



Metapontum Agrobios

Relazione Conclusiva

**PROVA DI VALUTAZIONE IN PIENO CAMPO DEL GENOTIPO
TRANSGENICO HIGHCARO, DELLA CV RED SETTER E DELL' IBRIDO
COMMERCIALE PERFECT PEEL.**

Notifica B/IT/03/01

Gruppo di Lavoro

Caterina D'Ambrosio

Giovanni Giorio

Adriana Lucia Stigliani

Collaboratori

Eustachio Acito

Giuseppe Festa

Antonio Giannantonio

Filomena Lelario

Angelo Petrozza

Nicola Santercole

Giovanni Sozio

INTRODUZIONE	4
Informazioni sul Genotipo Transgenico sottoposto a valutazione	4
Informazioni sul sito di emissione.....	7
Informazioni sui piani di monitoraggio, controllo, e trattamento del sito e dei rifiuti dopo l'emissione dei rifiuti	8
Informazioni sui metodi di trattamento del sito di emissione ad emissione avvenuta.....	9
Bibliografia	9
 VALUTAZIONE AGRONOMICA IN PIENO CAMPO DEI GENOTIPI HIGHCARO, PERFECTPEEL E REDSETTER	15
Introduzione	15
Metodi	15
Risultati.....	17
Discussione.....	19
 VALUTAZIONE DELLA TRASMISSIBILITÀ DEL POLLINE.....	21
Introduzione	21
Materiali e metodi	21
Risultati e discussione	22
 VALUTAZIONE DEL CONTENUTO DI GLICOALCALOIDI NEL FRUTTO DELLA PSGM E DELLA PIANTA CONTROLLO.....	26
Introduzione	26
Risultati e discussione.	27
Bibliografia	27

Introduzione

Il genotipo di pomodoro transgenico caratterizzato dalla produzione di bacche di pomodoro con un elevato tenore di beta-carotene è stato valutato in pieno campo (Notifica B/IT/01/03) comparandolo con la corrispettiva linea isogenica (cv. Red Setter) ed un ibrido commerciale altamente produttivo, il Perfect Peel. La sperimentazione ha avuto la finalità di valutare i rischi biologici conseguenti alla coltivazione di detta PSGM (Pianta Superiore Geneticamente Modificata) in pieno campo in una zona strettamente confinata. Contemporaneamente si è proceduto alla valutazione delle capacità produttive di tali piante in pieno campo, in confronto a due linee di riferimento.

Lo studio relativo al rischio ambientale conseguente alla coltura di tale PSGM parte dalle seguenti considerazioni:

- il pomodoro è una coltura annuale, non è una specie spontanea negli ambienti mediterranei, e non ha possibilità di sopravvivere al di fuori di uno specifico contesto agronomico;
- non esistono nell'ambiente mediterraneo specie selvatiche sessualmente compatibili con il pomodoro;
- la cultivar REDSETTER e la PSGM da essa derivata presentano una morfologia fiorale tale da rendere quasi impossibile l'impollinazione incrociata perché lo stigma non fuoriesce dal cono staminifero e la deiscenza delle antere avviene dorsalmente per cui il polline prodotto si trova direttamente a contatto con lo stigma dello stesso fiore.

Queste considerazioni rendono estremamente improbabile la possibilità che possa verificarsi diffusione del polline dalla pianta transgenica ad altre cultivar di pomodoro. Pur tuttavia abbiamo ritenuto opportuno verificare tale ipotesi ed a questo proposito si è proceduto alla valutazione dell'eventuale trasferimento del polline delle piante transgeniche nelle piante test di pomodoro presenti nella barriera che delimitava il campo secondo quanto riportato nel paragrafo: Valutazione trasferimento polline.

Il secondo obiettivo è stato perseguito attraverso la valutazione della produttività della PSGM rispetto al controllo Red Setter e ad un ibrido commerciale di pomodoro da industria impiegando un disegno sperimentale che ha consentito l'analisi statistica dei dati rilevati.

La sperimentazione è stata condotta nel periodo Maggio 2004 – Agosto 2004.

Informazioni sul Genotipo Transgenico sottoposto a valutazione

1. Descrizione delle caratteristiche introdotte

Le PSGM oggetto della presente sperimentazione sono costituite dalla generazione T₆ di piante selezionate mediante analisi fenotipiche relative alla colorazione del frutto ed analisi chimiche relative al contenuto totale ed alla composizione dei carotenoidi presenti nel frutto. Tali valutazioni sono state possibili in seguito all'allevamento delle piante in serra a contenimento.

Dal punto di vista genetico la modifica apportata ha consentito l'inserimento nel genoma di due transgeni :

- il gene *tLcy* (+), già presente nel genoma della pianta di pomodoro, che codifica per la licopene ciclasi, un enzima del percorso metabolico dei carotenoidi. La sintesi dei carotenoidi, nelle piante, inizia con la condensazione, catalizzata dall'enzima fitoene sintasi, di due molecole di geranil-geranil pirofosfato. Il prodotto di tale reazione, denominato fitoene, subisce due successive desaturazioni che portano alla formazione prima del fitofluene e successivamente dello zeta-carotene. Entrambe queste reazioni vengono catalizzate dalla fitoene desaturasi. L'azione della zeta-carotene desaturasi sullo zeta-carotene porta alla sintesi del licopene, un carotenoide rosso molto abbondante nel frutto del pomodoro maturo (Hirschberg 2001). Il licopene viene poi ciclizzato in beta-carotene e tale reazione è catalizzata dalla licopene ciclasi, codificata dal gene denominato *tLcy* che si esprime nelle foglie, nel fusto, nel fiore, e nei primissimi stadi di maturazione del frutto di pomodoro. La riduzione di espressione di tale gene nel frutto porta ad una minore sintesi di licopene ciclasi con conseguente accumulo di licopene nel frutto maturo. Nella pianta transgenica oggetto di studio la modifica genetica è consistita nell'inserimento di una copia aggiuntiva del gene della licopene ciclasi sotto il controllo di un promotore costitutivo quale il 35S. Ciò ha portato, nel frutto (organo in cui il gene endogeno normalmente viene espresso in maniera trascurabile), ad una over-espressione del gene omologo introdotto mediante trasformazione genetica, consentendo così la sintesi dell'enzima licopene ciclasi e conseguentemente la completa ciclizzazione del licopene in beta-carotene. I pomodori di tali linee transgeniche accumulano, quindi, beta-carotene, anziché licopene. Tale modifica si traduce a livello fenotipico in una variazione evidente del colore del frutto di pomodoro che da rosso diventa arancione e in una modifica nella composizione dei carotenoidi presenti nel frutto, in quanto tutto il licopene è convertito in beta-carotene.
- il gene *NptII* codificante per l'enzima neomicina fosfotrasferasi II che catalizza la fosforilazione della kanamicina. Come conseguenza della modificazione genetica le PSGM presentano i seguenti caratteri: fenotipo resistente a kanamicina, con capacità di crescere *in vitro* su terreno di coltura contenente kanamicina.

