

**PROBLEMI CONNESSI ALLA PRODUZIONE DI SEME IN RELAZIONE ALLA
PRESENZA DI PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE**

1. Introduzione

L'incorporazione di geni appartenenti a una o più popolazioni in un'altra popolazione è alla base del Flusso Genetico (FG). L'analisi delle conseguenze del FG da popolazioni di piante coltivate a piante selvatiche con esse compatibili o da piante coltivate a altre piante coltivate ha assunto nuovo interesse con l'introduzione nella pratica agricola delle Piante Geneticamente Modificate (PGM). Si distingue, quindi, tra:

- introgressione di un transgene da piante coltivate a piante selvatiche;
- presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di un transgene in coltivazioni convenzionali e biologiche per alimentazione umana e animale;
- presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di un transgene in coltivazioni da seme convenzionali e biologiche.

Il rischio di FG da una PGM a una pianta selvatica è legato al livello di FG possibile e all'eventuale vantaggio selettivo conferito dal transgene in condizioni naturali. E' possibile identificare transgeni capaci di produrre effettivi positivi, negativi e neutri sulla capacità riproduttiva (*fitness*) delle piante che ne sono dotati. Come conseguenza, nell'analisi dell'impatto ambientale di un particolare transgene devono essere presi in considerazione sia la presenza di piante selvatiche sessualmente compatibili, sia il potenziale infestante delle piante dotate del transgene. La possibilità del verificarsi di incroci fertili tra piante coltivate e piante selvatiche è alla base del FG verso le piante selvatiche; in Europa in alcuni casi tale flusso può verificarsi (ad esempio per colza e barbabietola da zucchero) mentre in altri casi (mais e soia) l'assenza di piante selvatiche sessualmente compatibili con le piante coltivate rende impossibile il FG. In questa seconda situazione l'unica possibilità, a livello puramente teorico, di fuga dei transgeni dalle PGM è legata al trasferimento orizzontale da pianta a micro-organismo .

Il FG da coltivazioni di PGM a coltivazioni convenzionali e biologiche per alimentazione umana o animale riguarda unicamente la presenza accidentale o tecnicamente inevitabile del transgene nel prodotto commerciale e non il trasferimento del transgene a piante selvatiche o, più generalmente, all'ambiente naturale circostante. Il problema pratico è quello di definire le distanze tra le PGM e le coltivazioni convenzionali e biologiche capaci di evitare il rischio di superare il livello di inquinamento da parte del transgene stabilito per legge (al momento 0,9% per le colture convenzionali).

Per quanto concerne il massimo livello di presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di un transgene in lotti di seme da utilizzare in agricoltura convenzionale e biologica, non c'è definizione da parte della UE. Non sono stati infatti definiti i limiti ufficiali di inquinamento da transgene posti in essere a livello comunitario per la produzione sementiera; questa mancanza di definizione si riflette sulla mancanza di procedure di laboratorio validate a livello comunitario per la ricerca dell'eventuale inquinamento a carico dei lotti di seme. Circa la validazione comunitaria di specifiche procedure di analisi delle sementi non risulta niente al momento ufficialmente pubblicato mentre tali procedure sono necessarie a causa delle difficoltà tecniche che si incontrano nell'approcciare il problema .

Per il settore sementiero l'esistenza di procedure di certificazione, già normate a livello di singoli Stati membri, potrebbe consentire l'individuazione di un sistema unico di rintracciabilità e controllo di filiera. In Gran Bretagna è stato definito un codice per le colture GM verificato secondo protocolli sperimentali, basato sulla individuazione lungo il percorso produttivo, dei punti critici in corrispondenza dei quali possono verificarsi le contaminazioni involontarie.

RETE DELLE REGIONI D'EUROPA OGM-FREE

Nel complesso appare che il controllo della contaminazione non intenzionale da parte di transgeni deve essere molto più attento per le colture da seme che per gli altri tipi di coltura.

2. Contaminazione accidentale da OGM di sementi e colture da seme.

La contaminazione di lotti di sementi e altro materiale di propagazione vegetale con seme di varietà GM può essere dovuta a cause diverse la cui rilevanza varia a seconda delle colture.

