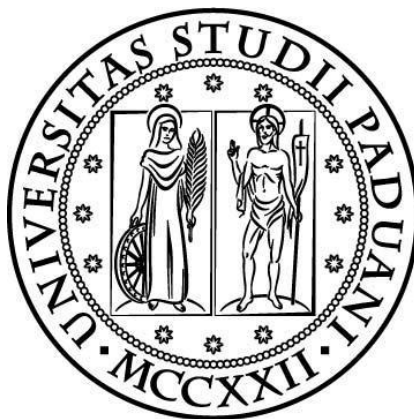


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA



ELABORATO DI LAUREA

Biofortificazione di piante di interesse alimentare

TUTOR: PROF. FIORELLA LO SCHIAVO

Dipartimento di Biologia

Co-TUTOR: PROF. NICOLETTA RASCIO

LAUREANDA: LARA DALLA ROVERE

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	Pag. 1
2. MALNUTRIZIONE DOVUTA A CARENZA DI MICRONUTRIENTI.....	Pag. 2
2.1. Micronutrienti inorganici – i minerali.....	Pag. 4
2.1.1. Piante biofortificate in micronutrienti minerali.....	Pag. 6
2.2. Micronutrienti organici – le vitamine.....	Pag. 7
2.2.1 Piante biofortificate in provitamina A (β -carotene). Pag.	10
3. FITONUTRIENTI NEL MIGLIORAMENTO DELLO STATO DI SALUTE UMANA.....	Pag. 14
3.1. Composti fenolici.....	Pag. 14
3.1.1. Piante biofortificate in antocianine.....	Pag. 18
3.1.2. Piante biofortificate in resveratrolo.....	Pag. 21
4. CONSIDERAZIONI FINALI.....	Pag. 23

1. INTRODUZIONE

La malnutrizione, purtroppo, è a tutt'oggi un problema di sanità a livello mondiale.

L'insufficienza di macro e micro nutrienti è un fenomeno diffuso principalmente tra le popolazioni dei Paesi in via di sviluppo, mentre il sovra consumo di alcuni nutrienti, per esempio gli acidi grassi saturi, riguarda essenzialmente gli abitanti dei Paesi industrializzati. (Yan et al., 2002)

Circa due terzi della popolazione mondiale ha a disposizione un'alimentazione composta per lo più da cereali, le cosiddette "staple crops", che sono carenti di sostanze essenziali per una buona salute dell'organismo.

Numerose sono le malattie legate alla malnutrizione, tra queste si annoverano: la pellagra, dovuta alla carenza di triptofano (precursore della vitamina B3); il beriberi, prodotto dal deficit di tiamina (vitamina B1); il rachitismo provocato dalla mancanza di vitamina D, di Calcio e di Fosforo e, infine, l'anemia, causata dalla carenza di Ferro.

Nel 2001 la General Assembly of the United Nations ha fissato l'anno 2015 come data del "Millennium Development Goals" (MDGs) la cui finalità è quella di superare i problemi legati alla salute e alla povertà. Tra gli otto obiettivi fissati dal MDGs si trova quello di combattere la fame nel mondo e ridurre la mortalità infantile e materna, sconfiggendo la malnutrizione derivante dalla carenza di risorse alimentari. (Mayer et al., 2008)

Passando alla situazione alimentare dei paesi industrializzati, in cui la malnutrizione non dipende dalla mancanza di cibo, ma piuttosto dal cattivo uso che se ne fa, è cosa accertata che una nutrizione soddisfacente e adeguata è in grado di prevenire specifici stati patologici oltre a migliorare e mantenere lo stato di salute generale dell'uomo.

E' da considerare che oltre a vitamine e minerali, che sono indispensabili per la salute, esistono composti che aiutano a migliorare il metabolismo delle cellule del nostro organismo. Questi composti, conosciuti con il termine generale di "fitonutrienti", si trovano nelle piante di interesse alimentare e giocano un ruolo importantissimo come coadiuvanti nella prevenzione e trattamento di certe malattie. Essi appartengono alla vasta e articolata classe dei prodotti secondari e includono, tra gli altri, i composti fenolici, molti dei quali svolgono importanti funzioni antiossidanti in grado di contrastare le azioni deleterie dei radicali liberi. I fitonutrienti, quindi, sono da considerare come importanti integratori alimentari da fornire all'organismo umano attraverso la dieta giornaliera. Carotenoidi e polifenoli sono spesso associati insieme in una dieta antiossidante. (Martin et al., 2011)

E' dimostrato che una dieta salutare basata sul consumo di frutta e verdura, è fortemente associata a una riduzione dell'insorgenza di malattie croniche come le malattie cardiovascolari, spesso causa di infarto, il diabete di tipo 2 e l'obesità.