2. Descrizioni sull'espressione dell'inserto

a) *Modalità e tempi di espressione dell'inserto durante il ciclo vitale della pianta*

I geni *Lcy*(+) e *NptII* vengono espressi costitutivamente in tutti gli organi della pianta, come atteso con l'uso di promotori costitutivi.

L'espressione del gene endogeno della licopene ciclasi e della copia introdotta mediante modificazione genetica è stata valutata mediante due tecniche: Northern Blot e la tecnica quantitativa della Real-Time RT-PCR e comparata con il livello di espressione della licopene ciclasi nel controllo Red Setter. L'analisi Real-Time è stata effettuata su

RNA totale estratto da foglie e da frutti a diversi stadi di maturazione (Mature Green, 8, 14, 21, 28 giorni dopo MG). Nelle foglie e nello stadio Mature green della PSGM il livello dei trascritti della licopene ciclase è stato circa sette volte superiore rispetto al controllo; negli altri stadi di maturazione del frutto il livello dei trascritti è stato da 35 a 45 volte superiore al controllo Red Setter (Stigliani et al. 2003). La determinazione del contenuto dei carotenoidi nel frutto maturo è stata effettuata mediante analisi HPLC. Tali determinazioni hanno consentito di verificare che nei frutti maturi delle PSGM quasi tutto il licopene viene convertito in beta-carotene, con valori di accumulo variabili tra 8 a 20 mg/100g di peso fresco. Tali determinazioni sono state effettuate su piante appartenenti a differenti generazioni ed i risultati di tutte queste indagini sono riportati dettagliatamente nei lavori D'Ambrosio et al. (2003, 2004).

b) Sito di espressione, ad esempio: radici, fusto, polline, ecc.

Le caratteristiche dell'inserto, vale a dire l'impiego di promotori costitutivi, sono tali da indurre la sua espressione durante tutto il ciclo vitale ed in ogni organo della pianta (vedi punto precedente).

c) Metodi utilizzati per la caratterizzazione.

L'espressione del gene della licopene ciclase è stata verificata mediante Northern Blot e Real Time RT-PCR. Questa tecnica recente ed estremamente potente consente di monitorare in tempo reale lo svolgimento della reazione di amplificazione. L'utilizzazione di tale tecnica richiede però la verifica di una serie di parametri necessari per poter effettuare esperimenti attendibili.

Al fine di ottenere un prodotto di reazione il più possibile specifico si è deciso di utilizzare sonde TaqMan. Il primo passo è stato rappresentato dal disegno della coppia di primer e delle sonde necessarie per effettuare lo studio di espressione. Ciò è stato fatto utilizzando il software Primer Express Version 1.5 della Applied Biosystems.

Successivamente si è proceduto con la definizione del metodo da impiegare per la determinazione dei livelli di espressione dei singoli geni. Per la quantificazione del trascritto genico è stato utilizzato il metodo di analisi "*Quantificazione relativa mediante l'uso della curva standard*" che richiede la determinazione di una Curva Standard per ogni gene e per ogni esperimento di amplificazione. Tutte le determinazioni sono state eseguite impiegando il sistema di amplificazione e rilevamento della BioRad (ICycler).

L'espressione di NptII è stata verificata indirettamente mediante esperimenti di selezione delle PSGM su substrato contenente kanamicina.

3. Stabilità genetica dell'inserto e stabilità fenotipica della PSGM

L'analisi genetica eseguita fino alla progenie T5 ottenuta per successive autofecondazioni delle piante transgeniche primarie (T0) ha confermato che i geni Lcy(+) e NptII vengono stabilmente trasferiti alla progenie, mantenendo l'attività biologica (alta produzione di β -carotene e resistenza alla kanamicina) e si comportano come un fattore mendeliano dominante. Nella prova sperimentale descritta di seguito si è proceduto all'analisi del comportamento in pieno campo di due linee di selezione, quelle che dalle precedenti prove in serra erano apparse più promettenti.

Informazioni sul sito di emissione

1. Ubicazione e dimensioni del sito di emissione

Metaponto, Frazione di Bernalda (MT). Il campo è stato allestito presso l'Azienda Sperimentale Dimostrativa Pantanello di proprietà della Agenzia Lucana di Sviluppo ed Innovazione in Agricoltura della Regione Basilicata (S.S. Jonica al Km 448.2) all'interno della quale è presente anche la Metapontum Agrobios. Il sito di emissione ha occupato una superficie di 6400 m² su cui si è provveduto ad effettuare il trapianto a mano osservando una distanza di 1,70 metri fra le bine e 0,50 metri tra le file e 0,40 sulla fila in 36 parcelle (totali) di 30m² ognuna. Su 12 parcelle è stata trapiantata la PSGM rappresentata da due linee di selezione (Fig.1).

2. Descrizione dell'ecosistema locale di emissione

Metaponto, Frazione di Bernalda (MT). - Clima temperato: temperatura media invernale circa 9°C (medie di 8°C a gennaio, il mese più freddo). Temperatura media estiva di circa 24°C (con valori medi di circa 28°C ad agosto). Precipitazioni piovose: media mensile 45 mm, con oscillazioni fra i 68-69 mm medi di novembre e dicembre ed i 14 mm medi di luglio. Una punta di 247 mm si è verificata nel mese di novembre 1990. Rara la presenza di neve ed ancor più rara quella della nebbia. La zona si trova in pianura a pochi metri sul livello del mare. Il terreno è tendenzialmente argilloso. L'agricoltura della zona è ad orientamento prevalentemente ortofrutticolo. La cerealicoltura e le colture industriali o da rinnovo (barbabietola, mais, sorgo, patata, girasole, ecc.) sono anche comuni in zona, mentre la coltura del pomodoro ha subito un arresto negli ultimi dieci anni a causa della diffusione del CMV (Cucumber Mosaic Virus) ceppo necrogenico. Oltre alle colture precedentemente indicate, l'area è limitatamente coperta dalla flora spontanea di tipo mediterraneo. Nella riserva "Salinella" sono presenti specie avicole stanziali e migratorie.

3. Presenza di specie sessualmente compatibili naturali o coltivate

Il pomodoro, pur avendo occupato nel passato grandi superfici della zona di emissione, ha subito una forte riduzione delle superfici negli ultimi anni ed, all'interno dell'Azienda Sperimentale Pantanello, non sarà presente nessuna coltura di pomodoro nel corso del 2004. I fattori che prevengono l'impollinazione incrociata del pomodoro con altre specie del genere *Lycopersicon* o con specie del genere *Solanum* sono ben documentate (Stevens and Rick, 1987) e non esistono evidenze che facciano supporre che anche il pomodoro geneticamente ingegnerizzato non si comporti nello stesso modo. Il pomodoro può essere manualmente incrociato con specie dello stesso genere, ma spesso è necessario effettuare tecnica di coltura di embrioni per ottenere ibridi fertili. Per tali considerazioni è possibile affermare che nelle condizioni dell'area di prova non esistono possibilità di incrocio tra pomodoro e altre piante, compreso il *Solanum nigrum* comune infestante di campi di pomodoro (Rick 1976, Rick 1983, DeVerna et al, 1987).

