-Bt cotton on behaviour, survival and development of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Prot* 2006;25(9):940-8.
  351. Sharma HC, Pampapathy G. Influence of transgenic cotton on the relative abundance and damage by target and non-target insect pests under different protection regimes in India. *Crop Prot* 2006;25(8):800-13.
  352. Dong HZ, Li WJ. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. *J Agron Crop Sci* 2007;193(1):21-9.
  353. Torres JB, Ruberson JR. Abundance and diversity of ground-dwelling arthropods of pest management importance in commercial Bt and non-Bt cotton fields. *Ann Appl Biol* 2007;150(1):27-39.
  354. Wu KongMing, Lu YanHui, Feng HongQiang, Jiang YuYing, Zhao JianZhou. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt-toxin containing cotton. *Science* 2008;321:1676-8.
  355. Sivasupramaniam S, Moar WJ, Ruschke LG, Osborn JA, Jiang C, Sebaugh JI, Brown GR, Shappley ZW, Oppenhuizen ME, Mullins JW, Greenplate JT. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. *J Econ Entomol* 2008;101(2):546-54.
  356. Guo JY, Wan FH, Dong L, Lövei GL, Han ZJ. Tri-trophic interactions between Bt cotton, the herbivore *Aphis gossypii* (Glover) (Homoptera: Aphididae), and the predator *Chrysopa pallens* (Rambur) (Neuroptera: Chrysopidae). *Env Entomol* 2008;37(1):263-70.
  357. Wan P, Wu K, Huang M, Yu D, Wu J. Population dynamics of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt cotton in the Yangtze river valley in China. *Environ Entomol* 2008;37(4):1043-8.
  358. Xue K, Deng S, Wang R, Yan F, Xu C. Leaf surface factors of transgenic Bt cotton associated with the feeding behaviours of cotton aphids: a case study of non target effects. *Sci China C Life Sci* 2008;51(2):145-56.
  359. Liu B, Cui J, Meng J, Hu W, Luo J, Zheng Y. Effects of transgenic Bt+CpTI cotton on the growth and reproduction of earthworm *Eisenia foetida*. *Frontiers Biosci* 2009;14(10):4008-14.

360. Marzban R, He Q, Liu X, Zhang Q. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and cytoplasmic polyhedrosis virus of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (HaCPV) on cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invertebr Pathol* 2009;101(1):71-6.
361. Dirie AM, Cohen MB, Gould F. Larval dispersal and survival of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) on cry1Ab-transformed and non-transgenic rice. *Env Entomol* 2000;29(5):972-8.
362. Bernal CC, Aguda RM, Cohen MB. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus livipennis*. *Entomol Exp Appl* 2002;47:267-97.
363. Wang ZhongHua, Shu QingYao, Cui HaiRui, Xu MengKui, Xie XiaoBo, Xia YingWu. The effect of Bt transgenic rice flour on the development of silkworm larvae and the sub-micro-structure of its midgut. *Scientia Agricultura Sinica* 2002;35(6):714-8.
364. Liu ZhiCheng, Ye GongYin, Hu Cui, Datta SK. Effects of Bt transgenic rice on population dynamics of main non-target insect pests and dominant spider species in rice paddies. *Acta Phytophylacica Sinica* 2002;29(2):138-44.
365. Wu WeiXiang, Ye QingFu, Min Hang, Chen HuaEr. Effect of cry1Ab toxin released from straw of Bt-transgenic rice on microflora and enzymatic activities in upland soil. *Acta Pedologica Sinica* 2003;40(4):606-12.
366. Cuong NL, Cohen MB. Mating and dispersal behaviour of *Scirpophaga incertulas* and *Chilo suppressalis* (Lepidoptera; Pyralidae) in relation to resistance management for rice transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes. *Int J Pest Manag* 2003;49(4):275-9.
367. Schoenly KG, Cohen MB, Barrion AT, Zhang WenJun, Gaolach B, Viajante VD. Effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice. *Env Biosafety Res* 2003;2(3): 181-206.
368. Bai YY, Jiang MX, Cheng JA. Effects of transgenic Cry1Ab rice pollen on fitness of *Propylea japonica* (Thunberg). *J Pest Sci* 2005;78(3):123-28.
369. Cai WanLun, Shi ShangBai, Yang ChangJu, Peng YuFa. Difference of arthropod communities in Bt rice paddies under different cropping patterns. *Acta Entomologica Sinica* 2005;48(4):537-43.
370. Jiao XiaoGuo, Cui XuHong, Zhang GuoAn. Effects of transgenic Bt rice on the population dynamics of nontarget insect pests in rice fields. *Chinese Bulletin of Entomology* 2006;43(6):774-7.
371. Zheng Yu, Li YueRen, Hu QiYong, Li BenJin, Zhang XiaoJun. Importance of neutral insects in the assessment of the ecological safety of pest-resistant transgenic rice. *J Fujian Agric Forest University* 2006;35(4):352-5.
372. Yao HongWei, Ye GongYin, Jiang CaiYing, Fan LongJiang, Datta K, Hu Cui, Datta SK. Effect of the pollen of transgenic rice line, TT9-3 with a fused cry1Ab/cry1Ac gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner on non-target domestic silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombyxidae). *Appl Entomol Zool* 2006;41(2):339-48.
373. Bai YY, Jiang MX, Cheng JA, Wang D. Effects of Cry1Ab toxin on *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae) through its prey, *Nilaparvata lugens* Stal (Homoptera: Delphacidae), feeding on transgenic Bt rice. *Env Entomol* 2006;35(4):1130-6.
374. Riudavets J, Gabarra R, Pons MJ, Messeguer J. Effect of transgenic Bt rice on the survival of three non target stored insect pests. *Env Entomol* 2006; 35(5):1432-8.
375. Chen Mao, Liu ZhiCheng, Ye GongYin, Shen ZhiCheng, Hu Cui, Peng YuFa, Altosaar I, Shelton AM. Impacts of transgenic cry1Ab rice on non-target planthoppers and their main predator *Cyrtorhinus lividipennis* (Hemiptera: Miridae) - a case study of the compatibility of Bt rice with biological control. *BioControl* 2007;47(2):242-50.



376. Li FangFang, Ye GongYin, Wu Qiong, Peng YuFa, Chen XueXin. Arthropod abundance and diversity in Bt and non-Bt rice fields. *Env Entomol* 2007;36(3):646-54.
377. Hu QiYong, Zheng Yu, Zhang XiaoJun, Hu XiBin, Li BenJin, Li YueRen. Effect of pest resistant transgenic rice on arthropod community diversity in Fujian Province. *Zhongguo Shengtai Nongye Xuebao / Chinese Journal of Eco-Agriculture* 2007;15(4):120-3.
378. Yao HongWei, Jiang CaiYing, Ye GongYin, Hu Cui, Peng YuFa. Toxicological assessment of pollen from different Bt rice lines on *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombyxidae). *Env Entomol* 2008;37(3):825-37.
379. Han L, Liu P, Wu K, Peng Y, Wang F. Population dynamics of *Sesamia inferens* on transgenic rice expressing Cry1Ac and CpTI in southern China. *Env Entomol* 2008;37(5):1361-70.
380. Chen H, Zhang G, Zhang Q, Lin Y. Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice lines on mortality and feeding behaviour of rice stem borers (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol* 2008;101(1):182-9.
381. Xia Hui, Lu BaoRong, Su Jun, Chen Rui, Rong Jun, Song ZhiPing, Wang Feng. Normal expression of insect-resistant transgene in progeny of common wild rice crossed with genetically modified rice: its implication in ecological biosafety assessment. *Theor Appl Gen* 2009;119(4):635-44.
382. Chen Mao, Ye GongYin, Liu ZhiCheng, Fang Qi, Hu Cui, Peng YuFa, Shelton AM. Analysis of Cry1Ab toxin bioaccumulation in a food chain of Bt rice, an herbivore and a predator. *Ecotoxicol* 2009;18(2):230-8.
383. Riddick EW, Dively G, Barbosa P. Effect of a seed-mix deployment of Cry3A-transgenic and nontransgenic potato on the abundance of *Lebia grandis* (Coleoptera: Carabidae) and *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ann Entomol Soc Am* 1998; 91(5): 647-53.
384. Hoy CW. Colorado potato beetle resistance management strategies for transgenic potatoes. *Am J Potato Res* 1999;76(4):215-9.
385. Armer CA, Berry RE, Kogan M. Longevity of phytophagous heteropteran predators feeding on transgenic Bt-potato plants. *Entomol Exp Appl* 2000; 95(3):329-33.
386. Pelletier Y, Clark C, Boiteau G, Feldman-Riebe J. The effect of Bt-transgenic potatoes on the movement of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Phytoprotection* 2000;81(3):107-14.
387. Reed GL, Jensen AS, Riebe J, Head G, Duan JJ. Transgenic Bt potato and conventional insecticides for Colorado potato beetle management: comparative efficacy and non-target impacts. *Entomol Exp Appl* 2001; 100(1):89-100.
388. Nault BA. Survival and fecundity of Bt-susceptible Colorado potato beetle adults after consumption of transgenic potato containing *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Cry3A toxin. *Entomol Exp Appl* 2001; 101(3):265-72.
389. Arpaia S, Schmidt JEU, Di Leo GM, Fiore MC. Oviposition of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and natural predation on its egg masses in Bt-expressing fields. *Biocontrol Sci Technol* 2009;19(9-10):971-84.
390. Bouchard E, Michaud D, Cloutier C. Molecular interactions between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine proteinase inhibitor from rice. *Mol Ecol* 2003;12(9):2429-37.
391. Duan JJ, Head G, Jensen A, Reed G. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* potato and conventional insecticides for Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) management on the abundance of ground-dwelling arthropods in Oregon potato ecosystems. *Environ Entomol* 2004; 33(2):275-81.

392. Mallampalli N, Gould F, Barbosa P. Predation of Colorado potato beetle eggs by a polyphagous ladybeetle in the presence of alternate prey: potential impact on resistance evolution. *Entomol Exp Appl* 2005;114(1):47-54.
393. Hussein HM, Sehnal F, Habustova O. Bt-potatoes resistant to Colorado potato beetle affect the performance of Egyptian armyworm (*Spodoptera littoralis*). *Acta Fytotechnica et Zootechnica* 2005;8(2):38-41.
394. Nedved O, Kalushkov P, Blagoev G. Spiders in Bt and non-Bt potato fields in Bulgaria. In: Romeis J, Meissle M (Ed.) *Ecological impact of genetically modified organisms*. Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "GMOs in integrated plant production", Lleida (Catalonia), Spain, June 1-3, 2005. *Bulletin OILB/SROP* 2006;29(5):49-55.
395. Cameron PJ, Wallace AR, Madhusudhan VV, Wigley PJ, Qureshi MS, Walker GP. Mating frequency in dispersing potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*, and its influence on the design of refugia to manage resistance in Bt transgenic crops. *Entomol Exp Appl* 2005;115(2):323-32.
396. Down RE, Ford L, Bedford SJ, Gatehouse LN, Newell C, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. Influence of plant development and environment on transgene expression in potato and consequences for insect resistance. *Transgenic Res* 2001;10(3):223-36.
397. Urwin PE Troth KM, Zubko EI, Atkinson HJ. Effective transgenic resistance to *Globorella pallida* in potato field trials. *Mol Breed* 2001;8(1):95-101.
398. Cloutier C, Boudreault S, Michaud D. Impact of Colorado potato beetle-resistant potatoes on non-target arthropods: a meta-analysis of factors potentially involved in the failure of a Bt transgenic plant. (originale: Impact de pommes de terre résistantes au doryphore sur les arthropodes non visés: une meta-analyse des facteurs possiblement en cause dans l'échec d'une plante transgénique Bt.) *Cahiers Agricultures* 2008;17(4):388-94.
399. Arpaia S, Sunseri F. Ecological impact of Bt-transgenic plants: 2. Assessing the potential invasiveness of transgenic eggplant resistant to the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *J Gen Breeding* 1996;50(4): 393-5.
400. Acciarri N, Vitelli G, Arpaia S, Mennella GF, Rotino GL. Transgenic resistance to the Colorado potato beetle in Bt-expressing eggplant fields. *Hort Sci* 2000;35:722-5.
401. Mennella G, D'Alessandro A, Arpaia S, Acciarri N, Sunseri F, Rotino GL. Management of resistance to Coleoptera (*Leptinotarsa decemlineata* Say) in transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) hybrids. In Voorrips RE (Ed.) *Proceedings of the XIIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant*, Wageningen May 17-19; 2004. p. 196-202.
402. Mennella G, Acciarri N, D'Alessandro A, Perrone D, Arpaia S, Sunseri F, Rotino GL. Mixed deployment of Bt-expressing eggplant hybrids as a reliable method to manage resistance to Colorado potato beetle. *Scientia Horticulturae* 2005;104(2):127-35.
403. Rovenska GZ, Zemek R, Schmidt JEU, Hilbeck A. Altered host plant preference of *Tetranychus urticae* and prey preference of its predator *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) on transgenic Cry3Bb-eggplants. *Biol Control* 2005;33(3):293-300.
404. Arpaia S, Di Leo GM, Fiore MC, Schmidt, JEU, Scardi M. Composition of arthropod species assemblages in Bt-expressing and near isogenic eggplants in experimental fields. *Env Entomol* 2007;36(1):213-27.
405. Lopez MD, Prasika JR, Bruck DJ, Lewis LC. Utility of ground beetle species in field tests of potential non-target effects of Bt crops. *Environ Entomol* 2005;34(5):1317-24.
406. Annamalai S, Ito Y, Saito T. Population fluctuations of the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) on cabbages in *Bacillus thuringiensis* sprayed and non-sprayed plots and factors affecting within-generation of immatures. *Res Popul Ecol* 1988;30(2):329-42.

407. Tang JD, Collins HL, Roush RT, Metz TD Earle ED, Shelton AM Survival, weight gain, and oviposition of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on broccoli expressing Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Econ Entomol* 1999;92(1):47-55.
408. Liu SS, Wang XG, Guo SJ, He JH, Shi ZH. Seasonal abundance of the parasitoid complex associated with the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in Hangzhou, China. *Bull Entomol Res* 2000;90(3):221-31.
409. Mason P, Braun L, Warwick SI, Zhu Bin, Stewart CN Jr. Transgenic Bt-producing *Brassica napus*: *Plutella xylostella* selection pressure and fitness of weedy relatives. *Env Biosafety Res* 2003;2(4):263-76.
410. Howald R, Zwahlen C, Nentwig W. Evaluation of Bt oilseed rape on the non-target herbivore *Athalia rosae*. *Entomol Exp Appl* 2003;106(2):87-93.
411. Harish K. Orientation, feeding, and ovipositional behaviour of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), on transgenic cabbage expressing Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *Env Entomol* 2004;33(4):1025-31.
412. Schuler TH, Potting RPJ, Denholm I, Poppy GM. Interactions between transgenic plants, the diamondback moth and natural enemies. In: Endersby NM, Ridland PM (Ed.). *Proceedings of the Fourth International Workshop The management of diamondback moth and other crucifer pests*. Gosford, Australia: The Regional Institute Ltd; 2004. p. 127-32.
413. Liu XX, Chen M, Onstad D, Roush R, Shelton AM. Effect of Bt broccoli and resistant genotype of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) on development and host acceptance of the parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Transgenic Res* 2011;20(4):887-97.
414. Manachini B, Landi S, Fiore MC, Festa M, Arpaia S. First investigations on the effects of Bt-transgenic *Brassica napus* L. on the trophic structure of the nematofauna. In Romeis J, Bigler F (Ed.) *Ecological Impact of Genetically Modified Organisms*. Prague, Czech Republic, 26-29 November 2003. *Bulletin OILB/SROP* 2004;27(3):103-8.
415. Ferry N, Mulligan EA, Stewart CN, Tabashnik BE, Port GR, Gatehouse AMR. Prey-mediated effects of transgenic canola on a beneficial, non-target, carabid beetle. *Transgenic Res* 2006;15(4):501-14.
416. Mittal A, Kumari A, Kalia V, Singh DK, Gujar GT. Spatial and temporal baseline susceptibility of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to *Bacillus thuringiensis* spore crystal mixture, purified crystal toxins and mixtures of cry toxins in India. *Biopesticides Internat* 2007;3(1):58-70.
417. Wang G, Zhang J Song F, Gu A, Uwais A, Shao T, Huang D. Recombinant *Bacillus thuringiensis* strain shows high insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* without affecting nontarget species in the field. *J Appl Microbiol* 2008;105(5):1536-43.
418. Bitzer RJ, Buckelew LD, Pedigo LP. Effects of transgenic herbicide-resistant soybean varieties and systems on surface-active springtails (Entognatha: Collembola). *Env Entomol* 2002;31(3):449-61.
419. Johnson MT, Gould F. Interaction of genetically engineered host plant-resistance and natural enemies of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in tobacco. *Environ Entomol* 1992;21(3):586-97.
420. Warren GW, Carozzi NB, Desai N, Koziel MG. Field evaluation of transgenic tobacco containing *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene. *J Econ Entomol* 1992;85(5):1651-9.
421. Johnson MT. Interaction of resistant plants and wasp parasitoids of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Entomol* 1997;26(2):207-14.
422. Wang GeJiao, Castiglione S, Chen Ying, Li Ling, Han YiFan, Tian YingChuan, Gabriel DW, Han YiNong, Mang KeQiang, Sala F. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. *Transgenic Res* 1996;5(5): 289-301.
423. Wang YanPing, Li Jing, Yang MinSheng, Liang HaiYong. Insect-resistance selectivity of transgenic hybrid poplar 741. *Scientia Silvae Sinicae* 2008;44 (8):67-71.

424. Genissel A, Augustin S, Courtin C, Pilate G, Lorme P, Bourguet D. Initial frequency of alleles conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* poplar in a field population of *Chrysomela tremulae*. *Proc Royal Soc London Series B* 2003;270(1517):791-7.
425. Zhang Zhen, Wang JunHui, Zhang JianGuo, Zhang ShouGong. Effects of transgenic poplars to the structure of insect community. *Scientia Silvae Sinicae* 2004;40(2):84-9.
426. Augustin S, Courtin C, Rejasse A, Lorme P, Genissel A, Bourguet D. Genetics of resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* poplars in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol* 2004; 97(3):1058-64.
427. Ewald D, Hu JJ, Yang MS. Transgenic trees in China? (Originale: Transgene Baume in China?) *Zeitschrift für Waldwirtschaft und Umweltvorsorge* 2006; 61(5): 231-3.
428. Coll M, Guershon M. Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. *Annu Rev Entomol* 2002;47:267-97.
429. Sims S. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Cry1A(c) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomol* 1995;20(4):493-500.
430. Meissle M, Romeis J. The web building spider *Theridion impressum* (Aranae: Theridiidae) is not adversely affected by Bt maize resistant to corn rootworms. *Plant Biotech J* 2009;7:645-56.
431. Li Yuhne, Romeis J. Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite *Tetranychus urticae* or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. *Biol Control* 2010;53(3):337-44.
432. Hönemann L, Zurbrügg C, Nentwig W. Effects of Bt-corn decomposition on the composition of the soil meso- and macrofauna. *Appl Soil Ecol* 2008; 40(2):203-9.
433. Knecht S, Nentwig W. Effect of Bt maize on the reproduction and development of saprophagous Diptera over multiple generations. *Basic Appl Ecol* 2010;11(4):347-53.
434. Arpaia S. Ecological impact of Bt-transgenic plants; 1: Assessing possible effects of CryIIIb toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J Gen Breeding* 1996;30(4):315-9.
435. Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie* 1999;30(6):465-73.
436. Walther-Hellwig K, Frankl R. Foraging habitats and foraging distances of bumblebees, *Bombus* spp. (hym., apidae), in an agricultural landscape. *J Appl Entomol* 2000;124(7-8):299-306.
437. Bendek P, Richards KW. The role of honeybees (*Apis mellifera*) and other insect pollinators in gene flow between oilseed rape (*Brassica napus*) and wild radish (*Raphanus raphanistrum*). *Acta Hort* 2000;561:47-51.
438. Malone LA, Burgess EPI, Gatehouse HS, Voisey CR, Tregidga EL, Philip BA. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honeybee flight activity and longevity. *Apidologie* 2001;32(1): 57-68.
439. Malone LA, Pham-Delegue MH. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 2001;32(4): 287-304.
440. Liu YanHe, Cheng ShengLu. Influences of transgenic insect-resistant plants on honey bees. *Entomol Knowledge* 2001;38(4):258-62.
441. Brodsgaard HF, Brodsgaard CJ, Hansen H, Lovei GL. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* 2003;34(2):139-45.
442. Hanley AV, Huang ZY, Peu WL. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria melonella*. *J Apic Res* 2003;42(4):77-81.
443. Morandin LA, Winston ML. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Env Entomol* 2003;32(3):555-63.

444. Arpaia S, Clemente A, Leo GMD, Fiore MC. Pollinator abundance and foraging behaviour on Bt-expressing transgenic canola plants. In: Bernardinelli I, Milani N. (Ed.) *EurBee*. Udine agf 2004; pp. 1-23.
445. Tesoriero D, Sgolastra F, Venier F, Sabatini A, Burgio G, Porrini C. Effects of Bt-oilseed rape on the foraging activities of honeybees in confined environment. *Redia* 2004;87:195-8.
446. Tesoriero D, Sgolastra F, Dall'Asta S, Venier F, Sabatini AG, Porrini C. Effetti della colza Bt sull'attività di bottinamento di *Apis mellifera* in ambiente confinato e di *Osmia rufa* in laboratorio. In: Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali dell'Università di Bologna e Direzione Generale per la Salvaguardia Ambientale del Ministero dell'Ambiente, della Tutela del Territorio e del Mare (Ed.). *Studio dell'impatto derivante dal rilascio deliberato nell'ambiente di piante geneticamente modificate (OGM) sulle popolazioni di artropodi e altri invertebrati negli ecosistemi agricoli interessati*. Bologna; 2005. p.47-63.
447. Babendreier D, Kalberer NM, Romeis J, Fluri P, Mulligan E, Bigler F. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* 2005;36(4):585-94.
448. Liu, B, Xu CG, Yan FM, Gong RZ. The impacts of pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. *Biodiversity and Conservation* 2005; 14(14):3487-96.
449. Tian Yan, Zhang YongJun, Wu KongMing, Zhao KuiJun, Peng YuFa, Guo YuYuan. Effects of transgenic Bt-cry1Ab corn pollen on the growth, development and enzymes activity in *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *J Agric Biotech* 2006;14(6):990-1.
450. Konrad R, Babendreier D. Are solitary bees affected when feeding on transgenic insect-resistant crop plants? In: Veseley V, Vorechovska M, Titera D (Ed.). *Proceedings of the Second European Conference on Apidology*. Prague, Czech Republic: Bee Research Institute; 2006. p. 74-5.
451. Malone LA, Scott-Dupree CD, Todd JH, Ramakutty P. No sub-lethal toxicity to bumblebees, *Bombus terrestris*, exposed to Bt-corn pollen, captan and novaluron. *New Zealand J Crop Horticult Sci* 2007;35(4):435-9.
452. Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;59(3):600-10.
453. Babendreier D, Reichart B, Romeis J, Bigler F. Impact of insecticidal proteins expressed in transgenic plants on bumblebee microcolonies. *Entomol Exp Appl* 2008;126(2):148-57.
454. Liu Biao, Shu Chang, Xue Kun, Zhou KeXin, Li XiaoGang, Liu DouDou, Zheng YangPing, Xu ChongRen. The oral toxicity of the transgenic Bt+CpTI cotton pollen to honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotox Env Safety* 2009;72(4):1163-9.
455. Duan JJ, Marvier M, Huesing J, Dively G, Huang ZY. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Plos One* 3(1): e1415. doi: 10.1371/journal.pone.0001415.
456. Hilbeck A, Meier MS, Raps A. Review on non-target organisms and Bt-plants, EcoStrat GmbH (Ecological Technology Assessment & Environmental Consulting). *Report to Greenpeace International*; 2000. p. 1-77.
457. Babendreier D, Kalberer NM, Romeis J, Fluri P, Bigler F. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 2004;35(3):293-300.
458. Huang ZY, Hanley AV, Pett WL, Langenberger M, Duan JJ. Field and semifield evaluation of impacts of transgenic canola pollen on survival and development of worker honey bees. *J Econ Entomol* 2004;97(5):1517-23.
459. Ramirez-Romero R, Desneux N, Decourtye A, Chaffiol A, Pham-Delegue MH. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotox Env Safety* 2008;70(2): 327-33.

460. Malone LA, Burgess EPJ. Impact of genetically modified crops on pollinators. In: Ferry N, Gatehouse AMR (Ed.). *Environmental impact of genetically modified crops*. Wallingford UK: CABI; 2009. p.199-224.
461. Carter C, Graham RA, Thornburg RW. Nectarin I is a novel soluble germin-like protein expressed in the nectar of *Nicotiana* sp. *Plant Mol Biol* 1999; 41(2):207-16.
462. Peumans WJ, Smeets K, Nerum KV, Leuven FV, van Damme EJM. Lectin and alliinase are the predominant proteins in nectar from leek (*Allium prorrhum* L.) *Planta* 1997;201(2):298-302.
463. Jouanin L, Girard C, Bonadé-Bottino M, Le Métayer M, Picard-Nizou A-L, Lerin J, Pham-Delegue M-H. Impact of oilseed rape expressing proteinase inhibitors on coleopteran pests and honey bees. *Cahiers Agriculture* 1998; 7(6):531-6.
464. Office of the Gene Technology Regulator. *Risk assessment and risk management for limited and controlled release of insect resistant (VIP) GM cotton*. Canberra: Australian Government; 2005. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ogtr.gov.au/internet/publishing.nsf/Content/DIR058-2005>; ultima consultazione 6/12/2016.
465. Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV. Field performance of elite transgenic maize plants expressing insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnol* 1993;11(2):194-200.
466. Fearing PL, Brown D, Vlachos D, Meghji M, Privalle L. Quantitative analysis of Cry1A(b) expression in Bt maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations. *Mol Breed* 1997;3(3):169-76.
467. Stanley-Horn DE, Dively GP, Hellmich RL, Mattila HR, Sears MK, Rose R, Jesse LCH, Losey JE, Obrycki JL, Lewis L. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21):11931-6.
468. EPA. *Biopesticides Registration Action Document*. *Bacillus thuringiensis plant-incorporated protectants*. Washington, DC: US EOPA; 2001. Disponibile all'indirizzo: [http://www.epa.gov/opppbd1/biopesticides/pips/bt\\_brad.htm](http://www.epa.gov/opppbd1/biopesticides/pips/bt_brad.htm); ultima consultazione 16/4/2014.
469. Mattila H, Sears M, Duan J. Response of *Danaus plexippus* to pollen of two new Bt corn events via laboratory bioassay. *Entomol Exp Appl* 2005;116(1): 31-41.
470. Greenplate J. Response to reports of early damage in 1996 commercial Bt transgenic cotton (Bollgard) planting. *Soc Invertebr Pathol Newsletter* 1997; 29:15-8.
471. Yao HongWei, Ye GongYin, Jiang CaiYing, Fan LongJiang, Datta K, Hu Cui, Datta, SK. Effect of the pollen of transgenic rice line, TT9-3 with a fused cry1Ab/cry1Ac gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner on non-target domestic silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombyxidae). *Appl Entomol Zool* 2006;41(2):339-48.
472. Bonade Bottino M, Girard C, Jouanin L, Le Metayer M, Picard-Nizou AL, Sandoz G, Pham-Delegue MH, Lerin J. Effects of transgenic oilseed rape expressing proteinase inhibitors on pest and beneficial insects. *Acta Horticolt* 1998;459:235-9.
473. Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D, Gatehouse HS. Effects of four protease inhibitors on the survival of working bumblebees, *Bombus terrestris* L. *Apidologie* 2000;31(1):25-38.
474. Ramsay G, Thompson CE, Neilson S, Mackay GR. Honeybees as vectors of GM oilseed rape pollen. In: *Proceedings of a symposium on gene flow and agriculture relevance for transgenic crops*. Farnham UK: British Crop Protection Council; 1999. p. 209-14.
475. Cresswell JE, Osborne JL. The effect of patch size and separation on bumblebee foraging in oilseed rape: implications for gene flow. *J Appl Ecol* 2004;41(3):539-46.
476. Rose R, Dively GP, Pettis J. Effects of Bt corn on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie* 2007;38(4):368-77.

477. Oldroyd BP. What's killing American honey bees? *Plos Biol* 2007;(6): e168.
478. Ratnieks FLW, Carreck NL. Clarity on honey bee collapse? *Science* 2010; 327:152-3.
479. Aubert M, Faucon J-P, Chauzat M-P. Enquête prospective multifactorielle: influence des agents microbiens et parasitaires, et des résidues de pesticides sur le devenir de colonies d'abeilles domestiques en conditions naturelles. *Agence Française de Sécurité Sanitaires des Aliments*; 2008. p. 1-31.
480. Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, Holmes EC, Ostiguy N, van Engelsdorp D, Lipkin WI, dePamphilis GW, Toth AL, Cox-Foster DL. RNA viruses in Hymenoptera pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PlosOne* 2010;5(12):p(e)14357.
481. Tabashnik BE. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* 1994;39:47-79.
482. Tabashnik BE, Liu Y-B, Malvar T, Heckel DG, Masson L, Ferré J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse. *Phil Trans Royal Soc Lond B* 1998;353(1376):1751-6.
483. Frutos R, Rang C, Royer M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit Rev Biotechnol* 1999;19(3):227-76.
484. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 2001;293:857-60.
485. Liu Y-B, Tabashnik BE, Dennehy TJ, Patin AL, Sims MA, Meyer SK, Carrière Y. Effects of Bt cotton and Cry1Ac toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Econ Entomol* 2001;94(5):1237-42.
486. Herrero S, Oppert B, Ferré J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(3):1085-9.
487. EPA. Scientific Advisory Panel. Subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-pesticides and resistance management. February 9-10, 1998. Docket No. OPPTS-00231.
488. Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zhao J-Z, Shelton AM, Gould F, Tabashnik BE. The diversity of Bt resistance genes in species of lepidoptera. *J Invertebr Pathol* 2007;95(3):192-7.
489. Akhurst RJ, Tames W, Bird LJ, Beard C. Resistance to the Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J Econ Entomol* 2003;96(4):1290-9.
490. González-Cabrera J, Escriche B, Tabashnik BE, Ferré J. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm. (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33(9):929-35.
491. Xu X, Yu L, Wu Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Env Microbiol* 2005;71(2):948-54.
492. Wang P, Zhao J-Z, Rodrigo-Simón A, Kain W, Janmaat AF, Shelton AM, Ferré J, Myers J. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of the cabbage looper *Trichoplusia ni*. *Appl Env Microbiol* 2007;73:1199-207.
493. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 2001;293:857-80.
494. Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Eilers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carrière Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9): 5004-9.
495. Tabashnik BE, Biggs RW, Higginson DW, Henderson S, Unnithan DC, Unnithan GC, Eilers-Kirk C, Sisterson MS, Dennehy TJ, Carrière Y, Morin S. Association between resistance to Bt cotton and cadherin genotype in pink bollworm. *J Econ Entomol* 2005;98:635-44.

496. Yang Y, Chen H, Wu Y, Yang Y, Wu S. Mutated cadherin alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Appl Env Microbiol* 2007;73(21):6939-44.
497. Jurat-Fuentes JL, Gahan LJ, Gould FL, Heckel DG, Adang MJ. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Biochemistry* 2004;43(44):14299-305.
498. Soberón M, Pardo-López L, López I, Gomez I, Tabashnik BE, Bravo A. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 2007;318:1640-2.
499. Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 2005;6(96). Disponibile all'indirizzo: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/6/96>; ultima consultazione 16/4/2014.
500. Li H, Oppert B, Higgins RA, Huang R, Buschman LL, Gao J-R, Zhu KY. Characterization of cDNAs encoding three trypsin-like proteinases and mRNA quantitative analysis in Bt-resistant and-susceptible strains of *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:847-60.
501. Liu YB, Tabashnik BE. Experimental evidence that refuge delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Phil Trans Royal Soc Lond B* 1997; 264(1381):605-10.
502. Tang JD, Collins HL, Metz TD, Earle ED, Zhao J-Z, Roush RT, Shelton AM. Greenhouse tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. *J Econ Entomol* 2001;94(1):240-7.
503. Alstad DN, Andow DA. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 1995;268(5219):1894-6.
504. Caprio MA. Source-sink dynamics between transgenic and nontransgenic habitats and their role in the evolution of resistance. *J Econ Entomol* 2001;94(3):698-705.
505. Onstad DW, Guse GA, Porter P, Buschman LL, Higgins RA, Sloderbeck PE, Peairs Fb, Gronholm GB. Modelling the development of resistance by stalk-boring lepidopteran insects (Crambidae) in areas with transgenic corn and frequent insecticide use. *J Econ Entomol* 2002;95(5):1033-43.
506. Carrière Y. Haplodiploidy sex and the evolution of pesticide resistance. *J Econ Entomol* 2003;96(6):1626-40.
507. United States Environmental Protection Agency, United States Department of Agriculture. *EPA and USDA Position paper on insect resistance management in Bt crops*. Washington, DC: US EPA; 1999.
508. Gould FA, Anderson A, Jones D, Sumerford D, Heckel G, Lopez J, Micinski S, Leonard R, Laster M. Initial frequency of alleles of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(8):3519-23.
509. Bentur JS, Andow DA, Cohen MB, Romena AM, Gould F. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Econ Entomol* 2000;93(5):1515-21.
510. Andow DA, Olson DM, Hellmich RL, Alstad DN, Hutchison WD. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol* 2000;93(1):26-30.
511. Bourguet D, Chaufaux J, Séguin M, Buisson C, Hinton JL, Stodola TJ, Porter P, Cronholm G, Buschman LL, Andow DA. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor Appl Genet* 2003;106(7): 1225-33.
512. Stodola TJ, Andow DA, Hyden AR, Hinton JL, Roark JJ, Buschman LL, Porter P, Cronholm GB. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in southern United States Corn Belt population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol* 2006;99(2):502-7.



513. Andreadis SS, Alvarez-Alfageme F, Sánchez-Ramos I, Stodola TJ, Andow DA, Milonas PG, Savopoulou-Soultani M, Castánera P. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Greek and Spanish population of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 2007;100(1):195-201.
514. Gould FL. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu Rev Entomol* 1998;43:701-26.
515. Mellon M, Rissler J. *Now or never: serious new plans to save a natural pest control*. Cambridge MA: Union of Concerned Scientists; 1998.
516. Gould FL. Testing Bt refuge strategies in the field. *Nature Biotechnol* 2000;18(3):266-7.
517. Shelton AM, Tang JD, Roush RT, Metz TD, Earle ED. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nature Biotechnol* 2000; 18(3):339-42.
518. European Commission. Directorate-General Environment. *Protocol for the monitoring of European corn borer and Mediterranean corn borer resistance to Bt-maize*. Brussels: European Commission; 2003. (DoC Nr ENV/03/24).
519. Environmental Protection Agency. *Pesticide Fact Sheet*. Washington, DC: US EPA; 2011; Disponibile all'indirizzo: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/pip/smartstax-factsheet.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/smartstax-factsheet.pdf); ultima consultazione 16/12/2016.
520. Cohen MB, Gould F, Bentur JS. Bt rice: practical steps to sustainable use. *International Rice Research Notes* 2000;25(2):4-10.
521. Riggini-Bucci TM, Gould F. Impact of intraplot mixtures of toxic and non-toxic plants on population dynamics of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) and its natural enemies. *J Econ Entomol* 1997;90(2):241-51.
522. Hellmich RL, Higgins LS, Witkowski JF, Campbell FE, Lewis LC. Oviposition by European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in response to various transgenic corn events. *J Econ Entomol* 1999;92(5):1014-20.
523. Cohen MB, Romena AM, Gould F. Dispersal by larvae of the stem borer *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Chilo suppressalis* in plots of transplanted rice. *Environ Entomol* 2000;20(5):958-71.
524. Dirie AM, Cohen MB, Gould FL. Larval dispersal and survival of two stem borer (Lepidoptera: Crambidae) species on cry1Ab-transformed and non-transgenic rice. *Environ Entomol* 2000;20(5):972-8.
525. Andow DA, Hutchinson WD. Bt-corn resistance management. In: Mellon M, Rissler J (Ed.). *Now or never: serious new plans to save a natural pest control*. Cambridge MA: Union of Concerned Scientist; 1998. p. 19-66.
526. Wu KM, Lu YH, feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science* 2008;321:1676-8.
527. Janmaat AF, Myers J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc Royal Soc B* 2003;270(1530):2263-70.
528. Kain WC, Zhao JZ, Janmaat AF, Myers J, Shelton AM, Wang P. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in a greenhouse-derived strain of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *J Eco Entomol* 2004;97(6): 2073-8.
529. Sayyed AH, Raymond B, Ibiza-Palacios MS, Escriche B, Wright DJ. Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(12):7010-7.

530. Pereira E JG, Storer NP, Siegfried BD. Inheritance of Cry1F resistance in laboratory-selected European corn borer and its survival on transgenic corn expressing the Cry1F toxin. *Bull Entomol Res* 2008;98(6):621-9.
531. Zhao XC, Wu KM, Liang GM, Guo YY. Modified female calling in Cry1Ac-resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) *Pest Manag Sci* 2009;65(4):353-7.
532. EPA. *Notice of pesticide: Registration. Bollgard II Cotton*. Washington, DC: US EPA; 2007. Disponibile all'indirizzo: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/000524-00522-20070601.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/000524-00522-20070601.pdf); ultima consultazione 16/12/2016.
533. Tabashnik BE, Dennehy TJ, Sims MA, Larkin K, Head GP, Moar WJ, Carrière Y. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxinCry2Ab. *Appl Env Entomol* 2002;68:3790-4.
534. Downes S, Mahon R, Olsen K. Monitoring and adaptative resistance management in Australia for Bt-cotton: current status and future challenges. *J Invertebr Pathol* 2007;95(3):208-13.
535. Hutchison WD, Burkness EC, Mitchell PD, Moon RD, Leslie TW, Fleischer SJ, Abrahamson M, Hamilton KL, Steffey KL, Gray ME, Hellmich RL, Kaster LV, Hunt TE, Wright RJ, Pecinovsky K, Rabaey TL, Flood BR, Raun ES. Area wide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. *Science* 2010;330(6001):222-5.
536. Tabashnik BE, Van Rensburg JB, Carrière Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *J Econ Entomol* 2009;102(6):2011-25.
537. Tabashnik BE, Sisterson MS, Ellsworth PC, Dennehy TJ, Antilla L, Liesner L, Whitlow M, Staten RT, Fabrick JA, Unnithan GC, Yelich AJ, Eilers-Kirk C, Harpold VS, Li X, Carrière Y. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. *Nature Biotechnol* 2010;28(12):1304-7.
538. Losey JE, Rayor LS, Carter ME. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 1999;399:214.
539. Jesse LCH, Obrycki JJ. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia* 2000;125(2):241-8.
540. Zangler AR, McKenna D, Wraight CL, Carroll M, Ficarello P, Warner R, Berenbaum MR. Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21):11908-12.
541. Oberhauser KS, Prysby MD, Mattila HR, Stanley-Horn DE, Sears MK, Dively G, Olson E, Pleasants JM, Lam WKF, Hellmich RL. Temporal and spatial overlap between monarch larvae and corn pollen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21):11913-18.
542. Pleasants JM, Hellmich RL, Dively GP, Sears MK, Stanley-Horn DE, Mattila HR, Foster JE, Clark P, Jones GP. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21): 11919-24.
543. Hellmich RL, Siegfried BD, Sears MK, Stanley-Horn DE, Daniels MJ, Mattila HR, Specer T, Bidne KG, Lewis LC. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21):11925-30.
544. Stanley-Horn DE, Dively GP, Hellmich HL, Mattila HM, Sears MK, Rose R, Jesse LCH, Losey JE, Obrycki JJ, Lewis L. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(21):11931-36.
545. Sears MK, Hellmich RL, Stanley-Horn DE, Oberhauser KS, Pleasants JM, Mattila HR, Siegfried BD, Dively GP. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: a risk assessment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(21):11937-42.
546. Shelton AM, Sears MK. The monarch butterfly controversy: scientific interpretations of a phenomenon. *Plant J* 2001;27(6):483-8.
547. Gatehouse AMR, Ferry N, Raemaekers RJM. The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. *Trends Gen* 2002;18(5):249-51.