Il World Health Organization ha stimato che il rischio di mortalità dovuto alle malattie croniche è risultato essere in crescita del 17% nel decennio compreso tra il 2005 – 2015. Questo aumento è dovuto all'innalzamento della durata della vita media, all'uso di tabacco, a una tendenza di vita sempre più sedentaria e, soprattutto, ad uno scorretto stile alimentare. Nel 2007 l' Oxford Healthy

Alliance pubblicò un documento chiamato “Grand Challenge” che si prefissava l’obiettivo di ridurre il rischio di malattie croniche promuovendo un regime alimentare più salutare, basato sul consumo di vegetali.

L’ American Institute for Cancer Research, inoltre, ha sperimentato gli effetti chemio-protettivi di alcuni metaboliti di origine vegetale ed è risultato che molti fitonutrienti possono bloccare l’insorgenza di micro tumori. (Martin et al., 2011) Come conseguenza, nel 2012 l’American Cancer Society ha raccomandato ai cittadini un consumo giornaliero di almeno 5 porzioni di frutta e verdura. (Martin, 2013) Purtroppo però la campagna “5-a-day” ha avuto poco successo e meno del 25% degli americani ha seguito questa regola.

Questo dimostra che, nonostante molti programmi di informazione pubblica circa l’importanza di un’alimentazione corretta come forma di salvaguardia della salute, le persone continuano a mangiare male e, talvolta, addirittura peggio che in passato. Ciò dipende anche dal fatto che è veramente difficile cambiare il proprio stile alimentare. (Martin et al., 2011) Il cosiddetto “cibo spazzatura” è più economico, facile da trovare, pratico, richiede meno tempo di preparazione ed è solitamente più appetibile.

Questo elaborato è focalizzato su alcuni esempi di “biofortificazione” di piante alimentari, cioè di sistemi che portano a potenziare la produzione e l’accumulo nelle piante di interesse di specifici micronutrienti e fitonutrienti, che possono poi venir trasferiti ai consumatori primari attraverso l’assunzione delle parti edibili. Ciò allo scopo di migliorare i valori nutrizionali della dieta sia per i paesi industrializzati sia per quelli in via di sviluppo.

2. MALNUTRIZIONE DOVUTA A CARENZA DI MICRONUTRIENTI

Il termine micronutrienti è usato per indicare nutrienti inorganici (minerali) o organici (es. vitamine) che sono richiesti in piccole quantità e che devono essere assunti con l’alimentazione perché l’organismo umano non è capace di sintetizzarli. (Sands et al., 2009)

L’uomo necessita di almeno 20 elementi minerali, 13 vitamine, 9 aminoacidi e 2 acidi grassi, richiesti a un livello minimo per prevenire disordini nutrizionali. (Zhao et al., 2011)

Studi clinici ed epidemiologici testimoniano l’importante ruolo di molti minerali (come Ferro, Zinco, Iodio, Calcio, Rame e Selenio) e delle vitamine (es. vitamine A, B₆, E) per la salute umana. (National Research Council, 2002)

In particolare, un recente report dell’United Nations System Standing Committee on Nutrition ha stimato che più della metà della popolazione mondiale, comprendente in particolare bambini in età prescolare (Fig.1), soffre di malnutrizione da micronutrienti (MNM), conosciuta anche come Hidden Hunger “fame nascosta”. Questa situazione viene attribuita a una dieta povera di elementi essenziali perché basata, come indicato in precedenza, sulle “staple crops” (riso, mais, frumento, soia, cassava) che, sebbene soddisfino la richiesta calorica, possiedono una insufficiente biodisponibilità dei microelementi essenziali.

Questa carenza è particolarmente diffusa nei paesi sottosviluppati dove una dieta varia ed equilibrata, con un consumo giornaliero di frutta, verdura, carne e pesce, sufficiente per apportare le dosi necessarie di vitamine e minerali, non sempre è possibile.