Inoltre in precedenti prove di campo condotte dalla Metapontum Agrobios impiegando altre PSGM (Not.n. B/IT/00/09) è stata dimostrata l'assenza di trasferimento del tratto genetico esogeno (resistenza a kanamicina) nelle piante di pomodoro trappola disposte intorno al campo di piante geneticamente modificate. La cultivar su cui è stato effettuato

tale studio è la UC82B, dalla quale è derivata la cultivar commerciale Red Setter, impiegata come organismo ricevente nella PSGM oggetto del presente studio.

4. Preparazione e gestione del sito di emissione, prima, durante e dopo l'emissione comprese pratiche colturali e modalità di raccolta.

Metaponto, Frazione di Bernalda (MT). - La zona è stata preparata utilizzando le normali pratiche colturali per il pomodoro che prevedono una rippatura a 40 cm seguita da accurati lavori di spianamento, di amminutamento e di sistemazione della superficie del terreno. La prova è stata realizzata secondo uno schema di trapianto a file binate. Lo schema sperimentale è stato a blocco randomizzato ed ha previsto 36 parcelle da 30 m² con 90 piante/parcella con un sesto d'impianto di 1,70 m x 0,50 m x 0,40:

- 12 parcelle contenevano la PSGM,
- 12 la linea controllo Red Setter,
- 12 un ibrido commerciale per pomodoro da industria altamente produttivo (Perfect Peel).

I 6400 m² del campo sperimentale hanno compreso anche la fascia di terreno incolto. Più precisamente partendo dalla recinzione sono state poste 4 file di Mais distanziate 0,5 metri l'una dall'altra (ampiezza totale della fascia coltivata 2 metri), due file di pomodoro (controllo) perimetrali ed infine le 36 parcelle da 30 m² (Fig. 1). La superficie investita dalle parcelle è stata quindi pari a 1300 m².

Preparazione del terreno: Il terreno destinato alla prova è stato preparato attraverso una aratura profonda eseguita a fine autunno 2003, un'aratura superficiale (20–30 cm) nella primavera 2004, seguita da accurati lavori di spianamento, di amminutamento e di sistemazione della superficie del terreno. E' stata effettuata la somministrazione preventiva di concimi fosfatici e potassici. La dose è stata pari ai 2/3 della quantità prevista alla semina o trapianto, il restante 1/3 è stato somministrato alla rincalzatura.

Semina e trapianto: Sia la semina che il trapianto sono stati posticipati rispetto ai tempi previsti e in seguito al rilascio dell'autorizzazione da parte del Ministero dell'Ambiente. (Decreto di autorizzazione 651), si è proceduto alla semina in alveoli di polistirolo (seminiere) utilizzando come substrato la torba sterile. Prima della semina il substrato è stato trattato con fungicidi sistemici quali Benomyl e Metalaxyl al fine di evitare infezioni fungine alla giovane piantina (*Phytium*; *Phytophthora*).

Il trapianto è stato effettuato quando le piantine in semenzaio avevano raggiunto l'altezza di 10-15 cm.

Informazioni sui piani di monitoraggio, controllo, e trattamento del sito e dei rifiuti dopo l'emissione dei rifiuti

1. distanza da altre specie vegetali selvatiche o coltivate sessualmente compatibili

All'interno dell'Azienda Sperimentale Pantanello, di dimensioni pari a circa 100 ha, l'unica coltura di pomodoro presente è stata quella relativa al sito di emissione. La distanza minima dai più vicini campi di pomodoro è stata sicuramente superiore ai 200

metri. Nel caso del pomodoro, come precedentemente specificato, non esistono specie selvatiche sessualmente compatibili.

2. eventuali misure per ridurre al minimo/prevenire la dispersione di organi di riproduzione della PSGM ad es. polline, semi, tuberi

La dispersione del polline è estremamente difficile in pomodoro in quanto specie altamente autogama. Allo scopo di limitare ulteriormente la già ridottissima probabilità di dispersione del polline sono state attuate le seguenti misure precauzionali. La distanza da altri campi di pomodoro ha reso praticamente impossibile l'incrocio con altre piante di pomodoro. Le quattro file di mais delimitanti il campo hanno rappresentato una sorta di barriera meccanica all'eventuale dispersione di polline. Inoltre sono stati disposti nastri cangianti (allogroici) che grazie all'azione combinata dell'olografia, del vento e della luce risultano fastidiosi per gli uccelli e creano una zona "off-limits" nella quale gli uccelli non entrano (Fig.2).

Informazioni sui metodi di trattamento del sito di emissione ad emissione avvenuta

Il sito è stato recintato da una rete metallica a maglie strette dell'altezza di 1,50 m ed interrata per la profondità di 20 cm. L'accesso al campo è stato possibile grazie alla presenza di una porta provvista di lucchetto ed è stato consentito solo al personale autorizzato. La presenza del campo è stata segnalata da un apposito cartello indicante il riferimento della notifica ed il tipo di pianta coltivata (Fig.2).

Le bacche raccolte sono state utilizzate esclusivamente per successive sperimentazioni di laboratorio. Il materiale non utilizzato è stato trattato in stufa a 180°C per 6 ore prima di essere eliminato come rifiuto. I residui della coltivazione rimasti sul campo sono stati raccolti, estirpati e bruciati (Fig.3).

Al termine della sperimentazione, il terreno è stato lasciato incolto per circa un anno in modo da poter eliminare eventuali piante conservate nel suolo e/o germinate spontaneamente. Successivamente è stato effettuato un intervento irriguo, un trattamento con dissecanti totali (tipo paraquat, glifosate, ecc.) ed un'aratura. Il terreno è rimasto incolto per un'ulteriore periodo di due mesi e non è stato reinvestito a pomodoro nell'annata successiva a quella della prova (Fig.4).

Bibliografia

D'Ambrosio C, Giorio G., Stigliani A.L. and Cellini F. 2003. Growing conditions greatly influence the accumulation of fruit carotenoid content in transgenic tomato plants overexpressing the lycopene b-cyclase gene. *Proceeding "PlantBiology 2003"*, p. 217, 25-30 July 2003, Hawaii USA

D'Ambrosio C., Giorio G., Marino I., Merendino A., Petrozza A., Salfi L., Stigliani A.L., Cellini F. 2004. Virtually complete conversion of lycopene into beta-carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato *lycopene β -cyclase (tlcy-b)* cDNA. *Plant Science* 166: 207-214

DeVerna JW., Chetelat RT., Rick CM. and Stevens MA. 1987 Introgression of *Solanum lycopersicoides* germoplasm. in *Tomato Biotechnology* 27-36. Nevins DJ and Jones RA Eds

Hirschberg J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol.*4(3): 210-8.