548. Oberhauser KS, Rivers ERL. Monarch butterfly (*Danaus plexippus*) larvae and Bt maize pollen: a review of ecological risk assessment for non-target species. *AgBiotechNet* 2003;5(1):1-7.
549. Marks LA, Kalaitzandonakes N, Allison K, Zakharova L. Media coverage of agrobiotechnology: did the butterfly have an effect? *J Agribusiness* 2003; 21(1):1-20.
550. Anderson PL, Hellmich RL, Sears MK, Smerford DV, Lewis LC. Effects of Cry1Ab-expressing corn anthers on monarch butterfly larvae. *Environ Entomol* 2004;33(4):1109-15.
551. Dively GP, Rose R, Sears MK, Hellmich RL, Stanley-Horn DE, Calvin DD, Russo JM, Anderson PL. Effects on monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after continuous exposure to Cry1Ab-expressing corn during anthesis. *Environ Entomol* 2004;33(4):1116-25.
552. Anderson PL, Hellmich RL, Prasifka JR, Lewis LC. Effects on fitness and behavior of monarch butterfly larvae exposed to a combination of cry1Ab-expressing corn anthers and pollen, *Env Entomol* 2005;34(4):944-52.
553. Prafika PL, Hellmich RL, Prafika JR, Lewis LC. Effects of cry1Ab-expressing corn anthers on the movement of monarch butterfly larvae. *Environ Entomol* 2007;36(1):288-33.
554. International Food Policy Research Institute. *Bt cotton and farmers suicides in India. Discussion paper 00808*. Washington, DC: IFPRI; 2008.
555. Choudhary B, Gaur, K. *Bt Cotton in India: A Country Profile*. Ithaca, NY: ISAAA; 2010. (ISAAA Series of Biotech Crop Profiles).
556. Karihaloo JL, Kumar PA. *Bt cotton in India - A status report 8<sup>th</sup> edition*. New Dehli: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB); 2009. p. 1-56.
557. Romeis J, Meissle M, Bigler F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnol* 2006;24(1): 63–71.
558. Burges HD. *Bacillus thuringiensis* in pest control: now and the future. *Pest Outlook* 2001;12(3):90-7.
559. Siegel JP. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J Invertebr Pathol* 2001;77(1):13-21.
560. Andow DA, Lövei GL, Arpaia S. Ecological risk assessment for Bt crops. *Nature Biotechnol* 2006;24(7): 749-51.
561. Romeis J, Meissle M, Bigler F. Reply to Ecological risk assessment for Bt crops. *Nature Biotechnol* 2006;24(7):751-3.
562. Romeis J, Bartsch D, Bigler F, Candolfi MP, Gielkens MMC, Hartley SE, Hellmich RL, Huessing JE, Jepson PC, Layton R, Quemada H, Raybound A, Rose RI, Schieman J, Sears MK, Shelton AM, Sweet J, Vaituzis Z, Wolt JD. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnol* 2008;26(2):203-8.
563. Lövei GL, Andow DA, Arpaia S. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. *Environ Entomol* 2009; 38(2):293-306.
564. Shelton AM, Naranjo SE, Romeis J, Hellmich RL, Wolt JD, Federici BA, Albajes R, Bigler F, Burgess EPJ, Dively GP, Gatehouse AMR, Malone LA, Roush R, Sears M, Sehnal F. Setting the record straight: a rebuttal to an erroneous analysis on transgenic insecticidal crops and natural enemies. *Transgenic Res* 2009;18(3):317-22.
565. Andow DA, Lövei GL, Arpaia S. Cry toxins and proteinase inhibitors in transgenic plants do have non-zero effects on natural enemies in the laboratory: rebuttal to Shelton et al. 2009. *Environ Entomol* 2009;38(6): 1528-32.
566. Shelton AM, Naranjo SE, Romeis J, Hellmich RL, Wolt JD, Federici BA, Albajes R, Bigler F, Burgess EP, Dively GP, Gatehouse AM, Malone LA, Roush R, Sears M, Sehnal F, Ferry N, Bell HA. Appropriate analytical methods are necessary to assess nontarget effects of insecticidal proteins in

- GM crops through meta-analysis (response to Andow et al. 2009). *Environ Entomol* 2009;38(6):1533-8.
567. Wolfenbarger LL, Naranjo SE, Lundgren JG, Bitzer RJ, Watrud LS. Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *Plos One* 2008;3(5):e2118.
568. Romeis J, Bartsch D, Bigler F, Candolfi MP, Gielkens MMC, Hartley SE, Hellmich RL, Huesing JE, Jepson PC, Layton R, Quemada H, Raybould A, Rose Ri, Schiemann J, Sears MK, Shelton AM, Sweet J, Vaitzuis Z, Wolt JD. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnol* 2008;26(2):203-208.
569. EFSA. Scientific opinion on the assessment of potential impacts of genetically modified plants on non-target organisms. *EFSA J* 2010;8(11):1877, doi: 10.2903/j.efsa.2010.1877.
570. Jongasma MA, Gould FL, Lgros M, Yang L, van Loon JJA, Dicke M. Oviposition behaviour of pest insects keeps Bt-cotton durably resistant. *Evolutionary Ecol* 2010;24(5):1017-30.
571. Tabashnik BE, Dennehy TJ, Carrière Y. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(43):15389-93.
572. Tabashnik BE, Gassmann AJ, Crowder DW, Carrière Y. Insect resistance to Bt crops: evidence against theory. *Nature Biotechnol* 2008;26(2):199-202.
573. Bourguet D. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in European corn borer: what chance for Bt maize? *Physiol Entomol* 2004;29(3):251-6.
574. Sanchis V, Bourguet D. *Bacillus thuringiensis* applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agron Sustain Dev* 2008;28(1):11-20.
575. Lu Y, Wu K, Jiang Y, Xia B, Li P, Feng H, Wychuys KAG, Guo Y. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science* 2010;328(5982):1151-4.
576. Wang Zi-jun, Lin H, Huang Ji-kun, Hu Rui-fa, Rozelle S, Pray C. Bt cotton in China. Are secondary insect infestations offsetting the benefits in farmer fields? *Agricultural Sciences in China* 2009;8(1):83-90.
577. Benuzzi M, Mosti M, Nicoli G. I Miridi predatori di Aleurodidi. In: Nicoli G, Radeghieri P (Ed.). *Gli ausiliari nell'agricoltura sostenibile*. Bologna: Calderini Edagricole; 2000. p. 73-83.
578. Wu KM, Guo YY. The evolution of cotton pests management practices in China. *Annu Rev Entomol* 2005;50:31-52.
579. He KL, Wang ZY, Zhang YJ. Monitoring Bt resistance in the field: China as a case study. In: Ferry N, Gatehouse AMR (Ed.). *Environmental impact of genetically modified crops*. Wallingford: CABI; 2009. p. 344-59.
580. Paoletti MG, Pimentel D. Environmental risk of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest controls. *J Agric Environ Ethics* 2000;12(3):279-303.
581. Fitt GP. An Australian approach to IPM in cotton: integrating new technologies to minimize insecticide dependence. *Crop Prot* 2000;19(8-10):793-800.
582. Bates SL, Zhao J-Z, Roush RT, Shelton AM. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature Biotechnol* 2005;23(1):57-62.
583. Shelton AM, Hatch SL, Zhao J-Z, Chen M, Earle ED, Cao J. Suppression of diamondback moth using Bt transgenic plants as trap crops. *Crop Prot* 2008; 27(3-5):403-9.
584. Naranjo SE, Ellsworth PC. Fifty years of the integrated control concept: moving the model and implementation forward in Arizona. *Pest Manag Sci* 2009;65(12):1267-86.
585. Tabashnik BE. Communal benefits of transgenic corn. *Science* 2010;330: 189-90.
586. Sisterson MS, Tabashnik BE. Simulated effects of transgenic Bt crops on specialist parasitoids of target pests. *Environ Entomol* 2005;34(4):733-42.

587. White JA, Andow DA. Host-parasitoid interactions in a transgenic landscape: spatial proximity effects of host density. *Environ Entomol* 2005; 34(6):1493-500.
588. Perry JN, Ter Braak CJ, Dixon PM, Duan JJ, Hails RS, Huesken A, Lavielle M, Marvier M, Scardi M, Schmidt K, Tothmeresz B, Schaarschmidt F, van der Voet H. Statistical aspects of environmental risk assessment of GM plants for effects on non-target organisms. *Environ Biosafety Res* 2009;8(2): 65-78.
589. Tabashnik BE, van Rensburg JBJ, Carrière Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. *J Econ Entomol* 2009; 102(6):2011-25.
590. Bergé JB, Ricroch AE. Emergence of minor pests becoming major pests in GE cotton in China. What are the reasons? What are the alternatives practices to this change of status? *GM Crops* 2010;1(4):1-6.
591. Perry JN, Devos Y, Arpaia S, Bartsch D, Gathmann A, Hails RS, Kiss J, Lheureux K, Manachini B, Mestdagh S, Neemann G, Ortego F, Schiemann J, Sweet JB. A mathematical model of exposure of non-target Lepidoptera to Bt-maize pollen expressing Cry1Ab within Europe. *Proc Roy Soc B Biol Sci* 2010;277(1686):1417-25.
592. Andow DA. The risk of resistance evolution of insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of Biosafety Reviews*. 2008;4:142-199.
593. Arpaia S. Genetically modified plants and “non-target” organisms: Analyzing the functioning of the Agrosystems. *Collection of Biosafety Reviews* 2009;5:12-79.
594. Feitelson JS, Payne J, Kim L. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Nature Biotechnol* 1992;10(3):271-5.
595. Tabashnik BE, Huang F, Ghimise MV, Leonard BR, Siegfried BD, Rangasamy M, Yang Y, Wu Y, Gahan LJ, Heckel DG, Bravo A, Soberón M. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different mechanisms of resistance *Nature Biotechnol* 2011;29(12):1128-31.
596. Verderio A, Bressan M, Bertolini M, Pino S, Mazzinelli G, Sartori G. Risultati delle varietà transgeniche di mais resistenti a piralide o tolleranti a glufosinate-ammonio. *L'Informatore agrario* 1998;12:61-70.
597. Franceschi S, Bidoli E, Baròn AE, La Vecchia C. Maize and risk of cancer of the oral cavity, pharynx and esophagus in northeastern Italy. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(17):1407-11.
598. Kershen DL. Sicurezza sanitaria e alimentare – I benefici del mais Bt. *Spazio Rurale* 2007; Supplemento al n. 10: 1-47.

## 11. RESISTENZA AGLI ERBICIDI

La resistenza è un carattere ereditario presente in alcuni individui di una specie vegetale; la resistenza può essere naturale o indotta da tecniche d'ingegneria genetica o di incrocio/selezione. Viene definita resistenza agli erbicidi la capacità di una pianta di sopravvivere e riprodursi perché non è danneggiata da una dose di erbicida normalmente letale. Il termine tolleranza agli erbicidi si riferisce, invece, alla capacità di una pianta di sopravvivere, crescere e riprodursi pressoché normalmente pur manifestando segni più o meno evidenti dell'azione fitotossica dell'erbicida a cui è stata esposta. Spesso il termine resistenza e il termine tolleranza sono usati come sinonimi per quanto riguarda le piante resistenti (HR per *herbicide resistant* nella nomenclatura internazionale). Le piante resistenti agli erbicidi sono state rapidamente adottate in agricoltura, in particolare quelle resistenti (tolleranti) al glifosato e resistenti al glufosinato (1-5), erbicidi non selettivi efficaci su numerose infestanti a foglia larga (dicotiledoni) o a foglia stretta (monocotiledoni).

### 11.1. Resistenza all'erbicida glifosato

Il glifosato (N-fosfometilglicina) viene, in genere, utilizzato nei frutteti o prima della semina per liberare il terreno dalle infestanti. È l'unico erbicida che inibisce competitivamente l'enzima 3-enolpiruvil-scichimato-5-fosfato sintetasi (EPSPS), che nei batteri e nelle piante, catalizza la condensazione tra il fosfoenolpiruvato (PEP) e lo scichimato-5-fosfato, per formare il 3-enolpiruvil-scichimato-5-fosfato, un prodotto intermedio della via biosintetica degli aminoacidi fenilalanina, tirosina e triptofano. Il glifosato viene incorporato dall'EPSPS al posto del PEP, bloccando così la biosintesi degli aminoacidi aromatici.

Le piante resistenti al glifosato sono state prodotte utilizzando geni in grado di assicurare il funzionamento della pianta anche in presenza dell'erbicida, come il gene *CP4*, isolato da *Agrobacterium* sp., e il gene della glifosato ossidoreduttasi (GOX), isolato da *Ochrobactrum anthropi*, che degrada il glifosato a gliossilato e ammino-metil-fosfonato (AMPA).

L'introduzione di soia, mais e cotone resistenti al glifosato ha profondamente cambiato, a partire dal 1996, la gestione delle infestanti nei campi coltivati (7).

La soia resistente al glifosato, prodotta da Monsanto, è stata rapidamente introdotta negli USA e in Argentina, dove, nel giro di 4 anni (2), circa il 90% del suolo destinato a questa coltivazione è stato coltivato a soia HR. Analoga velocità d'adozione si è verificata per la colza (6).

Negli USA è stata autorizzata anche la coltivazione dell'erba medica HR e sono in sperimentazione altre piante HR come la cipolla (*Allium cepa*) il pisello (*Pisum sativum*) e l'erba fienarola (*Poa pratensis*). Non viene invece coltivata la barbabietola da zucchero HR, sebbene sia stata autorizzata, perché gli agricoltori temono che non sia accettata dalle industrie saccarifere.

Gli erbicidi rappresentano oggi circa il 70% delle sostanze chimiche usate in agricoltura per cui l'introduzione delle piante HR ha innescato una controversia sulla possibilità che la loro adozione comporti un uso maggiore di erbicidi (7). La controversia è stata alimentata dall'assunto che un aumento nella quantità di sostanze chimiche equivalga ad un incremento del danno ambientale e del rischio tossicologico, senza considerare che il rischio varia considerevolmente da erbicida ad erbicida. Vandana Shiva, ambientalista indiana, sostiene che

l'introduzione delle piante HR nei Paesi in via di sviluppo, dove la gestione delle infestanti è effettuata con la rimozione manuale, porterebbe ad un aumento nell'uso degli erbicidi (8). Questo evento potrebbe verificarsi se diminuisse il costo del glifosato, per la scadenza del brevetto e, per concorrenza, quello degli altri erbicidi. Heimlich *et al.* Hanno, infatti, verificato che, rispetto al glifosato, gli altri erbicidi sono tre volte più tossici e persistono due volte più a lungo nell'ambiente (9) e anche se il glifosato viene impiegato in quantità elevate, è un erbicida a basso rischio tossicologico e a basso impatto ambientale (10). Inoltre, l'introduzione della soia HR ha portato, per anno, alla sostituzione di 3,27 milioni kg di altri erbicidi con 2,45 milioni di glifosato (4, 11).

Il glifosato non è comunque considerato un contaminante significativo, poiché non permane nel suolo anche dopo un uso prolungato (12).

Studi effettuati su suoli coltivati con piante HR trattate con glifosato non hanno rilevato, rispetto ai controlli, variazioni in densità di nematodi, biomassa microbica e respirazione del suolo (13).

Analisi eseguite sulla rizosfera hanno invece mostrato variazioni nella popolazione microbica del suolo associate alla coltivazione di piante transgeniche rispetto a coltivazioni non transgeniche (14), evento temporaneo che non persisteva fino alla stagione di semina successiva (15). Possiamo considerare questi effetti osservati sulla comunità microbica del suolo come transeunti e molto più variabili rispetto a quelli osservati su suoli trattati con altre pratiche agronomiche (rotazione, aratura, altri erbicidi e irrigazione) (16-18).

Il glifosato non ha effetti sull'ambiente acquatico (19), dove la sua capacità di legare alcuni ioni metallici ne riduce la biodisponibilità (20), tanto da essere autorizzato, negli USA, come erbicida per questi ambienti. Non sono stati, inoltre, riscontrati effetti del glifosato sulla fauna selvatica (21). Gli effetti sulla biodiversità vegetale sono illustrati nell'introduzione al capitolo 3 ("Ambiente").

L'uso su larga scala del glifosato può portare all'impossibilità di controllare tutte le specie di piante infestanti, in particolare quelle appartenenti a biotipi con elevata resistenza al glifosato, che andranno ad occupare nicchie ecologiche vacanti nell'agrosistema. Le infestanti possono infatti sviluppare resistenza agli erbicidi (nel sito <http://www.weedscience.org/in.asp> sono catalogate tutte le resistenze; ultima consultazione 16/4/2014) e questo processo viene accelerato dall'uso continuato nel tempo di uno stesso prodotto (22, 23).

Poiché per produrre una pianta HR sono necessarie manipolazioni complesse, si riteneva improbabile che la resistenza al glifosato potesse essere trasmessa alle infestanti. Oggi, invece, vi sono infestanti che presentano tale resistenza, ma solo alcune di queste sono la conseguenza della coltivazione di piante HR (Tabella 23).

La prima osservazione di resistenza al glifosato, sviluppata verosimilmente in seguito alla coltivazione della soia HR, risale al 2001, negli USA, sulla saeppola *Coryza canadensis* (26). In seguito, sempre associate all'impiego di piante HR, sono state trovate, negli USA, molte infestanti dannose resistenti (*Ambrosia artemisiifolia*, l'*Ambrosia trifida*, l'*Amaranthus palmeri*, l'*Amaranthus tuberculatus* e varie specie di *Coryza* e *Lolium*), mentre in Argentina comparivano resistenze nel *Sorghum halepense*, in Brasile nell'*Euphorbia heterophylla* e in Spagna in *Coryza bonariensis*, *Coryza canadensis* e *Lolium multiflorum* (27-30).

L'acquisizione della resistenza non è dovuta al flusso genico e i meccanismi sono differenti nelle diverse infestanti. Nel loglio italiano vi è una mutazione puntiforme nell'amminoacido 106 dell'EPSPS da prolina a serina (o treonina) che conferisce la resistenza al glifosato; nell'amaranto vi è un'amplificazione genica di EPSPS; nella saeppola l'erbicida viene, invece, inglobato nei vacuoli e non entra così in contatto con i cloroplasti (31, 32).

Studi effettuati sull'uomo sembrano mettere in evidenza possibili effetti patologici degli erbicidi, e quindi anche del glifosato, sulla salute umana.

Tabella 23. Infestanti che hanno sviluppato la resistenza al glifosato

Specie	Nome italiano	Anno prima osservazione	Paese
<i>Amaranthus palmeri</i>	amaranto	2005	USA (Georgia)
<i>Amaranthus tuberculatus (syn. rudis)</i>	amaranto	2005	USA (Missouri)
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ambrosia	2004	USA (Arkansas)
<i>Ambrosia trifida</i>	ambrosia	2004	USA (Ohio)
<i>Conyza bonariensis</i>	saepcola	2003	Sud Africa
		2004	Spagna
		2005	Brasile
		2005	Israele
		2006	Colombia
		2007	USA (California)
		2000	USA (Delaware)
<i>Conyza canadensis</i>	saepcola	2005	Brasile
		2006	Cina
		2006	Spagna
		2007	Repubblica ceca
<i>Conyza sumatrensis</i>	saepcola	2009	Spagna
<i>Digitaria insularis</i>	erba della pampa	2006	Paraguay
		2008	Brasile
<i>Echinochloa colona</i>	giavone meridionale	2007	Australia
<i>Eleusine indica</i>	gramigna indiana	1997	Malesia
		2006	Colombia
<i>Euphorbia heterophylla</i>	euforbia	2006	Brasile
<i>Kochia scoparia</i>	granata comune	2007	USA (Kansas)
		2001	Cile
		2003	Brasile
		2004	USA (Oregon)
<i>Lolium multiflorum</i>	loglio italiano	2006	Spagna
		2007	Argentina
		2008	Argentina
<i>Lolium perenne</i>	loglio perenne	1996	Australia
		1998	USA (California)
		2005	Francia
<i>Lolium rigidum</i>	loglio rigido	2006	Spagna
		2007	Italia
		2004	Colombia
<i>Parthenium hysterophorus</i>	cicutilla	2004	Colombia
<i>Plantago lanceolata</i>	piantaggine minore, lanciola, lingua di cane	2005	Argentina
<i>Sorghum halepense</i>	sorgo selvatico, grano di Siria	2005	Argentina
<i>Urochloa panicoides</i>	pasto africano	2008	Australia

In particolare, è stata descritta una possibile associazione tra l'esposizione delle gestanti e la presenza di malformazioni nel neonato, in un'area dell'Uruguay, dove è coltivata la soia resistente al glifosato (33). Tuttavia, gli stessi autori non precisano se gli effetti siano dovuti al



glifosato o alle altre sostanze chimiche impiegate. Studi precedenti, condotti negli USA, sulle famiglie di agricoltori che utilizzavano il glifosato, avevano rilevato la presenza dell'erbicida nelle urine degli operatori agricoli il giorno successivo al suo impiego, ma non in quelle dei familiari (34). Le concentrazioni di glifosato nelle urine erano strettamente correlate agli altri componenti della formulazione commerciale usata (35). Una correlazione analoga tra eccipienti della formulazione e tossicità *in vitro* è stata osservata in cellule di epatociti umani in coltura (36).

In seguito ad uno studio effettuato su embrioni di rana allo stadio di due cellule e uova di pollo fecondate iniettate con glifosato, è stato attribuito all'erbicida il ruolo di distruttore endocrino (37). Rita Levi Montalcini fin dai primi anni '50 ha dimostrato che questa via di somministrazione è in grado di provocare malformazione negli embrioni anche quando si iniettano sostanze innocue.

Le conclusioni di questo lavoro sugli embrioni sono risultate comunque irrealistiche sia a causa delle alte dosi e della via di somministrazione impiegata, sia per alcune incongruenze sperimentali.

Il glifosato, risulta comunque essere tossico per pesci e invertebrati acquatici (38,39) ed è leggermente dannoso per alcuni insetti benefici, predatori e parassitoidi (40). Nel ratto, il glifosato induce un ritardo nello sviluppo embrionale dello scheletro (41) ed ha effetti negativi sul sistema riproduttivo (42). Effetti negativi sono stati osservati anche su cellule umane di placenta in coltura (43) e su cellule umane embrionali (44). Questi risultati erano però più influenzati dalla formulazione dell'erbicida che dalla concentrazione del principio attivo (45).

Ad oggi, tutti gli studi tossicologici effettuati sul glifosato confermano le conclusioni degli organismi regolatori (FDA ed EFSA) secondo le quali tale composto non è teratogeno e non ha effetti sullo sviluppo.

## 11.2. Resistenza all'erbicida glufosinato

In risposta al successo commerciale delle piante Roundup Ready (si dicono Roundup ready, abbreviato RR, le colture geneticamente modificate al fine di tollerare gli erbicidi a base di glifosato) di Monsanto, la Bayer Crop System ha prodotto piante transgeniche di mais, cotone e colza resistenti all'erbicida glufosinato (prodotti commerciali Basta, Rely, Finale, Ignite, Challenge e LibertyLink) impiegato in dosi massicce, nei bordi delle strade, nei parchi, negli orti, nelle colture di mais, nei filari delle viti e nei frutteti.

Il glufosinato è la versione sintetica della fosfinotricina, un composto naturale isolato dallo *Streptomyces hygroscopicus*. La fosfinotricina impedisce la reazione tra ione ammonio e il glutammato, catalizzata dall'enzima glutammina sintetasi, per formare la glutammina, precursore di molte vie metaboliche, alcune delle quali vitali per la fotosintesi. Il gene che conferisce la resistenza alla fosfinotricina, *bar* o *pat*, isolato da *Streptomyces* sp., acetila la fosfinotricina rendendo inattiva, nella pianta che contiene tale gene, la via metabolica della glutammina.

Il glufosinato, diversamente dal glifosato, è un erbicida di "contatto" il cui effetto è limitato alle parti della pianta irrorate (46) e, non traslocando nelle radici, è inefficace contro le infestanti perenni.

Il glufosinato ha un'emivita relativamente bassa, permanendo nell'ambiente da 3 a 10 giorni (47) per poi essere degradato prima in due intermedi metabolici, l'acido 3-metilfosfinilpropionico (MPPA) e l'acido 2-metilfosfinil-acetico, e infine a CO<sub>2</sub>. Questa degradazione rapida fa sì che il glufosinato e il MPPA non percolino nei suoli al di sotto dei 10 cm (48). Il

glufosinato è assorbito fortemente dalle particelle del suolo per cui, pur essendo solubile in acqua, la sua concentrazione nelle acque superficiali è un decimo di quella degli altri erbicidi, impiegati nelle stesse condizioni (49).

Riguardo agli effetti sul suolo sono state descritte piccole e non significative modificazioni nelle comunità microbiche delle rizosfera che risultano transeunti in caso di coltivazione di piante non transgeniche e presenti, invece, anche nella senescenza, in caso di piante transgeniche (50).

Ad oggi, non sono stati descritti casi di resistenza al glufosinato da parte delle infestanti, mentre sono stati descritti effetti negativi sia per il glifosato che per il glufosinato, legati alla deriva degli erbicidi sui campi vicini a quelli trattati (51, 52).

Negli animali da laboratorio il glufosinato, dopo somministrazione orale o esposizione cutanea ha determinato sia effetti neurotossici (53) sia teratogeni (54, 55). L'MPPA, metabolita del glufosinato, è stato ritrovato invece nel sangue e nel cordone ombelicale di donne gravide (56) rafforzando l'allarme sul potenziale teratogeno del glufosinato (57), anche se lo studio non analizza le diete delle gestanti e non chiarisce l'origine dell'erbicida.

A fronte di queste evidenze il 13 gennaio 2009, su proposta dell'agenzia chimica svedese (*Kemikalieinspektionen*, KEMI), il Parlamento europeo ha vietato l'uso del glufosinato in Europa a partire dal 2017.

### 11.3. Resistenze multiple

La trasmissione di un transgene per la resistenza ad un erbicida attraverso l'incrocio occasionale con piante transgeniche sessualmente compatibili, è uno dei rischi più temuti. Spesso di questo evento sono responsabili i ricacci, cioè le piante che emergono dai semi o da parti di piante transgeniche resistenti rimasti nel terreno dalla coltivazione precedente. L'eliminazione dei ricacci resistenti richiede, in genere, l'applicazione di un altro prodotto o di miscele di più prodotti, e quindi un incremento nell'impiego degli erbicidi (59).

Incroci occasionali possono determinare anche molto rapidamente la trasmissione di geni di resistenza tra piante transgeniche e infestanti selvatiche sessualmente compatibili, come nel caso della colza (*Brassica napus*) transgenica; fenomeno che si è verificato in Canada negli anni novanta. Incroci casuali e ripetuti tra infestanti e piante di colza transgenica con resistenze diverse (glufosinato, imidazilone, glifosato), coltivate in campi limitrofi e tempi diversi, hanno portato allo sviluppo di alcune piante di colza con triplice resistenza (60). Studi pluriennali hanno dimostrato che le resistenze multiple sono comuni alle condizioni colturali adottate in Canada (61-63).

Sebbene le circostanze che hanno dato origine alla triplice resistenza siano piuttosto inusuali, è necessario variare regolarmente le tecniche di controllo erbicida/infestante per evitare la comparsa di ricacci che possono divenire infestanti a loro volta.

### 11.4. Resistenza agli erbicidi: il caso del Brasile

Gli agricoltori dello stato brasiliano *Rio Grande do Sul*, iniziarono a coltivare la soia Roundup Ready della Monsanto, nel 1998, importando clandestinamente i semi transgenici dall'Argentina. Le autorità locali e federali cercarono di fermare la coltivazione non autorizzata ma l'adozione della soia transgenica da parte degli agricoltori fu così rapida da costringere il

governo ad autorizzarne la coltivazione. Il Brasile, oggi, è il secondo produttore mondiale di soia transgenica, alla quale è dedicato circa l'85% della superficie coltivata.

Il caso della soia, specie autogama, è particolare rispetto ad altre piante, perché i semi raccolti possono essere utilizzati per la produzione degli anni successivi. Al contrario del mais, specie allogama, i cui semi, raccolti dagli ibridi, se piantati, perdono il vigore necessario a dare un buon raccolto.

Per questo motivo, Monsanto ha chiesto e ottenuto che gli agricoltori brasiliani le paghino il 2% dell'ammontare delle loro vendite a titolo di *royalties*. Si tratta, di fatto, di una tassa privata sulla produzione, in contrasto con il "farmer's right" sancito dai trattati internazionali, quali, ad esempio, la Convenzione sulla Biodiversità. Per tale motivo, 5 milioni di agricoltori brasiliani hanno chiesto alla Monsanto la restituzione delle *royalties* incassate. Il giudice di prima istanza ha dato loro ragione, ordinando alla Monsanto di rifondere le *royalties* fino ad un massimo di 2 miliardi di dollari. Monsanto ha presentato appello davanti alla corte federale, ma sta anche negoziando un compromesso con le imprese esportatrici di soia.

## 11.5. Conclusioni

La rapida diffusione della tecnologia HR non è stata accompagnata da adeguate misure di sostegno della tecnologia stessa, come è stato dimostrato dal rapido diffondersi delle infestanti resistenti al glifosato (64-67).

Il *National Environmental Research Institute* del Governo danese, ha osservato che un'appropriata gestione nell'impiego glifosato nella coltivazione della barbabietola da foraggio ha determinato un aumento della biodiversità vegetale e animale rispetto ai trattamenti convenzionali (67, 68).

Preoccupante è il rischio d'introggressione del transgene in piante correlate a causa degli effetti negativi sulla diversità genica. La pressione esercitata dall'uso massiccio del glifosato, richiederebbe l'adozione di adeguate strategie di gestione delle infestanti per garantire un futuro all'impiego di questa tecnologia (69-74) sempre che nuovi studi non mettano in discussione la sicurezza d'uso del glifosato. La comparsa d'infestanti resistenti al glifosato può portare comunque ad un maggior consumo dell'erbicida, come confermato da analisi effettuate negli USA (75).

La gestione delle infestanti potrebbe essere eseguita con una rotazione delle coltivazioni, poiché glifosato e glufosinato hanno un'attività residua molto bassa. Nel caso della soia HR si possono usare nella rotazione erba medica, trifoglio, cetrioli, mais, sorgo, piselli, peperoni, zucca e fagioli. Nel caso del mais HR oltre ai precedenti si possono usare anche soia, avena primaverile, mais dolce, tabacco, pomodori, patate bianche, orzo invernale, segale invernale e grano invernale.

Gli oppositori delle PGM sostengono che il glifosato danneggia le rese dei raccolti diminuendo i nutrienti necessari alla pianta e inducendo un aumento delle malattie nelle piante trattate creando problemi anche per gli animali che se ne nutrono (76, 77). Poiché il glifosato è in grado di complessare i cationi bivalenti (calcio, ferro, magnesio, manganese) sia nella pianta che nel suolo potrebbe verosimilmente diminuire la concentrazione di questi micronutrienti. Inoltre, persistendo nel suolo da 14 (78) a 60 giorni (79), non si può escludere che possa influenzare l'assunzione di micronutrienti da parte della pianta, anche se non ci sono prove a riguardo (80, 81). Ricercatori della *Ohio State University* pur riconoscendo che il glifosato può aumentare la severità di alcune malattie delle piante, concludono che questo aspetto sia significativamente diffuso ma non ancora scientificamente dimostrato (82-83).

Le piante infestanti competono con le piante coltivate per i nutrienti e la luce del sole, limitando così la produzione di queste ultime. Questo fatto ha portato ad un'adozione rapida delle piante HR e come conseguenza i coltivatori hanno abbandonato i buoni principi di gestione delle infestanti e dell'insorgenza della resistenza agli erbicidi. Invece di utilizzare il glifosato, come uno degli elementi di tale gestione, troppi agricoltori si avvalgono del glifosato per il controllo delle infestanti, cui è dovuta in buona parte la rapida comparsa di resistenze in tutti i continenti (84).

Un'altra conseguenza negativa, dovuta al successo delle piante resistenti al glifosato, è la diminuzione delle ricerche dedicate alla scoperta di nuovi erbicidi, il che potrebbe rendere problematica la gestione di future resistenze. L'evoluzione d'infestanti resistenti al glifosato e il movimento delle stesse nelle coltivazioni di piante HR richiederà un aumento nell'uso di altri erbicidi, anche se la velocità con cui questo fenomeno potrà compromettere l'uso del glifosato non è prevedibile (85). Un problema emergente è rappresentato anche dai ricacci di mais resistenti all'erbicida, che stanno diventando un problema nei sistemi di rotazione mais-colza (86).

L'adozione delle piante HR, per quanto detto sopra, può essere una risposta all'esigenza di controllare le infestanti, solo se la loro coltivazione è gestita con una strategia appropriata in conformità a un'agricoltura di precisione che consenta di ridurre la quantità di erbicida utilizzato e il danno ambientale dovuto all'aratura (87, 88).

Tale gestione appropriata non si è verificata negli USA come documentato da Benbrook (89). Benbrook, utilizzando i dati sul consumo degli erbicidi del *United States Department of Agriculture*, ha potuto dimostrare che tra il 1996, anno dell'introduzione della soia resistente al glifosato, e il 2006 l'uso degli erbicidi è aumentato negli USA dell'11%. I livelli di esposizione al glifosato, a causa dell'uso massiccio dello stesso, con gli alimenti, l'acqua e l'aria sono saliti negli ultimi anni negli USA (90). Anche gli effetti ambientali sono peggiorati con l'aumento nell'uso del glifosato, come il declino nelle popolazioni di farfalla monarca (91), la vitalità dei lombrichi (92) e l'efficienza nell'uso dell'acqua (93).

La comparsa delle infestanti resistenti al glifosato ha aumentato i costi di gestione delle infestanti stesse ed ha indotto gli agricoltori americani ad usare erbicidi, precedentemente abbandonati, poiché tossici per l'uomo, come l'acido 2,4 dicloro fenossiacetico (2,4 D). Tale strategia è stata adottata anche dalla Dow AgroSciences che ha presentato domanda per commercializzare una varietà di mais resistente proprio al 2,4 D (89).

L'uso in futuro del glifosato è stato messo in discussione dalla decisione dell'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) che ha inserito il glifosato stesso nella classe 2A e cioè "probabilmente cancerogeno" (94), successivamente rivista dopo un riesame *ad hoc* dell'EFSA.

## Bibliografia

1. Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. Glyphosate: a unique global herbicide. *ACS Monograph No. 189*. Washington DC: American Chemical Society; 1997. p. 617-42.
2. Penna JA, Lema D. Adoption of herbicide tolerant soybeans in Argentina: an economic analysis. In: Kalaitzandokanes N. (Ed.). *Economic and Environmental Impacts of Agrotechnology* New York: Kluwer-Plenum Press Publishers; 2003. p. 203-20.
3. Cajacob CA, Feng PC, Heck GR, Murtaza FA, Sammons RD, Padgett SR. Engineering resistance to herbicide. In: Christou P, Klee H (Ed.). *Handbook of Biotechnology*. Chichester UK: John Wiley & Sons; 2004. p. 353-72.
4. Gianessi LP. Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. *Pest Manag Sci* 2005;61(3):241-5.

5. Owen MDK. Herbicide-tolerant genetically modified crops: resistance management. In Ferry N, Gatehouse AMR (Ed.): *Environmental impact of genetically modified crops*. Wallingford UK: CABI; 2009. p. 115-64.
6. Monjardino M, Pannel DJ, Powles SB. The economic value of glyphosate-resistant canola in the management of two widespread crop weeds in Western Australian farming system. *Agric Syst* 2005;84(2):297-315.
7. Benbrook CM. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the United States: The first eight years. BioTech InfoNet, Technical Paper No 6, Nov 2003.
8. Heimlich RE, Fernandez-Cornejo J, McBride W, Klotz-Ingram JS, Jans S, Brooks N. Genetically engineered crops: has adoption reduced pesticide use? *Agric Outlook* 2000;274:13-7.
9. Shiva V. GMOs: a miracle? In: Nelson CC (Ed.). *Genetically modified organisms in agriculture: economics and politics*. London: Academic Press; 200. p. 191-6.
10. Nelson DS, Bullock GC. Simulating a relative environmental effect of glyphosate-resistant soybeans. *Ecol Econ* 2003;45(2):189-202.
11. Trewavas A, Leaver C. Is opposition to crops science or politics? An investigation into the arguments that GM crops pose a particular threat to the environment. *EMBO Reports* 2001;2(6):455-9.
12. Miller JJ, Hill BD, Chang C, Lindwall CW. Residue detections in soil and shallow groundwater after long-term herbicide applications in southern Alberta. *J Soil Sci* 1995;75(3):349-56.
13. Liphadzi KB, Al-Khatib K, Bensch CN, Stahlman PW, Dille JA, Todd TR, Rice CW, Hortak MJ, Head G. Soil microbial and nematode communities as affected by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. *Weed Sci* 2005;53(4):536-45.
14. Dunfield KE, Germida JJ. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. *FEMS Microbiol Ecol* 2001;38(1):1-9.
15. Dunfield KE, Germida JJ. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl Environ Microbiol* 2003;69(12):7310-8.
16. Dunfield KE, Germida JJ. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. *J Environ Qual* 2004;33(3):806-15.
17. Holland JM. The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agric Ecosys Environ* 2004;103: 1-25.
18. Sanyal D, Bhowmik PC, Anderson RL, Shrestha A. Revisiting the perspective and progress of weed management. *Weed Sci* 2008;56:161-7.
19. Solomon KR, Thomson DG. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J Toxicol Environ Health Part B*. 2003;6(3):289-324.
20. Tsui MT, Wang W-X, Chu LM. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Pollut* 2005;138(1):59-68.
21. Cerdeira AL, Duke SO. The current status and environmental impact of glyphosate-resistant crops: a review. *J Environ Qual* 2006;35(5):1633-58.
22. Preston C, Wakelin AM, Dolman FC, Bostaman Y, Boutsalis P. A decade of glyphosate-resistant *Lolium* around the World: mechanisms, genes, fitness, and agronomic management. *Weed Sci* 2009;57:435-41.
23. Owen MJ, Walsh MJ, Llewellyn RS; Powles S. Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual ryegrass (*Lolium rigidum*) populations. *Austr J Agric Res* 2007;58(7):511-8.
24. Grichar WJ, Besler BA, Brewer KD, Minton BW. Using soil-applied herbicides in combination with glyphosate in a glyphosate-resistant cotton herbicide program. *Crop Prot* 2004;23(10):1007-10.