Risulta che la Commissione europea stia valutando le soglie minime di tolleranza alla presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di OGM nelle sementi. In primo luogo si rende necessario che la Commissione definisca il concetto di “tecnicamente inevitabile” e, nel caso in cui fissi il valore della soglia minima di contaminazione questa sia la minima rilevabile dalle metodiche analitiche per coltura.

La Raccomandazione UE 2004/787/CE tratta delle tecniche per il campionamento e l'analisi per la presenza di contaminazioni da OGM. In essa si fa riferimento alle regole stabilite dall'*International Seed Testing Association* (ISTA), alle regole ISO per il campionamento, ai metodi forniti dal *Community Reference Laboratory for GM Food and Feed* di Ispra e dall'*European Network of GMO Laboratories* (ENGL).

Per la ricerca di OGM nei lotti di seme i fattori chiave sono il campionamento e i metodi analitici. Entrambi sono cruciali perché l'errore di campionamento e quello analitico si sommano.

a. Procedure di campionamento

E' molto importante adottare procedure di campionamento disegnate specificamente per la ricerca di OGM. Definizioni e informazioni sul campionamento nel contesto della ricerca di OGM sono forniti da Kay (Kay S, *Comparison of sampling approaches for grain lots. JRC Draft document* 2001).

Il campionamento, quindi, deve ricevere molta attenzione. Esso dipende dal limite soglia scelto per accettare la presenza di OGM: più basso il limite maggiore la difficoltà del campionamento e il suo costo. Per esempio, nelle analisi quantitative, per stimare affidabilmente (95% di probabilità ed errore di campionamento inferiore al 20%) una contaminazione dell'1% in un lotto omogeneo c'è bisogno di un campione di 3500 semi ma nel caso realistico di lotto eterogeneo bisognerebbe utilizzare 10000 semi. Per stimare in modo affidabile una contaminazione dello 0,1% nell'ipotesi di un'eterogeneità realistica del lotto Lischer indica un campione di circa 20 kg di granella di soia e di 30 kg di mais (Lischer, P., *Sampling procedures to determine the proportion of genetically modified organisms in raw materials. Part 2: Sampling, from batches of grain. Mitt. Lebensm. Hyg.*, 2001, 92: 305-311). La dimensione del campione dipende dalla dimensione del seme e dal livello di contaminazione da rilevare e aumenta rapidamente al diminuire di quest'ultimo. La definizione di una soglia dovrebbe tenere in considerazione la fattibilità economica della sua rilevazione.

E' in corso un progetto di ricerca che ha l'obiettivo di sviluppare metodi di campionamento specifici per la ricerca e la quantificazione della contaminazione da OGM (<http://biotech.jrc.it/sampling.htm>).

I metodi di campionamento applicati alle sementi non sono applicabili alle colture in campo. Appare molto difficile campionare piante in campo in modo efficace ed economico quando si voglia stimare un livello di contaminazione basso. Per esempio, prelevare un campione di 3000 piante di mais in campo presenterebbe difficoltà tecniche e costo elevato. Probabilmente il livello di errore di questo tipo di analisi sarebbe molto alto. Le difficoltà tecniche ed il costo elevato relativi ad un campionamento correlato a livelli di soglia molto bassi suggerisce il controllo sui lotti di sementi piuttosto che sulle colture da seme da effettuarsi in campo.

RETE DELLE REGIONI D'EUROPA OGM-FREE

b. Metodi di analisi

Il *Community Reference Laboratory* di Ispra fornisce una lista di metodi di analisi validati attraverso prove effettuate dalla rete ENGL (<http://biotech.jrc.it/methodsdatabase.htm>). Tutti questi metodi sono basati sulla PCR Real Time e sono evento-specifici, cioè disegnati per ciascun OGM presente sul mercato. Ad oggi sono disponibili metodi validati solo per pochi OGM, e non vi sono ancora metodi validati specifici per l'analisi di sementi.

Se è richiesto il rilevamento di OGM e non la loro quantificazione, una PCR qualitativa standard può essere un'alternativa molto efficace ed economica alla PCR Real Time. Si dovrebbe trattare di una PCR "nested" o di una PCR seguita dalla digestione dell'amplificato con un enzima di restrizione diagnostico o dal sequenziamento dell'amplificato.