Rick C.M., 1976 Tomato, family Solanaceae. *Evolution of Crop Plants* 268-273. Simmonds NW, ed Longman Publications, New York

Rick CM. 1983. Genetic Resources in Lycopersicon. in *Tomato Biotechnology* 17-26. Nevins DJ and Jones RA Eds

Stevens and Rick 1987. Genetics and Breeding. in Atherton, Rudich (EDS): “*Tomato Crop*”, London Chapman and Hall

Stigliani AL, Giorio G. and D’Ambrosio C. 2003. Proceedings “*Plant Biology 2003*”p.218, 25-30 July, Hawaii USA.

Fig. 1 = Vista aerea del campo sperimentale di pomodoro transgenico e schema del campo. Nella foto a destra si evidenzia la Metapontum Agrobios ed il campo sperimentale, che appare ingrandito nella foto in basso a sinistra. La superficie del campo è stata così suddivisa: recinzione del perimetro della prova (A); fascia perimetrale di mais larga 4m (B); file di bordo con pomodoro di controllo (C); parcelle sperimentali (D). Lo schema sperimentale impiegato è stato quello a blocco randomizzato.

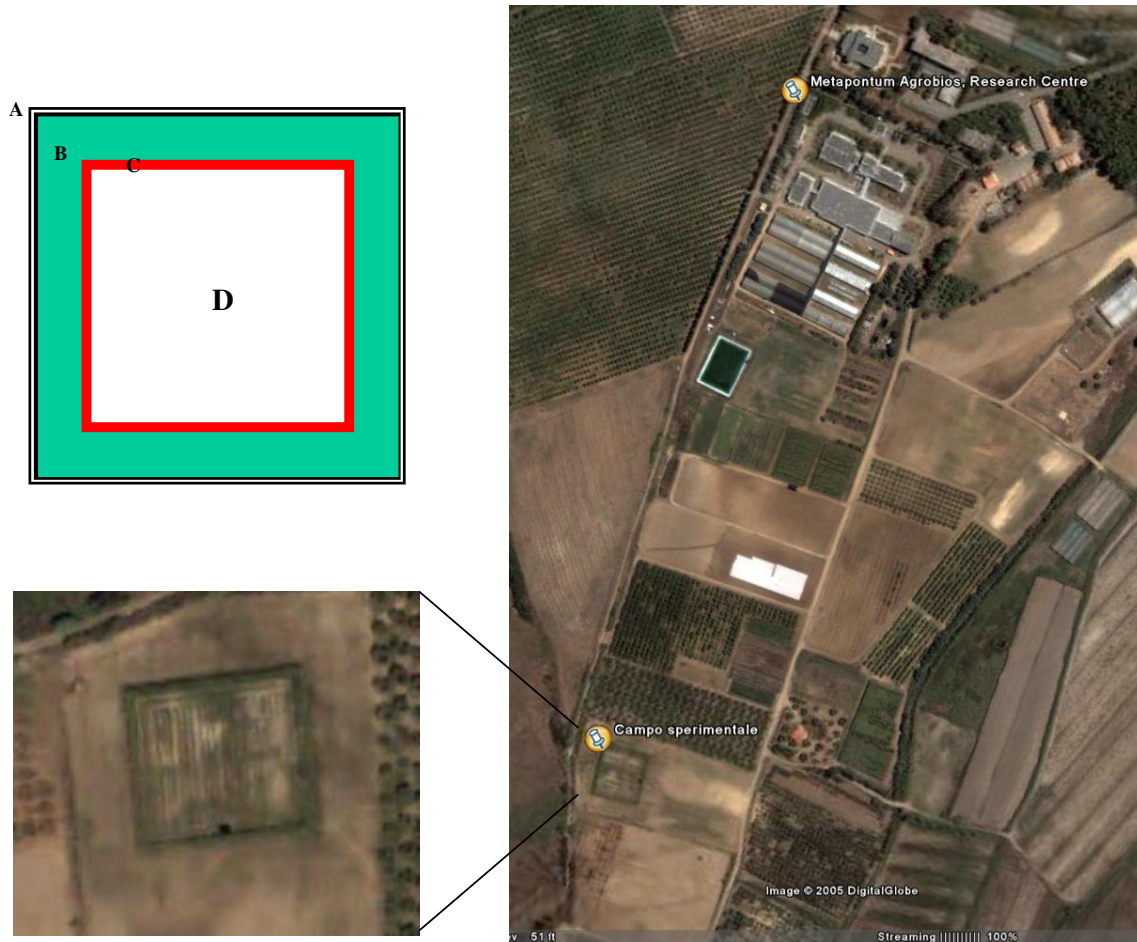




Fig. 2 = Differenti fasi del campo sperimentale: impianto (A), trapianto (B), fioritura (C), maturazione dei frutti (D). In basso sono riportati i particolari di piante Red Setter (a sinistra), ed HC (a destra). Da notare nel pannello C la presenza sul campo dei nastri cangianti anti uccello come richiesto



Fig. 3 Bruciatura dei residui di vegetazione sul sito di emissione.



Fig. 4 = Trattamento diserbante effettuato nell'Aprile 2005 sulla superficie che ha ospitato il campo sperimentale.

VALUTAZIONE AGRONOMICA IN PIENO CAMPO DEI GENOTIPI HIGHCARO, PERFECTPEEL E REDSETTER

Introduzione

La sperimentazione ha avuto l'obiettivo principale di valutare in pieno campo le prestazioni agronomiche e le caratteristiche qualitative delle bacche della linea transgenica di pomodoro HighCaro (HC) in confronto alla linea RedSetter (RS) originaria e all'ibrido PerfectPeel (HP), un ibrido commerciale dotato di performance agronomiche molto elevate.

Rispetto al disegno sperimentale previsto in fase di programmazione, la prova agronomica ha subito delle modifiche che hanno avuto dei riflessi sulle modalità di analisi statistica dei dati.

Le variazioni più rilevanti sono state le seguenti:

- non si è più studiato il fattore “Regime idrico”
- le determinazioni di laboratorio sono state eseguite non su 36 ma solo su 24 parcelle.

Tali modifiche si sono rese necessarie in quanto il trapianto tardivo ha comportato un elevato livello di infezione virale (CMV ceppo necrogenico) che ha seriamente compromesso la produzione.

Metodi

Disegno sperimentale

Il disegno sperimentale impiegato è stato il *Blocco Randomizzato* con 12 ripetizioni. La singola parcella era costituita da tre bine di circa 6 m di lunghezza contenenti 30 piante distribuite in due file parallele, per un totale di 90 piantine per parcella. Pertanto, per ogni genotipo erano teoricamente presenti sul campo 1080 piantine. I dodici blocchi erano disposti a coppie su 6 file. Il campo è stato suddiviso virtualmente in due parti, la parte SUD contenente le prime tre file con i blocchi 1a, 1b, 2a, 2b, 3a e 3b, e la parte NORD contenente i blocchi 4a, 4b, 5a, 5b, 6a e 6b.