25. York AC, Steward AM, Vidrine PR, Culpepper AS. Control of volunteer glyphosate-resistant cotton in glyphosate-resistant soybean. *Weed Technol* 2004;18(3):532-9.
26. VanGessel MJ. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci* 2001;49(6):703-5.
27. Owen MDK, Zelaya IA. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides In: Duke SO, Ragsdale NN. (Ed.). *Pest Management Science, Herbicide-Resistant Crops from Biotechnology: Current and Future Status*, symposium held during the 227th National American Chemical Society Meeting, Anaheim, California, USA, 28 March to 1 April, 2004. 2005; 61(3):301-11.
28. Cerdeira AL, Gazziero DLP, Duke SO, Matallo MB, Spadotto CA. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. *J Environ Sci Health Part B* 2007;42(5):539-49.
29. Vila-Aiub MM, Balbi MC, Gundel PE, Ghersa CM, Powles SB. Evolution of glyphosate-resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Sci* 2007;55(6):566-71.
30. Powles SB. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. *Pest Manag Sci* 2008;64(4):360-5.
31. Powles S, Preston C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technol* 2006;20(2):282-9.
32. Gaines TA, Zhang W, Wang D, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, Nissen SJ, Patzoldt WL, Tranel PJ, Culpepper AS, Grey TL, Webster TM, Vencill WK, Sammons RD, Jiang J, Preston C, Leach JE, Westra P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(3):1029-34.
33. Benitez Leite S, Macchi MA, Acosta M. Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos. *Pediatr (Assuncion)* 2007;34(2):111-21.
34. Acquavella JF, Bruce H, Alexander BH, Mandel JS, Gustin C, Baker B, Chapman P, Bleeke M. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure studies. *Environ Health Perspect* 2004;112(3):321-8.
35. Acquavella JF, Alexander BH, Mandel JS, Burns CJ, Gustin C. Exposure misclassification in studies of agricultural pesticides. *Epidemiology* 2006; 17(1):69-74.
36. Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini G-C. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicol* 2009;262(3):184-91.
37. Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, López SL, Carrasco AE. Glyphosate-based herbicide produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem Res Toxicol* 2010;23(10):1586-95.
38. Edginton AN, Sheridan PM, Stephenson GR, Thompson DG, Boermans HJ. Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environ Toxicol Chem* 2004;23(4):815-22.
39. Ohnesorge FK. Nutzpflanzen mit künstlicher Herbizidresistenz: Verbessert sich die Rückstandssituation? Toxikologische Aspekte. In van den Daele W, Pühler A, Sukopp H (Ed.). *Verfahren zur Technikfolgenabschätzung des Anbaus von Kulturpflanzen mit gentechnisch erzeugter Herbizidresistenz*. Berlin: WZP; 1994. p.27-82.
40. Hassan SA, Bigler F, Bogenschütz H, Boller E, Brun J, Chiverton C, Edwards P, Mansour F, Naton E, Oomen PA, Overmeier WPJ, Polgar L, Rieckman W, Samsoe-Petersen L, Stäubli A, Sterk G, Tavares K, Tuset JJ, Viggiani G, Vivas AG. Results of the fourth joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group Pesticides and Beneficial Organisms. *J Appl Entomol* 1998;105(1-5):321-9.
41. Dallegrave E, Di Giorgio Mantese F, Soares Coelho R, Pereira JD, Andrade AJ, Dalsenter PR, Langeloh A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-roundup in Wistar rats. *Toxicol Lett* 2003;142(1-2):45-52.

42. Dallegrave E, Di Giorgio Mantese F, Oliveira RT, Andrade AJM, Dalsenter PR, Langeloh. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol* 2007;81(9):665-73.
43. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Séralini GE. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 2005;113(6):716-20.
44. Banachour N, Séralini GE. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic and placental cells. *Chem Res Toxicol* 2009;22(1):97-105.
45. Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini GE. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicol* 2009;262(3):184-91.
46. Ruhland M, Engelhardt G, Pawlizki K. Distribution and metabolism of D/L-, L- and D-glufosinate in transgenic, glufosinate tolerant crops of maize (*Zea mays* L subsp *mays*) and oilseed rape (*Brassica napus* L var *napus*). *Pest Manag Sci* 2004;60(7):691-6.
47. Gallina MA, Stephenson GR. Dissipation of <sup>14</sup>C glufosinate in two Ontario soils. *J Agric Food Chem* 1992;40(4):165-8.
48. Smith AE, Belyk MG. Field persistence studies with the herbicide glufosinate-ammonium in Saskatchewan soils. *J Environ Qual* 1989;18(4): 475-9.
49. Wauchope RD, Estes TL, Allen R, Baker JL, Hornsby AG, Jones RL, Richards RP, Gustafson DI. Predicted impact of transgenic, herbicide-tolerant corn on drinking water in vulnerable watersheds of the mid-western USA. *Pest Manag Sci* 2002;58(2):146-60.
50. Gyamfi S, Pfeifer U, Stierschneider M, Sessitsch A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 2002;41(3):81-190.
51. De Snoo GR, de Jong FMW, van der Poll RJ, van der Linen MGAM: Effects of glufosinate-ammonium on crop vegetation-interim results. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* 2001; 66(2b): 731-41.
52. Ellis JM, Griffin JL. Soybean (*Glycine max*) and cotton (*Gossypium hirsutum*) response to simulated drift of glyphosate and glufosinate. *Weed Technol* 2002;16(3):580-6.
53. Fujii T, Ohata T, Horinaka M. Alterations in response to kainic acid in rats exposed to glufosinate-ammonium a herbicide, during the infantile period. *Proc Japan Acad Sci Series B* 1996;16(6):287-99.
54. Watanabe T. Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of the developing mouse embryos in culture. *Neuroscientific Lett* 1997;222(1):17-20.
55. Watanabe T, Iwase T. Development and dymorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture. *Terat Carcin Mutagen* 1996;16(6):287-99.
56. Aris A, Leblanc S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reprod Toxicol* 2001;31(4):528-33.
57. Garcia AM, Benavides FG, Fletcher T, Orts E. Paternal exposure to pesticides and congenital malformations. *Scand J Work Environ Health* 1998;24(6):473-80.
58. Madsen KH, Jensen JE. Weed control in glyphosate tolerant sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) *Weed Res* 1995;35(2):105-11.
59. Bjerregaard B, Madsen KH, Streibig JC. Herbicide resistant crops and impact of their use. Copenhagen: Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project no. 36; 1997. p.1-49.
60. Hall LM, Topinka K, Huffman J, Davis L, and Good A. Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. *Weed Sci* 2000;48(6):688-694.
61. Beckie HJ, Warwick SI, Nair H, Seguin-Swartz G. Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecol Appl* 2003;13(5): 1276-94.

62. Friesen LF, Nelson AG, van Acker RC. Evidence of contamination of pedigreed canola (*Brassica napus*) seedlots in Western Canada with genetically engineered herbicide resistance traits. *Agron J* 2003;95(5):1342-7.
63. Beckie HJ, Harker KN, Hall LM, Warwick SI, Legere A, Sikkema PH, Clayton G, Thomas AG, Leeson JY, Seguin-Swartz G, Simard MJ. A decade of herbicide-resistant crops in Canada. *Can J Plant Sci* 2006;86(4): 1243-64.
64. Mueller TC, Mitchell PD, Young BG, Culpepper AS. Proactive versus reactive management of glyphosate-resistant or -tolerant weeds. *Weed Technol.* 2005;19:924-33.
65. Johnson W, Gibson KD. Glyphosate-resistant weeds and resistance management strategies: an Indiana grower perspective. *Weed Technol.* 2006; 20:768-72.
66. Christoffoleti PJ, Galli AJB, Carvalho SJP, Moreira MS, Nicolai M, Foloni LL, Martins BAB, Ribeiro DN. Glyphosate sustainability in South American cropping systems. *Pest Manag Sci* 2008;64(4):422-7.
67. Elmegaard N, Bruus Pedersen M. Flora and fauna in Roundup tolerant fodder beet fields. *NERI Technical Report No 349* Silkeborg, Denmark: NERI; 2001. pp. 1-39
68. Strandberg B, Pedersen MB. Biodiversity in glyphosate tolerant fodder beet fields – timing of herbicide application. *NERI Technical Report No. 410*. Copenhagen: NERI; 2002. p.1-41.
69. Liebman M, Dyck E. Crop rotation and intercropping strategies for weed management. *Ecol Appl* 1993;3(1):92-122.
70. Gressel J. Crop fertility and volunteerism. London: Taylor & Francis; 2005; 422 pp.
71. Duke SO, Powles SB. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. *AgBioForum* 2009;12(3-4):346-57.
72. Ragsdale NN. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest Manag Sci* 2005;61(3):211-8.
73. Owen MDK, Zelaya IA. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag Sci* 2005;61(3):301-12.
74. Powles SB, Yu Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu Rev Plant Biol* 2010;61:317-47.
75. Sheridan C. Report blames GM crops for herbicide spike, downplays pesticide reductions. *Nature Biotechnol* 2010;28(2):112-3.
76. Zerbe L. Roundup red alert! What you need to know about the pesticide poised to “Push us all over the cliff”. *Rodale Wellness Newsletter* 2011; 3 Feb.
77. Smith J. Monsanto Roundup triggers over 40 plant diseases and endangers human and animal health. (<http://stienster.blogspot.it/2011/01/monsantos-roundup-triggers-over-40.html>; ultima consultazione 16/4/2014.
78. Zablotowicz RM, Accinelli C, Krutz LJ, Reddy KN. Soil depth and tillage effects on glyphosate degradation. *J Agric Food Chem* 2009;57(11): 4867-71.
79. Feng JC, Thompson DG. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. Persistence in foliage and soil. *J Agric Food Chem* 1990;48(4):1118-25.
80. Bott S, Tesfamariam T, Candan H, Cakmak I, Romheld V, Neumann G. Glyphosate- induced impairment of plant growth and micronutrient status in glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) *Plant Soil* 2008;312(1-2): 185-94.
81. Hartzler B. Glyphosate interactions with micronutrients and plant diseases. *Iowa State University Weed Science* 2010;[1-4]. Disponibile all'indirizzo: [www.weeds.iastate.edu/mgmt/2010/glyMndisease.pdf](http://www.weeds.iastate.edu/mgmt/2010/glyMndisease.pdf); ultima consultazione 16/12/2016.



82. Camberato J, Casteel S, Golsbrough P, Johnson B, Wise K, Woloshuk C. Glyphosate's impact on field crop production and disease development. *Purdue Extension Weed Science* 2011;[4 pp.]. Disponibile all'indirizzo: <http://www.btny.purdue.edu/weedscience/2011/glyphosatesimpact11.pdf>; ultima consultazione 16/12/2016.
83. Dorrance A. Glyphosate effects on occurrence and development of soybean diseases. In: Yost J (Ed.). *C.O.R.N. Newsletter 2001-05*.
84. Duke SO. Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction. *Pest Manag Sci* 2005;61(3):211-8.
85. Young BG. Changes in herbicide use patterns and production practices resulting from glyphosate resistant crops. *Weed Technol* 2006;20(2):301-7.
86. Krupke C, Marquardt P, Johnson W, Weller S Conley SP. Volunteer corn presents new challenges for insect resistance management. *Agron J* 2009; 101(4):797-9.
87. Bongiovanni R, Deboer JL. Precision agriculture and sustainability. *Precision Agric* 2004;5(4):359-87.
88. McBratney A, Whelan B, Ancev T, Bouma J. Future directions of precision agriculture. *Precision Agric* 2005;6(1):7-23.
89. Benbrook CM. Impacts of genetically engineered crops on pesticides use in the USA—the first sixteen years. *Environ Sci Eur* 2012; 24:24.
90. Chang F-C, Simick MF, Capel PD. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degraded aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environ Tox Chem* 2001;30(3):548-55.
91. Pleasants JM, Oberhauser KS. Milkweed loss in agricultural fields because of herbicide use: effects on the monarch butterfly population. *Insect Conserv Divers* 2013;6(2):135-44.
92. Casabé N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Gimenez R, Massaro R, Papa JC, Kesten E. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chloropyrifos in an Argentine soya field. *J Soils Sediments* 2007;7(4):232-9.
93. Zobiolo LHS, de Oliveira R, Kremer RJ, Constantin J, Bonato CM, Muniz AS. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. *Pesticide Biochem Physiol* 2010;97(3):182-93.
94. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, IARC, Lyon, France. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology* 2015;16(5):490-1.

## 12. EFFETTI SULLA COMUNITÀ BATTERICA DEL SUOLO

Nel suolo vi sono migliaia di specie di batteri, funghi, protozoi, e una varietà di micro e macrofauna. La composizione della popolazione del suolo varia in termini di tipo, numero e funzioni, a seconda della pianta coltivata e delle pratiche agronomiche associate.

La comunità batterica forma il gruppo numericamente dominante nell'ecosistema del suolo. Si stima che solo il 5% dei microorganismi del suolo sia stato identificato e che in 1 g di terreno vi siano 10.000 specie di batteri diversi. Inoltre, diversi tipi di suolo, in combinazione con fattori atmosferici, variazioni in umidità e materiale organico presente costituiscono ambienti molto eterogenei (1).

Forti differenze sono state osservate nei rapporti relativi tra diverse specie batteriche come conseguenza della coltivazione di piante differenti o di differenti cultivar della stessa pianta (2, 3). Tali osservazioni rendono particolarmente difficile la selezione dei parametri necessari per valutare se una pianta GM abbia un impatto diverso da quello delle piante non transgeniche sulle comunità batteriche del suolo.

Probabilmente, per tale motivo, a causa dei differenti metodi impiegati nello studio e per il differente comportamento delle diverse piante, le analisi condotte per la valutazione degli effetti delle piante transgeniche sulla biodiversità microbica del suolo ha dato finora risultati contrastanti (4-17). Infatti, alcuni autori non hanno osservato alcun effetto sulla frazione coltivabile dei batteri del suolo (6, 7, 9), altri hanno osservato alcuni effetti (4, 8) anche se piccoli e non persistenti se paragonati ad altre fonti naturali di variazione (18-21).

### 12.1. Flusso genico orizzontale

Con l'introduzione delle piante transgeniche in agricoltura si è ipotizzato che potesse verificarsi un possibile flusso genico orizzontale, con 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 e il DNA inserito (22), come descritto nel capitolo 7 "Geni marcatori per la resistenza agli antibiotici". 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, 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 (23-25). Gli esperimenti, finora condotti, non hanno dimostrato una trasformazione stabile nei batteri co-incubati con le piante transgeniche (26-29). Tuttavia, il ruolo del flusso genico orizzontale, nella realizzazione di una nicchia ambientale dovuta all'interazione pianta/batteri, non è chiara (30) e i metodi di laboratorio disponibili potrebbero anche portare ad una sottostima del fenomeno (31).

Il trasferimento del DNA transgenico dalla pianta ai batteri del suolo è stato osservato, solamente in condizioni molto artificiali, in laboratorio o in serra, tra sequenze omologhe e in condizioni di pressione selettiva, e nonostante ciò a bassissime frequenze (Tabella 24).

Tabella 24. Frequenza di trasformazione dovuta ai geni marcatori

Pianta trasformata e gene marcatore	Elemento ricevente	Frequenza di trasformazione	Rif.
Tabacco, <i>accl</i>	Batteri del suolo	Nessun evento	32
Patata, <i>amp</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	$<2 \times 10^{-17}$	33
Tabacco, <i>accl</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	$<6 \times 10^{-12}$	34
Barbabietola, patata, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	$>10^{-16}$	35-37
Barbabietola, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$5,4 \times 10^{-9}$	38*
Patata, colza, pomodoro, barbabietola, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	$3,5 \times 10^{-8}$	39*
Tabacco, <i>accl</i>	Suolo argilloso	Nessun evento	25
Barbabietola, <i>nptII</i>	Limo argilloso	Nessun evento	40
Barbabietola, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$<1,5 \times 10^{-9}$	41*
Tabacco, <i>nptII</i> , <i>aadA</i> , <i>aacI-IV</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	$1,6 \times 10^{-9}$	42*
Patata, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i> e <i>Pseudomonas stutzeri</i>	$1,7 \times 10^{-8}$ in presenza di sequenze omologhe; $<3 \times 10^{-12}$ in assenza	43
Tabacco, <i>aadA</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$4,1 \times 10^{-6}$ in presenza di sequenze omologhe; $<10^{-8}$ in assenza	44*
Tabacco, <i>nptII</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	$<3 \times 10^{-9}$	45*
Tabacco, <i>aadA</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$7,7 \times 10^{-4}$	46*
Patata, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$10^{-8}$	47
Barbabietola, <i>nptII</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	$10^{-9}$	48
Sei tipi di piante, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$10^{-8}$ in presenza di sequenze omologhe; nessun evento in assenza	49
Mais, <i>bla</i>	Batteri del suolo	Nessun evento	50
Tabacco, <i>aadA</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$6 \times 10^{-9}$ in presenza di sequenze omologhe; $<1,3 \times 10^{-10}$ in assenza	51
Patata e papaia, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$1,4 \times 10^{-4}$ in presenza di sequenze omologhe; $<6 \times 10^{-10}$ in assenza	52
Tabacco, <i>aadA</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$2,5 \times 10^{-9}$	53*
<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>nptII</i> , GFP	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$3 \times 10^{-8}$ in microcosmo sterile; $2,5 \times 10^{-11}$ in microcosmo non sterile	54*
Papaia, <i>nptII</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$<10^{-10}$ sia in presenza che in assenza di sequenze omologhe	55
Mais, <i>bla</i>	Batteri del suolo	Nessun evento	56
Mais, <i>bla</i>	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$1 \times 10^{-9}$	57*
Tabacco, <i>aadA</i> e GFP	<i>Acinetobacter baylyi</i>	$1 \times 10^{-9}$ sulle foglie	31

\*In questi esperimenti era presente una sequenza omologa nel batterio ricevente.

I valori riportati nella tabella indicano il numero dei batteri trasformati ottenuti rispetto al numero totale di batteri presenti nell'esperimento. Tuttavia, tali numeri devono essere considerati delle stime grossolane poiché non in tutti gli esperimenti i dati sono normalizzati ad un periodo standard di trasformazione. La funzione dei geni utilizzati in questi esperimenti è descritta in Tabella 12.

Le cellule di *Acinetobacter* sp. contenenti una copia difettiva del gene per la resistenza alla neomicina (*nptII*), con 10 o 317 coppie di basi delete, erano capaci di incorporare il DNA di varie piante transgeniche contenenti il gene *nptII* intatto, ripristinando la resistenza alla

neomicina, ma comunque a frequenze basse (38, 44). Tuttavia, se il ceppo batterico ricevente era privo di sequenze omologhe a quelle presenti nei geni inseriti nella pianta transgenica, non si osservava alcuna incorporazione di DNA (37, 41, 44). Anche usando i candidati più probabili per il trasferimento genico orizzontale e cioè i geni batterici per la resistenza agli antibiotici, seppure in condizioni artificiali atte a favorire il fenomeno, gli eventi osservati sono veramente rari. Questi esperimenti sono stati disegnati specificatamente per misurare il flusso genico, utilizzando DNA purificato e un ceppo di *Acinetobacter* altamente trasformabile; tale competenza, alla trasformazione, non si mantiene nel suolo (54).

In conformità con queste osservazioni, alcuni autori hanno sostenuto che, essendo l'evento di trasformazione così raro nelle condizioni naturali del suolo, il fenomeno del flusso genico orizzontale è irrilevante ai fini della valutazione del rischio posto dalle piante transgeniche (33, 37, 50, 58). Infatti, perfino nel caso di un simbiote strettamente associato alle radici della pianta, nella soia resistente all'erbicide non si osservava alcun passaggio o del promotore 35S, o dei geni *T-nos* ed *EPSPS* al simbiote *Rhizobium leguminosarum* (49).

Altri autori, non condividendo queste conclusioni, sostengono che i metodi attuali non hanno la sensibilità per monitorare degli eventi rari e che i batteri trasformati dall'acquisizione di un transgene possono richiedere anni prima di poter competere con i ceppi selvaggi in modo tale da poter essere determinati (59); d'altra parte è noto che il DNA rilasciato dalle piante nel terreno è degradato molto rapidamente, e solo una piccola quota può persistere per anni (60-63). La stessa ipotesi è stata formulata anche da altri autori che, sulla base dei risultati, stimano che la frequenza di trasferimento di un transgene da una pianta ad un batterio ricevente sia un trilione di volte più bassa di quelle misurate sperimentalmente in laboratorio e che quindi gli attuali metodi di monitoraggio non abbiano la sensibilità sufficiente a valutare il flusso genico orizzontale (64). Questi autori, assumendo che la frequenza del flusso genico orizzontale sia di  $10^{-17}$  e che sulla superficie del suolo vi siano  $5 \times 10^{28}$  batteri (65), hanno calcolato la presenza di 40 ricombinanti per ettaro, pari a 280 milioni di ricombinanti sull'intera superficie coltivata con piante transgeniche (66). Per identificare un singolo ricombinante, tenuto conto che solo l'1% dei batteri del suolo è coltivabile in laboratorio, il campione di suolo da analizzare sarebbe di 3 tonnellate. Tale analisi sarebbe irrealizzabile, e comunque è da considerare che i geni di resistenza agli antibiotici sono ubiquitari e trasferiti con meccanismi che consentono il trasferimento orizzontale tra specie batteriche differenti (67-69). I geni rilasciati dalle piante transgeniche si trovano perciò a competere con i batteri del suolo che sono la miglior sorgente di diversità e di abbondanza di geni per la resistenza agli antibiotici (70). Infatti, altri autori hanno isolato 480 specie microbiche dal suolo e le hanno analizzate tutte per la resistenza a 21 antibiotici, alcuni in uso da molto tempo, altri d'introduzione recente in terapia. Ogni ceppo si è rivelato essere resistente a più antibiotici da un minimo di 7 ad un massimo di 20. I batteri del suolo non solo hanno meccanismi sofisticati per proteggersi dagli antibiotici, ma sono anche in grado di produrli visto che dai batteri del suolo sono stati ottenuti il cloramfenicolo, l'acido clavulanico, l'eritromicina, la gentamicina, la rifampicina, la tetraciclina, la teicoplanina e la vancomicina.

## 12.2. Conclusioni

È importante, per inquadrare nella giusta prospettiva il problema del flusso genico orizzontale, considerare la quantità di DNA non transgenico rilasciato nell'ambiente. Pollini, foglie, frutta, detriti vegetali, per lisi cellulare, decomposizione dopo la maturazione fisiologica della pianta, degradazione enzimatica dovuta all'attacco di patogeni e deiezioni animali con DNA non completamente digerito, rilasciano nell'ambiente migliaia di tonnellate di DNA ogni

anno (71). La concentrazione nel suolo varia da 5 a 35 µg/g di suolo peso secco (72). Una rassegna recente ha reso evidente come la concimazione con il letame sia la via principale di rilascio di batteri resistenti agli antibiotici nell'ambiente; letame che, in varie parti del mondo, ha una concentrazione media di antibiotici intorno a 50 mg/kg (73). Una volta somministrati, dal 30 al 90% degli antibiotici, usati in medicina veterinaria, vengono escreti nel letame (74). Questa fonte cronica di contaminazione ambientale dà un contributo tale alla diffusione dell'antibiotico resistenza da soverchiare ogni possibile effetto delle piante transgeniche. Il contributo dell'Italia a questa fonte di contaminazione ambientale è comunque più basso di quello dei Paesi del Nord Europa (75).

La competizione del DNA transgenico si deve confrontare con questa situazione e con la diluizione che il gene marcatore subisce nell'inserimento nel genoma nucleare della pianta transgenica. Inoltre, le sequenze transgeniche sono trasferibili solo ad un numero limitato di batteri, capaci di sviluppare uno stadio di competenza e che tollerano il DNA estraneo (53, 72, 76). Nel suolo, i passaggi per il trasferimento del DNA dalla pianta al batterio ricevente sono costituiti da una serie di barriere selettive e vincolanti (77, 78). Vi è, d'altra parte, nell'ambiente un insieme significativo di geni, che impartiscono la resistenza agli antibiotici cui sono esposti batteri dotati di un enorme plasticità del genoma, per cui il rischio di un flusso genico orizzontale sembra irrilevante (79-81). Un evento di flusso genico orizzontale non ha alcuna conseguenza, salvo che non vi sia nell'ambiente circostante una pressione selettiva dovuta alla presenza di un antibiotico (82).

La possibilità del trasferimento di un gene dalla pianta alla comunità batterica del suolo dipende sia dal numero di copie del gene che dalla capacità del batterio di assimilare sequenze di DNA esogeno (competenza), sia dalla presenza nel batterio di sequenze omologhe a quelle del DNA esogeno. Sebbene il DNA possa persistere nel terreno per lunghi periodi, resta biologicamente attivo per poche ore o al massimo qualche giorno e pochi batteri del suolo sono nelle condizioni fisiologiche tali da poter assumere frammenti di DNA dall'ambiente circostante. Tale evento si stima essere  $10^{14}$  volte minore del naturale flusso genico tra batteri del suolo (83). A questo proposito valgono le stesse considerazioni fatte per l'assunzione del DNA esogeno da parte dei batteri intestinali nel capitolo 7.

Il fatto che il flusso genico orizzontale da pianta transgenica a batterio non dia a quest'ultimo alcun vantaggio selettivo, rispetto a quanto già disponibile in natura ma, anzi, possa costituire un peso dal punto di vista metabolico (84-86), e la rarità del verificarsi di un tale evento, rendono trascurabile il rischio per l'ambiente di questo fenomeno (87, 88).

## Bibliografia

1. Torsvik V, Goksoyr J, Daae F. High diversity in DNA in soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1990;56(3):782-7.
2. Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 1998;30(3):369-78.
3. Siciliano SD, Theoret CM, de Freitas JR, Hucl PJ, Germida JJ. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can J Microbiol* 1998;44(9):844-51.
4. Siciliano SD, Germida JJ. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiol Ecol* 1999;29(3):263-72.
5. O'Callaghan M, Glare TR. Impacts of transgenic plants and micro-organisms on soil biota. *New Zealand Plant Protection* 2001;54(1):105-10.

6. Lottmann J, Berg G. Phenotypic and genotypic characterization of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non transgenic potato plants. *Microbiol Res* 2001;156(1):75-82.
7. Schmalenberger A, Tebbe CC. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic herbicide-resistant maize (*Zea mais*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiol Ecol* 2002;40(1):29-37.
8. Tesfaye M, Dufault NS, Dornbusch MR, Allan DL, Vance CP, Samac DA. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. *Soil Biol Biochem* 2003;35(8):1103-13.
9. Wu WX, YE QF, Min H, Duan XJ, Jin WM. Bt-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatases activities in a flooded paddy soil. *Soil Biol Biochem* 2004;36(2):289-95.
10. Blackwood CB, Buyer JS. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. *J Environ Qual* 2004; 33(3): 832-6.
11. Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch ANE, Scrimgeour C, Andersen MN, Cortet J, Messean A, Sausse C, Lacroix B, Krogh PH. A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant Soil* 2005;275(1/2):135-46.
12. Griffiths BS, Caul S, Thompson J, Birch ANE, Scrimgeour C, Cortet J, Foggo A, Hackett CA, Krogh PH. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. *J Environ Qual* 2006; 35(3):734-41.
13. Lupwayi NZ, Hanson KG, Harker KN, Clayton GW, Blackshaw RE, O'Donovan JT, Johnson EN, Gan Y, Irvine RB, Monreal MA. Soil microbial biomass, functional diversity and enzyme activity in glyphosate-resistant wheat-canola rotations under low-disturbance direct seeding and conventional tillage. *Soil Biol Biochem* 2007;39(7):1418-27.
14. Devare M, Londoño-R LM, Thies JE. Neither transgenic Bt maize (MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: a 3-year field analysis. *Soil Biol Biochem* 2007;39(8):2038-47.
15. Oliveira AP, Pampulha ME, Bennet IP. A two-year field study with transgenic *Bacillus thuringiensis* maize: effects on soil microorganisms. *Sci Total Environ* 2008;405(1/3):351-7.
16. Mocali S, Castaldini M, Fabiani A, Marcucci A, Pagliai M, Benedetti A. Impact of different transgenic Bt corn varieties on microorganisms and soil quality. In: Dazzi C, Costantini E (Ed.). *The soils of tomorrow: soils changing in a changing world. Advances in Geoecology* 2008;39:569-80.
17. Riglietti A, Ruggiero P, Crecchio C. Investigating the influence of transgenic tobacco plants codifying a protease inhibitor on soil microbial community. *Soil Biol Biochem* 2008;40(12):2928-36.
18. Kowalchuck GA, Bruinsma M, van Veen JA. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. *Trends Ecol Evol* 2003;18(8):403-10.
19. Bruinsma M, Kowalchuck GA, van Veen JA. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biol Fertil Soil* 2003;37(6):329-37.
20. Dunfield KE, Germida JJ. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl Environ Microbiol* 2003;69(12):7310-18.
21. Heuer H, Kroppenstedt RM, Lottmann J, Berg G, Smalla K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(3):1325-35.
22. Sheu CeShing, Wu ChungYi, Chen ShuChuan, Lo ChiChu. Extraction of DNA from soil for analysis of bacterial diversity in transgenic and nontransgenic papaya sites. *J Agric Food Chem* 2008;56(24):11969-75.

23. Logan P. A review of gene transfer from genetically-modified micro-organisms. *Health & safety executive research report*. Merseyside, UK: HSE; 1999.
24. Widmer F, Seidler RJ, Donegan KK, Reed GL. Quantification of transgenic marker gene persistence in the field. *Mol Ecol* 1997;6(1):1-7.
25. Paget E, Lebrun M, Freyssinet G, Simonet P. The fate of recombinant plant DNA in soil. *Europ J Soil Biol* 1998;34(2):81-8.
26. Pietramellara G, Ceccherini MT, Ascher J, Nannipieri P. Persistence of transgenic and not transgenic extracellular DNA in soil and bacterial transformation. *Rivista di Biologia* 2006;99(1):37-68.
27. Nielsen KM, Bones AM, Smalla K, van Elsas JD. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event? *FEMS Microbiol Rev* 1998;22(2):79-103.
28. Droge M, Puhler A, Selbitschka W. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *J. Biotechnol.* 1998;64(1): 75-90.
29. Ray JL, Nielsen KM. Experimental methods for assaying natural transformation and inferring horizontal gene transfer. *Methods Enzymol* 2005;395:491-520.
30. van Elsas JD, Turner S, Bailey MJ. Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytol* 2003;157(3):525-37.
31. Rizzi A, Pontiroli A, Brusetti L, Borin S, Sorlini C, Abruzzese A, Sacchi GA, Vogel TM, Simonet P, Bazzicalupo M, Nielsen KM, Monier JM, Daffonchio D. Strategy for in situ detection of natural transformation-based horizontal gene transfer events. *App Environ Microbiol* 2008;74(4):1250-4.
32. Becker J, Siegert H, Logemann J, Schell J. Begleitende Sicherheitsforschung zur freisetzung gentechnisch veränderter Petunien. In: Bundesministerium für Forschung und Technologie (Ed.) *Biologische Sicherheit*. Berlin: BFT; 1994. p. 563-8.
33. Schlüter K, Fütterer J, Potrykus I. Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs – if at all – at an extremely low frequency. *Nature Biotechnol* 1995;13(10):1094-8.
34. Broer I, Dröge-Laser W, Gerke M. Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to *Agrobacteria*. In: Schmidt ER, Hankeln T (Ed.). *Transgenic organisms and biosafety, horizontal gene transfer, stability of DNA and expression of transgenes*. Heidelberg: Springer Verlag; 1996. p. 67-70.
35. Nielsen KM, van Weerelt MDM, Berg TN, Bones AM, Hagler AN, van Elsas JD. Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosm. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(5):1945-52.
36. Nielsen KM, Bones AM, van Elsas JD. Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosm. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(10):3972-7.
37. Nielsen KM, Gebhardt F, Smalla K, Bons AM, van Elsas JD. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413, *Theor App Genet* 1997;95(5/6):815-21.
38. Gebhardt F, Smalla K. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(4):1550-4.
39. De Vries J, Wackernagel W. Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol Gen Genet* 1998;257(6):606-13.
40. Gebhardt F, Smalla K. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol Ecol* 1999;28(3):261-72.
41. Nielsen KM, van Elsas JD, Smalla K. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFGΔ*nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin selection transformants. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(3):1237-42.

42. Bertolla F, Pepin R, Passelegue-Robe E, Paget E, Simkin A, Nesme X, Simonet P. Plant genome complexity may be a factor limiting in situ the transfer of transgenic plant genes to the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(9):4161-7.
43. de Vries J, Meier P, Wackernagel W. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol Lett* 2001;195(2):211-5.
44. Kay E, Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simonet P. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(7):3345-51.
45. Khrazami M, Hammes WP, Hertel C. Construction of a marker rescue system in *Bacillus subtilis* for detection of horizontal gene transfer in food. *Syst Appl Microbiol* 2002;25(4):471-4.
46. Ceccherini MT, Pote J, Kay E, Van VT, Marechal J, Pietramellara G, Nanimpieri P, Vogel TM, Simonet P. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(4):673-8.
47. De Vries J, Meier P, Herms K, Wackernagel W. Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of *Acinetobacter* sp. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(8):4455-62.
48. Meier P, Wackernagel W. Monitoring the spread of recombinant DNA from field plots with transgenic sugar beet plants by PCR and natural transformation of *Pseudomonas stutzeri*. *Transgenic Res* 2003;12(3):293-304.
49. Tepfer D, Garcia-Gonzales R, Mansouri H, Seruga M, Message B, Leach F, Perica MC. Homology-dependent DNA transfer from plants to a soil bacterium under laboratory conditions: implications in evolution and horizontal gene transfer. *Transgenic Res* 2003;12(4):425-37.
50. Badosa E, Moreno C, Montesinos E. Lack of detection of ampicillin resistance gene transfer from Bt176 transgenic corn to culturable bacteria under field conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 2003;48(2):169-78.
51. De Vries J, Herzfeld T, Wackernagel W. Transfer of plastid DNA from tobacco to the soil bacterium *Acinetobacter* sp. by natural transformation. *Mol Microbiol* 2004;53(1):323-34.
52. Iwaki M, Arakawa Y. Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 with DNA from commercially available genetically modified potato and papaya. *Lett Appl Microbiol* 2006;43(2):215-21.
53. Monier J-M, Bernillon D, Kay E, Faugier A, Rybalka O, Dessaux Y, Simonet P, Vogel TM. Detection of potential transgenic plant recipients among soil bacteria. *Environ Biosafety Res* 2007;6(1/2):71-83.
54. Simpson DJ, Fry JC, Rogers HJ, Day MJ. Transformation of *Acinetobacter bayly* in non-sterile soil using recombinant plant nuclear DNA. *Env Biosafety Res* 2007;6(1-2):101-12.
55. Lo C-C, Chen S-C, Yang J-Z. Use of real-time polymerase chain reaction (PCR) and transformation assay to monitor the persistence and bioavailability of transgenic genes released from genetically modified papaya expressing *nptII* and PRSV genes in the soil. *J Agric Food Chem* 2007;55(18):7534-40.
56. Demanèche S, Sanguin H, Poté J, Navarro E, Bernillon D, Mavingui P, Wildi W, Vogel TM, Simonet P. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(10):3957-62.
57. Rizzi A, Brusetti L, Arioli S, Nielsen KM, Tamagnini I, Tamburini A, Sorlini C, Daffonchio D. Detection of feed-derived maize DNA in goat milk and evaluation of the potential of horizontal transfer to bacteria. *Eur Food Res Technol* 2008;227(6):1699-709.
58. Conner AJ, Glare TR, Nap J-P. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J* 2003;33(1):19-46.



59. Kim YT, Park BK, Hwang EI. Investigation of possible gene transfer to soil microorganisms for environmental risk assessment of genetically modified organisms. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14(3):498-502.
60. Hay I, Morency MJ, Seguin A. Assessing the persistence of DNA in decomposing leaves of genetically modified poplar trees. *Canadian J Forest Res* 2002;32(6):977-82.
61. Cai Peng, Huang QiaoYun, Zhang XueWen, Chen Hao. Binding and transformation of extracellular DNA in soil. *Pedosphere* 2005;15(1):16-23.
62. Sheu CeShing, Wu ChungYi, Chen ShuChuan, Lo ChiChu. Extraction of DNA from soil for analysis of bacterial diversity in transgenic and nontransgenic papaya sites. *J Agric Food Chem* 2008;56(24):11969-75.
63. Bonadei M, Balestrazzi A, Frigerio B, Carbonera D. Soil persistence of DNA from transgenic poplar. *Environ Biosafety Res* 2009;8(2):79-86.
64. Pontiroli A, Ceccherini MT, Poté J, Wildi W, Kay E, Nannipieri P, Vogel TM, Simonet P, Monier JM. Long-term persistence and bacterial transformation potential of transplastomic plant DNA in soil. *Res Microbiol* 2010;161(5):326-34.
65. Nielsen KM, Townsend JP. Monitoring and modeling horizontal gene transfer. *Nature Biotechnol* 2004;22(9):1110-4.
66. Heinemann JA, Traavik T. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotechnol* 2004;22(9):1105-9.
67. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(12):6578-83.
68. Yin X, Stotzky G. Gene transfer among bacteria in natural environments. *Adv Appl Microbiol* 1997;45(1):153-212.
69. Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 1999;42(2):73-91.
70. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 2006;311(5759):374-7.
71. Dale PJ, Clarke B, Fontes EMG. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnol* 2002;20(6):567-74.
72. van Overbeek L, Ray J, van Elsas JD. Assessment of transformability of bacteria associated with tomato and potato plants. *Environ Biosafety Res* 2007;6(1/2):85-9.
73. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opinion Microbiol* 2011; 14(3):236-43.
74. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 2006;65(5):725-9.
75. de la Torre A, Iglesias I, Carballo M, Ramires P, Muñoz MJ. An approach for mapping the vulnerability of European Union soils to antibiotic contamination. *Sci Total Environ* 2012;414:672-9.
76. Brusetti L, Rizzi A, Abruzzese A, Sacchi GA, Ragg E, Bazzicalupo M, Sorlini C, Daffonchio D. Effects of rhizodeposition of non-transgenic and transplastomic tobaccos on the soil bacterial community. *Environ Biosafety Res* 2008;7(1):11-24.
77. Bertolla F, Simonet P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfer between transgenic plants and microorganisms. *Res Microbiol* 1999;150(6):375-84.
78. Gulden RH, Lerat S, Blackshaw RE, Powell JR, Levy-Booth DJ, Dunfield KE, Trevors JT, Pauls KP, Klironomos JN, Swanton CJ. Factors affecting the presence and persistence of plant DNA in the soil environment in corn and soybean rotations. *Weed Sci* 2008;56(5):767-74.