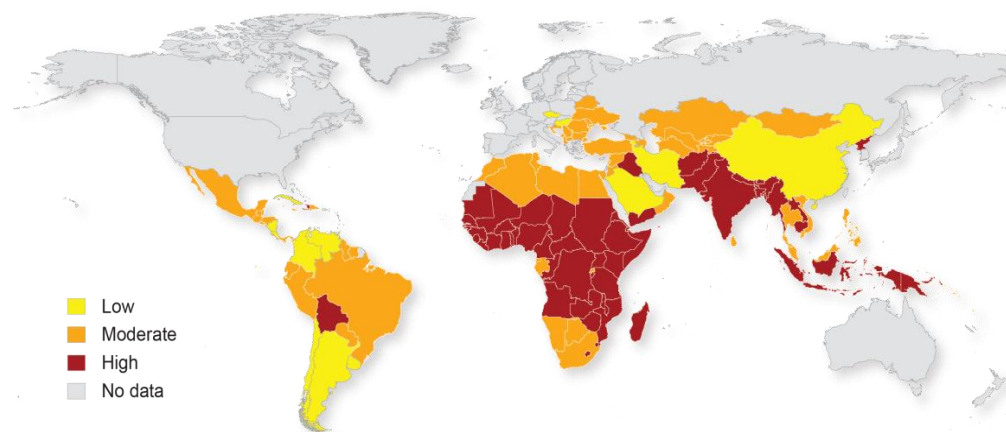


Figura 1. *Mappa che mette in evidenza la diffusione della MNM in bambini al di sotto dei 5 anni. Sono stati usati 3 colori in base al livello di gravità delle carenze nutrizionali (basso, moderato e alto). Dati forniti dalla World Health Organization.*

C'è anche da considerare che la diffusione della MNM comporta enormi conseguenze socio-economiche, sia per l'aumento delle malattie legate alla crescita e allo sviluppo infantile, sia per la perdita di forza lavoro negli adulti, oltre all'elevato tasso di mortalità. Queste motivazioni hanno spinto The Copenhagen Consensus a ritenere che affrontare il problema della malnutrizione da micronutrienti sia il migliore investimento che si possa fare, con un alto ritorno in benefici socio-economici. (Zhao et al., 2011)

Nei paesi economicamente sviluppati un sistema già in atto per migliorare l'apporto di microelementi con la dieta si basa sulla biofortificazione degli alimenti di uso comune, come il latte arricchito di vitamina D e il sale iodato. In questo caso la biofortificazione consiste nell'incremento della concentrazione di un particolare elemento direttamente nell'alimento. E' comunque molto più risolutivo intervenire con sistemi biotecnologici sulle piante di interesse alimentare, modificandole geneticamente in modo da potenziare la loro capacità di accumulare micronutrienti e facendo in modo che essi vengano concentrati nelle parti edibili. In tal modo verrebbero resi biodisponibili per ampie popolazioni i micronutrienti necessari per una crescita e uno sviluppo ottimali. (Sands et al., 2009)

I microelementi più frequentemente insufficienti nella dieta umana sono i minerali Ferro e Zinco e la Vitamina A, che risultano carenti rispettivamente nel 40%, 33% e il 40% della popolazione mondiale. (Zhao et al., 2011) Nel 2000 la World Health Organization li ha considerati tra le dieci cause principali di malattie nei paesi in via di sviluppo. (Mayer et al., 2008)

Questi tre elementi verranno trattati in modo specifico nel presente elaborato.

2.1. Micronutrienti inorganici – i minerali:

- FERRO

Il ferro è un costituente redox-attivo presente in molti gruppi catalitici essenziali, tra cui, ad esempio, i gruppi eme dell'emoglobina e dei citocromi. (Mayer et al., 2008)

La dose giornaliera di Ferro raccomandata (RDA = Recommended Dietary Allowance) è compresa tra 8.0 e 18.0 mg.

Esistono per il ferro, così come per altri elementi minerali, composti che, possono influenzare l'assorbimento di questi minerali assunti con la dieta. Sostanze definite "antinutrienti", come fitato, tannini, ossalato, fibre ed emaglutina, ne ostacolano l'assorbimento, mentre sostanze indicate come "promotori" ne stimolano l'assorbimento. Queste ultime comprendono: fitoferritina, riboflavina, ascorbato, β -carotene, cisteina, istidina, lisina, fumarato, malato e citrato. (White & Broadley, 2005)

La mancanza o carenza di Ferro causa problemi dello sviluppo cognitivo, di resistenza alle infezioni, della capacità di lavoro, della produttività e può causare gravi problemi sia al feto che alla madre durante la gravidanza.