Le determinazioni di laboratorio sono state eseguite sulle bacche di 24 bine selezionate in altrettante parcelle. La selezione della bina, fra le tre disponibili nella parcella scelta, ha introdotto, inevitabilmente, un ulteriore fattore di variabilità, poiché, in ogni singolo blocco, si è tentato di individuare le tre bine, una per ogni genotipo, che presentavano una certa uniformità relativamente agli attacchi di virus, di insetti o allo stress idrico subito.

Struttura del dataset

Si è operato per ogni bina sia il rilievo del numero totale di piante presenti, sia il numero di piante con sintomi molto severi di attacco virale. Sebbene le determinazioni analitiche siano state eseguite solo su 24 campioni di bacche provenienti da altrettante

bine selezionate, la raccolta ha interessato tutte le bine presenti nel campo. Per ogni singola bina si è proceduto alla ripartizione dei frutti nei tre gruppi distinti: bacche integre a vario grado di maturazione (produzione commerciabile); bacche verdi; scarto. Pertanto, le variabili produttive che sono state sottoposte ad analisi statistica sono: peso delle bacche definite commerciabili (*comm*); peso delle bacche verdi (*verdi*); peso delle bacche definibili come scarto (*scarto*).

Dalle tre variabili primarie si è proceduto al calcolo della variabile secondaria produzione totale per bina e per parcella e rapportando i valori ottenuti al numero delle piante presenti nella bina o parcella, si sono ottenuti i dati produttivi per pianta (espressi in grammi) riferiti alla bina o alla parcella.

Pertanto sono stati costituiti tre insiemi di dati: il primo contenente solo i dati produttivi per bina; il secondo contenente solo i dati produttivi per parcella; il terzo contenente i dati produttivi e quelli delle determinazioni chimiche e chimico-fisiche relativi alle 24 bine selezionate.

La Tabella 1 riporta le variabili analizzate:

Tabella 1= Variabili considerate nell'analisi		
	Variabili produttive	Unità di misura
Nome	Descrizione	
Totpia	peso totale bacche per pianta,	g
Comm	Peso bacche commerciabili per pianta,	g
Verdip	peso bacche verdi per pianta,	g
Scartop	peso scarto per pianta,	g
	Variabili Chimiche	
betaCar	Contenuto di beta-carotene della bacca	mg/100 g Tessuto fresco
Lic	Contenuto di licopene della bacca	mg/100 g Tessuto fresco
Lut	Contenuto di luteina della bacca	mg/100 g Tessuto fresco
totcaro	Somma di betaCar, Lic e Lut	mg/100 g Tessuto fresco
totcarot	Somma di totcaro e altri picchi non identificati	mg/100 g Tessuto fresco
SS	Sostanza secca della passata fresca	%
Brix	Gradi Brix della passata fresca	° Brix
Acid	Acidità della passata fresca	Meq [H ⁺]/100 g
cond1	Conducibilità della passata fresca	µs/cm

Totcarot = somma di **betacar**, **lic**, **lut** e degli altri presunti carotenoidi tranne **beta3**, separati dall'analisi HPLC ma non identificati chimicamente.

Modelli d'analisi

L'analisi dei dati è stata condotta con metodi di analisi statistica univariata. In particolare è stata applicata l'Analisi della Varianza (ANalysis Of Variance) che consente di stimare la significatività degli effetti dei livelli di uno o più fattori sulla variabilità dei parametri rilevati. Nel primo modello di analisi, il fattore da studiare era il "Genotipo" con tre livelli rappresentati dalle tre linee di pomodoro: HighCaro, RedSetter e PerfectPeel. In un secondo modello, oltre al Genotipo, è stato incluso anche il fattore Campo al fine di verificare una differenziazione fra le due zone del campo. Per le variabili per le quali l'ANOVA ha evidenziato un effetto statisticamente significativo

sulla variabilità dei dati, si è proceduto al confronto delle medie dei genotipi utilizzando il test t di Bonferroni.

Risultati

Analisi variabili produttive rilevate sulle 36 parcelle

L'analisi con il primo modello ha evidenziato che il fattore Genotipo esercita un effetto significativo sulla variabilità di *totpia*, *commp* e *scartop*, ma non su quella di *verdip*. La Tabella 2 riporta i risultati dell'ANOVA e del confronto fra le medie dei tre genotipi.

Tabella 2 = Analisi della varianza e confronto fra le medie dei tre genotipi utilizzando i dati medi delle 36 parcelle							
ANOVA (Analysis of Variance)			Significatività delle differenze fra le medie dei tre genotipi ¹				
Significatività dell'effetto del fattore genotipo			Bonferroni t test, $\alpha = 5\%$				
			Valori medi , g /pianta			Numerosità	MSD ²
Variabile	Valore di <i>F</i>	<i>p</i> -valore ³	HP	RS	HC	n1,n2,n3	
<i>Totpia</i>	18.65	< 0.0001	949.76 ^A	725.94 ^B	431.24 ^C	12,12,12	220.68
<i>Commp</i>	23.28	< 0.0001	734.48 ^A	450.40 ^B	288.55 ^B	12,12,12	171.45
<i>Scartop</i>	23.12	< 0.0001	126.61 ^B	178.1 ^A	78.06 ^C	12,12,12	38.126
¹ Medie di una stessa riga con una lettera simile sono significativamente non differenti							
² MSD, minima differenza significativa							
³ <i>p</i> -valore, Livello di significatività α . Probabilità che se H0 è vera, F assuma per semplice evento casuale un valore pari a quello calcolato.							

Dalla sua analisi si evidenzia che la linea transgenica HighCaro ha prodotto significativamente meno sia della varietà originaria RedSetter sia, come era atteso, dell'ibrido commerciale HP. La linea HighCaro ha prodotto 431.24 g di bacche per piante mentre la RedSetter 725.94 e l'ibrido 949.76. Pertanto, l'ibrido ha prodotto più del doppio della linea transgenica ed il 30 % in più della RedSetter.

L'analisi statistica eseguita con il modello includente il fattore CAMPO ha evidenziato che quest'ultimo esercitava un effetto solo sulla variabilità della componente *verdip*.

Poiché l'interazione Genotipo*Campo non è risultata significativa si è operato il confronto fra le medie dei due campi (Tab.3).

Tabella 3 = Analisi della varianza e confronto fra le medie dei due campi utilizzando i dati medi delle 36 parcelle						
ANOVA			Significatività delle differenze fra le medie dei due campi ¹			
Significatività dell'effetto del fattore CAMPO			Bonferroni t test, $\alpha = 5\%$			
			Valori medi , g /pianta		Numerosità	MSD ²
Variabile	Valore di F	<i>p</i> -valore ³	NORD	SUD	n1,n2,n3	
<i>verdip</i>	7.43	0.0214	116.68 ^A	50.48 ^B	18,18	54.134
¹ Medie di una stessa riga con una lettera simile sono significativamente non differenti .						
² MSD, minima differenza significativa .						
³ <i>p</i> -valore, Livello di significatività α . Probabilità che se H0 è vera, F assuma per semplice evento casuale un valore pari a quello calcolato.						