La sensibilità della PCR è molto alta. Il limite di individuazione (LOD) di una sequenza di DNA target (OGM-specifica) è il numero minimo di copie che può essere rilevato con la PCR qualitativa; esso è molto minore del limite di quantificazione (LOQ) che si applica nella PCR quantitativa. Teoricamente una sola copia di una sequenza di DNA presente nel campione di DNA da analizzare è rilevabile, quindi è la dimensione del genoma della specie vegetale e la quantità di DNA utilizzata per la reazione di PCR a stabilire i limiti di rilevamento. Per esempio, in un campione di analisi di 100 nanogrammi (ng) di DNA di *Zea mays* sono presenti fino a 36697 copie del genoma aploide, dato il valore 1C (peso del DNA di una copia del genoma aploide) di 2725 picogrammi (pg). Ne consegue che una copia del genoma aploide di mais in un campione di analisi di 100 ng corrisponde allo 0.0027%. Livelli di OGM al di sotto di questo non possono essere rilevati in modo affidabile (Kay and Van Den Eede 2001).

Utilizzando DNA puro, lo 0,05% di OGM è stato rilevato dal metodo ufficiale di analisi tedesco, mentre utilizzando *certified reference material* (farina di mais e soia a contenuto noto di OGM) il limite di rilevamento è stato dello 0,1%.

La tendenza prevalente è quella di non ufficializzare tutte le possibili metodiche analitiche, ma piuttosto di validare i laboratori accreditati attraverso l'organizzazione di ring test ufficiali. A tal fine si dovrebbe:

- individuare una autorità responsabile dell'aggiornamento dei sistemi di rilevamento;
- garantire ai laboratori accreditati nei diversi Paesi l'accesso a dettagliate informazioni relative ad ogni singola notifica di OGM;
- organizzare ring test per garantire una migliore uniformità di analisi.

3. Effetto delle pratiche agronomiche sul flusso genico da colture GM a colture convenzionali o biologiche.

Nella legislazione comunitaria sono raccomandate le corrette pratiche agronomiche da adottare per evitare la contaminazione delle colture anche destinate a produrre sementi. Sarebbe necessario introdurre la definizione dei punti critici della filiera produttiva in corrispondenza dei quali possono verificarsi le contaminazioni accidentali.

Da un punto di vista agronomico, l'introduzione di colture transgeniche solleva alcuni motivi di preoccupazione, riconducibili a tre considerazioni principali: (1) può realizzarsi flusso genico da una coltura GM ad una coltura convenzionale situata su appezzamenti limitrofi, attraverso impollinazione incrociata; (2) può realizzarsi flusso genico da una coltura GM verso le specie spontanee con essa compatibili (*wild relatives*), che possono a loro volta passare il transgene a colture convenzionali; (3) le piante GM possono disseminare spontaneamente e da questi semi possono originarsi individui transgenici (*volunteer crop*) nelle colture convenzionali seminate in successione. Altri motivi di preoccupazione sono legati alle colture GM nelle quali siano stati introdotti geni di resistenza ad uno o più erbicidi, che potrebbero incoraggiare un controllo poco razionale delle piante infestanti, favorendo la selezione della flora verso biotipi resistenti agli erbicidi e favorendo l'accumulo nella coltura e nell'ambiente di residui degli azidetti fitofarmaci.

Alcune pratiche agronomiche possono contribuire a contenere i problemi anzidetti. Un primo aspetto è legato alla scelta degli appezzamenti, in modo da garantire la separazione spaziale tra piante GM e convenzionali. I dati in letteratura potrebbero aiutare a definire le distanze più appropriate, in base alla capacità di diffusione del polline delle diverse colture GM.

Inoltre, l'adozione di metodi razionali di controllo della flora infestante dovrebbe permettere l'eliminazione delle "*volunteer GM crop*" dai campi coltivati con colture convenzionali o biologiche. Anche in questo caso i dati in letteratura dovrebbero chiarire quali tipi di diserbanti utilizzare, nonché dosi e metodi di intervento appropriati.

Per le "*Wild relatives*" invece data l'impossibilità pratica di eliminarle con certezza dai bordi dei campi o dagli appezzamenti limitrofi che potrebbero essere contaminati e la potenziale irreversibilità del fenomeno, nel caso di specie geneticamente modificate allogame, in ossequio al principio di precauzione, sarà necessario vietare la coesistenza in ambienti nei quali si presenti tale rischio.