E' stato rilevato, inoltre, che i figli allattati da madri anemiche dispongono di basse riserve di ferro e soffrono di malformazioni legate alla crescita. Anche la malnutrizione da carenza di ferro coinvolge principalmente i bambini (Fig.2). E' stato stimato che 800.000 morti all'anno sono attribuite a gravi forme di anemia. (Mayer et al., 2008)

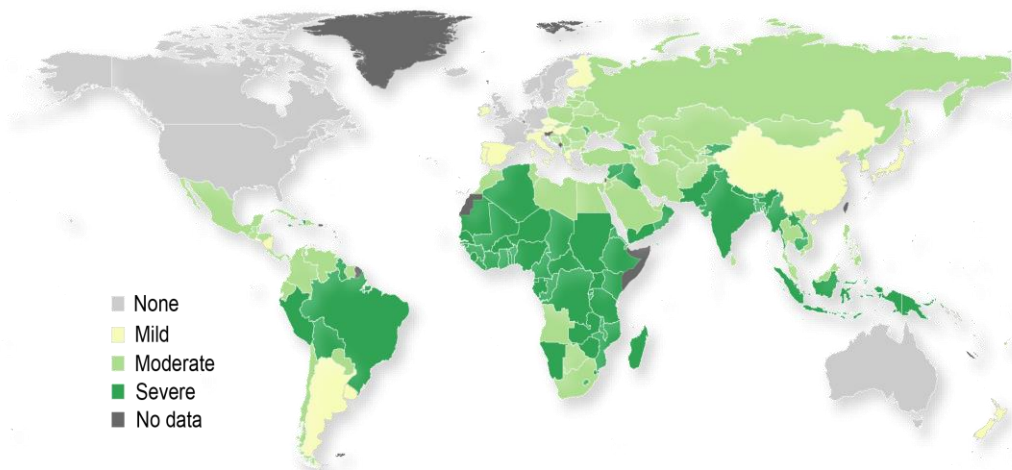


Figura 2. Mappa che mette in evidenza la distribuzione del deficit di Ferro nei bambini dai 6 mesi ai 5 anni d'età. I quattro colori usati si riferiscono a diversi gradi di carenza di ferro (in relazione alle quantità ritenute necessarie), indicati come assente (<5.0%), medio ($\geq 5.0\%$ –<20.0%), moderato ($\geq 20.0\%$ –<40.0%) e grave ($\geq 40.0\%$). Dati forniti dal *Worldwide Prevalence of Anaemia 1993–2005: WHO Global Database of Anaemia* World Health Organization.

- ZINCO

Lo Zinco è coinvolto nella sintesi dell'RNA e del DNA, ed è un costituente di molti enzimi indispensabili per la crescita cellulare e il differenziamento. (Mayer et al., 2008)

La dose giornaliera di Zinco raccomandata (RDA) è compresa tra 8.0 e 11.0 mg. L'assorbimento dello zinco assunto con la dieta è ostacolato da antinutrienti come fitato, tannini, fibre ed emaglutina e viene invece favorito da promotori come acido palmitico, riboflavina, ascorbato, cisteina, istidina, lisina, metionina, fumarato, malato e citrato. (White & Broadley, 2005)

Secondo l'International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) una lieve carenza di zinco è comune a tutte le popolazioni del mondo, mentre un terzo delle popolazioni soffre di gravi deficienze di questo importante micronutriente. Ancora una volta il deficit di zinco è stato rilevato in particolare nei bambini in età prescolare (Fig. 3).

La mancanza o carenza di Zinco comporta alterazioni della crescita, disfunzioni del sistema immunitario, seri disturbi legati alla gravidanza, anomalie dello sviluppo neurocomportamentale, aumento della mortalità. Il deficit di Zn è direttamente collegato a gravi casi di dissenteria che sono la maggior causa di morte infantile (Mayer et al., 2008)