Tale confronto ha evidenziato che, mediamente sui tre genotipi, il peso dei frutti verdi per pianta era di 116.68 g nel campo NORD e 50.48 nel campo SUD. Tale risultato fa

pensare ad un anticipo di maturazione nella zona SUD del campo che avrebbe avuto come conseguenza un minor valore medio di questa grandezza.

Analisi variabili produttive e determinazioni di laboratorio eseguite sui campioni di bacche delle 24 parcelle

Utilizzando il dataset includente i dati delle 24 parcelle selezionate si è proceduto alla verifica del primo modello di analisi per tutte le variabili disponibili.

La Tabella 4 riporta i risultati dell'ANOVA e del confronto fra le medie dei tre genotipi per le variabili per le quali il fattore Genotipo è risultato significativo.

Tabella 4 = Analisi della varianza e confronto fra le medie dei tre genotipi utilizzando i dati ottenuti sulle 24 bine							
ANOVA			Significatività delle differenze fra le medie dei tre genotipi ¹				
Significatività dell'effetto del fattore genotipo			Bonferroni t test, $\alpha = 5\%$				
						Numerosità	MSD ²
Variabile	Valore di F	p-valore ³	HP	RS	HC	n1,n2,n3	
<i>totpia</i>	9.70	0.0023	973.3 ^A	762.6 ^{AB}	512.2 ^B	8,8,8	279.2
<i>commp</i>	10.48	0.0017	756.8 ^A	486.7 ^B	340.1 ^B	8,8,8	251.0
<i>scartop</i>	6.65	0.0094	133.8 ^{AB}	195.4 ^A	94.9 ^B	8,8,8	75.5
<i>betaCaro</i>	168.19	<0.0001	0.57 ^A	0.63 ^A	7.66 ^B	8,7,8	1.24
<i>Lic</i>	663.83	<0.0001	10.89 ^A	10.29 ^A	0.05 ^B	8,7,8	0.93
<i>Lut</i>	18.84	<0.0001	1.14 ^A	1.09 ^A	0.23 ^B	8,7,8	0.47
<i>totcaro</i>	30.85	<0.0001	12.97 ^A	12.01 ^A	7.93 ^B	8,7,8	1.90
<i>totcarot</i>	29.76	<0.0001	13.17 ^A	12.54 ^A	8.40 ^B	8,7,8	1.86
<i>SS</i>	10.45	0.0017	5.64 ^A	5.08 ^B	5.58 ^A	8,8,8	0.37
<i>Brix</i>	22.76	<0.0001	4.13 ^B	3.96 ^C	4.36 ^A	8,8,8	2.72
<i>acid</i>	12.79	0.0007	5.95 ^A	5.41 ^B	6.12 ^A	8,8,8	2.72
<i>condI</i>	6.68	0.0092	5770 ^A	5208 ^B	5406 ^{AB}	8,8,8	424

¹ Medie di una stessa riga con una lettera simile sono significativamente **non differenti**.
² MSD, minima differenza significativa .
³ p-valore, Livello di significatività α . Probabilità che se H0 è vera, F assuma per semplice evento casuale un valore pari a quello calcolato.

L'analisi della Tabella 4 evidenzia che, riguardo le componenti della produzione, la linea HighCaro non si differenzia dalla linea RedSetter per la produzione totale e la produzione commerciabile per pianta. L'ibrido commerciale presenta le migliori performances produttive fornendo 973.3 g di bacche totali per pianta. Tale valore è molto superiore ai 512.2 g rilevati per l'HighCaro e abbastanza superiore ai 762.6 g della linea RS, sebbene in quest'ultimo caso la differenza di 210.7 g non risulta statisticamente significativa. Le maggiori differenze fra le tre linee si osservano per la produzione commerciabile. In questo caso, la linea HP produce 756.8 g di bacche per pianta mentre le linee RedSetter e HighCaro producono, rispettivamente, 486.7 e 340.1 g di bacche per pianta.

Riguardo il contenuto dei carotenoidi, le analisi hanno evidenziato che nei frutti della linea HighCaro si accumula prevalentemente beta-carotene, 7.66 mg/100g tessuto fresco, a discapito degli altri carotenoidi (*licopene*, 0.05 e *luteina* 0.23), mentre le linee HP e Redsetter sono equivalenti riguardo tali variabili. L'analisi del contenuto totale di carotenoidi nei frutti ha evidenziato che il genotipo transgenico, nelle condizioni

sperimentali, mostra un accumulo di carotenoidi significativamente inferiore a quello delle linee controllo. Infatti, mentre per l'ibrido e per la RedSetter i valori medi sono stati pari a 12.97 e 12.01 mg di carotenoidi totali per 100 g di PF, la linea transgenica ha accumulato un valore significativamente inferiore pari mediamente a 7.66 mg.

Il confronto fra i valori medi delle variabili *SS*, *acid* e *cond1* ha evidenziato che le linee HighCaro e HP sono sostanzialmente non differenti fra loro ma significativamente differenti dalla linea RedSetter, che presenta valori medi inferiori per *SS* e *acid*.

Per il parametro *Brix* le differenze fra le medie dei tre genotipi sono tutte significative.

Discussione

I risultati ottenuti dall'analisi statistica delle componenti della produzione, del contenuto di carotenoidi e delle proprietà chimiche e chimico-fisiche dei frutti o della passata ci consentono di affermare che la capacità della linea di pomodoro HighCaro di convertire nei frutti il licopene in beta-carotene si mantiene anche in condizioni di coltivazione in pieno campo. Infatti, le analisi sui frutti dei tre genotipi hanno evidenziato che nel genotipo HighCaro il valore medio di beta-carotene è pari a 7.66 mg per 100 g di peso fresco, mentre nei due genotipi di controllo si accumulano mediamente 0.57 e 0.63 mg, rispettivamente per l'ibrido HP e per la linea di riferimento RedSetter. L'analisi del contenuto totale di carotenoidi nei frutti ha evidenziato che nelle condizioni sperimentali applicate il genotipo transgenico manifesta una capacità di accumulo significativamente inferiore a quella delle linee di controllo. Ciò conferma i risultati di esperimenti precedenti in base ai quali si era dimostrato che le condizioni ambientali di crescita delle piante influiscono molto sulla capacità di questo genotipo di accumulare il beta-carotene. Il minore contenuto di carotenoidi totali riscontrabile nel genotipo HighCaro deriverebbe dal minore contenuto di beta-carotene rilevato nei frutti rispetto a quello effettivamente prodottosi. La differenza sarebbe da attribuire al processo di degradazione del beta-carotene che in pieno campo, data la sua maggiore instabilità chimica, si determina per l'azione di fattori di stress quali le elevate temperature, l'elevata radiazione o gli attacchi di patogeni etc. Data l'impossibilità di rilevare e quantificare, con la procedura analitica impiegata, i prodotti di degradazione, ne deriva che il contenuto totale di carotenoidi è sottostimato nel genotipo transgenico che, pertanto, appare incapace di raggiungere i livelli di contenuto totale ottenuti dalle altre due linee.