La rotazione delle colture è probabilmente uno degli aspetti più importanti per evitare le "*volunteer crops*". Infatti queste sono particolarmente dannose e difficili da eradicare se una coltura convenzionale segue da vicino nella rotazione una coltura transgenica della stessa specie. E' quindi fondamentale, dopo una coltura GM, adottare un ciclo di rotazione piuttosto lungo, da definire in base alla longevità dei semi nel terreno e alla possibilità di fenomeni di dormienza secondaria della specie GM considerata.

Gli aspetti legati alle rotazioni sono strettamente connessi al sistema di lavorazione adottato: è infatti dimostrato come le arature tendano a sfavorire specie poco longeve ed incapaci di dormienza secondaria, mentre la "non-lavorazione" tende a sfavorire specie molto longeve e con spiccata dormienza secondaria a causa dei fenomeni di mortalità *in situ* e predazione. I dati bibliografici dovrebbero chiarire quali siano i sistemi colturali più adatti a contenere la comparsa dell "*volunteer GM crops*" e quindi il flusso genico verso colture convenzionali e/o biologiche.

Altre aspetti tecnologici da considerare sono la falsa-semina, che può aiutare a prevenire la comparsa di "*volunteer crops*" nelle colture convenzionali e l'accurata pulizia delle macchine di raccolta e degli impianti di stoccaggio utilizzati per le colture GM.

4. Trasferimento orizzontale

L'ipotesi di un trasferimento di materiale genetico da Piante Geneticamente Modificate (PGM) a microbi ambientali, o a piante convenzionali tramite i suddetti microbi, è stata considerata

RETE DELLE REGIONI D'EUROPA OGM-FREE

in sede sia teorica che sperimentale con una serie di studi incentrati su fenomeni specifici nell'ambito del processo complessivo. L'assenza per questo argomento di un lavoro di ricerca sistematica sul territorio dell'Unione permette al momento solo una lettura critica ed un'interpretazione della letteratura scientifica disponibile per valutare i possibili rischi inerenti alla produzione di seme transgenico.

I meccanismi alla base del trasferimento di materiale genetico da PGM ad altri organismi è essenzialmente un Trasferimento Genico Orizzontale (TGO), altrimenti detto Laterale (TGL), che esclude la riproduzione sessuale e quindi supera facilmente le barriere di specie. In tale contesto il TGO può verificarsi secondo almeno tre differenti modelli, il primo dei quali è un semplice TGO da PGM a microbi, con la produzione di Microrganismi Geneticamente Modificati (MGM). Gli altri due modelli implicano un ulteriore TGO da MGM ad altri microbi o a piante non transgeniche.

Una valutazione critica dei tre modelli mostra che in effetti esiste qualche probabilità che si verifichi un TGO da PGM a microbi, mentre non esistono, al momento, evidenze sperimentali a conferma delle due altre ipotesi. In aggiunta è importante considerare che la diffusione di transgeni da MGM ad altri microbi sembra un problema minore nelle nazioni occidentali in cui l'uso, e talvolta l'abuso, di antibiotici ha causato la diffusione di batteri antibiotico resistenti in parecchi habitat. Quest'osservazione non vuol sottostimare il problema, ma piuttosto portare l'attenzione su un rischio effettivo che sembra suscitare meno preoccupazione di un effetto secondario della produzione di PGM ipotizzabile solo a livello teorico.