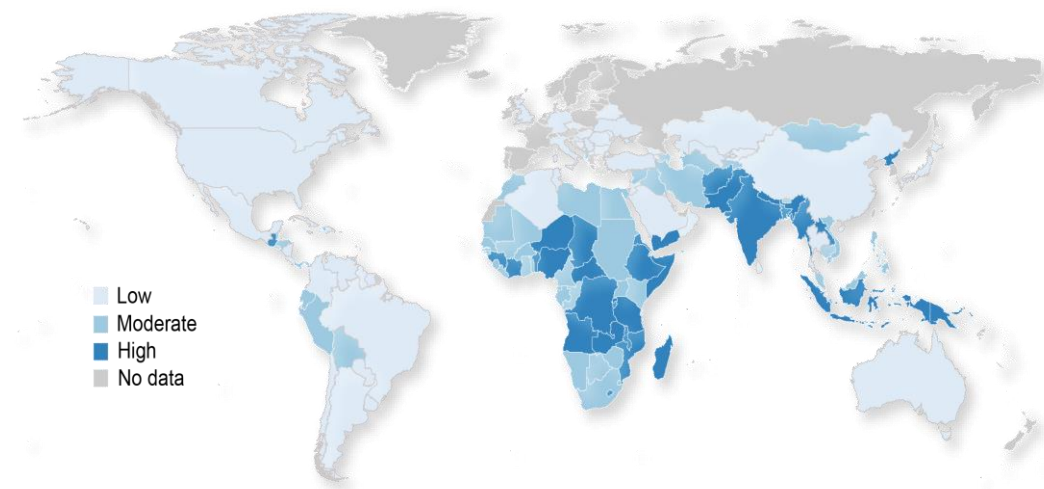


Figura 3. *Mapa che mette in evidenza la distribuzione mondiale del deficit di Zinco nei bambini sotto i 5 anni d'età. I tre colori usati distinguono come bassa ($\leq 20.0\%$), moderata ($>20\% - 40\%$), o alta ($\geq 40\%$) la carenza di zinco in relazione alla quantità considerata necessaria. Dati forniti dal World Health Organization, Global Health Observatory Database.*

2.1.2. Piante biofortificate in micronutrienti minerali

Il Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR) sta sperimentando modificazioni genetiche per aumentare la biodisponibilità di Fe e Zn nelle “staple crops” come riso (*Oryza sativa*, L.), frumento (*Triticum aestivum*, L.), mais (*Zea mays*, L.), soia (*Glycine max*, L.) e cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). L’obiettivo della CGIAR è quello di verificare la variabilità genetica e l’ereditabilità dei tratti minerali acquisiti dalle piante modificate, la loro stabilità nelle diverse condizioni del suolo e delle zone climatiche, e come aumentare la concentrazione dei minerali nelle parti edibili della pianta senza alterarne le altre caratteristiche. I rischi che queste modificazioni potrebbero comportare sono una crescita più lenta della pianta, una resa inferiore e, nel caso dei cereali, un minor numero di semi prodotti.

Sono state fatte mappe genetiche di popolazione per selezionare i tratti legati alla produzione di Fe e Zn nel riso e sono stati identificati tre tratti di DNA (QTL - Quantitative Trait Locus) che influenzano la concentrazione del Fe nella cariosside. (White & Broadley, 2005)

Grazie alla ricerca del programma Harvest Plus, inoltre, è stato possibile realizzare un ibrido di mais con il 25-30% di Fe e Zn in più rispetto alle comuni coltivazioni. (White & Broadley, 2005)

La modificazione genetica di una pianta di interesse può seguire due differenti approcci. Si possono utilizzare coltivazioni convenzionali e selezionare tecniche che portano ad una più alta concentrazione dei promotori della biodisponibilità dei micronutrienti (grado di assorbimento degli elementi minerali assunti con la dieta) o ad una diminuzione dei loro inibitori. In alternativa, possono venire adottate tecniche di ingegneria genetica per creare nuove coltivazioni di piante trasformate con le proprietà desiderate. Esempi di questi approcci sono: l’inserzione nella pianta di nuovi geni, il miglioramento dell’espressione di geni già presenti ma con in bassi livelli di trascrizione, l’abbattimento dell’espressione genica degli inibitori che ostacolano l’assorbimento degli elementi. (Lonnerdal, 2013)

Esistono varietà di piante selvatiche (wild type) caratterizzate da diverse capacità di assorbimento di questi minerali dal terreno e da diversi livelli di concentrazione di tali minerali in organi specifici. Selezionando alcune varianti genotipiche di queste piante si può aumentare la loro capacità di immagazzinamento dei micronutrienti minerali e favorire la mobilitazione delle loro riserve verso le parti edibili.

Nei cereali la maggior parte delle riserve di Fe e Zn si localizzano nello strato aleuronico delle cariossidi, che però viene rimosso durante la decorticazione e la lucidatura dei chicchi. E’ quindi importante verificare che la biofortificazione abbia aumentato la concentrazione dei minerali anche nell’endosperma del seme.

E’ stato rilevato che il fattore che maggiormente riduce la biodisponibilità dei micronutrienti è il fitato, ma che diminuirne il livello potrebbe avere come effetto un basso rendimento della pianta e una difficoltà nella germinazione. Un’ alternativa può essere quella di far esprimere nell’endosperma dei cereali la fitasi di microorganismi come *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus*, o delle fitasi termostabili.