79. de Vries J, Wackernagel W. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant Soil* 2004;266(1/2):91-104.
80. Heuer H, Smalla K. Horizontal gene transfer between bacteria. *Environ Biosafety Res* 2007;6(1/2):3-13.
81. Levy SB. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In Chadwick DJ, Goode J (Ed.). *CIBA Foundation Symposium 207 – Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread*. London: John Wiley & Sons; 1997. p. 1-9.
82. Glick BR. Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv* 1995; 13(2): 247-61.
83. Brigulla M, Wackernagel W. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issue. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;6(4):1027-41.
84. Kowalchuck GA, Bruinsma M, van Veen JA. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. *Trends Ecol Evol* 2003;18(8):403-10.
85. Kim YT, Park BK, Hwang EI, Yim NR, Kang TH, Lee SH, Kim SU. Investigation of possible gene transfer to soil microorganisms for environmental risk assessment of genetically modified organisms. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14(3):498-502.
86. Maa BL, Blackshaw RE, Roy J, He T. Investigation on gene transfer from genetically modified corn (*Zea mays* L.) plants to soil bacteria. *J Environ Sci Health Part B* 2011;46(7):590-9.
87. Keese P. Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environ Biosafety Res* 2008;7(3):123-49.
88. EFSA. Consolidated presentation of the joint scientific opinion of the GMO and BIOHAZ panels on the “Use of Antibiotic Resistance Genes as Marker Genes in Genetically Modified Plants” and the scientific opinion of the GMO Panel on “Consequences of the Opinion on the use of Antibiotic Resistance Genes in genetically Modified Plants on previous EFSA Assessment of Individual GM Plants” *EFSA J* 2009;1108:1-8.

### 13. PIANTE RESISTENTI AI VIRUS

Le malattie virali sono un fattore limitante importante nella produzione agricola, anche perché i viaggi internazionali, la spedizione di germoplasma vegetale, il commercio dei materiali vegetali stessi e l'eliminazione di molte barriere doganali, aumentano il rischio di introdurre nuovi virus, con i loro vettori, nei sistemi di produzione. Negli ultimi vent'anni sono stati identificati nuovi virus, virus emergenti o virus riemergenti a causa di cambiamenti nelle pratiche agronomiche. Importanti virus emergenti, in Europa, sono, secondo il sito della *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO, <http://www.eppo.org>), l'*Irish Yellow Spot Tosspovirus* (IYST, virus irlandese della macchia gialla trasmesso dai tripidi e trovato in Italia nelle coltivazioni di cipolle) e tre virus del pomodoro il *Pepino Mosaic Virus* (PepMV, virus del mosaico del pepino) trasmesso meccanicamente per contatto, il *Tomato apical stunt pospiviroid* (ToASP, virus dell'accorciamento degli internodi del pomodoro) trasmesso dalle api solitarie e il *Tomato torrado virus* (ToTV, virus delle bruciature del pomodoro) trasmesso dalla mosca bianca *Bemisia tabaci* e dalla mosca bianca delle serre *Trialeurodes vaporariorum*.

Il controllo delle malattie virali si attua mediante programmi di miglioramento genetico classico, l'impiego di strategie preventive basate su materiali vegetali di propagazione virus esenti, l'eliminazione dei vettori dalle colture, i sistemi di sorveglianza sul territorio e sulle importazioni. Oggi questi sistemi devono fronteggiare anche gli effetti che le variazioni climatiche inducono sulla diffusione dei virus.

Le malattie virali possono avere un impatto devastante sulla qualità e sulla quantità ottenibile di prodotti vegetali, per cui uno degli obiettivi più antichi del miglioramento delle piante è stato quello di incorporare geni per la resistenza ai virus mediante incroci tra varietà sensibili e varietà resistenti ai virus. Vi sono, però, molti casi nei quali non vi sono geni naturali di resistenza (1-3), il che ha indotto una ricerca attiva su nuovi metodi biotecnologici per "vaccinare le piante". L'introduzione della resistenza si può ottenere, in laboratorio, mediante l'espressione nella pianta di proteine del virus, come le proteine di movimento (MP), le proteine del capsido virale (CP) che interferiscono con la replicazione del virus, ma anche mediante l'espressione di RNA virale che induce fenomeni di silenziamento genico (3).

I virus delle piante (fitovirus) prendono, in genere, il nome dalla pianta sulla quale sono stati osservati per la prima volta e dal tipo di sintomi osservati (4). La tassonomia dei fitovirus, accettata a livello internazionale, non è perciò basata su un nome latino, come per gli altri organismi viventi, ma sull'inglese colloquiale (*International Committee on the Taxonomy of Viruses*). Questo fatto può generare confusione perché lo stesso virus, come il virus del mosaico del cetriolo, *Cucumber mosaic virus* (CMV), può infettare un migliaio di specie vegetali diverse tra loro. La trasmissione dei virus vegetali può avvenire tramite i semi e il polline, per azione meccanica in seguito alla propagazione vegetativa di tessuti infetti o al rilascio di linfa, oppure per azione di vettori, come nematodi, acari, altri insetti o funghi. In alcuni casi è quindi possibile controllare l'infezione virale mediante l'uso d'insetticidi. In campo aperto, un virus è trasmesso da un solo vettore specifico. Ad esempio, virus appartenenti alla stessa famiglia Potyviridae sono trasmessi da vettori differenti senza alcuna relazione tra loro: il virus Y della patata (genere *Potyvirus*, PVY) è trasmesso da diverse specie di acari; il virus del mosaico del loglio (genere *Rymovirus*) è trasmesso dall'acaro *Aceria tulipae*; il virus del mosaico giallo dell'orzo (genere *Bymovirus*) è trasmesso dal fungo *Polymyxa graminis* (4). L'alta specificità di questa relazione virus-vettore è dovuta all'interazione tra proteine specifiche, codificate dal vettore, e recettori specifici codificati dal virus (5-7).

I virus vegetali sono relativamente semplici essendo costituiti da un capsido che avvolge il genoma a base di DNA o RNA, a doppia o a singola elica, con una prevalenza dei virus a RNA, che sono circa il 70% del totale. Molti virus vegetali hanno un'origine ancestrale comune, come ad esempio il CMV, il virus del mosaico del tabacco, *Tobacco mosaic virus* (TMV), e il virus delle chiazze clorotiche del fagiolo, *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) (8). Nonostante l'origine comune, dimostrata da un'identica organizzazione del genoma e dagli elementi conservati nelle proteine di replicazione, questi virus differiscono enormemente nel numero delle piante ospiti; CMV infetta circa un migliaio di piante, TMV ne infetta un centinaio, mentre CCMV ne infetta solo alcune. Questo fatto suggerisce la possibilità che la selezione di nuovi membri della clade sia dovuta al ciclo infettivo ospite-virus (8).

In alcune infezioni virali si trova un RNA extragenomico, detto satellite, che è un parassita molecolare del virus (*helper*) cui è associato, e del quale sfrutta gli enzimi per la propria riproduzione (9). In generale, gli RNA satellite sono piccoli e non hanno omologia di sequenza con il virus associato. Alcuni gruppi di ricerca hanno dimostrato che l'RNA satellite può conferire resistenza all'infezione virale vera e propria (10-13). In questo caso l'RNA satellite si replica ad alti livelli, mentre il virus si replica a livelli molto inferiori al normale, senza causare effetti patologici nella pianta. Sfortunatamente, alcuni RNA satelliti, che sono in grado di proteggere molte specie vegetali, inducono una necrosi letale nel pomodoro e in alcune specie associate di *Lycopersicon*.

L'adozione delle tecnologie transgeniche come strategia antivirale è anche dovuta al fatto che, in molti casi, non è disponibile per una data pianta un gene di resistenza per un dato virus e al fatto che l'80% dei geni di resistenza ai virus, esistenti in natura, sono monogenici e solo la metà di questi sono basati su alleli dominanti (14). I geni rimanenti sono difficili da introdurre nelle piante, con la selezione e l'incrocio, a causa di complessi meccanismi di ereditarietà. Anche quando si sono ottenuti risultati significativi, in fase di sviluppo, la coltivazione successiva in campo aperto può essere danneggiata dalla comparsa di ceppi virali capaci di superare la resistenza (15).

## 13.1. Sperimentazione italiana con il CARNA-5

Nel 1988, le coltivazioni di pomodoro, in Puglia e Basilicata sono state quasi completamente distrutte da un'epidemia dovuta al CMV (16-18). Il danno economico è stato aggravato dall'abbandono da parte degli agricoltori della coltivazione tradizionale del pomodoro "San Marzano" e dalla necessità dell'industria tradizionale di trasformarsi per approvvigionarsi sui mercati più lontani. Questi problemi hanno indotto a cercare soluzioni per controllare il fenomeno e rivitalizzare un settore industriale molto importante.

All'azione del solo CMV è associata la malattia del pomodoro nota come "necrosi del frutto" presente in Campania dal 1988 (19). Una seconda malattia, nota come "necrosi letale" è comparsa per la prima volta in Alsazia nel 1974 (20), dovuta alla presenza del CARNA-5 nel CMV (21), come confermato nell'epidemia italiana del 1988 (16-18). La diffusione del virus CMV in natura è assicurata dagli afidi che, alimentandosi, contaminano la parte distale dello stiletto e possono trasferire il virus da una pianta malata ad una sana. La capacità di CMV di infettare un migliaio di piante diverse assicura un serbatoio naturale, costantemente presente sulle piante coltivate e sulle infestanti.

Il virus CMV è composto da un involucro proteico, il capsido, costituito da 180 subunità di uno stesso monomero proteico. Il capsido contiene 3 molecole di RNA a singola elica, RNA1, RNA2, RNA3, dalla cui presenza dipende l'infettività, e una piccola molecola di RNA subgenomico RNA4. Alcuni ceppi di CMV contengono un piccolo RNA extragenomico,

conosciuto come CARNA-5 (da *CMV-Associated RNA-5*). È un RNA satellite, di dimensioni variabili da 330 a 390 nucleotidi, totalmente dipendente dal CMV per la sua replicazione. CARNA-5 ha un importante ruolo biologico, essendo capace di modulare i sintomi indotti da CMV, sia attenuandoli sia aggravandoli (22). Infatti, esistono due tipi di CARNA-5 uno “necrotizzante” e uno “non necrotizzante”, incapace di indurre necrosi nella pianta. Studi comparativi hanno dimostrato che le varietà necrogeniche differiscono dalle varietà non necrogeniche per la presenza di una sequenza conservata di circa 30 nucleotidi all'estremità 3' terminale, noto come dominio, o determinante, necrogenico (23, 24). Una singola mutazione puntiforme può trasformare un RNA satellite non necrotizzante in uno necrotizzante. Le replicasi dei fitovirus non hanno capacità di correggere l'errore, è quindi ragionevole assumere che nel corso della replicazione dello RNA satellite non necrotizzante siano generate molecole potenzialmente necrotizzanti. L'assenza di correzione di possibili errori nell'inserimento delle basi, conferisce ai fitovirus una grande plasticità e la capacità di divergere con una frequenza di mutazione dell'ordine di  $1 \times 10^{-4}$  per ciclo di replicazione (5, 25, 26).

In Spagna, alla presenza di un'epidemia dovuta al CMV, si è osservato un accumulo di mutazioni dello RNA satellite, associato all'infezione naturale di CMV (27). Tale accumulo di mutazioni negli RNA satelliti, che si riscontra nelle infezioni, è dovuta sia alle mutazioni puntiformi sia alla ricombinazione (28, 29). Tuttavia, il mantenimento di alcune strutture molecolari funzionali è un vincolo (selezione negativa) all'evoluzione di tali varianti dello RNA satellite (30). Infatti, l'allineamento delle sequenze degli RNA satellite ha dimostrato che il dominio benigno differisce dal dominio necrotizzante per 12 nucleotidi su 30 (31, 32). L'acquisizione delle proprietà necrotizzanti da parte di un RNA satellite è, perciò, subordinata ad un accumulo di mutazioni in questi nucleotidi e al mantenimento della fittezza da parte del satellite nel passaggio da una pianta ospite ad un'altra. A tale proposito, è stato osservato che le varianti di CARNA-5, che provocano la necrosi nel pomodoro, non lo fanno in piante appartenenti alla stessa famiglia (peperoni e tabacco) od ad altre famiglie botaniche (33). In Italia, la maggior parte degli isolati di CARNA-5, ottenuti da pomodoro, tabacco, sedano e peperone, contiene il dominio necrotizzante (24).

In genere, se i semi sono stati protetti dall'infezione, il pomodoro sarà sano dato che il virus non si trasmette con i semi. È molto più difficile proteggere le piante durante la coltivazione. Per raggiungere quest'obiettivo, le piante di pomodoro sono state trasformate per produrre una variante benigna di CARNA-5, che con la sua presenza sopprime, in modo competitivo, la replica del virus, modula l'espressione dei sintomi e riduce perciò i danni (34). In questo modo la pianta resiste all'infezione di ceppi virulenti di CMV e necrotici di CARNA-5. Questo approccio ha comunque dimostrato che il pomodoro transgenico presenta una riduzione significativa dell'infezione e un incremento della resa del 50% (35-38).

Per le ragioni sopra esposte, è molto difficile valutare *a priori* il comportamento in campo aperto di un RNA satellite. Tale difficoltà indusse il Comitato Interministeriale per la Valutazione delle Biotecnologie a chiedere, ai sensi del Decreto legislativo 3 marzo 1993 n.92, al Comitato Scientifico per i Rischi Derivanti dall'Impiego di Agenti Biologici (oggi Comitato Nazionale per La Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita) di programmare e monitorare l'esperimento di rilascio deliberato di piante di pomodoro San Marzano, trasformate con il cDNA di CARNA-5, per valutare la resistenza all'infezione di CMV delle piante stesse. Il piano di sperimentazione, predisposto da Benvenuto E, Martelli GP e Quacquarelli A, è stato condiviso con la Commissione Europea e le autorità competenti degli Stati Membri (39). Vi era la preoccupazione che il CARNA-5 potesse ricombinarsi con facilità dando origine ad una nuova specie necrotizzante, molto pericolosa per il gran numero di ospiti del CMV.

La linea di pomodoro era stata trasformata con un gene chimerico, esprimente un RNA satellite benigno. L'esperimento ha coinvolto 1.000 piante trasformate e 1.000 non trasformate,

in condizioni di infezione naturale circondate da piante trappola di zucchini, peperone e melone. L'infezione era leggermente più bassa nelle piante transgeniche rispetto a quelle non trasformate e lo RNA satellite si ritrovava anche sulle piante di melone, zuccina e peperone limitrofe. La diffusione dello RNA satellite non causava alcun incremento delle infezioni su queste piante (40). Il risultato più significativo era che comunque non si osservava alcuna ricombinazione di CARNA-5 e non si formavano nuove specie necrotizzanti dello stesso. Un'attenuazione dell'infezione è stata osservata anche in altre piante trasformate con lo RNA satellite, come la petunia (41), il peperoncino (42) e il pomodoro (38).

Tuttavia, quando divenne evidente che le varietà necrogeniche differivano da quelle protettive solo per piccole variazioni di sequenza (27-32) s'incominciò a considerare pericolosa la vaccinazione con RNA satellite (43). Inoltre, la dimostrazione, in laboratorio, che il passaggio da benigno a necrogenico può avvenire spontaneamente e che la varietà necrogenica diventa dominante (44), rafforzata dalla protezione parziale dall'infezione nelle piante transgeniche rispetto ai controlli, e dalla possibilità che una singola mutazione potesse trasformare la varietà benigna dello RNA satellite in necrogenica, ha portato all'adozione di altre strategie per il controllo dei fitovirus, anche se quest'approccio non è stato del tutto abbandonato (45).

## 13.2. Vaccinazione con le proteine del capsido virale

La prima pianta transgenica resistente al virus TMV è stata ottenuta facendo esprimere il gene per la proteina del capsido virale nelle cellule di tabacco (46). Questo metodo, da allora, è quello che ha avuto le applicazioni più numerose. Il livello di protezione ottenuto varia da un'immunizzazione vera e propria ad un ritardo nella comparsa dei sintomi ad un'attenuazione degli stessi. La protezione può essere efficace contro vari ceppi dello stesso virus o contro più virus tra loro correlati (47, 48).

Il meccanismo di resistenza dovuto alle proteine del capsido, nonostante le numerose indagini effettuate, non è ancora completamente elucidato, anche perché tale meccanismo può essere diverso per virus differenti (49). Tuttavia, almeno nel caso del tabacco, vi sono evidenze che la resistenza contro il TMV sia una conseguenza dell'interazione tra la proteina transgenica del capsido e quella del virus infettante: 1) le piante transgeniche resistono al virus infettante, ma non all'inoculazione con l'RNA nudo o virus parzialmente privati del capsido (50, 51); 2) la resistenza delle piante transgeniche era più efficace contro i virus correlati al TMV che contro virus più lontani nella famiglia (52); 3) piante esprimenti proteine mutate del capsido in modo da modificare le interazioni elettrostatiche tra subunità mostravano la capacità di resistere all'infezione, al variare della capacità di aggregarsi delle subunità (53). Questi risultati suggeriscono che la resistenza sia conferita dalla struttura quaternaria delle proteine transgeniche del capsido piuttosto che alle subunità delle stesse in quanto tali.

La strategia basata sulle proteine del capsido virale ha avuto differenti percentuali di successo. Per esempio, l'utilizzo di capsido virale (CP) in sei tipi di piante diverse ha conferito una resistenza al CMV che variava dallo 0 al 100% (53) (Tabella 25).

Il potenziale dei costrutti CP è stato dimostrato nel caso della papaia (*Carica papaya*) che ha risolto un serio problema agronomico nell'isola di Puna nelle Hawaii. In quest'isola la produzione di papaia era scesa da 58.000 tonnellate/anno nel 1994 a 35.000 tonnellate/anno nel 1997, a causa dell'attacco dello *Papaya ringspot virus* (PSRV) che interferisce con la fotosintesi (63). A maggio 1998 sono stati distribuiti agli agricoltori i primi semi di papaia transgenica, esprimente la proteina del capsido di PSRV, resistenti al virus. Nel 2000 la produzione era ritornata quella del 1994.

**Tabella 25. Resistenza al virus delle piante transgeniche esprimenti le proteine del capsido di CMV**

Pianta	Grado di resistenza in %	Rif.
Cetriolo	86-100	54
Pomodoro	80-100	55
Pomodoro	100	56
Zucchini	92-100	57
Pomodoro	50-100	58
Pomodoro	100	59
Pomodoro	70-100	60
Pomodoro	0-100	61
Peperoncino	10-90	62

La presenza delle piante resistenti, diminuendo la circolazione del virus, ha consentito la coltivazione biologica della papaia nell'isola di Puna (64), essendo il flusso genico molto basso e assente nelle piante ermafrodite (65). Esperimenti sono in corso per estendere la coltivazione di papaia resistente allo PSVR in altre parti del mondo sebbene la resistenza allo PSVR non sia altrettanto efficace contro gli isolati virali provenienti da Thailandia, Australia e Brasile (66). A Taiwan, le piantagioni sperimentali di papaia resistente allo PSVR sono state attaccate da un altro virus il *Papaya leaf distortion mosaic virus* (67). Tuttavia, in laboratorio sono già state prodotte cultivar resistenti ad entrambi i virus (68).

La coltivazione della papaia resistente allo PSVR non ha effetti sulla microbiologia del suolo (69) e l'alimentazione dei roditori con la stessa non causa alcun effetto sull'apparato intestinale (70) e sul sistema immunitario (71). Risultati attesi, perché consumiamo con i vegetali freschi grandi quantità di virus, patogeni per i vegetali, che non hanno mai causato problemi per la salute umana. Nelle feci d'individui sani sono state identificate circa 37.000 sequenze virali simili a quelle dei virus patogeni vegetali (72). Inoltre, i virus presenti nelle feci erano capaci di infettare le piante per cui anche gli uomini possono essere un veicolo nella diffusione dei virus vegetali.

I costrutti CP si sono rivelati particolarmente efficaci con la creazione dello zucchini CZW-3, nel quale l'espressione dei tre geni CP specifici conferisce resistenza non solo al cucumovirus CMV ma anche a due potyvirus il *Watermelon mosaic virus 2* (WMV, virus del mosaico dell'anguria) e lo *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, virus del mosaico giallo dello zucchini), trasmessi, in natura, da diverse specie di afidi. La linea CZW-3 è stata autorizzata nel 1996 per la commercializzazione negli USA (57). Numerosi studi hanno verificato se la coltivazione della varietà transgenica ponesse ulteriori rischi rispetto alla varietà non transgenica (73-77). È stato possibile dimostrare che in campo aperto le piante esprimenti le proteine del capsido di ceppi virali, trasmessi dagli afidi, non influenzavano la diffusione di ceppi non trasmissibili dagli afidi stessi (78).

Il controllo usuale degli afidi richiede numerose applicazioni d'insetticida, per cui l'adozione dello zucchini transgenico ha generato notevoli benefici economici per gli agricoltori. Un altro beneficio è derivato dal fatto che le piante transgeniche, inibendo la replicazione e riducendo la frequenza di acquisizione dei virus da parte degli afidi, determinano una riduzione delle epidemie anche sulle piante convenzionali. Questi benefici possono essere vanificati dai costi indiretti causati dai coleotteri dello zucchini. Tali coleotteri, alla presenza d'infezioni virali, preferiscono le piante transgeniche in buona salute, rispetto alle convenzionali infette, sulle quali masticando le foglie rilasciano con le feci dei batteri che causano avvizzimento delle piante stesse (79). Tuttavia, nell'autorizzare la coltivazione di queste piante, le autorità USA non hanno adottato alcuna precauzione sebbene siano capaci di trasferire la modifica genetica

alle piante selvatiche, presenti in tutto il Nord America (76, 80). Il flusso dei geni resistenti ai virus era dovuto al polline e non agli afidi (78), cosa non sorprendente visto che le cucurbitacee sono impollinate in modo efficiente dalle api dello zucchini, anche se alcuni agricoltori collocano gli alveari di api mellifere nei loro campi. Questo complesso di osservazioni suggerisce di evitare le coltivazioni di zucchini resistenti ai virus in aree in cui sono presenti delle specie selvatiche correlate (81, 82).

La strategia della vaccinazione con le proteine del capsido per conferire la resistenza ai virus è stata applicata con successo, oltre che al pomodoro, a molte altre piante quali la patata (83-88), la barbabietola da zucchero (89-93), e la linea C5 del susino, che è stato recentemente deregolamentato dallo *Animal and Plant Health Inspection Service* (APHIS) con l'obiettivo di usarlo in caso di comparsa di infezione.

Il potyvirus *Plum pox virus* (PPV) è l'agente eziologico della sharka, o vaiolatura del susino, capace di devastare le coltivazioni della specie *Prunus*. Nel nostro Paese, i servizi fitosanitari regionali eseguono controlli per il virus su una trentina di piante, appartenenti allo stesso genere, alcune delle quali ornamentali, tra cui mandorlo, ciliegio, susino, albicocco e pesco; gli ultimi tre sono quelli che subiscono i danni maggiori. Il virus, comparso in Bulgaria nel 1918, si è diffuso sulla maggior parte del continente europeo, nel vicino e Medio Oriente e nelle Americhe. Sono in pratica esenti da infezioni le coltivazioni di Australia, Nuova Zelanda, Sud Africa e California (94). La diffusione è dovuta alla mancanza, in passato, di controlli adeguati e al commercio illegale di materiale vegetativo che insieme agli afidi è la via di trasmissione del virus.

I numerosi isolati del PPV, ben caratterizzati molecularmente, differiscono per l'aggressività, la trasmissibilità da parte degli afidi e la sintomatologia provocata. Queste differenze, legate alle caratteristiche molecolari e sierologiche, hanno portato al raggruppamento dei virus isolati in sei tipi di ceppo: PPV-D (Dideron), PPV-M (Marcus), PPV-EA (El-Amar), PPV-C (cherry), PPV-W (Winona) e PPV-Rec (ricombinante tra D e M) (95, 96).

La malattia non uccide gli alberi ma riduce la qualità dei frutti; gli alberi malati, se non vengono rimossi, diventano un serbatoio permanente del virus. Attualmente il controllo consiste nella rimozione degli alberi infetti. In Spagna, ad esempio, a partire dal 1989, sono stati rimossi 2,3 milioni di alberi (94). L'eradicazione è stata adottata anche in Italia (97), dove la malattia è comparsa nel 1973 nel nord est con il ceppo PPV-D che si è poi diffuso nelle altre parti del Paese (98). Il nord nel 1996, è stato vittima del ceppo PPV-M, che è trasmesso con grande efficienza dagli afidi, ceppo che si presenta sporadicamente nel resto del Paese (98, 99). Mentre in Puglia l'eradicazione degli alberi infetti è stata efficace, non si è avuto lo stesso risultato in Veneto nelle piantagioni di albicocco (98).

I tentativi di ottenere piante resistenti a PPV per selezione e incrocio non danno i risultati sperati, sia perché finora non sono state trovate sorgenti di resistenza in natura, sia per la difficoltà di trovare marcatori che guidino la selezione (100). Tuttavia, a causa degli effetti di PPV sull'industria delle drupacee, studi per l'ottenimento di cultivars di *Prunus* resistenti al virus sono in corso con i metodi classici (101).

La prima varietà transgenica, resistente al PPV, è stata realizzata in Europa, mediante l'inserimento del gene CP del virus in *Prunus domestica* (102). Studi di campo, tuttora in corso, sono stati condotti per un periodo di 8 anni in Spagna (103-104), Romania (105-107), Repubblica Ceca (108) e Polonia (109). Questi esperimenti hanno consentito di determinare che la resistenza non è dovuta ad una sovraespressione della proteina CP, ma al silenziamento genico e alla produzione di RNA interferenti (110). Tale silenziamento era stabile dopo molti anni in campo aperto (109). La sicurezza ambientale è stata valutata dal Consorzio europeo TRANSVIR. È stato dimostrato che la resistenza del clone C-5, denominato "*HoneySweet*", è mantenuta al variare delle caratteristiche molecolari di PPV e che lo stesso clone non ha alcun



impatto sulle popolazioni di afidi che visitano le piante (64, 74, 111). Inoltre, in tutti gli anni di sperimentazione non sono stati osservati eventi di ricombinazione tra i virus isolati dalle piante transgeniche e quelli isolati dalle piante non transgeniche (112), neppure quando queste venivano co-infettate con *Apple chlorotic leaf spot virus* (virus della maculatura clorotica fogliare del melo, ACLSV), con *Prune dwarf virus* (virus del nanismo del susino, PDV) e con *Prunus necrotic ringspot virus* (virus della maculatura anulare necrotica del susino, PNRV) (111).

Il complesso unico del genere *Prunus* pone molti problemi riguardo al flusso genico dal susino transgenico alle specie non transgeniche, perché il genere comprende circa 200 specie. In Italia, ad esempio le specie spontanee sono 16, di cui le più numerose sono il *Prunus cocomilia*, a fiori bianchi e diffuso nell'Italia meridionale e Sicilia, il *Prunus mahaleb*, noto col nome di Ciliegio canino, e il *Prunus spinosa*, noto anche come Prugnolo, spontaneo in tutt'Italia. Inoltre accanto alle varietà coltivate come il susino, l'albicocco, il mandorlo, il pesco, il ciliegio, il lauroceraso, esistono, in Italia, anche specie rinselvatichite come il *Prunus avium*, o ciliegio dai fiori colorati di bianco-rosa, il *Prunus serrulata* dai fiori colorati di bianco con screziature rosa, il *Prunus subhirtella* var. *pendula* a fruttificazione edule.

Questa situazione complessa rende difficile una valutazione del flusso genico nel *Prunus*, essendo questi influenzato dalla diversità genetica, dalla capacità di superarla, dalla compatibilità genetica inter- e intra-specifica, dall'auto sterilità, presente in molte specie, dalla frequenza elevata d'impollinazione incrociata, dall'impollinazione effettuata dagli insetti, dalla natura di pianta perenne, dall'architettura fenotipica, molto complessa (altezza del baldacchino, eterogeneità della corona, numero dei fiori per singola pianta) e l'esistenza di specie ornamentali e selvatiche (113, 114). Le differenze di ploidia tra differenti specie non assicurano la segregazione genetica. Perciò, l'eventuale commercializzazione del susino transgenico porrà dei problemi di coesistenza per le coltivazioni commerciali convenzionali, ma consentirà una migliore comprensione dei meccanismi di flusso genico e ibridazione tra specie all'interno del complesso *Prunus*.

### 13.3. Eteroincapsidamento

La maggior parte dei virus vegetali non ha un involucro lipidico esterno ed è la proteina capsidica a proteggerne il genoma, e a svolgere un ruolo sia nell'interazione con l'ospite nei diversi stadi dell'infezione virale che nella trasmissione del virus, contenendo il sito di riconoscimento da parte dei vettori. Lo sviluppo delle piante transgeniche resistenti ai virus ha sollevato il problema dell'eteroincapsidamento (transincapsidamento) nel quale la proteina capsidica transgenica incapsida genomi virali eterologi, in presenza d'infezioni da altri virus, dando così origine a nuovo virus, il cui genoma non codifica per la proteina capsidica che lo ingloba. In realtà, l'incapsidamento è un fenomeno specifico che richiede il riconoscimento dello RNA virale da parte della proteina capsidica. Questo processo è specie specifico e l'incapsidamento avviene solo con RNA virale omologo a quello che codifica per la proteina capsidica (115- 116). Infatti, piante esprimenti la proteina capsidica del ceppo N del virus Y della patata, infettate con un ceppo diverso O, producono particelle infettive che incorporano entrambe le varianti della proteina (117). La frequenza di eteroincapsidazione può essere molto alta (118). In altre osservazioni sui virus della famiglia dei potyvirus, il virus del mosaico giallo della zuccina (ZYMV-NAT), non trasmissibile dagli afidi, è invece trasmesso da questi ultimi, dopo infezione di *Nicotiana benthamiana* esprime la proteina capsidica del vaiolo del pruno (PPV) (119). In questo caso si erano formate particelle virali, contenenti il genoma di ZYMV-NAT, eteroincapsidate dalle proteine capsidiche di PPV che di conseguenza modificavano le

caratteristiche epidemiologiche del virus infettante. Nel caso in cui le piante transgeniche di *Nicotiana benthamiana*, esprime la proteina capsidica del vaiolo del pruno (PPV), erano infettate con virus non appartenenti alla famiglia dei potyvirus (*Tobacco mosaic tobamovirus*, *Potato X potexvirus* e *Beet necrotic yellow vein furovirus* BNYVV), non si osservava alcuna incapsidazione eterologa (120).

I tentativi di individuare fenomeni di eteroincapsidazione, in campo aperto, ad oggi non hanno dato risultati significativi nel caso della papaia, dello zucchini e del pomodoro, che esprimevano proteine del capsido virale (121); questo fenomeno, invece, si osserva nel caso d'infezioni miste con virus simili in piante non transgeniche (45); fenomeno che, invece, non si osserva in natura, in presenza di coinfezione da parte di virus differenti, (122, 123). Il processo dell'eteroincapsidazione può essere evitato modificando i geni che esprimono le proteine del capsido, in modo da conservare le proprietà antivirali ed evitare l'incapsidamento eterologo (45, 124).

Il risultato dell'eteroincapsidazione è un virione "mascherato" che ha un capsido non corrispondente al genoma del virus; capsido che può o non può essere sufficientemente funzionale per la trasmissione del virus ad un'altra pianta. In campo aperto, il virus mascherato potrà essere trasmesso, in modo significativo, ad altra pianta solo nel caso di trasmissione da parte degli insetti (125). Il capsido non corrispondente non è mantenuto nei cicli successivi d'infezione virale, perché la conseguente produzione di proteine del capsido è diretta dal genoma virale, consentendo l'assemblaggio corretto del virus originario. L'eteroincapsidazione è, perciò, transeunte e qualunque possibile rischio ambientale si manifesta solo nel primo ciclo d'infezione se il virus mascherato infetta una pianta suscettibile (126).

## 13.4. Ricombinazione

La ricombinazione è l'unione di sequenze nucleotidiche che in precedenza non erano collegate. La comparazione di numerose sequenze virali ha dimostrato che la ricombinazione ha giocato un ruolo importante nell'evoluzione dei virus vegetali (127, 128), mentre è molto più difficile predire un possibile ruolo della ricombinazione nella comparsa di nuovi virus. Alla ricombinazione tra due differenti luteovirus è stata attribuita la nascita del nuovo virus *Cucurbit aphid-borne yellow virus* (129), osservato per la prima volta in Francia (130) e isolato in seguito anche dalle coltivazioni italiane (131). Analogamente la comparsa del *Sugarcane yellow leaf virus* è stata attribuita alla ricombinazione di un polerovirus e un luteovirus (132, 133). Fenomeni di ricombinazione sono stati descritti anche per i virus a DNA circolare, a singola elica (134, 135).

La comparsa di un virus ricombinante richiede non solo che la ricombinazione sia avvenuta in modo appropriato per consentire la sopravvivenza del nuovo virus, ma anche che la pressione selettiva lo favorisca rispetto ai virus progenitori non ricombinati. Se la comparsa di un nuovo virus dipende dalla pressione selettiva piuttosto che dalla ricombinazione, la possibilità di una maggior ricombinazione nelle piante transgeniche resistenti ai virus sarà poco significativa (136).

È stato dimostrato che, in condizioni controllate, si possono formare acidi nucleici chimera tra il trascritto transgenico e il genoma di un nuovo virus che va ad infettare la pianta (45, 137-139). Il virus risultante potrebbe avere un comportamento epidemiologico completamente diverso da quello dei due virus che lo hanno generato. In condizioni d'infezione virale mista, molto comune nelle piante, contatti tra RNA eterologi possono essere molto frequenti, tanto che alla ricombinazione è attribuito il ruolo di meccanismo evolutivo dei virus vegetali (140, 141).

Il fenomeno di ricombinazione è frequente nelle condizioni di forte pressione selettiva, come quella che si raggiunge in serra, con l'utilizzo di virus parzialmente disattivati, che creavano condizioni di pressione selettiva in favore di molecole ricombinanti che ripristinavano le proprietà infettive (137-139).

È da notare che la ricombinazione può anche portare ad una scomparsa della resistenza. Piante che esprimevano la proteina del capsido di PVY, resistenti ad alcuni ma non a tutti i ceppi di PVY, sono state infettate contemporaneamente con due ceppi di PVY, uno bersaglio della proteina capsidica e l'altro no. La forte pressione selettiva che ne risultava a favore della ricombinazione ha portato all'eliminazione delle sequenze CP bersaglio (142). Nelle prove di campo, invece, dove la pressione selettiva è minore, perché tutti i virus infettanti sono totalmente attivi, il fenomeno non è presente, né nel susino né nella vite. Nel susino transgenico, esprime la CP del PPV, coltivato per un decennio, non è stato osservato alcun fenomeno di ricombinazione (104, 111). Analogamente, in prove, di durata pluriennale, con portainnesti esprimenti la CP del *Grapevine fanleaf virus* (virus dell'arricciamento fogliare della vite, GFLV), non sono stati rilevati virus ricombinanti (111, 142). La frequenza di ricombinazione, al contrario, è stata maggiore nelle piante non transgeniche di controllo rispetto ai portainnesti transgenici (143). Questo risultato è stato attribuito al fatto che le piante transgeniche, impedendo la replicazione virale anche dei ceppi più virulenti, causano una diminuzione della popolazione virale. L'esperienza di campo ha messo in evidenza una situazione diametralmente opposta al rischio paventato che le piante transgeniche favoriscano gli eventi di ricombinazione.

## 13.5. Resistenza RNA mediata

Il fenomeno della resistenza dovuta allo RNA è stato osservato, per la prima volta, in piante esprimenti lo RNA satellite sia del CMV (11) che del TSVR, *Tobacco ring spot virus* (143). La resistenza venne attribuita alla competizione tra gli RNA satellite non codificanti e lo RNA genomico del virus. Altri RNA subvirali, come gli RNA difettivi interferenti (136) e la regione non codificante 3' del genoma virale, fatta esprimere in una pianta transgenica (144) conferiscono la resistenza.

Il meccanismo di resistenza più importante mediato dallo RNA è il silenziamento genico post traslazionale. Infatti, la resistenza al *Tobacco Etch Virus* (TEV) può essere conferita da un gene CP non traslato con la resistenza più efficace nelle piante dove non vi era accumulo di RNA messaggero transgenico. Le piante che presentavano resistenza e accumulo iniziale di RNA messaggero transgenico erano infettate, dopodiché il recupero delle stesse, che portava ad uno stato di completa insensibilità al virus, era accompagnato dalla scomparsa dello RNA messaggero transgenico (145). Il fenomeno è dovuto ad una degradazione, specifica per sequenza, sia dello RNA messaggero transgenico che del corrispondente RNA virale. Questa ipotesi è stata in seguito ampiamente confermata (146-149).

La situazione nelle piante che esprimono le proteine del capsido può essere molto complessa perché un singolo transgene può conferire sia la resistenza mediata dalla proteina che quella mediata dallo RNA. Questo doppio meccanismo è stato osservato nella lattuga, nella quale il capsido transgenico conferisce la resistenza al *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) con un meccanismo di silenziamento genico e in misura minore conferisce la resistenza anche ad altri virus della stessa famiglia dei tospovirus (150). Presumibilmente la sequenza degli altri tospovirus è sufficientemente differente da quella del transgene TSWV, per consentire loro di sfuggire al meccanismo del silenziamento.