Le analisi chimiche sui frutti hanno evidenziato che i valori di *SS*, *gradi Brix* e *acidità* sono significativamente più elevati nella passata ottenuta con i pomodori HighCaro che con quella ottenuta dai pomodori di controllo.

Relativamente alle componenti della produzione, la valutazione agronomica ha confermato la superiorità produttiva dell'ibrido rispetto alla RedSetter ed alla linea HighCaro anche in condizioni ambientali estremamente selettive, quali quelle che si sono verificate nel corso della coltivazione.

Le differenze fra le tre linee sono apparse più accentuate considerando i valori medi per parcella (Tab. 2) invece che le stime di produzione basate sulle 24 bine selezionate per il campionamento dei frutti (Tab. 4). Come era stato già anticipato nell'introduzione della nota tecnica, la selezione delle bine su cui operare il campionamento dei frutti da mandare in laboratorio, è stata operata in modo tale che le bine dello stesso blocco fossero quanto più possibile uniformi riguardo lo sviluppo delle piante e l'incidenza di attacchi di patogeni. Per tale motivo, i risultati delle analisi basati sui dati delle 24 bine sono da considerarsi stime di quelli che si sarebbero realizzati se si fossero avute

condizioni ottimali di coltivazione. I risultati ottenuti con le medie delle parcelle possono, invece, essere considerati come la risposta produttiva dei genotipi analizzati in condizioni ambientali estremamente selettive, quali quelle che effettivamente si sono realizzate. In tali condizioni la capacità produttiva della linea transgenica si è rivelata inferiore rispetto al corrispettivo controllo. Questi risultati sono in contrasto con quanto osservato in serra, dove la linea transgenica anche in condizioni di stress abiotico indotto (stress idrico) ha mostrato una maggiore rusticità.

La differente tipologia degli stress in pieno campo (sommatoria di stress abiotici e biotici) ha invece consentito di evidenziare un comportamento produttivo sicuramente superiore della linea controllo. Studi successivi dovranno essere condotti allo scopo di separare tutte le componenti dello stress osservato in pieno campo e di monitorare la risposta della pianta transgenica alle differenti condizioni. Ciò servirà a meglio caratterizzare da un punto di vista agronomico la PSGM e definire le condizioni di allevamento che ne massimizzano la capacità produttiva.

VALUTAZIONE DELLA TRASMISSIBILITÀ DEL POLLINE

Introduzione

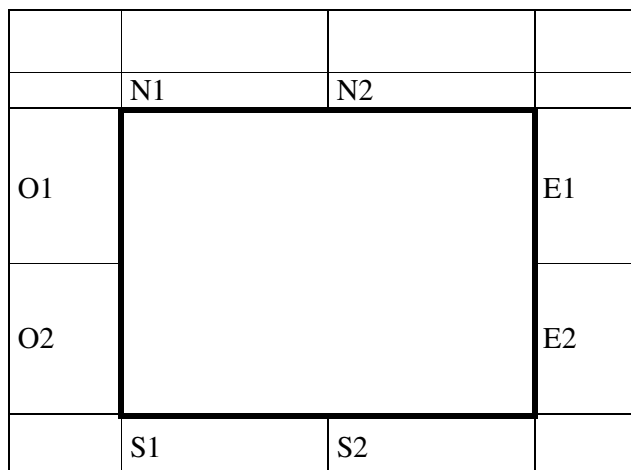
La pianta transgenica oggetto di studio è caratterizzata dall'overespressione del gene della licopene ciclase di pomodoro. Anche in condizioni di eterozigosi la presenza del transgene determina la conversione del licopene, che normalmente si forma nella bacca di pomodoro, in beta-carotene. La differente tipologia di carotenoide accumulatosi nella bacca genera una variazione del colore del frutto che passa dal rosso intenso ad un arancio brillante (Fig.5).

Disponendo, quindi, di un marcatore colorimetrico che ci consente di differenziare tra piante transgeniche e piante controllo, si è ritenuto di poter verificare l'eventuale trasmissibilità del polline della pianta transgenica osservando la comparsa del fenotipo arancione tra i frutti della progenie delle file di bordo e delle piante controllo che all'interno del disegno sperimentale confinavano con le parcelle transgeniche.

Materiali e metodi

Si è proceduto alla raccolta del seme dei frutti delle piante Red Setter :

- delle file di bordo suddivise in 8 settori (2 per ogni lato) come indicato nello schema,



- delle file confinanti con le parcelle transgeniche (5),

per un totale di 13 differenti sezioni.

Le file di bordo hanno prodotto circa 3000 semi per sezione, dalle file confinanti con le parcelle transgeniche sono stati ottenuti circa 1000 semi per fila.

Per ogni gruppo sono stati seminati 550 semi che hanno portato al trapianto in serra a contenimento di 500 piante.

Si è proceduto al rilievo della colorazione del frutto non appena erano presenti sulla pianta almeno 3 frutti maturi. Subito dopo la pianta è stata estirpata (Fig.6).

Risultati e discussione

Sono state analizzate 500 piante per ogni sezione. La coltura ha risentito delle basse temperature del periodo invernale e ciò ha rallentato di circa 20 giorni il ciclo produttivo. Tutte le piante sono arrivate a frutto e tutti i frutti hanno mostrato il caratteristico colore rosso intenso.

Le osservazioni effettuate ci consentono di affermare che non è stata evidenziata alcuna trasmissibilità del tratto genetico esogeno della PSGM nella progenie delle piante controllo.

Non essendo stata individuata alcuna pianta, sulle 500 analizzate per ogni sezione, con fenotipo arancio la probabilità che l'evento di trasmissione del polline si realizzi non può che essere inferiore allo 0,2%. Tale trasferimento può essere escluso sia per le piante delle file di bordo (che sarebbero state interessate da una trasmissibilità "long-distance"), sia per quelle provenienti dalle file limitrofe alla PSGM (trasmissibilità "short distance").

La ragione di ciò è da ricercare nella particolare morfologia del fiore della cultivar di pomodoro impiegata nell'esperimento che è caratterizzata da antere che racchiudono lo stigma impedendo che questo possa essere fecondato da polline esogeneo (Fig.7).



Fig. 5 = A) Pianta della cultivar controllo Red Setter (a destra) con i tipici pomodori rossi, pianta della linea transgenica HC (a sinistra) con i caratteristici pomodori arancioni. **B)** Sezione longitudinale di pomodori HC (in alto) e pomodori Red Setter (in basso).



Fig.6 = Prova in serra della trasmissibilità del polline. Semina, trapianto, maturazione, eliminazione piante.



Fig.7 = Fiori della cultivar controllo Red Setter (pannello superiore) e della linea transgenica HC (pannello inferiore). La morfologia florale risulta essere perfettamente uguale tra i due genotipi ed è evidente la chiusura dello stigma ad opera del cono staminifero.

Valutazione del contenuto di glicoalcaloidi nel frutto della PSGM e della pianta controllo.