Queste osservazioni preliminari suggeriscono di concentrare l'attenzione sulla possibilità di un semplice TGL da PGM a microbi. La letteratura scientifica disponibile indica che alcune specie batteriche dei generi *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* possono essere trasformate da DNA esogeno grazie alla loro competenza naturale. Purtroppo, la maggior parte dei pur ottimi lavori che presentano tali dati sono basati su sperimentazioni in laboratorio e perciò in condizioni non necessariamente simili a quelle del reale ambiente agricolo dove tali TGO potrebbero aver luogo. Un altro problema è il fatto che la maggior parte dei dati preliminari per progettare tali esperimenti non sono disponibili o sono comunque così eterogenei da rendere difficile trarre conclusioni generali. Tutto considerato, questi articoli scientifici indicano che la frequenza di trasformazione è relativamente bassa. Un altro punto cruciale è la fitness relativa dei MGM dopo la trasformazione. Quest'aspetto è stato anche meno studiato di quello circa la possibilità di TGO in ambienti naturali, benché in articoli recenti sia considerato il vero fattore limitante dell'intero processo. Di fatto, se i MGM hanno fitness simile o perfino inferiore a quella degli altri microrganismi ambientali della stessa specie, il TGO può rappresentare un interessante fenomeno per la speculazione scientifica più che un reale rischio. Inoltre, il fatto che parecchie trasformazioni abbiano utilizzato plasmodi come vettori, e non abbiano progredito verso alcun tipo di integrazione nel genoma microbico, indica che la stabilità genetica del transgene non può essere considerata alta.

Considerando globalmente tutte queste informazioni possiamo trarre la conclusione preliminare che il TGL da PGM a microbi è possibile, ma la diffusione e la permanenza ambientale di tali MGM è improbabile. Fintanto che non saranno disponibili più dati e fino a quando non si effettuerà una ricerca sistematica sul territorio EU, i problemi sollevati dalla produzione di semi da PGM potrebbero essere risolti pragmaticamente con il semplice confinamento delle produzioni transgeniche in aree (o appezzamenti) specifiche dove non possano essere coltivate piante convenzionali per un periodo che potrebbe essere stimato prudenzialmente sulla base della permanenza del DNA transgenico nel suolo, che è attualmente stimata in un massimo di quattro anni in condizioni ideali.

5. Aspetti economici

Dal punto di vista economico il principale problema legato alla coesistenza è quello relativo alla fattibilità di un mercato e di un sistema di lavorazione dei prodotti a più canali e alla fissazione

RETE DELLE REGIONI D'EUROPA OGM-FREE

o meno delle soglie di tolleranza. Le soglie di tolleranza hanno una importanza fondamentale, specialmente per le colture suscettibili a trasferimenti genetici.

Le implicazioni economiche della coesistenza delle colture geneticamente modificate con quelle non modificate consistono sostanzialmente in due principali problemi:

1. il costo dell'isolamento, per evitare o minimizzare la presenza accidentale di OGM in sementi convenzionali;
2. le conseguenze economiche del superamento delle soglie di tolleranza.

Per evitare l'incremento dei costi di isolamento per le colture da seme vanno individuate zone "chiuse" dove la coesistenza non è ammessa.

Allo stesso tempo per evitare costi troppo elevati di campionamento e analitici per la determinazione quantitativa di OGM nelle sementi e facilitare i controlli non vanno fissate soglie di tolleranza.

Altri elementi possono essere implicati nell'analisi economica della coesistenza di colture GM e non GM. Studi recenti sono giunti alla conclusione che un importante costo nell'isolamento e nella conservazione dell'identità delle colture non GM non deriva dalla pulizia delle macchine, o delle attrezzature per la manipolazione, o da altre misure in azienda, ma piuttosto dal "rimescolamento" dei sistemi di lavorazione. Le strutture di stoccaggio esistenti sono troppo poche, troppo grandi, e spesso collocate male nel territorio. Quindi la contaminazione viene vista come un problema non solo aziendale, ma anche esterno, successivo. E' pur vero che una sistemazione delle infrastrutture di lavorazione è senza dubbio un processo lungo, che può essere conseguito in modo graduale nel tempo, visti gli elevati costi da sostenere per cambiare le strutture. Si tratterebbe dunque, di un progetto a lungo termine.

6. Conclusioni

Assicurare la coesistenza tra forme di agricoltura transgenica, convenzionale e biologica assume particolare importanza quando il concetto deve essere applicato al settore della produzione di sementi. In campo sementiero si corre infatti il rischio che tollerando soglie di contaminazione accidentale anche molto basse si possa con il tempo avere comunque colture convenzionali e biologiche con alti livelli di contaminazione. Per tale ragione è strategico ai fini della produzione sementiera non applicare soglie di tolleranza o se indispensabile adottarne con valori prossimi allo zero.

I costi economici relativi alla garanzia della non contaminazione (di trasporto, stoccaggio, lavorazione, ecc.) e della certificazione devono essere a carico di chi immette il prodotto sul mercato.