Il silenziamento genico sembrerebbe essere la soluzione al problema della ricombinazione, perché non vi è accumulo di RNA messaggero transgenico e quindi non vi è materiale per la

ricombinazione, a differenza della resistenza impartita dalle proteine CP. Invece, già dal 1998, si è visto che, molti virus vegetali hanno la capacità di interferire con il silenziamento genico (151-155). Sebbene la scomparsa della resistenza non sia stata osservata in rilasci su larga scala in campo aperto (156, 157) e sia possibile stabilizzare la stessa mediante l'uso di sequenze transgeniche modificate (158), ad oggi non è chiaro se tale fenomeno, oltre al rilievo economico che potrebbe rivestire, possa avere un impatto ambientale.

## 13.6. Flusso genico

Nel caso in cui un virus alteri la fittezza delle piante suscettibili di una popolazione selvatica, l'introggressione (cioè il trasferimento permanente di un gene in una specie interfertile) della resistenza, allo stesso virus, effettuata dal polline di una pianta correlata resistente, porterà ad un incremento progressivo della popolazione selvatica. Si tratta di un caso in cui il flusso genico favorisce, paradossalmente, l'aumento della biodiversità. Invece, se i fattori che determinano le dimensioni della popolazione sono, ad esempio, la pressione esercitata dagli erbivori, o la presenza di microrganismi che mettono in pericolo la sopravvivenza dei semi, allora l'introggressione della resistenza ai virus non avrà alcun effetto sulle dimensioni della popolazione.

Per verificare se un gene di resistenza ai virus influenzi la fittezza di una popolazione selvatica occorre stabilire se (136):

- vi è flusso genico tra la pianta transgenica e la sua controparte selvatica;
- la controparte selvatica è resistente o suscettibile al virus;
- il virus è presente o meno nella controparte selvatica durante le diverse fasi di sviluppo;
- l'infezione virale ha un effetto sulla fittezza della controparte selvatica;
- il virus influenza la dimensione della popolazione selvatica.

Una volta stabilita l'esistenza di una potenziale introggressione, si può determinare in serra se la popolazione selvatica è resistente o suscettibile al virus. Nel caso in cui la pianta selvatica fosse suscettibile, potrebbe non essere affetta da virosi a causa della nicchia ecologica occupata. Le popolazioni vicine alla costa marina di barbabietola (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) sono suscettibili al virus della rizomania (*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYVV) che è trasmesso dal fungo *Polymyxa betae*. Il fungo non tollera la salinità, per cui il virus è in pratica assente vicino al mare e il flusso genico dalla specie coltivata (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*), resistente alla rizomania, alla specie selvatica non conferirebbe a quest'ultima alcun vantaggio competitivo (159, 160). Tale flusso genico, d'altra parte, è sfavorito anche dalla forte divergenza genetica tra la specie marittima e le altre specie correlate, che sempre su base genetica possono essere suddivise in tre raggruppamenti, barbabietola coltivata, selvatica e ruderale, cioè barbabietola che vive sui terreni disturbati dall'uomo (161). L'analisi di 42 popolazioni ruderali non ha evidenziato alcuna introggressione con la specie coltivata (162). È molto probabile che l'introggressione dopo la formazione del primo ibrido sia molto limitata (163). Non è perciò sorprendente che un secolo di flusso genico da *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* non abbia alterato la diversità genetica della specie selvatica *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima*, nell'area italiana di produzione della barbabietola (164).

Differente è la situazione per quanto riguarda lo zucchini CZW-3, la cui coltivazione è stata autorizzata negli USA, pur in presenza di una notevole popolazione selvatica. Il passaggio della resistenza ai virus CMV, ZYMV e WMV dallo zucchini transgenico (*Cucurbita pepo* sp. *ovifera* var. *ovifera*) alla specie selvatica imparentata (*Cucurbita pepo* sp. *ovifera* var. *texana*) è stata documentata in prove di campo (165-167). Se i tempi di fioritura sono sincronizzati, la frequenza degli eventi d'ibridazione aumenta all'aumentare del rapporto tra numero di piante

transgeniche e numero di piante selvatiche, ed è sufficiente una sola generazione d'ibridi per ottenere l'introggressione della resistenza ai virus. La fittezza di tali ibridi di *Cucurbita texana* è determinata dalla pressione selettiva cui sono sottoposti. In presenza di una bassa concentrazione di virus, gli ibridi si comportano come la varietà selvatica. Un'analisi su larga scala delle popolazioni selvatiche, che crescono vicino allo zucchini transgenico, ha identificato sintomi d'infezione, dovuti a CMV, ZYMV o WMV2, solo nel 2% delle piante. Questo basso livello d'infezione suggerisce che la resistenza ai virus non darà un vantaggio competitivo efficace alle popolazioni spontanee esaminate (168).

La letteratura riporta anche alcune esperienze con il genere *Brassica* (169-175). Vi era una particolare preoccupazione dovuta alla frequenza naturale d'introggressione, dovuto al flusso genico, tra le diverse specie di questo genere che è al 30% (171) e alla notevole distanza, cui tale incrocio può ancora essere presente (172). Tuttavia, in campo aperto, gli ibridi F<sub>1</sub> non avevano alcun vantaggio competitivo rispetto alla pianta coltivata e non erano resistenti al virus (173).

La resistenza ai virus, anche se in un numero limitato di casi, è stata introdotta con tecniche tradizionali di selezione e incrocio (174-176). Il rischio di flusso genico è identico in questi casi a quello delle piante transgeniche, ma non risulta che sia mai stato studiato.

### 13.7. Il caso del promotore 35S

Il promotore 35S, del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV), è stato usato in un gran numero di piante transgeniche, perché i costrutti di questo promotore con la regione codificante per la proteina d'interesse, consentono l'accumulo di grandi quantità dei prodotti genici (RNA e proteine) in quasi tutti i tessuti della pianta trasformata. È l'affidabilità di tali livelli di espressione che ha determinato l'uso estensivo di questo promotore. Alcuni autori hanno sostenuto che vi sono pericoli associati all'uso di tale promotore, perché potrebbe favorire la ricombinazione tra molecole di DNA (177). Tale affermazione era basata sull'osservazione, in esperimenti biostatici di trasformazione del riso, della presenza di un *hot spot* di ricombinazione in questo promotore (178). Ho *et al.*, sulla base di questa osservazione, sostennero che la presenza di un *hot spot* per la ricombinazione avrebbe causato una mobilità del promotore sia nelle cellule vegetali sia in quelle animali. In queste ultime, avrebbe determinato se si fosse inserito vicino ad un oncogene attivandolo, l'insorgenza di un tumore. È noto che il promotore 35S si può esprimere in cellule umane a bassa concentrazione e in modo transeunte (179-180). Tuttavia, in questi esperimenti sono state usate quantità notevoli di DNA, estraneo alle cellule umane, contenente il promotore 35S, ed è noto che i frammenti di DNA estraneo stimolano i meccanismi di riparazione delle cellule favorendo, così, la ricombinazione. Infatti, è noto, da tempo, che la struttura del DNA integrato è influenzata dalla quantità di DNA introdotto inizialmente che determina il grado d'induzione del sistema di riparazione del DNA (181). Inoltre, è interessante notare che quando si usa un vettore di trasformazione più naturale come l'*Agrobacterium*, il promotore 35S non si comporta come un *hot spot* di ricombinazione, per cui l'osservazione precedente è probabilmente dovuta all'impiego della tecnica biostatica con la quale s'introducono nella cellula quantità massicce di frammenti di DNA (182, 183).

Se si esamina la catena di eventi necessaria per confermare l'ipotesi di Ho *et al.*, occorre ricordare che consumiamo normalmente, con le piante non transgeniche, grandi quantità di DNA contenente il promotore 35S. Il CaMV infetta vari membri della famiglia delle Brassicacee (ravanella, cavoli, broccoli, cavolfiori, crescione, ecc). Si stima che il 10% di queste piante sia infettato dal CaMV (184). In alcune indagini epidemiologiche l'infezione è stata riscontrata nel 50% delle piante (185) con ciascuna cellula infetta contenente decine di

migliaia di copie del genoma virale, comprendenti sia DNA “nudo” che DNA nelle particelle virali (186). Se il consumo di DNA contenente il promotore 35S fosse pericoloso, dovremo temere più le piante infette che quelle transgeniche (187).

## 13.8. Conclusioni

Il lavoro svolto dal progetto europeo TRANSVIR, *Environmental impact assessment of transgenic grapevines and plums on the diversity and dynamics of virus populations*, sulla diversità e la dinamica degli organismi non bersaglio, quali possono essere gli insetti vettori dei virus, non ha rilevato differenze in campo aperto sulle popolazioni degli afidi, vettori e non (104, 188). Non hanno dimostrato differenze anche le ricerche su microorganismi del suolo eseguite in piantagioni di papaia resistente al PRSV e piantagioni di controllo (189, 190) a Taiwan, mentre alcune differenze sono state riscontrate in Cina (191). Nuove ricerche sono necessarie per verificare se si tratti di un fenomeno significativo o transeunte (190).

La ricombinazione tra RNA transgenico ed RNA virale non ha ad oggi causato problemi ambientali nel caso delle specie resistenti a virus già coltivate su larga scala come la papaia e lo zucchini (53, 192).

L'analisi delle proteine transgeniche del capsido virale, espresse dalle piante resistenti ai virus, ha dimostrato che non hanno effetti tossici od allergizzanti (3, 193) e che non vi sono differenze nel profilo di espressione proteica tra pianta “vaccinata” e pianta non transgenica libera da infezione (194). Grandi quantità di proteine virali vegetali sono ingerite quotidianamente e ripetutamente dall'uomo, senza che nel corso del tempo siano state osservate reazioni avverse (72).

Infine, da quanto sopra esposto, è evidente che la “vaccinazione” transgenica delle piante è un metodo efficiente di controllare le malattie virali delle piante stesse e che le tecniche disponibili permettono di eliminare le cause di rischio dovute all'eteroincapsidazione e alla ricombinazione, ma gli stessi risultati ci dicono che per le piante, resistenti a virus, che saranno sviluppate in futuro, sarà necessario monitorare accuratamente il flusso genico tra specie compatibili.

## Bibliografia

1. Maule AJ, Caranta C, Boulton MI. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol Plant Pathol* 2007;8(2):223-31.
2. Palukaitis P, Carr JP. Plant resistance response to viruses. *J Plant Pathol* 2008;90(2):153-71.
3. Saldarelli P. Esperienze di impiego in pieno campo di piante transgeniche resistenti per la resistenza ai virus. *Accademia dei Georgofili: Innovazioni nella difesa delle colture con mezzi a basso impatto ambientale*. 2008; 5(S7):55-72.
4. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Wien: Springer-Verlag; 1995. p. 1-586.
5. Murrant AF, Raccah B, Pirone T, Transmission by vectors: In: Milne RG (Ed.). *The plant viruses: The filamentous viruses vol. 4*. New York: Plenum Press; 1988: p. 237-73.
6. Kikkert M, Meurs C, van den Wetering F, Dorfmüller S, Peters D, Kormelink R, Goldbach R. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathol* 1998;88(1):63-9.

7. Whitfield AE, Ullman DE, German TL. Tospovirus-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol* 2005;43:459-89.
8. Schneider WL, Roossinck MJ. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interaction. *J Virol* 2001;75(14):6566-71.
9. Murrant AF, Mayo MA. Satellites of plant viruses. *Ann Rev Phytopathol* 1982;20:49-68.
10. Waterworth HE, Kaper JM, Tousignant ME. CARNA-5, the small cucumber mosaic virus-dependent replicating DNA, regulates disease expression. *Science* 1979;204(4395):845-7.
11. Harrison BD, Mayo MA, Baulcombe DC. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 1987;328: 799-802.
12. Montasser MS, Tousignant ME, Kaper JM. Satellite-mediated protection of tomato against Cucumber mosaic virus: I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. *Plant Dis* 1991;75(1):86-92.
13. Gallitelli D, Vovlas C, Martelli G, Montasser MS, Tousignant ME, Kaper JM. Satellite-mediated protection of tomato against Cucumber mosaic virus: II. Tomato field test under natural epidemic condition in southern Italy. *Plant Dis* 1991;75(1):93-5.
14. Kang BC, Yeam L, Jahn MM. Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol* 2005;43:581-621.
15. Garcia-Arenal F, McDonald BA. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathol.* 2003;93(8):941-52.
16. Gallitelli DA, Di Franco A, Vovlas C. Epidemie del virus del mosaico del cetriolo e di un potyvirus in Italia meridionale: repertorio dei virus e aspetti ecologici. *L'Informatore Agrario* 1988; 44:40-50.
17. Gallitelli DA, Di Franco A, Vovlas C, Crescenzi A, Ragozzino A. Una grave virosi del pomodoro in Italia meridionale. *L'Informatore Agrario* 1988;44: 67-70.
18. Gallitelli DA, Di Franco A, Vovlas C, Kaper JM. Infezioni miste del virus del mosaico del cetriolo (CMV) e di potyvirus in colture ortive in Puglia e Basilicata. *Informatore Fitopatologico* 1988;38:57-64.
19. Benetti MP. Una grave necrosi dei frutti di pomodoro associata al virus del mosaico del cetriolo. *Giornale di agricoltura* 1988;90:42-5.
20. Marrou J, Duteil H. La nécrose de la tomate. *Annales de Phytopathologie* 1974;6:155-71.
21. Kaper JM, Waterworth HE. Cucumber mosaic virus-associated RNA5: casual agent for tomato necrosis. *Science* 1977;196:429-31.
22. Collmer CW, Howell SH. Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by a plant virus. *Ann Rev Phytopathol* 1992;30:419-42.
23. Kaper JM, Tousignant Me, Steen MT. Cucumber mosaic virus-associated RNA5 XI. Comparison of 14 CARNA5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence. *Virology* 1988;163(2): 284-92.
24. Grieco F, Lanave C, Gallitelli D. Evolutionary dynamics of cucumber mosaic virus satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology* 1997; 229(1):166-74.
25. Kearney CM, Donson J, Jones GE. Low level of genetic drift in foreign sequences replicating in an RNA virus in plants. *Virology* 1993;192(1):11-7.
26. Strauss JH, Strauss EG. Evolution of RNA viruses. *Ann Rev Microbiol* 1988; 42:657-83.
27. Aranda MA, Fraile A, Garcia-Arenal. Genetic variability and evolution of the satellite RNA of Cucumber mosaic virus during natural epidemics. *J Virol* 1993;67(10):5896-5901.
28. Aranda MA, Fraile A, Dopazo J, Malpica JM, Garcia-Arenal F. Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *J Mol Evol* 1997;44(1):81-8.

29. Garcia-Arenal F, Escriu F, Aranda MA, Alonso-Prados JL, Malpica JM, Fraile A. Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Res* 2000;71(1-2):1-8.
30. Fraile A, Garcia-Arenal F. Secondary structure as a constraint to the evolution of a plant satellite RNA. *J Mol Biol* 1991;221(4):1065-9.
31. Devic M, Jaegle M, Baulcombe D. Symptom production on tobacco and tomato is determined by two distinct domains of the satellite RNA of Cucumber mosaic virus (Strain Y). *J Gen Virol* 1989;70(10):2765-74.
32. Devic M, Jaegle M, Baulcombe D. Cucumber mosaic virus satellite RNA (strain Y): analysis of sequences which affect systemic necrosis on tomato. *J Gen Virol* 1990;71(4):1443-9.
33. Kaper JM. Viral satellite, molecular parasites for plant protection: In: Lumsen RD, Vaughn JL (Ed.). *Pest management: biologically based technologies. Proceedings of Beltsville Symposium 18*. Washington DC: Agricultural Research Service, USDA; 1993. p. 134-43.
34. Martelli GP. Trasformazione genetica per la resistenza in piante coltivate. *Atti Accademia dei Georgofili* 1991;37:349-68.
35. Tien P, Wu GS. Satellite RNA for the biocontrol of plant diseases. *Adv Virus Res* 1991;39: 321-9.
36. Tien P. Satellite RNA for the control of plant diseases. In: *Risk Assessment in Agricultural Biology. Proceedings of the International Conference*. Oakland: Division of Agriculture and Natural Resources, University of California; 1990. p. 29-37.
37. Sayama H, Sato T, Kominato M, Natsuaki T, Kaper JM. Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathol* 1993;83(4):405-10.
38. Stommel JR, Tousignant ME, Wai T, Pasini R, Kaper JM. Viral satellite RNA expression in transgenic tomato confers field tolerance to cucumber mosaic virus. *Plant Dis* 1998;82(4):391-6.
39. Presidenza del Consiglio dei Ministri. Dipartimento per le Politiche Comunitarie – Comitato Scientifico per i Rischi Derivanti dall'Impiego di Agenti Biologici. *Risk Assessment of the use of plants genetically modified with the satellite RNA of the cucumber mosaic virus – The case: the tomato transformed with the cDNA of CARNA 5*. 1994. p. 1-29
40. Monti MM, Valanzuolo S, Cassani G, Colombo M. Transgenic tomatoes expressing a Cucumber mosaic virus satellite RNA: field testing and analysis of satellite RNA spread. *J Plant Pathol* 1999;81(2):113-22.
41. Kim SJ, Paek KH, Kim B-D. Delay in disease development in transgenic petunia plants expressing Cucumber mosaic virus I<sub>17</sub>N-satellite RNA. *J Am Soc Hort Sci* 1995;120(3):393-9.
42. Kim SJ, Lee SJ, Kim B-D, Paek KH. Satellite RNA-mediated resistance to Cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). *Plant Cell Rep* 1997;16(12):825-30.
43. Jacquemond M, Tepfer M. Satellite RNA-mediated resistance to plant viruses: Are the ecological risks well assessed? In: Hadidi A, Khetarpal RH, Koganezawa H (Ed.). *Plant virus disease control*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press; 1998. p. 94-120.
44. Palukaitis P, Roossinck MJ. Spontaneous change of a benign satellite RNA of Cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnol* 1996; 14(10):1264-8.
45. Maoka T, Hayano Y, Kawabe K, Fukumoto F, Kashiwazaki S, Iwasaki M. Virus resistance in transgenic tomato expressing satellite RNA of Cucumber mosaic virus. 3: Mutation analysis of satellite RNA through translation and transmission. *Research Bulletin of the National Agricultural Research Center for Hokkaido Region* 2008;188:31-43.
46. Powel Abel P, Nelson RS, De B, Hoffman N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 1986;232:738-43.



47. Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE. Coat-protein mediated resistance against virus infection. *Ann Rev Phytopathol* 1990;28:451-74.
48. Lomonosoff GP. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Ann Rev Phytopathol* 1995;33:323-43.
49. Bendahmane M, Chen I, Asurmendi S, Bazzini AA, Szecsi J, Beachy RN. Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein. *Virology* 2007; 366(1):107-16.
50. Register JC, Beachy RN. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* 1988;166(2):524-32.
51. Nejdat A, Beachy RN. Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Mol Plant-Microbe Interact* 1990;3(3):247-51.
52. Bendahmane M, Fitchen JH, Zhang G, Beachy RN. Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobomavirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* 1997;71(10):7942-50.
53. Morroni M, Thompson JR, Tepfer M. Twenty years of transgenic plant resistant to *Cucumber mosaic virus*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2008; 21(6):675-4.
54. Gonsalves D, Chee P, Provvidenti R, Seem R, Slighton JL. Comparison of coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by Cucumber mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. *Nature Biotechnol* 1992;10(12):1562-70.
55. Xue B, Gonsalves C, Provvidenti R. Development of transgenic tomato expressing a high level of resistance to Cucumber mosaic virus strains of subgroups I and II. *Plant Dis* 1994;78(11):1038-41.
56. Provvidenti R, Gonsalves C. Inheritance of resistance to Cucumber mosaic virus in a transgenic tomato line expressing the coat protein of the white leaf strain. *J Hered* 1995;86(2):85-8.
57. Tricoli DM, Carney KJ, Russel PF, McMaster JR, Groff DW, Hadden KC, Himmel PT, Hubbard JP, Boeshore ML, Quemada HD. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to Cucumber mosaic virus, Watermelon mosaic virus 2 and Zucchini yellow mosaic virus. *Nature Biotechnol* 1995;13:1458-65.
58. Gielen J, Ultzen T, Bontems S, Loots W, van Schepen A, van Westerboek A, de Haan P, van Grihsven A. Coat protein-mediated protection to Cucumber mosaic virus infections in cultivated tomato. *Euphytica* 1996; 88(2):139-49.
59. Fuchs M, Provvidenti R, Slighton JL, Gonsalves D. Evaluation of transgenic tomato plants expressing the coat protein gene of Cucumber mosaic virus strain WL under field conditions. *Plant Dis* 1996;80(3):270-5.
60. Kaniewski W, Ilardi V, Tomassoli L, Mitsky T, Layton J, Barba M. Extreme resistance to Cucumber mosaic virus (CMV) in transgenic tomato expressing one or two viral coat proteins. *Mol Breed* 1999;5(2):111-9.
61. Tomassoli V, Ilardi V, Barba M, Kaniewski W. Resistance of transgenic tomato to Cucumber mosaic cucumovirus under field conditions. *Mol Breed* 1999;5(2):121-30.
62. Shin R, Park JM, An JM, Paek KH. Ectopic expression of Ts1l in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* 2002;15(10):983-9.
63. Gonsalves D. Transgenic papaya in Hawaii and beyond. *AgBioForum* 2004;7(1-2):36-40.
64. Fuchs M, Gonsalves D. Safety of virus resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu Rev Phytopathol* 2007;45:173-202.
65. Manshardt RM, Mello CL, Lum SD, Ta L. Tracking papaya pollen movement with the GUS transgene marker. *Acta Horticult* 2007;740:183-8.

66. Tennant PF, Gonsalves C, Ling KS, Fitch M, Manshardt R, Slightom JL, Gonsalves D. Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathol* 1994;84(11):1359-66.
67. Bau HJ, Kung YJ, Raja JA, Chan SJ, Chen KC, Chen YK, Wu HW, Yeh SD. Potential threat of a new pathotype of Papaya leaf distortion mosaic virus infecting transgenic papaya resistant to Papaya ringspot virus. *Phytopathol* 2008;98(7):848-56.
68. Kung YJ, Bau HJ, Wu YL, Huang CH, Chen TM, Yeh SD. Generation of transgenic papaya with double resistance to Papaya ringspot virus and Papaya leaf-distortion mosaic virus. *Phytopathol* 2009;99(11):1312-20.
69. Sheu C, Wu CY, Chen SC, Lo CC. Extraction of DNA from soil for analysis of bacterial diversity in transgenic and nontransgenic papaya sites. *J Agric Food Chem* 2008;56(24):11969-75.
70. Powell M, Wheatley AO, Omoruyi F, Asemota HN, Williams NP, Tennant PF. Comparative effects of dietary administered transgenic and conventional papaya on selected intestinal parameters in rat models. *Transgenic Res* 2010; 19(3):511-8.
71. Chen YN, Hwang WZ, Fang TJ, Cheng YH, Lin JY. The impact of transgenic papaya (TPY10-4) fruit supplementation on immune responses in ovalbumin-sensitized mice. *J Sci Food Agric* 2011;91(3):539-46.
72. Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run J-Q, Wei CL, Soh SWL, Hibberd ML, Liu ET, Rowher F, Ruan Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLOS Biology* 2006;4(1):108-18.
73. Fuchs M, Gonsalves D. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Nature Biotechnol* 1995;13(12):1466-73.
74. Fuchs M, Gonsalves D. Environmental safety assessment of virus-resistant transgenic squash: lessons and perspectives. In: *The 8th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, Montpellier, France, 26-30 September. Saskatoon: International Society for Biosafety Research. 2004. p. 47-9.
75. Gaba V, Zelcer A, Gal-On A. Cucurbit biotechnology - the importance of virus resistance. *In Vitro Cell Develop Biol* 2004;40(4):346-58.
76. Arriaga L, Huerta E, Lira-Saade R, Moreno E, Alarcon J. Assessing the risk of releasing transgenic Cucurbita spp. in Mexico. *Agric Ecosys Environ* 2006;112(4):291-99.
77. Fuchs, M. Virus-resistant transgenic crops: insights into their environmental impact after the first decade of release. In: Lorito M, Woo SL, Scala F (Ed.) *Biology of plant-microbe interactions, Volume 6. Proceedings of the 13th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*, Sorrento, Italy, 21-27 July 2007. St. Paul: International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions; 2007. p. 110.
78. Fuchs M, Klas FE, McFerson JR, Gonsalves D. Transgenic melon and squash expressing coat protein genes of aphid-borne viruses do not assist the spread of an aphid non-transmissible strain of cucumber mosaic virus in the field. *Transgenic Res* 1998;7(6):449-62.
79. Sasu MA, Ferrari MJ, Du D, Winsor JA, Stephenson AG. Indirect costs of a nontarget pathogen mitigate the direct benefits of a virus-resistant transgene in wild Cucurbita. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(45):19067-7.
80. Fuchs M, Chirco EM, Gonsalves D. Movement of coat protein genes from a commercial-virus-resistant transgenic squash into wild relatives. *Environ Biosafety Res* 2004;3(1):5-16.
81. Decker-Walters DS, Staub JE, Chung SM, Nakata E, Quemada HD. Diversity in free-living populations of Cucurbita pepo (Cucurbitaceae) as assessed by random amplified polymorphic DNA. *Systematic botany* 2002; 27(1):19-28.

82. Prendeville HR, Pilson D. Transgenic virus resistance in cultivated squash affects pollinator behavior. *J Appl Ecol* 2009;46(5):1088-96.
83. Pythoud F. Pommes de terre transgeniques résistantes aux virus: bilan et perspectives en matière de sécurité pour l'environnement. *Revue Suisse d'Agriculture* 1994;26(2):69-74.
84. Malnoë PG, Droz E, Vaistij F. Risk assessment: the evolution of a viral population in transgenic plants. *Dialogue on risk assessment of transgenic plants: scientific, technological and societal perspectives*. Dornach, CH, 28 October 1997. Criccieth, UK: Ifgene; 1997. p. 4-9.
85. Villalobos VM, Rivera-Bustamante R. Field tests on transgenic potatoes in Mexico. *The biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms*. Tsukuba, Japan: JIRCAS; 1997. p. 157-62.
86. El-Khishin DA, Hamid AA, El-Moghazt G, Metry EA. Assessment of genetically modified potato lines resistant to potato virus Y using compositional analysis and molecular markers. *Res J Agricul Sci* 2009;5(3):261-71.
87. Maki-Valkama T, Alkonene JPT. Pathogen derived resistance to potato virus Y: mechanism and risks. *Agric Food Sci Finland* 1999;8(4/5):493-513.
88. Yakovleva GA, Rod'kina IA, Yasshchenko NOP. Finding of phenotypic resistance to potato virus Y in field tests of transgenic potato plants with gene of the virus coat protein. *Russian Agricultural Sciences* 2001;3(1):6-14.
89. Bartsch D, Schmidt M, Pohl-Orf M, Haag C, Schuphan I. Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to Beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations. *Mol Ecol* 1996;5(2):199-205.
90. Smith HG, Patron NJ, Mayo MA, Barker H, Liney MS. Environmental impact of transgenic virus-resistant sugar beet. In: *63e Congres Institut International de Recherches Betteravieres, Interlaken, Switzerland, 9-10 fevrier 2000*. Brussels: Institut International de Recherches Betteravieres; 2000. p. 267-77.
91. Bartsch D, Brand U, Morak C, Pohl-Orf M, Schuphan I, Ellstrand NC. Biosafety of hybrids between transgenic virus-resistant sugar beet and swiss chard. *Ecol Appl* 2001;11(1):142-7.
92. Dietz-Pfeilstetter A, Barg E, Weber A. Genexpression in gentechnisch veränderten Virus- und Herbizidresistenten Pflanzen im Gewachshaus und unter Freilandbedingungen. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 2005;57(8):167-71.
93. Gurel E, Gurel S, Lemaux PG. Biotechnology applications for sugar beet. *Crit Rev Plant Sci* 2008;27(2):108-40.
94. Cambra M, Capote N, Myrta A, Llàcer G. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *Bull EPPO* 2006;36(2):202-4.
95. Cambra M, Boscia D, Myrta A, Palkovics L, Navratil M, Barba M, Gorris MT, Capote N. Detection and characterization of Plum pox virus: serological methods. *Bull EPPO* 2006;36(2):254-61.
96. Olmos, A, Capote N, Candresse T. Detection and characterization of Plum pox virus: molecular methods. *Bull EPPO* 2006;36(2):262-6.
97. Myrta A, Di Terlizzi B, Savino V, Martelli GP. Control and monitoring: monitoring and eradication of sharka in south-east Italy over 15 years. *Bull EPPO* 2006;36(2):309-11.
98. Di Terlizzi B, Boscia D. Plum pox virus (PPV) in Italy. *Bull EPPO* 2006; 36(2):205.
99. Dallot G, Glasa M, Jevremovic D, Kamenova I, Paunovic S, Labonne G. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of plum pox virus strain M. *Arch Virol* 2011;156(3):539-42.
100. Bassi D. Breeding resistance: breeding for resistance to Plum pox virus in Italy. *Bull EPPO* 2006;36(2):327-9.

101. Badenes ML, Moustafa TA, Martinez-Calvo J, Llacer G. Resistance to a sharka trait in a family from selfpollination of “Lito” apricot cultivar. *Acta Hort* 2006;701:381-4.
102. Scorza R, Ravelonandro M, Callahan AM, Cordts JM, Fuchs M, Dunez J, Gonsalves D. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Rep* 1994;14(1):18-22.
103. Capote N, Cambra M. Variability of Plum pox virus population in PPV-resistant transgenic and non-transgenic plums. *Phytopathologia Polonica* 2004;36:107-13.
104. Capote N, Perez-Panades J, Monzo C, Carbonell E, Urbaneja A, Scorza R, Ravelonandro M, Cambra M. Assessment of the diversity and dynamics of Plum pox virus and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions. *Transgenic Res* 2008;17(3):367-77.
105. Zagrai I, Ravelonandro M, Scorza R, Minoiu N, Zagrai L. Field release of transgenic plums in Romania. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Animal Sciences and Veterinary Medicine* 2008;65(1/2):358-65.
106. Zagrai I, Ravelonandro M, Scorza R, Gaboreanu I, Ferencz B, Popescu O, Zagrai L, Maxim A. Serological and molecular variability of Plum pox virus in transgenic and conventional plums. *Acta Hort* 2005;738:703-10.
107. Zagrai I, Zagrai L, Ravelonandro M, Gaboreanu I, Pamfil D, Ferencz B, Popescu O, Scorza R, Capote N. Environmental impact assessment of transgenic plums on the diversity of Plum pox virus populations. *Acta Hort* 2008;781:309-17.
108. Polák J, Pivalová J, Jokes M, Svoboda J, Scorza R, Ravelonandro M. Preliminary results of interaction of Plum pox virus (PPV), Prune dwarf virus (PDV) and apple chlorotic leafspot virus (ACLSV) with transgenic plants of plum *Prunus domestica*, clone C-5 grown in an open field. *Phytopathologia Polonica* 2004;36:115-22.
109. Hily JM, Scorza R, Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M. Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Res* 2004;13(5): 427-36.
110. Scorza R, Callahan A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Ravelonandro M. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res* 2001;10(3):201-9.
111. Fuchs M, Cambra M, Capote N, Jelkmann W, Kundu J, Laval V, Martelli GP, Minafra A, Petrovic N, Pfeiffer P, Pompe-Novak M, Ravelonandro M, Saldarelli P, Stussi-Garaud C, Vigne E, Zagrai I. Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. *J Plant Pathol* 2007;89(1):5-12.
112. Zagrai I, Zagrai L, Ravelonandro M, Gaboreanu I, Pamfil D, Ferencz B, Popescu O, Scorza R, Capote N. Environmental impact assessment of transgenic plums on the diversity of Plum pox virus populations. *Acta Hort* 2008;781:309-17.
113. Oddou Muratorio S, Demesure MB, Pelissier R, Gouyon PH. Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Mol Ecol* 2004;13(12):3689-702.
114. Cici SZ, Van Acker RC. Gene flow in *Prunus* species in the context of novel trait risk assessment. *Environ Biosafety Res* 2010;9(2):75-85.
115. Latham JR, Wilson AK. Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes? *Mol Plant Pathol* 2008;9(1):85-103.
116. Farinelli L, Malnoë P, Collet GF. Heterologous encapsidation of potato virus Y strain O (PVY<sup>O</sup>) with the transgenic coat protein of PVY strain N (PVY<sup>N</sup>) in *Solanum tuberosum* cv. Bintje. *Nature Biotechnol* 1992;10(9):1020-5.

117. Jacquet C, Delecolle B, Raccach B, Lecoq H, Dunez J, Ravelonandro M. Use of modified Plum pox virus coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants. *J Gen Virol* 1998;79(6):1509-17.
118. Candelier-Harvey P, Hull R. Cucumber mosaic virus genome is encapsidated in Alfalfa mosaic virus coat protein expressed in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res* 1993;2(5):277-85.
119. Maiss E, Koenig R, Lesemann DE. Heterologous encapsidation of viruses in transgenic plants and in mixed infections. In Jones DD (Ed.). *Proceedings of the 3rd International Symposium*, Monterey, California, USA, 13-16 November. 1994. p.129-39.
120. Gonsalves D, Fuchs M, Klas F, Tennant P. Field assessment of risks when using transgenic papayas, cucurbits and tomatoes expressing viral coat protein genes. In Jones DD (Ed.). *Proceedings of the 3rd International Symposium*, Monterey, California, USA, 13-16 November. 1994. p.117-27.
121. Buzkan N, Minafra A, Saldarelli P, Castellano A, Dell'Orco M, Martelli GP, Golles R, Machado ML da C. Heterologous encapsidation in non-transgenic and transgenic *Nicotiana* plants infected by Grapevine viruses A and B. *J Plant Pathol* 2001;83(1):37-43.
122. Prins M, Liamer M, Noris E, Schibert J, Wassenegger M, Tepfer M. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol* 2008;9(1):73-83.
123. Jacquet C, Ravelonandro M, Dunez J. High resistance and control of biological risks in transgenic plants expressing modified plum pox virus coat protein. *Acta Virol* 1998;42(4):235-7.
124. Varrelmann M, Maiss E. Mutations in the coat protein gene of Plum pox virus suppress particle assembly heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* 2000;81(3):567-76.
125. Turturo C, Friscina A, Gaubert S, Jacquemond M, Thompson JR, Tepfer M. Evaluation of potential risks associated with recombination in transgenic plants expressing viral sequences. *J Gen Virol* 2008;89(1):327-35.
126. Falk BW, Bruening G. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? *Science* 1994;263:1395-6.
127. Boyer JC, Morch MD, Haenni AL. Can plant viruses exchange genetic material? In: Grunberg-Manago M, Clark BFC, Zachau JG (Ed.). *Evolutionary tinkering in gene expression*. New York and London Plenum Press; 1989. (NATO ASI series 169). p. 175-92.
128. Garcia-Arenal F, Fraile A, Malpica JM. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* 2001;39:157-86.
129. Gibbs MJ, Cooper JI. A recombinational event in the history of luteoviruses probably induced by base-pairing between the genomes of two distinct viruses. *Virology* 1995;206(2):1129-32.
130. Lecoq H, Bourdin D, Wipf-Scheibel C, Bon M, Lot H, Lemaire O, Herrbach E. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathol* 1992;41(6):749-61.
131. Tomassoli L, Meneghini M. First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Italy. *Plant Pathol* 2007;56(4):720.
132. Smith GR, Borg Z, Lockhart BEL, Braithwaite KS, Gibbs MJ. Sugarcane yellow leaf virus: a novel member of the Luteoviridae that probably arose by inter-species recombination. *J Gen Virol* 2000;81(7):1865-9.
133. Moonan F, Molina J, Mirkov TE. Sugarcane yellow leaf virus: an emerging virus that has evolved by recombination between Luteoviral and Poleroviral ancestors. *Virology* 2000;269(1):156-71.
134. Saunders K, Stanley J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 1999;264(1):142-52.

135. Briddon RW, Mansoor S, Bedford ID, Planner MS, Saunders K, Stanley J, Zafar Y, Malik KA, Markham PG. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* 2001;285(2):234-43.
136. Tepfer M. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu Rev Phytopathol* 2002;40:467-91.
137. Greene AE, Allison RF. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 1994;263:1423-5.
138. Jakab G, Vaistji EE, Droz E, Manoe P. Transgenic plants expressing viral sequences create a favorable environment for recombination between viral sequences: In: Tepfer M, Balazs E (Ed.). *Virus-resistant transgenic plants: potential ecological impact*. Heidelberg: INRA-Springer; 1997. p. 45-51.
139. Lei WanLi, Fang RongXiang, Zhang GuoHua, Chen XiaoYing, Zhang XiaoQin. Recombination with coat protein transgene in a complementation system based on Cucumber mosaic virus (CMV). *Science in China Series C - Life Sciences* 2001;44(3):263-73.
140. Vigne E, Bergdoll M, Guyader S, Fuchs M. Population structure and genetic diversity within Grapevine fanleaf virus isolates from a naturally infected vineyard: evidence for mixed infection and recombination. *J Gen Virol* 2004;85(8):2435-45.
141. Moury B, Desbiez C, Jacquemond M, Lecoq H. Genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molecular epidemiology. *Adv Virus Res* 2006;67(1):49-87.
142. Aaziz R, Tepfer M. Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J Gen Virol* 1999;80(6):1339-46.
143. Gerlach WL, Llewellyn D, Haseloff J. Construction of a plant disease resistance gene using satellite RNA of Tobacco ringspot virus. *Nature* 1987;328:802-5.
144. Zaccomer B, Cellier F, Boyer JC, Haenni AL, Tepfer M. Transgenic plants to express genes including the 3' untranslated region of the Turnip yellow mosaic virus (TYMV) genome are partially protected against TYMV infection. *Gene* 1993;136(1-2):87-94.
145. Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 1993;5(12):1749-59.
146. Fagard M, Vaucheret H. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000;51:167-94.
147. Covey SN, Al-Kaff, NS. Plant DNA viruses and gene silencing. *Plant Mol Biol* 2000;43(2/3):307-22.
148. Rao HongYu, Huang MinRen, Wang MingXiu. The silencing of transgenes in transgenic plants. *J Nanjing Forestry University*. 2000;24(3):56-60.
149. Dietzgen RG, Mitter N. Transgenic gene silencing strategies for virus control. *Australasian Plant Pathol* 2006;35(6):605-18.
150. Pang S-Z, Jan F-J, Carney K, Stout J, Tricoli DM, Quemada HD, Gonsalves D. Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant J* 1996;9(6):899-909.
151. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB. A viral suppressor of gene silencing in plants *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(22):13079-84.
152. Kasschau KD, Carrington JC. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* 1998;95(4):461-70.
153. Mitter N, Sulistyowati E, Graham MW, Dietzgen RG. Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends Plant Sci* 2001;6(6):246-7.

154. Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyan J. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 2002;21(12):3070-80.
155. Mitsuhashi I, Shirasawa-Seo N, Iwai T, Nakamura S, Honkura R, Ohashi Y. Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants: possible mechanism for noninheritance of the silencing. *Genetics* 2002;160(1):343-52.
156. Thomas PE, Hassan S, Kaniewski WK, Lawson EC, Zalewski JC. A search for evidence of virus/transgene interactions in potatoes transformed with the *Potato leafroll virus* replicase and coat protein genes. *Mol Breed* 1998;4(5):407-17.
157. Thomas PE, Lawson EC, Zalewski JC, Reed GL, Kaniewski WK. Extreme resistance to *Potato leafroll virus* in potato cv. Russet Burbank mediated by the viral replicase gene. *Virus Res* 2000;71(1-2):49-62.
158. Jørgensen B, Albrechtsen M. Stability of RNA silencing-based traits in potato after virus infection. *Mol Breed* 2007;19(4):371-6.
159. Bartsch D, Brand U. Saline soil condition decreases rhizomania infection of *Beta vulgaris*. *J Plant Pathol* (1998);80(3):219-23.
160. Bartsch D, Lehnen M, Clegg J, Pohl-Orf M, Schuphan II, Ellstrand NC. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Mol Ecol* 1999;8(10):1733-41.
161. Fénart S, Arnaud JF, De Cauwer I, Cuguen J. Nuclear and cytoplasmic genetic diversity in weed beet and sugar beet accessions compared to wild relatives: new insights into the genetic relationships within the *Beta vulgaris* complex species. *Theor Appl Genet* 2008;116(8):1063-77.
162. Arnaud JF, Fénart S, Godé C, Deledicque S, Touzet P, Cuguen J. Fine-scale geographical structure of genetic diversity in inland wild beet populations. *Mol Ecol* 2009;18(15):3201-15.
163. Andersen NS, Siegismund HR, Meyer V, Jørgensen RB. Low level of gene flow from cultivated beets (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) into Danish populations of sea beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (L.) Arcangeli). *Mol Ecol* 2005;14(5):1391-405.
164. Bartsch D, Cuguen J, Biancardi E, Sweet J. Environmental implications of gene flow from sugar beet to wild beet: current status and future research needs. *Environ Biosafety Res* 2003;2(2):105-15.
165. Spencer LJ, Snow AA. Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 2001;86(6):694-702.
166. Fuchs M, Chirco EM, Gonsalves D. Movement of coat protein genes from a commercial virus-resistant transgenic squash into a wild relative. *Environ Biosafety Res* 2004;3(1):5-16.
167. Fuchs M, Chirco EM, McFerson JR, Gonsalves D. Comparative fitness of a wild squash species and three generations of hybrids between wild x virus-resistant transgenic squash. *Environ Biosafety Res* 2004;3(1):17-28.
168. Quemada H, Strehlow L, Decker-Walters DS, Staub JE. Population size and incidence of virus infection in free-living populations of *Cucurbita pepo*. *Environ Biosafety Res* 2008;7(4):185-96.
169. Jørgensen RB, Hauser T, D'Hertefeldt T, Andersen NS, Hooftman D. The variability of processes involved in transgene dispersal-case studies from Brassica and related genera. *Environ Sci Pollut Res Int* 2009;16(4):389-95.
170. Raybould A, Cooper I. Tiered tests to assess the environmental risk of fitness changes in hybrids between transgenic crops and wild relatives: the example of virus resistant *Brassica napus*. *Environ Biosafety Res* 2005; 4(3):127-40.
171. Tang G, Song W, Zhou W. Gene flow and its ecological risks of transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 2005;16(12):2465-8.

172. Raybould AF, Clarke RT. Defining and measuring gene flow. *Proceedings of the Symposium Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. Keele 12-14 April 1999. Farnham, UK: British Crop Protection Council; 1999; p. 41-8.
173. Cooper, JI. The hazard of ecological release in wild relatives of transgenic TuMV-tolerant brassicas. *The 8th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*. Montpellier, France, 26-30 September, 2004. Saskatoon, Canada: International Society for Biosafety Research; 2004. p. 50-2.
174. Solomon-Blackburn RM, Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 2001;86:17-35.
175. Ordon F, Perovic D, Habekuss A, Krämer I, Hariri D, Guilleroux M, Weyen J, Förster J, Schondelmaier J, Devaux P, Feuerhelm D, Stein N, Winter A, Azhaguvel P, Graner A, Friedt W. Molecular breeding for virus resistance in cereals. *Options Méditerranéennes, Series A* 2008;81:153-7.
176. Munger HM. Breeding for viral resistance in cucurbits. In: Kyle MM (Ed.). *Resistance to viral diseases of vegetables: genetics and breeding*. Portland: Timber Press; 1993. p. 8-43.
177. Ho Mae Wan, Ryan A, Cummins J. Cauliflower mosaic viral promoter: a recipe for disaster? *Microb Ecol Health Dis* 1999;11(4):194-7.
178. Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DA, Christou P. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant J* 1999;17(6):591-601.
179. Vlasak J, Smahel M, Pavlik A, Pavingerova D, Briza J. Comparison of hCMV immediate early and CaMV 35S promoters in both plant and human cells. *J Biotechnol* 2003;103(3):197-202.
180. Tepfer M, Gaubert S, Leroux-Coyau M, Prince S, Houdebine LM. Transient expression in mammalian cells of transgenes transcribed from the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Environ Biosafety Res* 2004;3(2): 91-7.
181. Myhre MR, Fenton KA, Eggert J, Nielsen KM, Traavik T. The 35S CaMV plant virus promoter is active in human enterocyte-like cells. *Eur Food Res Technol* 2006;222(1/2):185-93.
182. Bishop JO, Smith P. Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. *Mol Biol Med* 1989;6(4):283-98.
183. Hull R, Covey SN, Dale P. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microb Ecol Health Dis* 2000;12(1):1-5.
184. Broadbent L. *Investigation of virus diseases of brassica crops*. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1957.
185. Hull R, Covey SN. Characterization of cauliflower mosaic virus DNA forms isolated from infected turnip leaves. *Nucleic Acids Res* 1983;11(6):1881-95.
186. Morel J-B, Tepfer M. Pour une évaluation scientifique des risques: le cas du promoteur 35S. *Biofutur* 2000;201(1):28-35.
187. Fuchs M, Gonsalves D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu Rev Phytopathol* 2007;45:173-202.
188. Hsieh YT, Pan TM. Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial diversity. *J Agric Food Chem* 2006; 54(1):130-7.
189. Sheu C, Wu CY, Chen SC, Lo CC. Extraction of DNA from soil for analysis of bacterial diversity in transgenic and nontransgenic papaya sites. *J Agric Food Chem* 2008;56(24):11969-75.



190. Wei XD, Zou HL, Chu LM, Liao B, Ye CM, Lan CY. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities. *J Environ Sci (China)* 2006;18(4):734-40.
191. MorroniM, Thompson JR, Tepfer M. Analysis of recombination between viral RNAs and transgene mRNA under conditions of high selection pressure in favour of recombinants. *J Gen Virol* 2009;90(11):2798-807.
192. Lin ChihHui, Sheu Fuu, Lin HsinTang, Pan TzuMing. Allergenicity assessment of genetically modified cucumber mosaic virus (CMV) resistant tomato (*Solanum lycopersicon*). *J Agric Food Chem* 2010;58(4):2302-6.
193. Fermín G, Keith RC, Suzuki JC, Ferreira SA, Gaskill DA, Pitz KA, Manshardt RM, Gonsalves D, Tripathi S. Allergenicity assessment of the Papaya ringspot virus coat protein expressed in transgenic Rainbow papaya. *J Agric Food Chem* 2011;59(18):10006–12.
194. Di Carli M, Villani ME, Bianco L, Lombardi R, Perrotta G, Benvenuto E, Donini M. Proteomic analysis of the plant-virus interaction in Cucumber mosaic virus (CMV) resistant transgenic tomato. *J Proteome Res* 2010; 9(11):5684-97.

## 14. COESISTENZA TRA COLTURE TRANSGENICHE, CONVENZIONALI E BIOLOGICHE

L'approvazione della coltivazione di nuove colture geneticamente modificate ha innescato un dibattito sulla coesistenza tra le diverse forme di agricoltura (1-7).

La coesistenza può essere definita come la capacità dell'agricoltore di compiere una scelta pratica per ottenere produzioni che rispondano a criteri legali e/o a standard contrattuali di purezza.

In Italia, l'opposizione al transgenico sostiene che ingenti danni verrebbero dall'adozione delle coltivazioni transgeniche anche ai prodotti DOP (Denominazione d'Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta) indipendentemente dal fatto che si tratti di prodotti vegetali o meno, o che le coltivazioni del transgenico siano effettuate con piante sessualmente incompatibili con quelle protette.

### 14.1. Pratiche nell'agricoltura tradizionale

Nel vivace dibattito concernente le PGM, si dimentica spesso che varietà differenti della stessa pianta sono convissute per generazioni e che la presenza avventizia (accidentale) è stata riconosciuta come una conseguenza casuale della coesistenza, che può essere minimizzata, ma non del tutto eliminata. Tutte le produzioni agricole commercializzate hanno qualche percentuale di presenza avventizia, le cui soglie sono riconosciute da standard volontari e leggi. Queste soglie hanno portato allo sviluppo di pratiche di coltivazione, raccolto e trasporto tali da minimizzare gli incroci, la ricrescita della pianta coltivata come spontanea e il mescolamento involontario (8). Le buone pratiche risultanti sono state sviluppate decenni fa per fornire semi della stessa purezza anche se provenienti da sistemi agricoli differenti. A questo proposito è interessante rilevare che esistono già filiere controllate, su base contrattuale tra agricoltori e imprese di trasformazione industriale, ad esempio per quanto riguarda gli alimenti per l'infanzia, l'orzo per la produzione della birra e il mais per la produzione dell'amido.

Negli USA, ad esempio, circa il 5% della superficie coltivata a mais è dedicata a varietà speciali (alto livello di amilasi, alto contenuto in oli, ecc.), mentre in Canada circa il 4% della superficie coltivata a colza è destinata alla colza ad alto contenuto di acido erucico per la produzione di olii industriali e alla varietà Nexera per la produzione di oli vegetali più salubri e stabili. Vi sono, perciò, filiere distinte per prodotti non GM che coesistono, da molti anni, con la filiera convenzionale, senza compromettere la purezza richiesta dalle varietà speciali.

Negli USA l'area destinata alla coltivazione del mais biologico è aumentata, tra il 1999 e il 2002 del 187%, in particolare in Minnesota, Iowa e Wisconsin, fino a raggiungere lo 0,4% della superficie coltivata a mais, mentre nello stesso periodo, negli stessi Stati, la superficie coltivata a mais GM aumentava del 270% fino a raggiungere il 36% del totale. Nonostante la preponderanza delle superfici coltivate tradizionalmente o con il transgenico, rispetto al mais biologico, non vi sono stati problemi di contaminazione. Dati analoghi si ottengono analizzando le superfici coltivate a soia. A fronte del quadro tracciato sopra, i dati attualmente disponibili indicano che le colture GM coesistono senza problemi economici e commerciali con le colture biologiche e convenzionali, anche perché negli USA la soglia di OGM permessa nel biologico è del 5%.

In Canada, invece, dove la soglia per il biologico è dello 0%, sebbene la superficie coltivata a colza (canola) biologica sia solo lo 0,04% del totale, è in corso un processo che un gruppo di agricoltori biologici del Saskatchewan ha tentato nei confronti dei produttori della colza resistente all'erbicida, affermando di non aver potuto vendere la propria produzione, per la presenza accidentale di colza transgenica. Sempre in Canada, esiste una filiera controllata per la colza ad alto contenuto di acido erucico (Colza HEAR), usata a scopi industriali. L'acido erucico è cardiotossico e rappresenta quindi un rischio se presente negli alimenti. I contratti per la coltivazione della colza a basso contenuto di acido erucico richiedono che siano usate sementi certificate prive di acido erucico, che le macchine agricole usate siano pulite e segregate e che vi sia una distanza d'isolamento dai campi coltivati con la varietà che contiene l'acido erucico. Tale distanza, ad esempio, è di 50 metri nel Regno Unito e di 100 m in Germania. La distanza, adottata in Germania, consente di avere lotti per l'alimentazione umana con meno dello 0,2% di colza HEAR (9). Nell'uso comune la presenza di acido erucico nell'olio di colza, destinato all'alimentazione umana, è tollerata se sotto al 2%.

In Europa, la coesistenza di mais transgenico con il biologico è stata valutata in Spagna. In questo Paese, tra il 1998 e il 2003 è stato coltivato il mais resistente agli insetti (Bt), varietà *Comba CB*, della Syngenta su una superficie di circa 25.000 ettari pari al 5% della superficie totale coltivata a mais che è pari a 460.000 ettari. Nel 2003, il Governo Spagnolo ha approvato per la coltivazione altre 5 varietà di mais transgenico e la superficie utilizzata ha raggiunto il 7% del totale. Agli agricoltori spagnoli è stato raccomandato di utilizzare delle zone rifugio, coltivate con mais non transgenico, pari al 20% della superficie coltivata, nel caso in cui la coltivazione superasse i 5 ettari. È stato, inoltre, raccomandato di piantare almeno 4 file di mais convenzionale tra il transgenico e altro mais "vulnerabile" come il mais biologico o quello che deve essere certificato libero da OGM. Tuttavia agli agricoltori non viene raccomandato di raccogliere separatamente le diverse filiere. L'esperienza spagnola dimostra che non vi sono problemi di coesistenza tra agricoltura transgenica e convenzionale, mentre non si possono trarre conclusioni per l'agricoltura biologica, essendo le superfici, coltivate a mais biologico, molto piccole (le stime parlano di 100-1.000 ettari).

Un altro esempio di filiera controllata è dato dalla coltivazione del grano perché, in Italia, le paste secche possono essere prodotte solo con grano duro. Tuttavia, è sempre possibile trovare, a causa di contaminazioni accidentali dopo il raccolto, piccole percentuali di grano tenero nelle partite di grano duro e viceversa. Per tale motivo produttori e trasformatori si sono accordati su una soglia massima di grano tenero nel grano duro del 3%. Questa soglia è stata poi ufficializzata dal DPR 9 febbraio 2001, n. 187: "Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari, a norma dell'articolo 50 della legge 22 febbraio 1994, n. 146" (*Gazzetta Ufficiale* n. 117 del 22 maggio 2001).

## 14.2. Aspetti regolatori

L'UE definisce la coesistenza come: "capacità degli agricoltori di operare una libera scelta tra agricoltura convenzionale, biologica o transgenica, nel rispetto degli obblighi legali materia di etichettatura e di norme di purezza" (10). Il Regolamento (CE) 1829/2003 e la raccomandazione della Commissione del 23 luglio 2003 costituiscono la base legale per la coesistenza nell'UE (10, 11). L'art. 43 di tale Regolamento affida agli Stati Membri il compito di adottare misure adeguate per evitare la presenza accidentale di materiale OGM in altri prodotti. Questi provvedimenti suggeriscono di non adottare misure di coesistenza che vadano oltre la soglia prevista per l'etichettatura dei prodotti contenenti OGM, pari allo 0,9%.

La maggior parte delle Regioni italiane vieta la coltivazione di PGM aderendo allo *European GMO-Free Regions Network* (<http://gmo-free-regions-nrw.de>).

Emerge dalla regolamentazione degli Stati europei che le distanze di isolamento previste per evitare la contaminazione così come le norme amministrative della coesistenza, e le norme per la responsabilità per le perdite economiche dovute al mescolamento accidentale sono un vero e proprio mosaico, come si evince dalle distanze di isolamento prescritte (Tabella 26).

**Tabella 26. Distanze di isolamento prescritta tra PGM e piante non GM**

<b>Stato Membro</b>	<b>Distanza d'isolamento tra PGM e piante non GM</b>
Austria	Non disponibile
Belgio	Mais: Fiandre 200 m; Vallonia 300-600 m.
Bulgaria	30 km
Ceca, Repubblica	Mais 70 m, o 35 file di mais convenzionale come barriera. Mais biologico 200 m, o 100 m e 50 file come barriera Patata 3-10 m. Patata biologica 20 m.
Danimarca	Mais 200 m. Barbabietola 50 m; 2000 m per le aree destinate alla produzione di seme. Patata 20 m.
Finlandia	Orzo, frumento e avena 0,5 m. Segale 300 m; 600 m per la segale biologica. Colza 200 m; 400 m per la colza biologica. Barbabietola, nessun isolamento. Patata 5-10 m. Erbe da foraggio 200 m.
Francia	Mais 50 m sia per il convenzionale che il biologico
Germania	Mais 150 m; 300 m per il biologico (distanze riducibili se gli agricoltori vicini sono d'accordo). In Brandeburgo e Sassonia, 800-1000 m dai rifugi della fauna selvatica.
Irlanda	Mais 50 m; 75 m per il biologico. Barbabietola 6 m; 9 m per il biologico. Patata 20 m; 30 m per il biologico e 40 per i campi dove si producono semi biologici. Frumento e orzo 6 m; 9 m per il biologico e 12 m per i campi dove si producono semi biologici.
Italia	Mais 200-1000 m Soia 50-200 m
Lettonia	Mais 200 m; 400 m per il biologico. Colza 4000 m; 6000 m per il biologico. Barbabietola 100 m; 300 m per il biologico. Patata 20 m; 100m per il biologico.
Lituania	Mais 200 m. Barbabietola 50 m. Patata 20 m.
Lussemburgo	Mais 800 m. Barbabietola 2000 m. Colza 3000 m.
Paesi Bassi	Mais 25 m; 250 per il biologico. Barbabietola 1,5 m; 3 m per il biologico. Patata 3 m; 10 per il biologico.

segue

continua

Stato Membro	Distanza d'isolamento tra PGM e piante non GM
Polonia	Mais 200/300 m. Barbabetola 100 m; 3000 m per la produzione di semi. Patata 50 m.
Portogallo	Mais 200 m; 300 m per il biologico.
Slovacchia	Mais 200 m; 300 per il biologico (può essere ridotto di 2 m per ogni fila tampone utilizzata). Barbabetola 50 m. Colza 400 m (può essere ridotto di 2 m per ogni fila tampone utilizzata). Patata 20 m.
Slovenia	Non disponibile
Spagna	Mais 50 m; 300 m per la produzione di sementi. Le distanze non sono necessarie se le prime 4 file del mais convenzionale vicino sono OGM o se il mais vicino ha un diverso periodo di fioritura
Svezia	Mais 25 m se da seme; 15 m se da silos; la distanza raddoppia se il mais contiene più di un transgene. Patata 2 m.
Regno Unito	Mais da foraggio 80 m. Mais da granella 110 m. Colza 35 m.
Romania	Mais 200 m.
Ungheria	Mais 400-800 m.
Svizzera	Moratoria in atto
Estonia, Malta, Cipro	Non hanno ancora stabilito norme in materia

### 14.3. Aspetti economici

Gli unici agenti in grado di identificare i prodotti transgenici sono i produttori di semi e gli agricoltori che decidono di usarli. Un agricoltore che non usa semi GM non ha modo di sapere se i semi che vuole piantare siano transgenici o meno. È ragionevole pensare che lo stesso problema riguardi il consumatore di un prodotto agricolo trasformato o meno. Nasce, quindi, il problema di assicurare la scelta dell'agricoltore per il tipo di produzione desiderato a fronte della possibilità della presenza avventizia (non intenzionale) delle PGM in produzioni non GM e viceversa. Questo problema è legato anche alle scelte del consumatore che potrà scegliere tra alimenti GM e alimenti non GM, non solo sulla base di un sistema di tracciabilità ed etichettatura efficace, ma anche sulla base di un'agricoltura capace di offrire diversi tipi di prodotti.

I Ministri dell'Agricoltura degli Stati Membri dell'UE, riconoscendo la difficoltà di assicurare lo 0% di contaminazione, hanno stabilito, nel 2007, delle soglie di tolleranza per la presenza accidentale, o tecnicamente non evitabile, di materiale GM autorizzato in alimenti. La soglia di tolleranza è stata fissata nello 0,9% e si applica sia ai prodotti dell'agricoltura OGM e convenzionale che all'agricoltura biologica; il che significa che un prodotto biologico con un contenuto accidentale inferiore allo 0,9% di transgenico, può ancora essere etichettato come biologico. Questa soglia è priva di significato scientifico, perché essendo le PGM valutate come sicure per la salute umana e per l'ambiente prima dell'immissione in commercio, la soglia di tolleranza non è correlata a problemi di sicurezza. Invece, la soglia riflette un equilibrio politico tra la possibilità di scelta del consumatore e l'attendibilità dei metodi d'analisi, per i quali più bassa è la soglia, più grande è l'errore analitico. La soglia rispecchia anche le richieste

confliggenti delle società sementiere e agro-alimentari di tenerla alta e quella dei gruppi ambientalisti e dei consumatori di tenerla la più bassa possibile. Quando la soglia di tolleranza viene superata, il prodotto mischiato dovrà, nell'UE, essere etichettato come contenente un organismo geneticamente modificato.

Un prodotto contenente tracce di PGM potrebbe spuntare prezzi di mercato più bassi, soprattutto nel caso di prodotti biologici, ma anche nel caso di prodotti convenzionali, a causa del valore di mercato più alto per i prodotti biologici. Il danno economico può essere aggravato dalla perdita della certificazione biologica, che preclude l'accesso a questo segmento di mercato. Nel caso di prodotti convenzionali, l'etichettatura PGM può influenzare l'accettabilità del mercato se il consumatore preferisce i prodotti senza OGM. La coesistenza si estende per l'agricoltore dalla fattoria al primo punto di vendita (es. il silo elevatore), per cui tutto ciò che è venduto dall'agricoltore deve rispondere alle norme di etichettatura quando arriva al primo punto di vendita.

I problemi economici della coesistenza sono stati esaminati sotto diversi aspetti: dalle misure per rimanere sotto alle soglie di tolleranza (5, 6, 8, 12-16); alla fattibilità e ai costi di attuare tali misure (5, 17-20); ai costi di separazione tra le colture e alla potenziale perdita di reddito nel caso di mescolamento accidentale dei prodotti (21-23); ai costi della coesistenza (24, 25).

La coesistenza acquista significato solo se nella comunità degli agricoltori "coesistono" due diversi incentivi economici; se uno di essi manca, non esiste un problema di coesistenza. Un agricoltore deciderà di piantare PGM solo se i benefici derivanti da questa coltura eccedono i costi d'adozione delle misure di coesistenza. In qualunque sistema di conservazione dell'identità (purezza delle sementi, certificazione biologica), gli agricoltori che vogliono preservare la qualità di un prodotto specifico sono responsabili dell'adozione delle misure necessarie. Al contrario, nell'UE, gli agricoltori che coltivano piante non GM, non hanno alcun obbligo di adottare misure di coesistenza che sono invece responsabilità di chi coltiva PGM. Tuttavia gli agricoltori che coltivano piante non GM, potrebbero avere un incentivo economico ad adottare misure di coesistenza se sperano di ricevere un premio economico per i loro prodotti.

I sistemi, adottati dagli Stati Membri, e sintetizzati nella Tabella 27, impongono all'agricoltore che voglia usare PGM di adottare una serie di regole *ex ante* prima di andare in campo e di eventualmente dover affrontare dei costi di responsabilità *ex post*. Le regole *ex ante* adottate dagli Stati Membri richiedono nella maggioranza dei casi che l'agricoltore riceva un'autorizzazione ufficiale prima di piantare PGM. L'Austria, e le linee guida delle Regioni italiane richiedono che ogni singolo campo e pianta GM siano autorizzate dalle autorità locali. Ungheria, Irlanda e Slovacchia sono orientate verso procedure simili. La Repubblica Ceca invece non ha in pratica regole *ex ante*. La maggior parte degli Stati Membri prevede una registrazione delle aree utilizzate in registri pubblici, l'informazione agli agricoltori vicini e ai proprietari dei terreni e la tenuta di un apposito quaderno di campagna. Ungheria e Slovacchia prevedono anche il consenso scritto degli agricoltori vicini (26-28).

In generale, le procedure di autorizzazione, e i doveri di registrazione e informazione, trasferiscono il diritto di decisione dall'agricoltore alle autorità pubbliche, in netto contrasto con la libertà di scelta sostenuta dalla Commissione europea, e impongono dei costi notevoli all'agricoltore stesso. Anche le distanze minime di separazione, previste dai differenti Stati Membri, imporranno dei costi di transazione diversi secondo la dimensione della fattoria e del numero dei vicini, più piccola è la fattoria, maggiori sono i costi di transazione per ottenere il consenso dei vicini (5). Tuttavia, le distanze minime di separazione possono ridurre in maniera significativa i costi di responsabilità *ex post*. A questo proposito, il Lussemburgo richiede che l'agricoltore copra con un'assicurazione appropriata gli eventuali danni derivanti ai vicini dal co-mescolamento. Ad oggi, non vi sono società di assicurazione che negozino contratti in materia.

Tabella 27. Obblighi *ex ante* che regolano la coesistenza negli Stati Membri della UE\*

Obblighi <i>ex ante</i>	Adottati o in fase di adozione
<b>1. Procedure di approvazione</b>	
1.1 Divieto di coltivazione in aree specifiche	AT, DE, HU, LU, PT, SK
1.2 Approvazione di ogni campo	AT, HU, IE, IT, SK
1.3 Formazione obbligatoria pagata dall'agricoltore OGM	DK, HU, IT, SK
1.4 Consensi obbligatori del proprietario e dei vicini	AT, BE, HU, LU, SK
<b>2. Doveri di registrazione e informazione</b>	
2.1 Registrazione delle aree in basi di dati pubbliche	AT, DE, DK, EE, LV, LT, SK
2.2 Registrazione delle aree in basi di dati pubbliche, ad accesso ristretto	PT, ES, FI, FR, HU, IT, NL, PL
2.3 Informazione agli agricoltori vicini e ai proprietari	AT, DK, HU, NL, PL, SK
2.4 Tenuta di un apposito registro	CZ, DE, DK, ES, FR, HU, IT, NL, PL, PT
<b>3. Misure di segregazione</b>	
3.1 Distanze minime richieste	AT, CZ, DE, DK, ES, FR, HU, IT, NL, PL, SK
3.2 Zone tampone	AT, CZ, ES, FR, PL, SK
3.3 Intervalli di rotazione	EE, LT, SE
<b>4. Obblighi assicurativi</b>	
4.1 Fondo di compensazione pagato dall'agricoltore OGM in base agli ettari coltivati integrato da un sostegno governativo	DK
4.2 Fondo di compensazione pagato dalle parti private interessate	IE, FR, NL, PT, UK
4.3 Obbligo di accensione di un'assicurazione contro i danni	AT, IT, LU

\*Rielaborata da 26.

AT: Austria; BE: Belgio; CZ: Repubblica ceca; DK: Danimarca; DE: Germania; EE: Estonia; ES: Spagna; FI: Finlandia; FR: Francia; HU: Ungheria; IE: Irlanda; IT: Italia; LV: Lettonia; LT: Lituania; LU: Lussemburgo; NL: Paesi Bassi; PL: Polonia; PT: Portogallo; SE: Svezia; SK: Slovacchia; UK: Regno Unito

Altri Stati hanno previsto l'istituzione di fondi di compensazione. In Danimarca, l'agricoltore che pianta PGM deve contribuire ad un fondo di compensazione, calcolato sulla superficie utilizzata, per perdite economiche che non possono essere attribuite alla sua responsabilità. Nei Paesi Bassi, al fondo di compensazione contribuiscono tutte le figure interessate: agricoltori che piantano PGM, agricoltori biologici, industrie sementiere, industrie biotecnologiche (29).

Nei costi *ex post* occorre considerare anche i costi delle analisi molecolari volte a dimostrare un eventuale mescolamento tra PGM e piante non GM ai fini di una rivendicazione di danno. In tutte le giurisdizioni tali costi devono essere sostenuti da chi rivendica il danno, fermo restando il riconoscimento degli stessi da parte dei tribunali nel caso che il danno rivendicato sia riconosciuto. Nel caso dei transgenici, alcuni Paesi hanno attribuito all'agricoltore PGM l'onere della prova (Tabella 28). I differenti sistemi di responsabilità adottati a livello europeo possono diventare un problema nel caso di contaminazione transfrontaliera. È vero che la Corte di Giustizia Europea si è sempre attenuta al principio del diritto romano *lex loci delicti commissi*, ma è chiaro che gli agricoltori che operano vicino ai confini dovranno tener conto delle prescrizioni, in termini di distanze, dello Stato limitrofo.

Tecnicamente il controllo dell'assenza/presenza di PGM richiede la separazione delle filiere, anche se la cosiddetta tolleranza zero per le PGM è scientificamente inconcepibile e tecnicamente irrealizzabile. La separazione degli ingredienti, infatti, può essere falsata dal flusso genico tra coltivazioni, il mescolamento accidentale dei lotti durante la conservazione, il trasporto e la produzione. L'agricoltore deve separare e identificare i campi di coltivazione e i lotti raccolti e la loro conservazione.

**Tabella 28. Responsabilità ex post che regolano la coesistenza negli Stati Membri dell'UE\***

<b>Obblighi ex post</b>	<b>Adottati o in fase di adozione</b>
<b>1. Responsabilità legale per danni</b>	
1.1 Responsabilità basata sul codice civile	CZ, ES, HU, SK
1.2 Responsabilità basata su colpa	AT, DK, FR, NL
1.3 Responsabilità stringente dell'agricoltore OGM	AT, DE, IE, PI, UK
1.4 Responsabilità congiunta	DE
<b>2. Prova del danno</b>	
2.1 Onere della prova a carico dell'agricoltore OGM	AT, DE, FR, IT**
2.2 Onere della prova a carico di chi si ritiene danneggiato	IE, UK
<b>3. Sanzioni</b>	
3.1 Multe per omissione degli obblighi ex ante	AT, CZ, ES, FR, IT, LV, LT, LU, PL, PT, SK

\*Rielaborata da 26.

\*\*Per l'Italia, dove non esistono misure di coesistenza approvate, si è fatto riferimento al documento "Linee guida per le normative regionali di coesistenza tra colture convenzionali, biologiche e transgeniche".

**AT:** Austria; **CZ:** Repubblica ceca; **DK:** Danimarca; **DE:** Germania; **E:** Irlanda; **ES:** Spagna; **FR:** Francia; **HU:** Ungheria; **IT:** Italia; **LV:** Lettonia; **LT:** Lituania; **LU:** Lussemburgo; **NL:** Paesi Bassi; **PL:** Polonia; **PT:** Portogallo; **SK:** Slovacchia; **UK:** Regno Unito

Questa organizzazione richiede una separazione degli strumenti utilizzati, ed è per questo molto costosa e poco flessibile. Richiede, inoltre, un accordo condiviso da tutti i componenti della filiera e una delega di governo del sistema ad un organismo centralizzato che abbia una qualche forma di autorità su tutti i partner coinvolti (es. una catena di supermercati, un'organizzazione per l'agricoltura biologica, organizzazioni di agricoltori, società sementiere). L'efficienza del sistema richiede dei controlli appropriati su tutti i punti della filiera, a partire dal materiale grezzo.

A causa di questa natura "nascosta" delle PGM, il metodo più efficace per garantire il sistema informativo è la certificazione di tutta la filiera agro-alimentare da parte di un ente certificatore terzo. Il sistema fino a questo momento ha lavorato solo indicando la tracciabilità d'origine o la tracciabilità di processo. Ora, con le PGM diventa necessario applicare entrambe le tracciabilità. Il livello dei costi per assicurare la coesistenza è determinato, perciò, anche dai meccanismi adottati per evitare il mescolamento con PGM ed eliminare i lotti mescolati. Accanto ai costi di separazione dobbiamo calcolare i costi di garanzia per le procedure informative che assicurino il consumatore che l'identità non OGM sia preservata nella filiera.

Anche il completo dispiegamento di tutte le misure sopra indicate non tutela completamente il consumatore, perché questi non ha modo di accertare se l'informazione ricevuta dall'etichettatura è accurata. Infatti, l'informazione tra venditore e consumatore può essere asimmetrica a causa di comportamenti opportunistici, il venir meno del coordinamento necessario tra stadi di produzione e la difficoltà dei controlli. La domanda da porsi prima di adottare le misure sintetizzate nelle Tabelle 26-28 è perciò: "quale organizzazione economica è capace di mantenere separate le filiere OGM da quelle non OGM?"

## 14.4. Aspetti tecnico-scientifici

Gli studi, pur numerosissimi, sulla coesistenza di piante transgeniche e convenzionali, adottano piani sperimentali diversi e pongono l'accento, comunemente, sul problema del flusso genico. È possibile, tuttavia da tali studi ricavare un'indicazione sui fattori significativi per la valutazione dei problemi tecnico-scientifici posti dalla coesistenza.



La presenza accidentale di una coltura in un'altra o di materiale indesiderato può essere dovuta ad una molteplicità di fattori:

- impurezze nelle sementi;
- dispersione del polline tra particelle limitrofe, a distanze più o meno grandi in funzione della specie;
- mescolanza di colture, durante il raccolto o nelle operazioni che seguono il raccolto, dovuto all'uso comune delle attrezzature;
- piante spontanee prodotte dalle sementi che rimangono nel terreno;
- metodi di trasporto e di trasformazione.

Questo complesso di situazioni pratiche rende inevitabile che i prodotti agricoli commercializzati abbiano una presenza accidentale di materiale estraneo.

Le sementi, utilizzate in Italia, sono ottenute sotto il controllo del Centro di Sperimentazione e Certificazione delle Sementi (SCS), afferente al Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), attraverso una serie di passaggi dal materiale di base al seme certificato. Un seme certificato è un seme geneticamente distinguibile, uniforme e stabile, prodotto in condizioni di moltiplicazione verificate. Durante la produzione è necessario che siano mantenute delle distanze minime tali da impedire il rischio di mescolanze con semi di altre specie od altre varietà della stessa specie al momento del raccolto. Al termine della produzione, le sementi vengono analizzate, se necessario pulite, ed etichettate.

Il seme certificato garantisce all'agricoltore:

- purezza della varietà;
- standard minimi legali per la purezza tecnica e il livello di germinabilità;
- standard minimi legali per la presenza di semi di altre specie;
- massimo contenuto d'umidità.

Analogamente a quanto avviene per le sementi, sono prefissate anche le soglie di tolleranza massima per i materiali contaminanti il prodotto finale da destinare al consumo. Tali contaminanti possono essere costituiti da sementi di altre colture, da materiale erbaceo, da erbe infestanti, insetti e da sporcizia; la soglia di contaminazione ammessa, ad esempio dai disciplinari della Camera di Commercio di Milano, è del 3% per il mais e del 2% per il grano. Si comprende bene come, anche se la contaminazione fosse dovuta solamente ai semi di un'altra coltura, magari non commestibile, i contratti commerciali per prodotti sia dell'agricoltura biologica sia convenzionale, tollerano contaminazioni ben al disopra dello 0,9% fissato per le PGM.

Nessuna operazione di raccolto rimuove completamente la pianta coltivata dal terreno. È stato stimato che il 5% dei semi/tuberi rimanga nel terreno dopo il raccolto. Nel caso di semi piccoli come quelli della colza, si trovano nei terreni coltivati da 5.000 a 10.000 semi per metro quadrato. Una certa dispersione di semi, sia prima sia durante il raccolto è praticamente inevitabile; nella maggioranza dei casi i semi sono dispersi vicino alla pianta coltivata. I semi dispersi possono sopravvivere a lungo nel suolo in dipendenza dalle condizioni climatiche dell'anno e dalla temperatura e umidità del suolo stesso. I semi rimasti nel terreno hanno il potenziale per germinare in seguito, alla presenza delle giuste condizioni di umidità e temperatura. Possono, invece, diventare dormienti se esposti a stress, come la mancanza d'acqua e la bassa temperatura, od esposti al buio, mediante aratura. Misure di laboratorio indicano che i semi possono persistere a lungo nel terreno (Tabella 29).

Tuttavia, nella pratica, il numero dei semi, che rimangono vitali nel terreno, è limitato dal fatto che, nei nostri climi, molti semi germinano in autunno e le pianticelle risultanti non resistono alle temperature invernali. Inoltre, il controllo delle spontanee è generalmente effettuato dall'agricoltore come buona pratica agronomica.

**Tabella 29. Sopravvivenza massima osservata (anni) dei semi nel suolo**

Sopravvivenza	Pianta
<1 anno	Avena ( <i>Avena sativa</i> ), frumento ( <i>Triticum aestivum</i> ), mais ( <i>Zea mais</i> ), segale ( <i>Secale cereale</i> ), cipolla ( <i>Allium cepa</i> )
1-4 anni	Orzo ( <i>Hordeum vulgare</i> ), loglio ( <i>Lolium perenne</i> )
1- >10 anni	Loglio ( <i>Lolium multiflorum</i> ), erba medica ( <i>Medicago sativa</i> ), carota ( <i>Daucus carota</i> )
5- >20 anni	Colza ( <i>Brassica napus</i> ), barbabietola da zucchero e da foraggio ( <i>Beta vulgaris</i> ), trifoglio ( <i>Trifolium pratense</i> e <i>T. repens</i> ), sedano rapa ( <i>Apium graveolens</i> ), patata ( <i>Solanum tuberosum</i> )

Molti semi sulla superficie del terreno saranno mangiati dagli uccelli e altri animali o distrutti dall'attacco dei funghi. Vi sono poi semi che sopravvivono nel terreno per poche settimane (da 2 a 8) dopo il raccolto, come il riso (*Oryza sativa* e *O. glaberrima*). La persistenza dipende strettamente dalle pratiche agronomiche. Ad esempio, nel caso della colza, la sopravvivenza è del 60% se si ara il terreno subito dopo il raccolto, mentre scende sotto all'1%, dopo un mese, in assenza di aratura (30).

#### 14.4.1. Colza

La colza (*Brassica napus*) e la senape nera (*Brassica rapa*), in Italia, sono specie introdotte, distribuite dalla pianura al piano montano (1.000 m), inselvatichite negli incolti, come piante ruderali e infestanti. Sporadica, prevalentemente nel centro Italia, è invece *Brassica oleracea* dall'incrocio spontaneo della quale con *Brassica rapa*, si ritiene derivi la colza. L'incrocio, perciò, di *Brassica napus* con le specie selvatiche o inselvatichite è sempre possibile se vi è sovrapposizione dei periodi di fioritura. In particolare l'incrocio tra *Brassica napus* e *Brassica rapa* è capace di diventare permanente, a differenza dell'incrocio di *Brassica napus* con le specie selvatiche compatibili (1).