Introduzione

L'alfa-tomatina è il principale glicosteroide alcaloide (glicoalcaloide) naturale del pomodoro, presente in alte concentrazioni nella foglia e negli stadi iniziali di sviluppo del frutto. Nel corso della maturazione del frutto, il livello di alfa-tomatina diminuisce gradualmente, come risultato dei processi catabolici, fino a raggiungere valori prossimi allo zero nella bacca matura (Kozukue *et al.* 1994). La concentrazione di questo glicoalcaloide è di circa 3,37-3,59 mg/100g di peso fresco nel frutto immaturo, mentre nei pomodori maturi si riduce progressivamente. La presenza di tomatina nelle foglie e nei frutti verdi del pomodoro ha lo scopo di impedire la predazione da parte di animali o di piccoli insetti. Nel corso della maturazione del frutto la degradazione di questa sostanza è collegata alla modifica del colore e all'aumento del contenuto di zuccheri che nel complesso rendono i frutti eduli e attraenti per i predatori che ne promuovono la dispersione dei semi.

Un altro fattore che influenza il contenuto di glicoalcaloidi nel frutto di pomodoro è la cultivar. I contenuti di glicoalcaloidi nel pomodoro sono variabili in funzione della cultivar che dello stadio di maturazione del frutto.

In letteratura e' riportata una correlazione negativa tra il contenuto di glicoalcaloidi e il contenuto di carotenoidi totali su diverse tipologie di pomodoro in condizioni di moderato stress salino (Leonardi *et al.*, 2000). La dimostrazione di una relazione inversa tra contenuto di carotenoidi e glicoalcaloidi potrebbe supportare l'ipotesi di un ridotto contenuto di questi ultimi nel genotipo transgenico. Si riportano di seguito i risultati ottenuti dalla valutazione de contenuto di glicoalcaloidi nei pomodori prodotti nella prova sperimentale oggetto della presente nota.

Materiali e metodi:

La determinazione dei glicoalcaloidi è stata realizzata mediante l'utilizzo di un sistema HPLC-MS della Finnigann (ThermoQuest, San Jose, CA, USA).

L'estratto è stato preparato partendo da 0,5 g di campione liofilizzato, macinato e sospeso in 10 ml di acido acetico al 1%. La sospensione ottenuta è stata mantenuta in agitazione per circa 2 h per facilitare il passaggio delle sostanze solubili nel solvente di estrazione. Il campione è stato centrifugato (Centrifuge 4225 Alc) a 4000 rpm per 20 minuti ed il pellet nuovamente estratto con 10 ml di acido acetico al 1%. Dopo filtrazione su filtri in nylon da 0,22 mm (Whatman), il prodotto delle due estrazioni è stato iniettato in colonna.

La separazione dei glicoalcaloidi e degli agliconi è stata realizzata con una colonna cromatografica LC-ABZ, Supelcosil ammido-C16 (250 x 4,6 mm, 5 mm).

La migliore separazione è stata ottenuta utilizzando, come fase mobile, una miscela di metanolo ed acqua acidificata con lo 0,1% di acido formico, fatta eluire in gradiente ad una velocità di 0,8 mL/min

Per ottenere risultati cromatografici riproducibili è stato indispensabile, al termine di ogni corsa, riequilibrare la colonna per almeno 5 minuti con la fase mobile alla composizione iniziale del gradiente.

Per l'analisi quantitativa dei glicoalcaloidi e dei relativi agliconi è stato adottato il metodo dello standard esterno.

La riproducibilità per ogni analita esaminato è stata stimata in termini di tempi di ritenzione (tr). La deviazione standard relativa percentuale (DSR%), calcolata sulla base di dieci repliche di una stessa iniezione, è risultata più bassa del 2,7% per tutti i composti analizzati, rivelando così una buona stabilità cromatografica del metodo.

Risultati e discussione.

E' stata evidenziata la presenza dei due glicoalcaloidi più tipici del frutto di pomodoro: la tomatina e la deidrotomatina (Tab.5 e Fig.8) , mentre sono risultati assenti la α -chaconina e la α -solanina.

I risultati (Tab.5) evidenziano l'assenza di differenze nel contenuto di glicoalcaloidi dei pomodori provenienti dalla PSGM (HC) rispetto ai valori riscontrati nei pomodori provenienti dalla linea controllo Red Setter. Inoltre non è stata evidenziata la comparsa di differenti classi di glicoalcaloidi.

Possiamo cioè affermare che le sostanze identificate nei campioni geneticamente modificati sono dello stesso tipo e quantitativamente comparabili a quelle presenti nel controllo.

Bibliografia

Kozukue N, Kozukue E, Yamashita H, Fujii S. 1994. Alfa-tomatine purification and quantification in tomatoes by HPLC. J Food Sci. 59: 1211-1212

Leonardi C, Ambrosino P, Esposito F, Fogliano V. 2000. Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. J Agric Food Chem 48: 4723-7

Tabella 5 = Contenuto di tomatina e deidrotomatina nei campioni di pomodoro Red Setter ed HC						
Denominazione campione	Alfa-tomatina mg/100g DW	Alfa-tomatina mg/100gFW	SD	Deidrotomatina mg/100g DW	Deidrotomatina mg/100g FW	SD
Red Setter (23464)	3.02	0,16	0.09	0.26	0,013	0.05
Red Setter (23461)	3.51	0,2	0.31	0.38	0,021	0.04
HC (23467)	3.34	0,2	0.03	0.30	0,017	0.05
HC (23465)	2.05	0,1	0.05	0.19	0,010	0.01

SD = deviazione standard della misura strumentale; DW = peso secco; FW = peso fresco

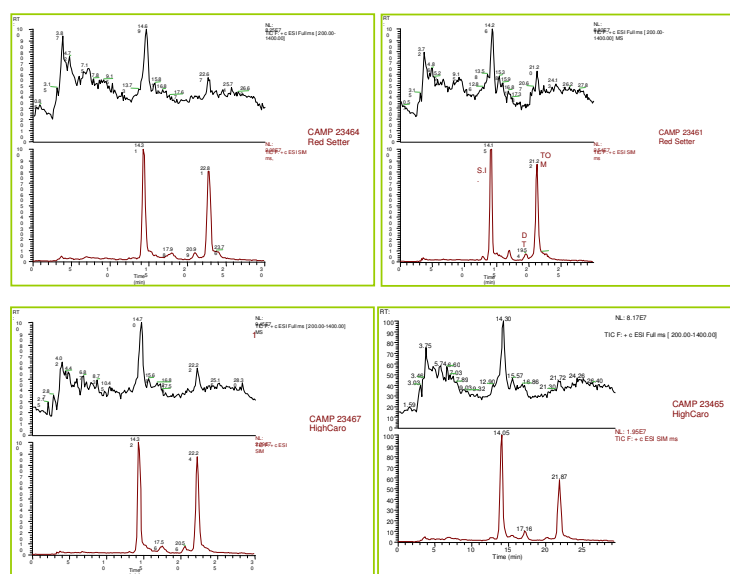


Fig. 8 = Spettri all del contenuto di glicoalcaloidi. SI=Standard Interno; DT= deidrotomatina; T = alfa-tomatina.