Test compiuti su animali da laboratorio hanno dimostrato una maggior biodisponibilità di Zn in un grano transgenico contenente una fitasi termostabile, cioè un enzima capace di resistere alle elevate temperature della cottura. (Zhao & McGrath, 2009)

2.2. Micronutrienti organici – le vitamine:

Le vitamine sono un piccolo gruppo di composti organici indispensabili nella dieta umana.

Il termine “vitamina” è stato coniato dal biochimico polacco Casimiro Funk nel 1912 in seguito all’isolamento, per la prima volta, di una sostanza, presente nell’esocarpo del riso, in grado di alleviare il beriberi. Inizialmente lo scienziato, credendo che questa sostanza fosse un composto essenziale contenente un gruppo amminico, la chiamò “vital-amine” per sottolinearne la natura amminica e l’importanza vitale per la salute umana.

Attualmente 13 composti sono classificati come vitamine, distinte in lipo-solubili (es. A,D,E,K) o idro-solubili (es. B e C).

L’importanza di questi micronutrienti organici è fondamentale e i numerosissimi studi effettuati su di essi hanno portato a definire con precisione le caratteristiche delle singole vitamine e le quantità necessarie per la salute dell’organismo umano (Tab.1).

Nei paesi sviluppati l’apporto vitaminico è abbastanza equilibrato se si segue una dieta bilanciata, basata sul consumo di frutta e verdura. Questo però non accade ai 5 miliardi di persone dei paesi in via di sviluppo, che non possono permettersi una dieta così varia. (Fitzpatrick et al., 2012)

La vitamina più studiata è la Vitamina A, poiché moltissimi aspetti della salute umana possono essere turbati da un suo deficit.

Vitamin	Adult Females ^b	Lactating Females ^b	Wheat/ 100 g ^c	Rice/ 100 g ^d	Corn/ 100 g ^e	Potatoes/ 100 g ^f	Cassava/ 100 g ^g
Calories (kcal)			361	130	59	87	160
Vitamin A ($\mu\text{g}/\text{d}$) ^h	700	1300	2	0	3	0	2
Vitamin D ($\mu\text{g}/\text{d}$) ⁱ	15	15	0	0	0	0	0
Vitamin E (mg/d) ^j	15	19	0.4	-	0.02	0.01	0.19
Vitamin K (mg/d)	90*	90*	0.3	-	0	2.1	1.9
Vitamin B ₁ (mg/d)	1.2	1.4	0.08	0.02	0.017	0.106	0.087
Vitamin B ₂ (mg/d)	1.1	1.6	0.06	0.016	0.006	0.02	0.048
Vitamin B ₃ (mg/d) ^k	14	17	1	0.4	0.175	1.439	0.854
Vitamin B ₅ (mg/d)	5*	7*	0.438	0.441	0.078	0.52	0.107
Vitamin B ₆ (mg/d)	1.3	2.0	0.037	0.05	0.021	0.299	0.088
Vitamin B ₈ ($\mu\text{g}/\text{d}$)	30*	35*	-	-	-	-	-
Vitamin B ₉ ($\mu\text{g}/\text{d}$)	400	500	33	2	1	10	27
Vitamin B ₁₂ ($\mu\text{g}/\text{d}$)	2.4	2.8	0	0	0	0	0
Vitamin C (mg/d)	75	120	0	0	0	13	20.6

Tabella 1. Comparazione delle vitamine contenute in 5 principali piante di interesse alimentare e degli RDA per donne adulte e allattanti. (da Fitzpatrick et al., 2012)

- VITAMINA A

La Vitamina A (Retinolo) (Fig.4) è un composto di 20 atomi di carbonio correlato alla famiglia dei carotenoidi, pigmenti naturali isoprenoidi che svolgono funzioni importanti come pigmenti antenna e fotoprotettivi dell'apparato fotosintetico e che sono anche responsabili del colore giallo-arancione di foglie, fiori e frutti. Il retinolo nell'organismo umano deriva dal metabolismo del β -carotene introdotto con la dieta e definito per questo motivo "provitamina A".