In Germania studi condotti su semi di colza transgenica hanno dato dei risultati contrastanti. Nel caso di una colza resistente al glufosinato d'ammonio, semi transgenici sono stati recuperati dal terreno 5 anni dopo la coltivazione (31). Nel caso di altre cultivar resistenti al glufosinato, la sopravvivenza dopo due anni dall'incorporazione nel suolo era minima, e comunque più bassa di quella di cultivar convenzionali usate come controllo (32). I semi transgenici recuperati dai campi erano vitali, solo se l'ultima coltivazione non era più vecchia di 5 anni, e non tutti i semi erano transgenici, a causa della segregazione  $F_2$ , dovuta alla natura ibrida dei semi stessi (33).

Nella varietà di colza, detta canola, coltivata in Canada, i ricacci di colza sono abbastanza frequenti (34), e altrettanto frequente è l'impollinazione incrociata tra varietà della stessa pianta (35) anche a distanze di 800 e 2.500 metri (36). Tanto è vero che, vi è stata una prevedibile diffusione del transgene nella canola, dopo l'adozione della canola resistente all'erbicida glifosato (Roundup Ready). Nel Canada occidentale, nel 2003, il 48% della canola coltivata era resistente a questo erbicida. Inoltre, gli agricoltori fanno un uso estensivo del glifosato in primavera per controllare le infestanti prima della semina. In questo modo si crea una forte pressione selettiva a favore dei ricacci di canola con il gene della resistenza al Roundup Ready. Questi ricacci hanno una fittezza migliore di quelli non resistenti, in presenza dell'erbicida, per cui la loro frequenza aumenterà rapidamente (37).

Nel Regno Unito, in uno studio durato tre anni, si è vista una diminuzione rapida della fecondazione incrociata all'aumentare della distanza; diminuzione seguita da una lunga coda,

dovuta più agli insetti impollinatori che al trasporto del polline da parte del vento. Vi era una forte variabilità della frequenza di fecondazione incrociata con la stagione, ma in un caso si è trovata fino a 26 km di distanza (38). Tuttavia, l'agente impollinatore non era il vento perché i fiori catturano il polline solo quando sono aperti controvento, infatti, i petali schermano completamente lo stigma. In generale fiori si aprono contemporaneamente disponendosi radialmente rispetto al gambo e in una posizione chiusa al vento prevalente.

Nel caso della colza il co-miscelamento tra PGM e piante non GM è strettamente dipendente dalla banca dei semi nel suolo, cioè dai semi vitali o dalle propagule presenti nel suolo e capaci di ricostituire le piante da cui derivano; mentre si può controllare la presenza di semi ibridi, presenti in quelli usati per la semina, semplicemente avendo l'accortezza di far germogliare i semi per due settimane prima della loro coltivazione, perché l'uniformità delle condizioni, necessarie per la germinabilità riduce la fittezza degli eventuali ibridi durante la coltivazione (39).

Inoltre, per ridurre le dimensioni della banca di semi presente nel suolo si può ricorrere alla zappatura tra le file di coltivazione (40) o ad un'aratura post raccolto dilazionata nel tempo (41, 42). Infatti, in assenza di semi nel suolo, la presenza di ricacci è effimera e transeunte (43).

#### 14.4.2. Barbabietola da zucchero/foraggio

La barbabietola è auto-incompatibile, impollinata dal vento e produce, con un periodo di fioritura lungo, una grande quantità di polline. In Italia, è necessario gestire efficacemente la coltivazione della barbabietola transgenica per la presenza di specie selvatiche sessualmente compatibili (*Beta maritima*).

La specie coltivata è una biennale che produce le radici, usate nel primo anno per la produzione, zucchero o foraggio, e nel secondo anno dei fiori e quindi dei semi. La pianta viene raccolta nel primo anno, prima che possa fiorire e produrre semi. In alcuni casi, però, in dipendenza dalla temperatura e dalla varietà usata, la pianta fiorisce anche nel primo anno, e se la fioritura non è strettamente controllata vi è la possibilità di flusso genico tra la specie coltivata (OGM o meno) e la specie selvatica, che fiorisce annualmente (44). In genere, gli agricoltori rimuovono a mano lo scapo florale, una volta formato, per evitare che lo zucchero accumulato nel tubero sia consumato per produrre i fiori, eliminando così una possibile fonte di incrocio dovuto al polline.

La specie selvatica produce una grande quantità di semi, invece del tubero, e la sua compatibilità fisiologica con la pianta coltivata favorisce la formazione d'ibridi, che rappresentano un problema nelle aree del sud della Francia e del nord Italia, dove sono prodotte le sementi usate in tutta Europa. Tuttavia, misure effettuate in campo aperto, sia in Germania (45) sia in Francia (46), hanno dimostrato che, in termini di coesistenza, il flusso genico tra piante transgeniche e piante coltivate non transgeniche rappresenta problema maggiore, che non quello tra piante transgeniche e la controparte selvatica. Inoltre, in Danimarca, si è visto che la biodiversità, sia in termini di flora sia di fauna, è più ricca nei campi di barbabietola transgenica rispetto ai campi coltivati tradizionalmente (47). In generale, la coesistenza nel caso della barbabietola riguarda i semi e non il tubero che può essere raccolto in modo da evitare il co-miscelamento tra PGM e piante non GM.

La soglia europea, per le impurezze che possono essere presenti nelle sementi di barbabietola, è lo 0,2%, il che significa l'introduzione potenziale di 200 semi di barbabietola selvatica per ettaro. La barbabietola selvatica ha potenzialmente una grande capacità di disperdere, nello spazio e nel tempo, la caratteristica transgenica, perché è molto competitiva, fiorisce prima di quella coltivata e i suoi semi possono persistere più a lungo nel suolo. Se il transgene si diffonde mediante un'infestazione della specie selvatica, questo fatto può compromettere la coesistenza per 10 anni a causa della persistenza dei semi nel terreno come

osservato dal progetto europeo *Sustainable Introduction of GMOs into European Agriculture* (SIGMEA) (descritto in <http://www6.inra.fr/sigma/Outcomes/3.-Environmental-impacts-of-GM-crops>).

### 14.4.3. Cereali

Le piante autogame, come il frumento, hanno una bassa frequenza d'incrocio e conseguente flusso genico, anche quando sono coltivate vicine (48-50). Tuttavia, tale flusso aumenta esponenzialmente al diminuire del numero di piante per m<sup>2</sup> (51). Il flusso genico può, invece, diventare significativo in caso di ricacci di piante transgeniche, dovuti alle coltivazioni precedenti, in ragione dell'emergenza temporale dei ricacci stessi e quindi dell'eventuale sincronia di fioritura con la varietà coltivata (52). Tutte le prove di campo hanno dimostrato che i semi di frumento, presenti nel terreno dopo il raccolto di giugno, danno origine a nuove piante da 14 a 15 mesi dopo il raccolto stesso, cioè in generale nel mese di settembre (53). Anche nella stagione successiva, la maggior parte dei ricacci emerge tra agosto e settembre. Il fenomeno è dovuto al fatto che i semi dei cereali richiedono una pausa temporale dopo la maturazione affinché possano germinare (54). Tale pausa temporale è molto variabile in dipendenza dalla varietà coltivata e dalle condizioni ambientali. Molto variabile è anche l'emergenza dei ricacci a seconda che i campi vengano arati o meno dopo il raccolto. In assenza di aratura, il numero dei ricacci è cinque volte maggiore rispetto all'aratura che seppellisce i semi nel terreno; però, più è profonda l'aratura, maggiore è la sopravvivenza dei semi.

Il successo nella gestione dei ricacci transgenici, vista la variabilità descritta sopra, dipenderà in larga misura dalla frequenza con cui il frumento transgenico viene ruotato con altre coltivazioni. Intervalli lunghi tra una coltivazione di frumento transgenico e l'altra ridurranno la probabilità di ricacci. Infatti, per controllare i ricacci, è stato suggerito un ciclo di 4 anni, ruotando con piante differenti come il mais e il girasole (55).

Anche nel caso dell'orzo il flusso genico tra piante vicine è basso (56), anche se i semi d'orzo, con una capacità di sopravvivenza nel suolo, fino a 4 anni, possono dare origine a ricacci, dilazionati nel tempo, capaci di potenziale flusso genico (53).

La coesistenza per i cereali richiede quindi una gestione accurata per evitare i ricacci.

### 14.4.4. Patata

La patata coltivata (*Solanum tuberosum*) è originaria del Sud America e non appartiene alla flora italiana, anche se in Italia vi sono alcune selvatiche, imparentate come l'erba morella (*Solanum nigrum*), di origine asiatica, e la morella rampicante (*Solanum dulcamara*), presenti in tutto il territorio, la prima in pianura e la seconda nei boschi ripariali.

La patata è propagata per via vegetativa con i tuberi. L'incrocio tra varietà gioca un ruolo solo nei processi di selezione per la produzione di semi. Inoltre, la patata è principalmente un'autoimpollinante e il flusso del polline, mediato dal vento o dagli insetti, è limitato a 5-10 m dal bordo della coltivazione; risultati confermati anche nel rilascio sperimentale della patata Amflora, nei quali l'incrocio era dello 0,7% a 1,5 m dalla pianta transgenica e zero a 5 m dalla stessa (1). L'incrocio tra patata GM e convenzionale non ha conseguenze immediate sul prodotto raccolto: solo se il seme così formato è capace di crescere e di riprodursi nella forma di tubero può originare del co-miscelamento per l'emergenza di ricacci in un raccolto successivo. I tuberi sono sensibili al freddo e non sopravvivono ad inverni rigidi. Il rischio veramente basso d'incrocio è tale da non richiedere distanze minime di separazione tra patate GM e patate non GM.

#### 14.4.5. Mais

Lo *European Coexistence Bureau* ha pubblicato le linee guida per assicurare, in Europa, la coesistenza del mais GM con il mais convenzionale e biologico (57). Il documento comunitario raccomanda distanze d'isolamento decrescenti all'aumentare della percentuale di comescolamento desiderata. Ad esempio, per mantenere la soglia comunitaria dello 0,9% propone un intervallo da 15 a 50 m per il consumo in chicchi e da 0 a 25 m per il consumo dell'intera pianta; essendo gli intervalli dovuti alle differenti condizioni climatiche delle aree europee di coltivazione del mais.

A causa del lungo periodo di domesticazione, il mais non può sopravvivere senza la cura dell'uomo. Inoltre, anche se i semi rilasciati nel terreno possono svernare e germinare nell'anno successivo, non può diventare un'infestante perché i ricacci hanno scarsa vitalità e raramente producono nuovi semi (58).

La necessità di sviluppare misure per la coesistenza ha generato un gran numero di studi sull'impollinazione incrociata tra campi di mais (59-67); studi analizzati da recenti rassegne (8, 68, 69). Tutti i dati riportati concordano con il fatto che a una distanza di 10-25 m l'impollinazione crociata si riduce in media da 0,35% a 0,235 e che a distanza di 50 m si riduce ulteriormente allo 0,19%. In base a questi risultati, si è concluso che una distanza di 40 m di terreno spoglio è sufficiente per contenere la presenza avventizia di mais GM sotto alla soglia legale di etichettatura (70).

Questi risultati hanno suggerito due strategie diverse per evitare ulteriormente l'incrocio indesiderato: la prima basata su zone tampone e la seconda basata su zone di scarto. Le zone tampone possono essere costituite da terreno incolto, da piante coltivate della stessa specie della PGM o da piante di specie diverse, tenendo conto del comportamento del polline di mais una volta rilasciato (71). Sulla base dei dati raccolti da esperimenti, effettuati in Europa, sono state raccomandate zone tampone di 20-30 metri per mantenere l'introggressione sotto la soglia di etichettatura (71). Tuttavia, per campi piccoli permane la limitazione pratica delle dimensioni necessarie della zona tampone che potrebbe rappresentare un'area troppo grande rispetto alla superficie dedicata alla coltivazione. Sarà praticamente impossibile mantenere l'introggressione al di sotto della soglia europea per un campo piccolo, situato a valle dei venti prevalenti, rispetto a campi donatori di polline molto grandi (5, 8, 9). Quando i campi di PGM e campi di piante non GM non sono adiacenti, l'effetto delle zone tampone potrebbe non essere evidente. Infatti, zone tampone, realizzate con piante di mais non GM, piantate intorno ai campi di mais GM, sono efficaci solo se le due coltivazioni sono adiacenti (5, 64, 66). Le zone tampone per le coltivazioni di mais GM, possono coincidere con le zone rifugio prescritte per il mais Bt, ad evitare l'insorgenza di resistenza alla piralide (72).

Se la zona tampone è costituita da piante non GM, raccolte separatamente ed etichettate e vendute come PGM, siamo in presenza di una zona di scarto. Le zone di scarto sono più efficaci delle zone tampone create intorno ai campi di PGM per delimitare l'introggressione (73). Della Porta *et al.* hanno verificato che 2 file di mais, non GM, usate come scarto, sono efficaci quanto 12 file, piantate come zona tampone intorno al campo di PGM. Analogamente, è stata proposta una scelta alternativa tra zone di scarto e zone tampone, secondo le dimensioni del campo donatore di polline e del campo ricevente (74). In Germania, lo scarto del raccolto, effettuato sui primi tre metri di mais non GM, riduceva il contenuto totale di PGM del 55% e lo scarto dei primi 6 metri del 71%, mentre ulteriori incrementi della zona scartata non davano altri benefici (67). Esperimenti di zone tampone con altre piante, come girasole e trifoglio, hanno dimostrato che queste non sono efficienti come il mais nel ridurre l'incrocio (65, 75). La diminuzione rilevante della fecondazione incrociata con la distanza è dovuta alla vitalità del polline. Infatti, al momento del rilascio avviene una selezione tra polline vitale e polline non vitale. Il polline

vitale, molto umido, è più pesante e si deposita rapidamente. Il polline non vitale è secco e più leggero per cui viene trasportato più lontano (76).

Un altro fattore cruciale nell'impollinazione tra cultivar diverse è la disponibilità di polline quando le setole (stili della pianta di mais) sono mature (14, 77). Il livello più alto d'incrocio si osserva quando l'intervallo temporale tra la fioritura del campo donatore di polline e campo ricevente non supera i 3 giorni (64, 78). Anche piccole differenze di ritardo della fioritura dell'ordine di 4-5 giorni possono ridurre l'incrocio del 25% (64). Un ritardo di fioritura di 4 giorni tra donatore e ricevente riduce il contenuto in OGM del campo ricevente sotto la soglia dello 0,9% (79). Una riduzione del 50% è causata da un ritardo di 6 giorni (64, 79), mentre al di sopra di 7 giorni di ritardo di fioritura l'incrocio è zero (61, 64, 80). Queste osservazioni potrebbero far pensare che un modo semplice di assicurare la coesistenza è di ritardare la semina o del mais GM o del mais non GM, ma in realtà le condizioni climatiche possono far sì che un ritardo di semina non si traduca automaticamente in un ritardo di fioritura. Infatti, almeno nel caso di semine precoci, un ritardo nella semina di 20 giorni si traduce in un ritardo di soli 3-5 giorni nella fioritura. Tuttavia, un ritardo nella semina di due settimane si traduce in una diminuzione netta della distanza alla quale l'incrocio tra mais donatore e mais ricevente scende a zero (81).

Poco significativo è il contributo dei ricacci alla dispersione dei transgeni, perché hanno scarso vigore, raramente producono pannocchie e impollinano le piante vicine con solo una frequenza dello 0,16% (82).

In conclusione, osservando delle regole minime di distanza d'isolamento, di fioritura asincrona e di gestione delle filiere di raccolto e post-raccolto, è possibile rimanere all'interno della soglia stabilita dall'UE, come dimostrato anche dall'analisi di 562 pubblicazioni dedicate alla dispersione dei transgeni del mais (83) e dai risultati del progetto europeo SIGMEA (*vedi* <http://www.inra.fr/sigma/Publications>).

Un problema particolare è posto dall'incrocio tra le varietà moderne di mais, ormai coltivato quasi dovunque, e le varietà locali (ecotipi) che sono differenti dalle cultivar moderne. Le varietà locali sono una risorsa genetica importante che deve essere preservata dall'incrocio sia con le varietà commerciali moderne sia con le varietà transgeniche. Tali varietà locali sono ancora coltivate in Italia sia per la preparazione di piatti tipici (come in Toscana con il Formenton Otto File Garfagnana o in Veneto con il caso del mais marano riscoperto grazie a una campagna promossa dai Ristoratori Scledensi e da parte dell'Istituto di maiscoltura di Lonigo) che per progetti nazionali e regionali di sostegno alla biodiversità (84-88). L'Unità di Ricerca per la Maiscoltura di Bergamo ha una collezione di 600 varietà locali italiane. Ad oggi, non è possibile valutare la superficie ad esse destinata, a fronte di più di 1 milione di ettari coltivati a mais convenzionale e circa 9000 ettari coltivati a mais biologico (83). Considerando le superfici coinvolte, il flusso genico non può che essere unidirezionale dagli ibridi moderni alle varietà locali (86). Questo flusso unidirezionale dovrebbe diminuire la diversità genetica della popolazione ricevente, con la conseguenza estrema di una possibile estinzione (88, 89). Invece, Bitocchi *et al.* hanno, sorprendentemente, trovato che non vi era una riduzione nella diversità genetica delle varietà locali italiane utilizzate (86). Gli autori citati hanno concluso che, non essendovi condizioni spaziali o temporali per spiegare l'assenza d'introggressione, tale fatto era dovuto solamente alle pratiche agronomiche adottate. Questi risultati, insieme agli scenari sviluppati per la Regione Toscana (90), dimostrano che con misure appropriate è possibile, nel caso del mais, assicurare la coesistenza tra i diversi tipi di agricoltura convenzionale, biologica, transgenica e degli ecotipi.

#### 14.4.6. Altre piante

La ricerca sugli aspetti scientifici della coesistenza di altre piante transgeniche con la controparte non GM o selvatica è stata del tutto frammentaria.

Tra le piante autogame è stato studiato il panico (*Setaria italica*) sia per il flusso da piante resistenti all'erbicida a piante non GM limitrofe, che il flusso verso la controparte selvatica (*Setaria viridis*) che cresce all'interno o vicino ai campi coltivati. Nel primo caso la trasmissione del transgene era dello 0,03% a 10 m (91), nel secondo, in uno studio durato 6 anni, la frequenza di resistenza all'erbicida trasmessa alla specie selvatica era  $2 \times 10^{-6}$  (92). Frequenze basse di trasmissione transgenica sono state osservate anche in altre piante autogame, come il lino (93) e il cardamo (94). Trascurabile è il rilascio aereo del polline nel caso della soia, pari in media ad un granulo per cm<sup>2</sup> rilasciato al giorno, durante 19 giorni di fioritura (95). Nella soia, infatti, l'impollinazione avviene il giorno prima dell'apertura completa del fiore (96).

Le caratteristiche del fiore e del polline limitano la fecondazione incrociata anche nel cotone. Il cotone fiorisce dal basso verso l'alto, con il fiore che si apre all'alba bianco, diventa rosa nel pomeriggio e si chiude di notte senza più riaprirsi. I fiori sono autoimpollinanti perché i granuli di polline sono grandi e riscoperti di una sostanza viscosa, che li fa aderire l'un l'altro, e li rende intrasportabili dal vento (97). In generale, zone tampone di 20 m, piantate con cotone non transgenico, sono sufficienti per evitare anche l'introggressione mediata dalle api (98, 99). Le api, infatti, evitano i campi di cotone percorrendo chilometri se vi sono campi di mais o di cardamo nelle zone di foraggiamento (97).

Flusso genico mediato dal polline è stato osservato anche tra il riso transgenico e la controparte non modificata, anche se a frequenze molto basse. Tali frequenze, tuttavia, con valori medi intorno allo 0,2% quando le piante erano vicine (100-108) e allo 0,01% ad una distanza di 6 m (109), ottenuti in esperimenti differenti, in condizioni ambientali specifiche, presentano un andamento dispersivo e non possono essere applicabili a tutte le situazioni. Apparentemente, l'incrocio, tra riso transgenico e non, potrebbe essere controllato mantenendo una separazione spaziale limitata tra le coltivazioni, ma solo in quelle aree in cui non vi sono infestanti sessualmente compatibili. Il riso crodo (descritto nella sezione 9.3.6) ha la stessa coppia di cromosomi e condivide, in Italia, la stessa nicchia ecologica del riso coltivato. Sono queste caratteristiche genetiche e la coabitazione negli stessi sistemi agronomici che rendono difficile il controllo del riso crodo, che disperde i semi nel suolo molto facilmente prima del raccolto, il che gli permette di diffondersi e di alimentare la banca dei semi nel suolo. L'incrocio tra riso coltivato e riso crodo è limitato dal fatto che la vitalità del polline è molto breve, da 5 a 10 minuti, per cui la fecondazione incrociata può interessare solo le piante molto vicine (109). Nel caso del riso non si può, come nel caso del mais, gestire il flusso genico, mediato dal polline, con una fioritura asincrona, perché i semi di crodo contaminanti del riso coltivato vengono seminati insieme e l'andamento della fioritura è complesso, potendo il crodo fiorire prima o dopo il riso coltivato. Inoltre, il tempo totale di fioritura è di pochi giorni per il riso coltivato, mentre per il crodo la fioritura varia da una a più settimane. Molti esperimenti (analizzati nella referenza 109) sono stati compiuti per misurare il flusso genico dal riso coltivato, reso resistente all'erbicida, al riso crodo. In Italia, ad esempio, la frequenza d'introggressione della resistenza all'erbicida era dello 0,08% a 20 cm di distanza dalla sorgente del polline (110).

In contrasto con gli studi sulla dispersione del polline, la frequenza di formazione degli ibridi tra riso crodo e riso coltivato, diventa significativa, solo se la coabitazione avviene per più di una stagione (111). Gli ibridi di crodo hanno una vitalità del polline e una produzione di semi paragonabile a quella della pianta selvatica (112, 113). Questo fatto può rendere molto difficile

la gestione dell'infestazione da riso crodo ed è questo il motivo per cui la FAO ha attivato l'*Interregional Cooperative Research Network on Rice in the Mediterranean Climate Areas*, coordinato dall'Università di Torino (114).

Altri fattori che consentono di limitare l'incrocio con il riso crodo sono la scelta dei campi coltivati in relazione ai venti prevalenti (115) e il fatto che i semi di riso transgenico non sopravvivono in terreni bagnati (116).

Ad oggi, il flusso genico nelle piante autogame non rappresenta un particolare problema per la coesistenza. Tuttavia, nel caso del riso, la conoscenza sulla fittezza degli ibridi che si possono formare tra riso coltivato, riso selvatico e riso infestante sono molto limitate per cui sono necessarie altre ricerche per valutare le conseguenze dovute alla fuga del transgene dal riso GM e le specie selvatiche geneticamente compatibili.

#### **14.4.7. Piante impollinate dagli insetti**

USA e Canada hanno autorizzato la coltivazione di erba medica (*Medicago sativa*) resistente all'erbicida glifosato. Tale autorizzazione è stata accompagnata da molte polemiche trattandosi di una pianta impollinata prevalentemente dalle api solitarie della specie *Megachile* (presenti anche in Italia), dai bombi e in misura molto minore dalle api domestiche. Queste ultime, in particolare, le cui arnie sono normalmente disposte nei campi destinati alla produzione dei semi di erba medica, possono raggiungere distanze anche di chilometri dall'arnia, con una percorrenza media di 800 metri, anche se il numero di api in movimento decresce esponenzialmente con la distanza dall'alveare (117). Tuttavia, alcuni autori hanno raccomandato una distanza di almeno 1,5 km tra campo donatore e campo ricevente (118).

Il controllo sul flusso genico mediato dal polline di fatto è controllato dalle caratteristiche della produzione di erba medica. I campi destinati alla produzione di foraggio raggiungono l'optimum del valore nutrizionale, e sono raccolti, quando le piante sono immature, cioè, quando il baldacchino fogliare è meno del 10% del fusto, contiene un solo fiore aperto e non ha semi. Campi, destinati al foraggio, ben gestiti, hanno pochi fiori aperti, non sono attraenti per le api impollinatrici e non costituiscono una sorgente di polline per i campi limitrofi.

In esperimenti con campi di erba medica foraggera, lasciati arrivare a maturazione completa, situati vicino a campi destinati ad essere raccolti, la frequenza di flusso genico era dello 0,21% a 45 m e 0% a 200 m. Sulla base di questi risultati è stata adottata una distanza per la produzione di sementi certificate, prive del transgenico, di 275 m (900 piedi) dai campi di erba medica resistente al glifosato.

Vicino ai campi coltivati si trovano facilmente piante di erba medica inselvaticite (119, 120) fenomeno che potrebbe interessare anche la pianta transgenica. Questi studi hanno confermato che i geni si possono muovere avanti e indietro tra pianta coltivata e pianta inselvaticita. La pianta transgenica inselvaticita ha maggiori difficoltà a sopravvivere perché non ha i vantaggi dell'irrigazione e degli eventuali trattamenti insetticidi della pianta coltivata. Inoltre, la produzione di polline delle piante inselvaticite, distribuite casualmente sui terreni marginali è trascurabile rispetto a quella dei campi di produzione, caratterizzati da un'alta densità di piante.

La gestione del flusso genico nell'erba medica transgenica deve tuttavia prendere in considerazione la gestione delle piante inselvaticite. In particolare occorre evitare la dispersione dei semi nella fase di raccolta e la semina non voluta dei terreni marginali a causa della perdita di semi.



## 14.5. Conclusioni

Il quadro descritto sopra, delle misure adottate per la coesistenza, sia a livello europeo sia nazionale, ha evidenziato una regolamentazione *ex ante* e una responsabilità *ex post*, il cui risultato è di vincolare quella libera scelta dell'agricoltore e del consumatore di avvalersi dell'agricoltura OGM, o dell'agricoltura biologica, o dell'agricoltura convenzionale propugnata in tutti i documenti della Commissione UE. La stessa Commissione, tre anni dopo aver pubblicato la Raccomandazione 2003/556/CE, che sanciva il principio della libera scelta, concludeva che: "L'esperienza limitata e la necessità di concludere il processo d'adozione nazionale delle misure di coesistenza non sembrano giustificare, ad oggi, lo sviluppo di un approccio legislativo dedicato armonizzato" (121). È chiaro che, anche in futuro, vi sarà poco da riferire e ancor meno esperienza sarà disponibile, visto che le regole di coesistenza, di fatto, escludono la coltivazione di PGM in Europa. I Paesi come l'Italia, l'Austria, l'Ungheria, il Lussemburgo, la Polonia e la Slovacchia che vogliono bandire gli OGM dal loro territorio hanno introdotto regole *ex ante* molto restrittive. Queste regole, insieme a fattorie di piccole dimensioni, spesso associate a numerose coltivazioni biologiche, impediranno anche in futuro la coltivazione di PGM. È interessante notare come nella stessa Comunicazione al Parlamento Europeo, la Commissione rilevi che molte delle misure adottate non appaiano "proporzionate".

Tuttavia alcuni Paesi che hanno misure *ex ante* meno restrittive e misure *ex post* più innovative come la Repubblica Ceca, Danimarca, Spagna e Paesi Bassi avranno più possibilità di coltivare PGM. Nel frattempo, gli Stati potranno continuare a bandire le piante GM, non su base scientifica ma mediante misure amministrative.

Nel 2010, la Commissione che, in precedenza, aveva dichiarato illegittime le disposizioni con cui alcuni Stati Membri dichiaravano alcune aree geografiche libere da PGM (*OGM free*), ha riconosciuto agli Stati Membri tale facoltà, purché siano in grado di dimostrare che le misure di coesistenza, per le particolari condizioni topografiche e climatiche, non possano assicurare il necessario standard di purezza (122).

Sempre nel 2010, la Commissione per superare lo stallo delle autorizzazioni a nuove PGM propone agli Stati Membri una nuova direttiva che lascia liberi gli Stati di vietare o meno la coltivazione di PGM sul proprio territorio o parti di esso. La Direttiva (UE) 2015/412, approvata a marzo 2015, modifica la Direttiva 2001/18/CE "per quanto concerne la possibilità per gli Stati Membri di limitare o vietare la coltivazione di organismi geneticamente modificati (OGM) sul loro territorio". La direttiva mantiene a livello centrale (EFSA) la valutazione scientifica sulla sicurezza d'uso delle PGM mentre delega gli Stati Membri a vietarne la coltivazione sulla base delle seguenti motivazioni che possono essere usate singolarmente o in combinazione:

- a. obiettivi di politica ambientale;
- b. pianificazione urbana e territoriale;
- c. uso del suolo;
- d. impatti socio-economici;
- e. esigenza di evitare la presenza di OGM in altri prodotti;
- f. obiettivi di politica agricola;
- g. ordine pubblico (unica motivazione che non può essere usata singolarmente).

Queste motivazioni sgomberano il campo da tutte le pseudo-considerazioni scientifiche adottate in questi anni per giustificare il divieto di coltivazione. Le misure che gli Stati possono adottare devono essere coerenti con gli obblighi internazionali fissati dalla *World Trade Organization* (WTO), non possono cioè impedire il libero commercio delle PGM autorizzate. Questo significa che gli Stati possono vietare la coltivazione ma non l'importazione di PGM;

significa, altresì, che eventuali dispute o ritorsioni decise dal WTO saranno responsabilità dei singoli Stati Membri.

Le Regioni italiane, schierate contro le PGM, temono molto la libertà, data dalla direttiva, per il rischio che le sanzioni commerciali, previste dal WTO, e a quel punto del tutto lecite, sarebbero dirette contro i singoli Stati e non contro l'intera EU. Così vino, formaggi, salumi, scarpe o occhiali da sole potrebbero finire sotto i colpi di una ritorsione commerciale degli stati produttori di PGM. Ecco perché le Regioni, che reclamano la loro autonomia quando si tratta di vietare le coltivazioni PGM, hanno chiesto al Ministero per politiche agricole e forestali di fare da parafulmine invocando una "clausola di salvaguardia" nazionale in modo che le singole Regioni siano al riparo dalle cause davanti a WTO (123, 124).

È chiaro che nel caso dell'agricoltura GM, in generale, la Commissione e gli Stati Membri hanno rinunciato ad ogni valutazione scientifica. Non solo le soglie per la presenza avventizia di PGM sono più restrittive che nel caso dell'agricoltura convenzionale, ma le distanze d'isolamento adottate per mantenere tali soglie sono arbitrarie, eccessive e motivate politicamente indipendentemente dai risultati scientifici. Insistere su tali distanze gonfiate equivale ad esercitare una pressione indebita sugli agricoltori che devono misurarsi con misure punitive se vi è un incrocio, una cosiddetta "contaminazione" con le piante convenzionali, mentre le ricerche effettuate hanno dimostrato che è possibile gestire la coesistenza in modo appropriato.

## Bibliografia

1. Netherlands Commission on Genetic Modification. *Coexistence in agriculture: mixing, out crossing and isolation distance*. Bilthoven NL: COGEM; 2001. p. 1-45.
2. Lelley T, Balázs E, Tepfer M. Ecological Impact of GMO. Dissemination in agro-systems. *International OECD Workshop*. Grossrussbach, Austria, 27-28 September 2002. Paris: OECD; 2002. p. 1-218.
3. Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Flakkebjerg. Boelt B (Ed.). *Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Conference on the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic crops*. Slagelse, DK; 2003. p. 1-228.
4. Brookes G, Barfoot P. Co-existence in North American agriculture: can GM crops be grown with conventional and organic crops? Dorchester UK: PG Economics Ltd. 2004. p. 1-13.
5. Messean A, Angevin F, Gómez-Barbero M, Menrad K, Rodriguez-Cerezo E. New case studies on the coexistence of GM and non-GM crops in European agriculture. *European Commission Joint Research Centre Technical Report EUR 22102 EN*. European Communities 2006.
6. Cardinali G, Fatichenti F, Nicolia A, Ferrandini N, Manzo A, Rosellini D, Spataro G, Veronesi F, Onofri A, Tei F, Boggia A, Nucciarelli N, Pennacchi F. In: Veronesi F (Ed.). *Coesistenza tra colture geneticamente modificate, convenzionali e biologiche nel contesto dell'agricoltura umbra*. Perugia: Cornicchia Grafiche; 2006. p. 1-134.
7. Accademie e Società Scientifiche. *Coesistenza tra colture tradizionali, biologiche e geneticamente modificate. Consensus Document*. Milano: Litorama; 2006. p. 1-12.
8. Devos Y, Demont M, Dillen K, Reheul D, Kaiser M, Sanvido M. Coexistence of genetically modified (GM) and non-GM crops in the European Union. A review. *Agron Sustain Dev* 2009;29(1):11-30.
9. Devos Y, Demont M, Dillen K, Reheul D, Kaiser M, Sanvido O. Coexistence of genetically modified and non-GM crops in the European Union: A review. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Véronique S, Alberola C (Ed.). *Sustainable Agriculture*. Berlin: Springer; 2009. p. 203-228.

10. Europa. Raccomandazione della Commissione UE del 23 luglio 2003, 2003/556/CE, recante orientamenti per lo sviluppo di strategie nazionali e migliori pratiche per garantire la coesistenza tra colture transgeniche, convenzionali e biologiche. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L189, del 29/7/2003.
11. Europa. Regolamento 1829/2003 (CE) del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 sugli alimenti e mangimi geneticamente modificati. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L268 del 18/10/2003.
12. Eastham K, Sweet J. Genetically modified Organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. *Environmental Issue Report* No 28. Copenhagen, DK: European Environment Agency; 2002. p. 1-75.
13. Van de Wiel CCM, Lotz LAP. Outcrossing and coexistence of genetically modified with (genetically) unmodified crops: A case study of the situation in the Netherlands. *NJAS Wageningen J Life Sci* 2006;54(1):17-35.
14. Devos Y, Reheul D, de Schrijver A. The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. *Environ Biosafety Res* 2005; 4(2):71-87.
15. Sanvido O, Widmer F, Winzeler M, Streit B, Szerencsits E, Bigler F. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Res* 2008;17(3):317-35.
16. Damgaard C, Kjellsson G. Gene flow of oilseed rape (*Brassica napus*) according to isolation distance and buffer zone. *Agric Ecosys Environ* 2005; 108(4):291-30.
17. Hüsken A, Dietz-Pfeilstetter A. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Transgenic Res* 2007;16(5):557-69.
18. Hoyle M, Cresswell JE. The effect of wind direction on cross-pollination in wind-pollinated GM crops. *Ecol Appl* 2007;17(4):1234-43.
19. Furtan WH, Guzel A, Weseen AS. Landscape clubs: co-existence of genetically modified and organic crops. *Can J Agr Econ* 2007;55(1):185-95.
20. Belcher K, Nolana J, Philips PWB. Genetically modified crops and agricultural landscapes: spatial patterns and contamination, *Ecol Econ* 2005; 53(3):387-401.
21. Devos Y, Reheul D, Thas O, de Clercq EM, Cougnon M, Cordemans K. Implementing isolation perimeters around genetically modified maize fields. *Agron Sust Dev* 2007;27(3):155-65.
22. Devos Y, Thas O, Cougnon M, de Clercq EM, Cordemans K, Reheul D. Feasibility of isolation perimeters for genetically modified maize. *Agron Sust Dev* 2008;28(4):195-206.
23. Moschini G, Bulut H, Cembalo L. On the segregation of genetically modified, conventional and organic products in European agriculture: a multi-market equilibrium analysis. *J Agric Econ* 2005;56(3):347-72.
24. Kalaitzandonakes N, Maltsbarger R, Barnes J. Global identity preservation costs in agricultural supply chains. *Can J Agr Econ* 2001;49(4):605-15.
25. Bullock DS, Desquilbet M. The economics of non-GMO segregation and identity preservation. *Food Policy* 2002;27(1):81-99.
26. Beckmann V, Soregaroli C, Wesseler J. Coexistence rules and regulations in the European Union. *Amer J Agric Econ* 2006;88(5):1193-9.
27. Jank B, Rath J, Gaugitsch H. Co-existence of agricultural production systems. *Trends Biotechnol* 2006;24(5):198-200.
28. Ramessaar K, Capell T, Twyman RM, Christou P. Going to ridiculous lengths: European coexistence regulations for GM crops. *Nature Biotechnol* 2010;28(2):133-6.

29. European Centre of Tort and Insurance Law in: Koch A (Ed.). Liability and compensation schemes for damage resulting from the presence of genetically modified organisms in non-GM Crops. Wien: Austrian Academy of Sciences; 2007. p. 1-220.
30. Pekrun C, Hewitt JDJ, Lutman PJW. Cultural control of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *J Agric Sci* 1998;130(2):155-63.
31. Roller A, Beismann H, Albrecht H. Persistence of genetically modified, herbicide-tolerant oilseed rape – first observations under practically relevant conditions in South Germany. *Z Pfl Krankh PflSchutz Sonder* 2002;18: 255-60.
32. Roller A, Beismann H, Albrecht H. The influence of soil cultivation on the seedbank of GM-herbicide tolerant and conventional oilseed rape. *Asp Appl Biol* 2003;69:131-5.
33. Beismann H, Roller A, Zeitler R. Assessing the number of transgenic oilseed rape seeds in the soil seed bank of former release sites. *Asp Appl Biol* 2003; 69:209-15.
34. Leeson JY, Thomas AG, Andrews T, Brown KK, van Acker RC. Manitoba weed survey of cereal and oilseed crops. *Weed Survey Series Publication 02-2*. Saskatoon: Agriculture and Agri-Food Canada; 2002. p. 1-191
35. Cuthbert JL, McVetty PBE. Plot-to-plot, row-to-row and plant-to-plant out-crossing studies in oilseed rape. *Can J Plant Sci* 2001;81(4):657-64.
36. Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powless SB, Roush RT. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 2002;296:2386-88.
37. Jaseniuk M, Brulè-Babel AL, Morrison IN. The evolution of genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Sci* 1996;44(1):176-93.
38. Ramsay G, Thompson C, Squire G. Quantifying landscape-scale gene flow in oilseed rape. London: DEFRA; 2003. p.1-50.
39. Norris C, Sweet J, Parker J, Law J. Implications for hybridization and introgression between oilseed rape (*Brassica napus*) and wild turnip (*B. rapa*) from an agricultural perspective. In: den Nijs HCM, Bartsch, D, Sweet J (Ed.). *Introgression from genetically modified plants into wild relatives*. Proceedings of a conference organized by the University of Amsterdam (Netherlands) and the Robert Koch Institute (Germany), in January 2003. Wallingford, UK: CABI Publishing; 2003. p. 107-23.
40. Andersen NS, Rasmussen J, Jorgensen RB. You reap what you sow-or do you? Volunteers in organic row-sown and broadcast-sown oilseed rape fields. *Eur J Agron* 2010;32(2):121-6.
41. Gruber S, Pekrun C, Claupein W. Population dynamics of volunteer oilseed rape (*Brassica napus* L.) affected by tillage. *Eur J Agron* 2004;20(4):351-61.
42. Gruber S, Claupein W. Fecundity of volunteer oilseed rape and estimation of potential gene dispersal by a practice-related model. *Agric Ecosys Env* 2007; 119(3/4):401-8.
43. Beckie HJ, Warwick SI. Persistence of an oilseed rape transgene in the environment. *Crop Prot* 2010;29(5):509-12.
44. Logden P. Weed beet: a review. *AspAppl Biol* 1993;35:185-94.
45. Bartsch D, Wehres U, Goddecke U, Gathmann A. Introduction to field trial data of crop to weed beet gene flow. In: *Proceedings of the 1st European Conference on Co-existence of Genetically Modified Crops with Conventional and Organic Crops*. Slagelse, Denmark; 2003. p. 105-7.
46. Vigouroux Y, Darmency H, Gestat De Garambe T, Richard-Molard M. Gene flow between sugar beet and weed beet. In *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. British Crop Protection Council Symposium 1999;72:83-8.
47. Elmegaard N, Buus Pedersen M. Flora and fauna in roundup tolerant fodder beet fields. In: *National Environmental Research Institute Technical Report, No 349*. 2003; p. 1-39.