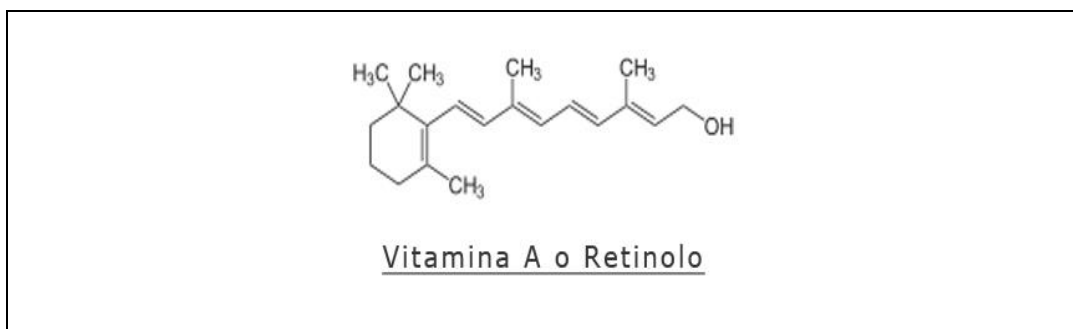


Fig. 4. Formula della vitamina A

La vitamina A gioca un ruolo fondamentale nella differenziazione cellulare a livello epiteliale, nell'efficacia immunitaria, nella crescita e nello sviluppo embrionale, nello sviluppo delle ossa, nella riproduzione, nella regolazione genica e nel processo visivo a livello della retina.

Il fabbisogno giornaliero raccomandato di vitamina A (RDA) è di 6 mg. (Blomhoff & Blomhoff, 2005)

Il primo sintomo dell'insufficienza di vitamina A è la nictalopia, comunemente chiamata cecità notturna, che nei bambini può diventare una cecità completa. (Martin et al., 2011)

Possono insorgere anche patologie a livello della congiuntiva e della cornea (xerotalmia e cheratite), patologie che possono portare a infiammazioni ed infezioni col risultato di cecità irreversibile.

La depressione del sistema immunitario aggrava condizioni patologiche, come morbillo e dissenteria, fino ad un aumento della mortalità infantile 9 volte superiore alla media.

La carenza di vitamina A è molto diffusa nei paesi sottosviluppati e i bambini in età prescolare sono quelli più esposti ai danni derivanti dallo scarso apporto di questa vitamina (Fig.5).

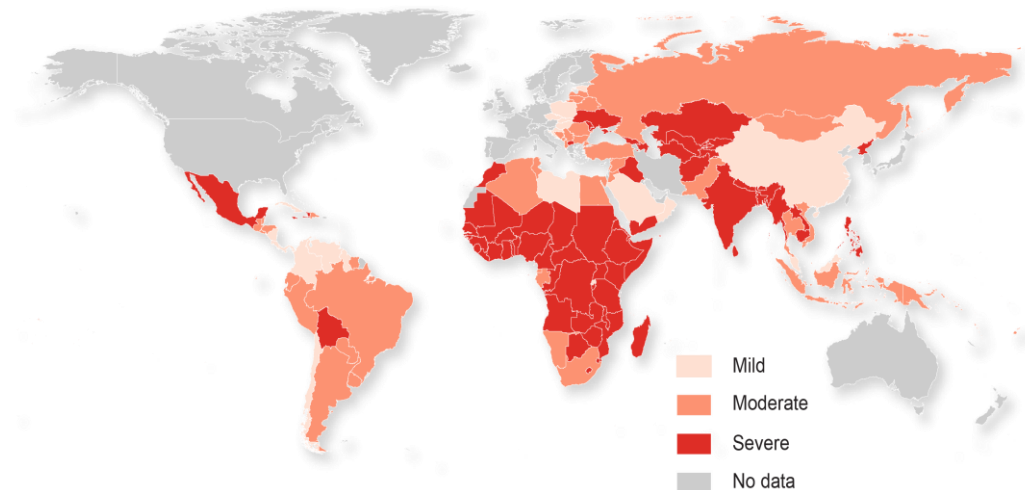


Figura 5. Mappa che mette in evidenza la distribuzione del deficit di Vitamina A nei bambini in età prescolare. I tre colori usati distinguono il deficit medio ($\geq 2\%$ - $< 10\%$); moderato ($\geq 10\%$ - 20%) e grave ($\geq 20\%$) in relazione alla RDA. Dati forniti dal *Global Prevalence of Vitamin A Deficiency in Population at Risk 1995-2005: WHO Global Database on Vitamin A Deficiency*.

È stato calcolato che 127 milioni di bambini in età prescolare sono affetti da deficit di vitamina A con 250,000-500,000 casi di cecità ogni anno. Una combinazione di interventi nutrizionali, come l'allattamento, un'alimentazione completa, un supplemento di vitamina A coadiuvata da un corretto apporto di Zinco, può prevenire circa il 25% di queste morti.

Poiché l'uomo, come è stato detto, sintetizza questa vitamina a partire dal suo precursore β -carotene, sono state attivate numerose ricerche allo scopo di ottenere piante biofortificate in grado di produrre più provitamina A nelle parti edibili.