48. Waines JG, Hedge SG. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers. *Crop Sci* 2003;43(2):451-63.
49. Loureiro I, Escorial MC, Garcia-Baudin JM, Gonzalez A, Chueca MC. Outcrossing in wheat: summary of field and experimental data under semi-arid conditions. *Third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM Based Agricultural Supply Chains*. Seville, Spain, November 20-21, 2007. Bruxelles: European Commission; 2008. p. 75-8.
50. Wang TianYu, Shi YunSu, Li Yu, Darmency H. Testing coexistence and genetic containment for an autogamous crop. *Transgenic Res* 2009;18(5): 809-13.
51. Willenborg CJ, Brule-Babel AL, van Acker RC. Low crop plant population densities promote pollen-mediated gene flow in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Transgenic Res* 2009;18(6):841-54.
52. Willenborg CJ, Luschei EC, Brule-Babel AL, van Acker RC. Flowering phenology and synchrony between volunteer and cropped spring wheat: implications for pollen-mediated gene flow. *Crop Sci* 2009;49(3):1029-39.
53. Anderson RL, Soper G. Review of volunteer wheat (*Triticum aestivum*) seedling emergence and seed longevity in the soil. *Weed Technol* 2003;17(3):620-6.
54. Hilhorst HM, Toorop PE. Review on dormancy, germinability, and germination in crop and weed seeds. *Adv Agron* 1997;61(1):111-65.
55. de Corby KA, Acker RC, van Brule-Babel AL, Friesen LF. Emergence timing and recruitment of volunteer spring wheat. *Weed Sci* 2007;55(1) 60-9.
56. Ritala A, Nuutila AM, Aikasalo R, Kauppinen V, Tammisola J. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley. *Crop Sci* 2002;42(1):278-85.
57. Czarnak-Klos M, RodriguezCerezo E. European Coexistence Bureau (EcoB). Best practice documents for the coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming, 1. Maize crop production. JRC59319. Luxembourg: Publication Office of the European Union; 2010. p. 1-70.
58. OECD. *Consensus document on the biology of Zea mays sbsp. mays (maize)*. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology Vol 1. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2003.
59. Goggi AS, Caragea P, Lopez-Sanchez H, Westgate M, Aritt R, Clark C. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain producing fields. *Field Crops Res* 2006;99(2-3):147-57.
60. Pla M, La Paz J-L, Peñas G, Garcia N, Palaudelmàs M, Esteve T, Messeguer J, Melé E. Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated flow from GM to conventional maize in a field study. *Transgenic Res* 2006;15(2):219-228.
61. Messeguer J, Peñas G, Ballester J, Bas M, Serra J, Salvia J, Palaudelmàs M, Melé E. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotech J* 2006;4(6):633-45.
62. Weber WE, Brigenzu T, Broer I, Eder J, Holz F. Coexistence between GM and non-GM maize crops – Tested in 2004 at the field scale level (Erprobungsanbau 2004). *J Agron Crop Sci* 2007;193(2):79-92.
63. Weekes R, Allnut T, Boffey C, Morgan S, Bilton M, Daniels R, Henry C. A study of crop-to-crop gene flow using farm scale sites of fodder maize (*Zea mays* L.) in the UK. *Transgenic Res* 2007;16(2):203-11.
64. Della Porta G, Ederle D, Bucchini L, Prandi M, Verderio A, Pozzi C. Maize pollen mediated gene flow in the Po valley: source recipient distance and effect on flowering time. *Eur J Agron* 2008;28(3):255-65.
65. Langhof M, Hommel B, Husken A, Schiemann J, Wehling P, Wilhelm R, Rühl G. Coexistence in maize: do non maize buffer zones reduce gene flow between maize fields? *Crop Sci* 2008;48(1):305-16.

66. van der Wiel CCM, Groeneveld RMW, Dolstra O, Kok EJ, Sholtens MJM, Thissen JTNM, Smulders MJM, Lotz LAP. Pollen mediated gene flow in maize tested for coexistence of GM and non-GM crops in the Netherlands: effect of isolation distance between fields. *NJAS Wageningen J Life Sci* 2009;56(4):405-23.
67. Langhof M, Hommel B, Husken A, Njontie C, Schiemann J, Wehling P, Wilhelm R, Ruhl G. Coexistence in maize: isolation distance in dependence on conventional maize field depth and separate edge harvest. *Crop Sci* 2010; 50(4):1496-508.
68. Sanvido O, Widmer F, Winzeler M, Streit B, Szerencsits E, Bigler F. Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Res* 2008;17(3):317-35.
69. Messéan A, Squire G, Perry J, Angevin F, Gome M, Townend P, Sausse C, Breckling B, Langrell S, Dzeroski S, Sweet J. Sustainable introduction of GM crops into European agriculture: a summary report of the FP6 SIGMEA research project. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 2009;16(1):37-51.
70. Riesgo L, Arreal FJ, Sanvido O, Rodriguez-Cerezo E. Distances needed to limit cross-fertilization between Gm and conventional maize in Europe. *Nature Biotechnol* 2010;28(8):780-2.
71. Vogler A, Wettstein-Battig M, Aulinger-Leipner I, Stamp P. The airborne pollen flow of maize (*Zea mays* L.) in a multi-crop designed field plot. *Agric Forest Meteorol* 2009;149(10):1776-80.
72. Vacher C, Bourguet D, Desquilbet M, Lemarié S, Ambec S, Hochberg ME. Fees or refuges: which is better for the sustainable management of insect resistance to transgenic Bt corn? *Biol Lett* 2006;2(2):198-202.
73. Della Porta G, Ederle D, Bucchini L, Prandi M, Pozzi C, Verderio A. *Gene flow between neighbouring maize fields in the Po valley: a fact-finding investigation regarding coexistence between conventional and non-conventional maize farming in the Region of Lombardy, Italy*. Milano: Centro Documentazione Agrobiotecnologie; 2006. p. 1-30.
74. Gustafson DI, Horak MJ, Remund KM, Rosenbaum EW, Soteres JK. Empirical modelling of genetically modified maize grain production practices to achieve European Union labelling thresholds. *Crop Sci* 2006; 46(5):2133-40.
75. Klein E, Lavigne C, Foueillassar X, Laredo C, Gouyon PH. Effet d'une discontinuité du couvert végétal sur la dispersion du pollen de maïs. *Séminaire de restitution de résultats de l'AIP "OGM et Environnement" 1998-2001*. Paris 30 avril 2002. Paris: INRAN; 2002: p. 1-6.
76. Foueillassar X, Weber M. Maize pollen viability: an important factor to consider in coexistence studies. *Third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM Based Agricultural Supply Chains*, Seville, Spain, 20-21 November 2007. Brussels: European Commission; 2008. p. 255-6.
77. Bassetti P, Westgate ME. Floral asynchrony and kernel set in maize quantified by image analysis. *Agron J* 1994;86(4):699-703.
78. Bannert M, Vogler A, Stamp P. Short-distance cross-pollination of maize in a small-field landscape as monitored by grain color markers. *Eur J Agron* 2008;29(1):29-32.
79. Angevin F, Klein EK, Cholmet C, Gauffretau A, Lavigne C, Messéan A, Meynard JM. Modelling impacts of cropping systems and climate on maize cross-pollination in agricultural landscapes: the MAPOD model. *Eur J Agron* 2008;28(3):471-84.
80. Palau-del-màs M, Melé E, Peñas G, Pla M, Nadal A, Serra J, Salvia J, Messeguer J. Sowing and flowering delays can be efficient strategy to improve coexistence of genetically modified and conventional maize. *Crop Sci* 2008;48(6):2404-13.
81. Halsey ME, Remund KM, Davis CA, Qualls M, Eppard PJ, Berberich SA. Isolation of maize from pollen-mediated gene flow by time and distance. *Crop Sci* 2005;45(6):2172-85.
82. Palau-del-màs M, Peñas G, Melé E, Serra J, Salvia J, Pla M, Nadal A, Messeguer J. Effect of volunteers on maize gene flow. *Transgenic Res* 2009;18(4):583-94.

83. Ricroch A, Bergé JB, Messéan A. Revue bibliographique sur la dispersion des transgènes a partir du maïs génétiquement modifié. *Comptes Rendus Biologies* 2009;332(10):861-75.
84. Gauthier P, Gousenard B, Dallard J, Redaelli R, Rebourg C, Charcosset A, Boyat A. RFLP diversity and relationships among traditional European maize populations. *Theor Appl Genet* 2002;105(1):91-9.
85. Barcaccia G, Lucchin M, Parrini P. Characterization of a flint maize (*Zea mays* var. *indurata*) Italian landrace. Genetic diversity and relatedness by SSR and inter-SSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 2003;50(3):253-71.
86. Lucchin M, Barcaccia G, Parrini P. Characterization of a flint maize (*Zea mays* convar. *Mays*) Italian landrace. Morpho-phenological and agronomic traits. *Genetic Resources and Crop Evolution* 2003;50(3):315-27.
87. Bitocchi E, Nanni L, Rossi M, Rau D, Bellucci E, Giardini A, Buonamici A, Vendramini GG, Papa R. Introgression from modern hybrid varieties into landrace populations of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Mol Ecol* 2009; 18(3):603-21.
88. Huxel GR. Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation*.1999;89(2):143-52.
89. Wolf DE, Takebayashi N, Riesenbergh LH. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* 2001;15(4):1039-53.
90. Mazzoncini M, Balducci E, Gorelli S, Russu R, Brunori G. Coexistence scenarios between GM and GM-free corn in Tuscany Region (Italy). *Third International Conference Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM Based Agricultural Supply Chains*, Seville, Spain, 20-21 November, 2007. Brussels: European Commission; 2008. p. 295-6.
91. Wang T, Shi Y, Li Y, Darmency H. Testing coexistence and genetic containment for an autogamous crop. *Transgenic Res* 2009;18(5): 809-13.
92. Shi Y, Wang T, Li Y, Darmency H. Impact of transgene inheritance on the mitigation of gene flow between crops and their wild relatives: the example of foxtail millet. *Genetics* 2008;180(2):969-75.
93. Jhala AJ, Bhatt H, Topinka K, Hall LM. Pollen-mediated gene flow in flax (*Linum usitatissimum* L.): can genetically engineered and organic flax coexist? *Heredity* 2011;106(4):557-66.
94. McPherson MA, Good AG, Topinka AK, Yang RC, McKenzie RH, Cathcart RJ, Christianson JA, Stobek C, Hall LM. Pollen-mediated gene flow from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) intended for plant molecular farming to conventional safflower. *Environ Biosafety Res* 2009;8(1):19-32.
95. Yoshimura Y. Wind tunnel and field assessment of pollen dispersal in soybean *Glycine max* (L.) Merr. *J Plant Res* 2011;124(1):109-14.
96. Carlson JB, Lersten NR. Reproductive morphology. In: Boemia HR, Specht JE (Ed.). *Soybeans: Improvement, Production and Uses, 3rd Edition*. Madison, Wisconsin, USA, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 2004; p. 59-95.
97. Van Deynze AE, Sundstrom FJ, Bradford KJ. Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Sci* 2005;45(4):1565-70.
98. Llewellyn D, Tyson C, Constable G, Duggan B, Beale S, Steel P. Containment of regulated genetically modified cotton in the field. *Agric Ecosys Environ* 2007;121(4):419-29.
99. Hofs J-L, Klein E, Pierre J, Chevre A-M, Bau B. GM cotton gene flow in small-scale farming systems: Probable impact on organic cotton production in Africa. *Third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM Based Agricultural Supply Chains*, Seville, Spain, 20-21 November 2007. Brussels: European Commission; 2008. p. 87-90.
100. Chen LJ, Lee DS, Song ZP, Suh HS, Lu B-R. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Ann Bot* 2004;93(1):67-73.

101. Song ZP, Lu B-R, Wang B, Chen JK. Fitness estimation through performance comparison of F1 hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Ann Bot* 2004;93(3):311-6.
102. Jun Rong, Zhiping Song, Jun Su, Hui Xia, Bao-Rong Lu, Feng Wang. Low frequency of transgene flow from Bt/CpTI rice to its nontransgenic counterparts planted at close spacing. *New Phytologist* 2005;168(3):559-66.
103. Lu B-R, Snow AA. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience* 2005;55(8):669-78.
104. Kawashima S, Shibake H. Modelling of pollen dispersal and hybridization processes for estimating spatial distribution of gene flow. *Third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM Based Agricultural Supply Chains*, Seville, Spain, 20-21 November 2007. Brussels, Belgium, European Commission. 2008. p. 291-2.
105. Jun Rong, Bao-Rong Lu, Zhiping Song, Jun Su, Allison A. Snow, Xinsheng Zhang, Shuguang Sun, Rui Chen and Feng Wang. Dramatic Reduction of Crop-to-Crop Gene Flow within a Short Distance from Transgenic Rice Fields. *New Phytologist* 2007;173(2):346-53.
106. Peñas G, Català M, Melé E, Llorach T, Pia E, Messeguer J. Effects of field size and physical barriers on GM-pollen mediated gene flow in rice. *Third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM Based Agricultural Supply Chains*, Seville, Spain, 20-21 November, 2007. Brussels, Belgium: European Commission. 2008. p. 237-8.
107. Lu B-R, Yang C. Gene flow from genetically modified rice to its wild relatives: assessing potential ecological consequences. *Biotechnology Advances* 2009;27(6):1083-91.
108. Xia H-B, Wang W, Xia H, Zhao W, Lu B-R. Conspecific crop-weed introgression influences evolution of weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) across a geographical range. *PlosOne* 2010; 6(1):e16189.
109. Gealy DR, Mitten DH, Rutger JN. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*Oryza sativa*): implications for weed management. *BioOne* 2003;17(3):627-45.
110. Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfa V, Catala MM, Baldi G, Mele E. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistant gene as a trace marker. *Theor Appl Genet* 2001;103(8):1151-9.
111. Langevin SA, Clay K, Grace JB. The incidence and effects of hybridisation between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 1990;44(4):1000-8.
112. Oard JH, Cohn MA, Linscombe S, Gealy D, Gravois K. Field evaluation and seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed red rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci* 2000;157(1):12-22.
113. Song ZP, Lu B-R, Wang B, Chen JK. Fitness estimation through performance comparison of F1 hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Ann Bot* 2004;93(3):311-6.
114. Ferrero A. Biology and control of red rice (*Oryza sativa* L. var. *sylvatica*) infesting European rice fields. In: Chataigner J (Ed.) *Medoryzae* 2000;9:2-4.
115. Messeguer J, Marfa V, Català MM, Guiderdoni E, Melé E. Field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. *Mol. Breeding* 2004;13(1):103-12.
116. Lee SY, Kim MS, Han SS. Evaluation of crossability, seed dormancy and overwintering ability in glufosinate ammonium-resistant GM rice and their hybrids with non-GM and weedy rice. *Korean Journal of Crop Sci* 2006; 51(1):53-8.
117. Hagler JR, Mueller S, Teuber LR, Machtley SA, Van Deynze A. Foraging range of honey bees, *Apis mellifera*, in alfalfa seed production fields. *J Insect Sci* 2011;11(1): 8-12.
118. St. Amand PC, Skinner DZ, Peadar RN. Risk of alfalfa transgene dissemination and scale-dependent effects. *Theor Appl Gen* 2000;101(1/2): 107-14.



119. Bagavathiannan MV, van Acker RC. The biology and ecology of feral alfalfa (*Medicago sativa* L.) and its implications for novel trait confinement in North America. *Crit Rev Plant Sci* 2009;28(1):69-87.
120. Bagavathiannan MV, Gulden RH, van Acker RC. Occurrence of alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations along roadsides in southern Manitoba, Canada and their role in intraspecific gene flow. *Transgenic Res.* 2011; 20(2):397-407.
121. EC. Annex to the Communication from the Commission to the Council and the European Parliament: Report on the Implementation of National measures on the Coexistence of Genetically Modified Crops with Conventional and Organic Farming. Commission Staff Working Document, SEC(2006) 313, Bruxelles.
122. Raccomandazione (2010/C 200/01) della Commissione, del 13 luglio 2010, recante orientamenti per l'elaborazione di misure nazionali in materia di coesistenza per evitare la presenza involontaria di OGM nelle colture convenzionali e biologiche.
123. Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome. Ordine del giorno in materia di OGM. 12/49/CR9b/C10, 4 aprile 2012.
124. Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome. Linee guida per le normative regionali di coesistenza tra colture convenzionali, biologiche e geneticamente modificate. Roma: Conferenza delle Regioni e delle Province Autonome; 2007. Disponibile all'indirizzo: [www.regioni.it/upload/coesist\\_ogm\\_18\\_10\\_07.pdf](http://www.regioni.it/upload/coesist_ogm_18_10_07.pdf); ultima consultazione 12/12/2016.

## 15. CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro è stato di valutare lo stato delle conoscenze scientifiche attuali sul rilascio ambientale e la sicurezza d'uso delle PGM, esaminando sia i potenziali benefici sia i rischi documentati dalle ricerche effettuate. L'analisi condotta ha dimostrato che: a) le PGM vanno valutate caso per caso con una comparazione sperimentale su le stesse cultivar ottenute con l'agricoltura convenzionale e l'agricoltura biologica; b) non vi sono rischi direttamente connessi all'uso di PGM in alimentazione umana e animale; c) i rischi connessi all'uso delle PGM resistenti all'erbicida ne sconsigliano l'uso nell'agricoltura italiana. Conclusioni simili sono state raggiunte anche da Nicolia *et al.*, analizzando 1783 documenti scientifici, pubblicati tra il 2002 e il 2012 (1).

Infatti, l'incremento esponenziale della superficie coltivata a PGM ha esposto una platea crescente di persone al consumo di alimenti GM senza che siano stati descritti effetti negativi per la salute, mentre altrettanto non può dirsi per l'ambiente per quanto riguarda gli PGM resistenti all'erbicida. Quest'ultima applicazione ha, da un lato, contribuito positivamente al controllo dei cambiamenti climatici, perché potendo evitare l'aratura, lascia l'anidride carbonica intrappolata nel suolo; dall'altro ha portato alla comparsa di molte infestanti resistenti all'erbicida stesso.

Va da ultimo commentata brevemente l'attitudine del consumatore europeo rispetto alle PGM, ponendo lo stesso troppa enfasi sui miti, generati dal web, e poca sull'osservazione scientifica e il buonsenso. Molti siti web riportano che non esistono vantaggi economici dovuti alla coltivazione di PGM. Al contrario, uno studio recente ha dimostrato, tramite una meta-analisi condotta sia su lavori scientifici che sulla letteratura grigia, che -nel caso delle PGM resistenti agli insetti-la resa viene aumentata in media del 25%, mentre l'uso dei pesticidi diminuisce del 40%.

Minori sono invece i benefici derivanti dall'impiego di PGM resistenti all'erbicida con rese aumentate intorno al 9% e con una diminuzione nell'uso degli erbicidi solo del 2% (2).

Tutti i sondaggi formali, condotti periodicamente dall'UE, o saltuariamente da agenzie governative o associazioni di consumatori, ci dicono che la maggior parte dei consumatori è contraria alle PGM. Questi sondaggi ci dicono veramente come si comporterebbero i consumatori quando fossero loro offerti prodotti alimentari contenenti PGM?

Nella primavera del 2004, ai consumatori di una città tedesca furono offerti del pane e delle patatine fritte, falsamente etichettati OGM, ad un prezzo ridotto rispetto agli stessi prodotti non etichettati. Le vendite furono 4 volte superiori per il pane "GM" e venti volte superiori per le patatine "GM". Nel Regno Unito, il 28% dei consumatori era disponibile ad acquistare cereali GM per la prima colazione qualora il prezzo fosse stato inferiore a quello dei prodotti convenzionali (3). Il prezzo più basso, in un'altra ricerca invogliava, a comprare GM, quasi il 65% dei consumatori francesi (4, 5). Risultati analoghi si sono ottenuti quando l'alimento falsamente etichettato GM era più saporito di quello non GM (6). Se i sondaggi europei ampliassero le loro domande al prezzo e alla qualità degli alimenti GM potrebbero riservarci qualche sorpresa.

Inoltre, l'analisi scientifica dimostra, che la percezione che esista un'incompatibilità tra la produzione di alimenti tipici e qualità degli stessi e la coltivazione di PGM, non è corretta; anzi la scienza può dare un contributo decisivo per salvare alcune varietà vegetali tipiche a rischio di estinzione come il pomodoro San Marzano, la vite che produce il nero d'Avola, il riso Carnaroli (7).

Infine l'atteggiamento dei decisori politici italiani che, ignorando i dati scientifici, impongono regole per la produzione e la segregazione dei mercati GM, richiamandosi al principio di precauzione, appare eccessivo sia alla luce dei livelli di rischio sia dei potenziali benefici. Il principio di precauzione, invece di essere proporzionato alla domanda sociale di protezione, viene invocato, anche in assenza di rischi certi, per assecondare lobbies e sfruttare l'allarme sociale che ne deriva per guadagnare consenso (8-9).

## Bibliografia

1. Nicolia A, Manzo A, Veronesi F, Rosellini D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit Rev Biotechnol* 2014;34(1):77-88.
2. Klümper W, Qaim M. A meta-analysis of the impact of genetically modified crops. *Plos One* 2014;9(11):e111629.
3. Moon W, Balasubramanian SK. Is there a market for genetically modified foods in Europe? Contingent valuation of GM and non-GM breakfast cereals in the United Kingdom. *Agbioforum* 2004;6(3):Article 6.
4. Noussair C, Robin S, Ruffieux BJMA. Do consumers not care about biotech foods or do they just not read the labels. *Econ letters* 2002;75(1):47-53.
5. Noussair C, Robin S, Ruffieux BJMA. Do consumers really refuse to buy genetically modified food. *Econ J* 2004;114(1):102-20.
6. Grunert KG, Bech-Larsen T, Lahteenmaki L, Veland O, Astrom A. Attitudes toward the use of GMOs in food production and their impact on buying intention: The role of positive sensory experience. *Agribusiness* 2004;20(1):85-107.
7. Basso B, Casati D, Frisio D, Giorgi B, Rossi L, Sala F. *Biotechnologie per la tutela dei prodotti tipici italiani*. Milano: 21<sup>mo</sup> secolo editore; 2003.
8. Defer R. Il caso OGM. Il dibattito sugli organismi geneticamente modificati. Roma: Carrocci editore; 2014. p. 1-145.
9. Sunstein Cass R. *Il diritto della paura. Il principio di precauzione*. Bologna: Il Mulino; 2010. p. 1-320.



**APPENDICE A**  
**Nomi delle piante citate in bibliografia**



## Piante citate in bibliografia

Nome italiano	Nome inglese	Nome scientifico
Aglio	Garlic	<i>Allium sativum</i>
Albicocco	Apricot	<i>Prunus armeniaca</i>
Amaranto	Palmer's amaranth	<i>Amaranthus palmeri</i> , <i>A. tuberculatus</i>
Ambrosia	Ragweed	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , <i>A. trifida</i>
Ananas	Pineapple	<i>Ananas sativa</i>
Aneto	Dill	<i>Anethum graveolens</i>
Arachide	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>
Avena	Oat	<i>Avena sativa</i>
Avocado	Avocado	<i>Persea americana</i>
Banana	Banana	<i>Musa paradisiaca</i>
Barbabietola	Beet	<i>Beta vulgaris</i>
Basilico	Basil	<i>Ocimum basilicum</i>
Cacao	Cocoa	<i>Theobroma cacao</i>
Caffè	Coffee	<i>Coffea arabica</i>
Canna da zucchero	Sugarcane	<i>Saccharum sp.</i>
Carota	Carrot	<i>Daucus carota</i>
Cassava, manioca	Cassava, manioc, yuca	<i>Manihot esculenta</i>
Cavolfiore	Cauliflower	<i>Brassica oleracea var. botrytis</i>
Cavolo	Cabbage	<i>Brassica oleracea var. acephala</i>
Cece	Chickpea	<i>Cicer arietinum</i>
Cetriolo	Cucumber	<i>Cucumis sativus</i>
Cicoria	Chicory	<i>Cichorium intybus</i>
Cicutilla	Feverfew	<i>Parthenium hysterophorous</i>
Ciliegio	Cherry	<i>Prunus avium</i>
Cipolla	Onion	<i>Allium cepa</i>
Cocco	Coconut	<i>Cocos nucifera</i>
Cocomero	Watermelon	<i>Citrullus lanatus</i>
Colza	Rapeseed	<i>Brassica napus</i>
Cotone	Cotton	<i>Gossypium sp.</i>
Erba fienarola	Kentucky bluegrass, Smooth meadow-grass, or Common meadow-grass	<i>Poa pratensis</i>
Erba medica	Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>
Erba della pampa	Sourgrass	<i>Digitaria insularis</i>
Euforbia	Mexican fireplant, Painted euphorbia, Desert poinsettia, Wild poinsettia, Fire on the mountain	<i>Euphorbia heterophylla</i>
Garofano	Carnation	<i>Dyanthus caryophyllus</i>
Giavone meridionale	Jungle rice	<i>Echinochloa colona</i>
Granata	Burningbush, Ragweed, Summer cypress, Fireball, Mexican firebrush, Mexican fireweed	<i>Bassia scoparia</i> , <i>Kochia scoparia</i>
Fagiolo	Bean	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Fagiolino	French bean, Green bean, Squeaky bean	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Finocchio	Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>
Fragola	Strawberry	<i>Fragaria x ananassa</i>
Fruento, grano	Wheat	<i>Triticum spp.</i>
Gelso	Mulberry	<i>Morus sp.</i>
Girasole	Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>
Kiwi	Kiwifruit	<i>Actinidia chinensis</i>
Lattuga	Lettuce	<i>Lactuca sativa</i>
Lampone	Raspberry	<i>Rubus idaeus</i>
Limone	Lemmon	<i>Citrus limon</i>
Lino	Flax, linseed	<i>Linum usitatissimum</i>

Nome italiano	Nome inglese	Nome scientifico
Loglio italiano	Italian ryegrass	<i>Lolium multiflorum</i>
Loglio perenne	Perennial ryegrass	<i>Lolium perenne</i>
Loglio rigido	Stiff darnel, Wimmera ryegrass	<i>Lolium rigidum</i>
Lupino	Lupin	<i>Lupinus albus</i>
Mango	Mango	<i>Mangifera indica</i>
Mais	Maize	<i>Zea mais</i>
Mandorlo	Almond	<i>Amygdalus communis</i> L. = <i>Prunus amygdalus</i> Batsch; <i>Prunus dulcis</i> Miller
Mango	Mango	<i>Mangifera indica</i>
Melanzana	Eggplant	<i>Solanum melongena</i>
Melo	Apple	<i>Malus domestica</i>
Melone	Cantaloupe	<i>Cucumis melo</i>
Miglio	Common millet, Hog millet, White millet	<i>Panicum miliaceum</i>
Nocciolo	Hazel	<i>Corylus avellana</i>
Noce	Walnut	<i>Juglans regia</i>
Olivo	Olive	<i>Olea europaea</i>
Orzo	Barley	<i>Hordeum vulgare</i>
Palma da olio	African oil palm	<i>Elaeis guineensis</i>
Papaia	Papaya	<i>Carica papaya</i>
Patata	Potato	<i>Solanum tuberosum</i>
Patata dolce	Sweet potato	<i>Ipomoea batatas</i>
Peperone	Pepper	<i>Capsicum annum</i>
Pero	Pear	<i>Pyrus communis</i>
Pesco	Peach	<i>Prunus persica</i>
Piantaggine minore, lanciola, lingua di cane	Ribwort plantain	<i>Plantago lanceolata</i>
Pisello	Pea	<i>Pisum sativum</i>
Pistacchio	Pistachio	<i>Pistacia vera</i>
Pomodoro	Tomato	<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Lycopersicum esculentum</i>
Prugno, Susino	Plum	<i>Prunus domestica</i>
Rafano	Radish	<i>Raphanus sp.</i>
Riso	Rice	<i>Oryza sativa</i> , <i>O. glaberrima</i>
Saepola	Horseweed, Coltstail, Marestail, Butterweed	<i>Conyza sp.</i>
Segale	Rye	<i>Secale cereale</i>
Soia	Soya	<i>Glycine max</i>
Sorgo	Milo, Egyptian millet, Durra	<i>Sorghum vulgare</i>
Tabacco	Tobacco	<i>Nicotiana tabacum</i>
Trifoglio	Clover, trefoil	<i>Trifolium sp</i>
Uva	Grape	<i>Vitis vinifera</i>
Zucca	Pumpkin	<i>Cucurbita maxima</i>
Zucchino	Squash	<i>Cucurbita pepo</i>



**APPENDICE B**  
**Funzioni della Commissione Interministeriale**  
**di Valutazione delle Biotecnologie (1993-2003)**



Il DL.vo 3 marzo 1993, n. 92 (*Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale* n. 78, 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).

Questa normativa Europea è stata promulgata al fine di valutare il rilascio nell'ambiente di un organismo modificato geneticamente in laboratorio con caratteristiche tali che la natura non avrebbe potuto produrre autonomamente. La norma ha lo scopo di creare un sistema di studio e di controllo atto a risolvere i problemi di conoscenza legati all'incertezza sul comportamento di tale organismo e sui suoi possibili effetti sulla salute umana, animale e sull'ambiente.

Per tale motivo e fin dall'inizio, la legislazione ha richiesto che una valutazione preventiva di rischio fosse effettuata prima di ogni rilascio ambientale di OGM, e che nessun rilascio potesse essere eseguito senza l'assenso preventivo di un'autorità competente.

Quest'approccio *orizzontale* della regolamentazione era basato su una valutazione eseguita *step-by-step* per ogni singolo rilascio in modo da garantire che eventuali rischi sconosciuti fossero identificati molto precocemente a partire dalle fasi iniziali della sperimentazione.

Questo significava che per le PGM la scala del rilascio, una volta terminata la fase di studio in serra, potesse essere progressivamente aumentata solamente dopo che i risultati della valutazione dei primi esperimenti condotti su poche decine di piante avessero fornito dati di sicurezza in termini sia di protezione della salute umana e animale che dell'ambiente.

Il DL.vo n. 92 definiva gli OGM come organismi il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto occorre in natura, mediante incrocio o tramite ricombinazione genetica naturale; esso ha regolato sia il rilascio deliberato a fini sperimentali e l'immissione sul mercato di prodotti contenenti o costituiti da OGM e identificava il Ministero della Salute quale Autorità competente nazionale chiamata a valutare i rischi prevedibili, immediati o futuri, che gli OGM potevano presentare per la salute umana, animale o per l'ambiente.

A tale scopo presso l'autorità competente è stata istituita la Commissione Interministeriale di Valutazione (CIV), 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 superiore di sanità e di prevenzione e sicurezza del lavoro. La CIV poteva, a sua volta, richiedere pareri su aspetti specifici al Consiglio superiore di sanità e al Comitato nazionale per la biosicurezza e le biotecnologie, istituito presso il Segretariato generale della Presidenza del Consiglio dei Ministri in base alla legislazione nazionale che aveva recepito la Direttiva comunitaria 90/220/CEE. Quest'ultimo Comitato aveva (ed ha tuttora) come compito principale l'elaborazione di linee guida atte a valutare la sicurezza delle applicazioni biotecnologiche.

Nell'ambito delle proprie competenze, la CIV, nel corso degli anni, ha esaminato tutte le notifiche con un approccio, caso per caso, basato sull'analisi dei seguenti aspetti scientifici:

- la biologia della pianta originale e trasformata;
- la funzione del gene nell'organismo donatore;
- le modifiche della pianta dovute al nuovo gene inserito;
- gli eventuali effetti sugli organismi presenti nell'ambiente;
- la probabilità di trasferimento genico sia orizzontale (ad esempio trasferimento dell'antibiotico resistenza), sia 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.

Lo studio dettagliato delle caratteristiche della pianta originale, sottoposta a modifica genetica, è uno degli strumenti più utili per valutare la sicurezza ambientale di una pianta transgenica. Descrizioni complete della biologia delle più importanti piante coltivate si possono trovare nel sito dell'OECD: <http://www.oecd.org>

Naturalmente, le descrizioni devono tenere in considerazione anche l'ambiente nazionale dove avviene il rilascio; in particolare, devono essere valutate: a) le pratiche agronomiche in uso; b) le malattie

più comuni; c) gli insetti predatori; d) la presenza o meno di specie correlate; e) l'interazione con altri organismi come gli insetti impollinatori, gli erbivori, le micorrize, i microrganismi e gli insetti del suolo, gli uccelli e gli animali.

Una volta eseguita una prima valutazione sulla sicurezza d'uso, la CIV può esprimere parere favorevole al rilascio sperimentale della pianta transgenica o respingere la domanda del notificante.

Il parere favorevole per la realizzazione di campi sperimentali è, molto spesso, accompagnato da prescrizioni, come misure di contenimento fisico, rappresentate da distanze di sicurezza da altre piante coltivate nella stessa area o la messa a dimora di colture di bordo, adatte a circondare la particella sperimentale con altre piante sessualmente incompatibili con quella in esame.

Le misure di contenimento da attuare possono essere anche di tipo temporale ricorrendo all'emasculazione della pianta transgenica. Se non previste nei protocolli sperimentali presentati, la CIV richiede al notificante di effettuare analisi specifiche sul prodotto della coltivazione, come, ad esempio, la determinazione della concentrazione di erbicida nelle parti edibili di una pianta resa resistente all'erbicida stesso.

Insieme alla notifica viene presentato anche 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 e rispondere alle richieste degli altri Stati dell'UE. Durante la fase del rilascio deliberato la CIV può effettuare ispezioni sia ai campi sperimentali che ai laboratori che eseguono le analisi allo scopo di verificare la conformità degli esperimenti a quanto notificato e alle prescrizioni formulate nell'autorizzazione al rilascio. Le ispezioni sono 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 CIV e dal Ministero delle politiche agricole. Infine, il notificante al termine della fase sperimentale deve presentare una relazione all'autorità competente, preparata secondo linee guida predisposte dalla CIV.

La valutazione sulla sicurezza ambientale di ogni singolo evento di trasformazione avviene sulla base dei dati contenuti nella notifica, nella letteratura scientifica internazionale, nei rapporti degli ispettori e nella relazione finale sulla sperimentazione sia in serra che in campo aperto.

Una volta che la PGM è stata sottoposta in modo soddisfacente alle prove di campo negli ecosistemi che potrebbero essere influenzati dal suo impiego, il fabbricante che intenda immetterla sul mercato per la prima volta, deve dimostrare, sulla base dei risultati di tutti i rilasci sperimentali, delle analisi di laboratorio eseguite e di una documentazione scientifica appropriata, che la commercializzazione e l'uso della PGM o dei prodotti che la contengono non presentano rischi per la salute umana, animale o per l'ambiente.

Al 31 dicembre 2002, in Italia erano stati autorizzati 252 rilasci sperimentali di piante e 16 rilasci sperimentali di altri organismi (*Azospirillum* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp.) a fini di ricerca e sviluppo (Tabella B1).

La documentazione raccolta durante le prove sperimentali e le ispezioni effettuate dalla CIV in questo lungo periodo di tempo non hanno evidenziato alcun effetto negativo delle PGM sull'ambiente.

A partire dal 2003, il Ministero dell'ambiente e tutela del territorio ha assunto le funzioni di autorità competente (<http://bch.minambiente.it>).

Tra i compiti del Ministero dell'ambiente c'è anche quello di inviare la comunicazione di tutte le autorizzazioni concesse alle autorità regionali competenti per territorio.

Oggi la Direttiva comunitaria di riferimento è la 2001/18/CE, recepita nel nostro ordinamento tramite il DL.vo 224 del 8 luglio 2003; la norma, non ha, di fatto, modificato in modo sostanziale le modalità di notifica, bensì, tramite l'inserimento di allegati più dettagliati, ha adeguato al progresso tecnico-scientifico le informazioni richieste per la valutazione dell'impatto sulla salute umana, animale e sull'ambiente di una operazione di rilascio deliberato di un OGM.

Nonostante questo miglioramento della legislazione, le ultime notifiche sperimentali – autorizzate in Italia – risalgono al 2004.

Tabella B1. Rilasci sperimentali di PGM in Italia

Pianta	Anno												Tot
	93	94	95	96	97	98	99	00	01	02	03	04	
Barbabietola		2	2	4	6	18	8	2					42
Ciliegio							3						3
Cicoria				1	2								3
Cicoria verde	1	1	3	1									6
Cocomero							1						1
Colza							1	1					2
Fragola						2	1			1			4
Geranio						1							1
Ginestrino								1					1
Kiwi								1					1
Lattuga								1					1
Limone								3					3
Mais	3	4	19	30	8	14	11	3		4			96
Melanzana					4	1	2	1				1**	9
Mirtillo							1						1
Olivo						2							2
Patata		1	1	2	1		1	1					7
Pomodoro	4	5	9	13	6	5	1	3		1	1		48
Radicchio				1	1								2
Riso						1	2	1	1	2			7
Soia		1	1	1			1						4
Tabacco		1						1	1				3
Tagete			3	5	4			2					14
Vite								1					1
Zucchino				1									1

\*Tabella elaborata da dati CIV e del [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_activities/gmo](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/gmo)

\*\*Rilascio autorizzato dal Ministero dell'Ambiente

Come conseguenza di una campagna mediatica messa in atto contro gli OGM da varie organizzazioni e in contrasto con quanto affermato da scienziati e ricercatori nel corso degli anni, non è stata più presentata alcuna notifica di tipo sperimentale e nel nostro Paese molti corsi di laurea dedicati alle biotecnologie sono stati chiusi per carenza di iscritti.

Al contrario, molti prodotti autorizzati alla commercializzazione sul territorio europeo e internazionale, frutto dei progetti di ricerca, delle esperienze scientifiche e dello studio di ricercatori che operano in altri Stati europei e internazionali, sono autorizzati alla commercializzazione anche in Italia.



*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di dicembre, 4° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, dicembre 2016*