2.2.1. Piante biofortificate in provitamina A (β -carotene)

Un'importante esempio di applicazione dell'ingegneria genetica allo scopo di indurre o incrementare la sintesi di β -carotene in piante di interesse alimentare è quello che ha portato ad una nuova varietà di riso detta "Golden Rice". Questa varietà transgenica della specie *Oryza sativa* è capace di accumulare β -carotene nell'endosperma della cariosside, conferendole il caratteristico colore giallo/arancio (Fig.6). (Mayer et al., 2008)



Figura 6. Confronto tra riso *wild-type* (a sinistra) e *Golden Rice* (a destra)

In un primo esperimento, gli embrioni di riso sono stati messi in contatto con una sospensione di *Agrobacterium tumefaciens*. Quest'ultimo è un batterio Gram negativo considerato il miglior mezzo di trasferimento genico nelle cellule vegetali. Con un'unica trasformazione vennero inseriti nel plasmide di *A. tumefaciens* due geni della via biosintetica del β -carotene, precisamente i geni dell'enzima fitoene sintasi (PSY) di *Narcissus pseudonarcissus* e dell'enzima carotene desaturasi (CRTI) del batterio *Erwinia uredovora*. Attraverso il plasmide tali geni vennero introdotti negli embrioni di riso ed integrati nel genoma della pianta. Dei due geni di interesse, il primo catalizza la formazione da geranil geranil difosfato (GGDP) di fitoene, che è il precursore iniziale della via di sintesi dei carotenoidi. Il secondo, invece, conduce le reazioni di desaturazione che portano dalla molecola del fitoene a quella del licopene, che è il precursore diretto del β -carotene. Per completare la via carotenogenica è richiesto l'enzima licopene β -ciclasi (β -LCY) che inserisce nella molecola del licopene i due anelli β -iononici che caratterizzano la molecola del β -carotene. Inizialmente si pensava che fosse necessario introdurre nel riso anche il gene del narciso codificante per la β -LCY, ma si dimostrò invece che il riso *wild type* possedeva già questo gene.

Da questo primo esperimento si ottennero cariossidi di *Golden Rice* che contenevano 1,6 $\mu\text{g/g}$ di peso secco di β -carotene. Purtroppo questa quantità era ancora troppo esigua per riuscire a far fronte alle esigenze nutrizionali di chi si cibava di quel riso.

La ricerca così è proseguita cercando di rafforzare ulteriormente la via carotenogenica nel riso. Un successo si ottenne sostituendo il gene *psy* del narciso con quello del mais (*Zea mais*). In tal modo, infatti, venne prodotta una nuova generazione di riso: il *Golden Rice II*. Questo nuovo riso biofortificato accumulava nella cariosside 31 $\mu\text{g/g}$ di peso secco di β -carotene, 20 volte di più rispetto alla prima generazione. Questi valori di bioaccumulo del carotenoide si dimostrarono di estremo interesse. Venne infatti calcolato che per un bambino in età prescolare poco meno di 100 g di riso della nuova generazione risultavano sufficienti ad apportare la metà della dose giornaliera necessaria di β -carotene. (Al-Babili & Beyer, 2005)

Lo stesso tipo di approccio biotecnologico, ha portato a interessanti risultati anche in altre piante di interesse alimentare, conducendo, ad esempio, alla produzione di “golden potatoes” e banane arricchite in β -carotene (Figg.7,8).

Nei laboratori di Biotecnologie dell’ENEA e dell’Università di Friburgo è stata creata una nuova varietà di patata arricchita di β -carotene, chiamata “golden potato”.

Il suo contenuto di provitamina A è stato aumentato di circa 3600 volte e questa biofortificazione ha permesso di raggiungere metà del fabbisogno giornaliero di vitamina A con una porzione di 250 g, rispetto ai 900 Kg della varietà originaria (la *Desirée*). Occorre sottolineare che la nuova varietà di patate, non essendo coperta da brevetto, ha anche un vantaggio economico perché ne consente il libero utilizzo e la libera coltivazione nel rispetto delle normative vigenti.

Nell’esperienza di ricerca condotta da Diretto e collaboratori nel 2007 sono stati trasferiti nella patata tre geni selezionati da *Ervinia*, codificanti gli enzimi fitoene sintasi, fitoene desaturasi e licopene β -ciclastasi, che guidano la sintesi di β -carotene. Ne sono risultati tuberi con una colorazione fenotipica giallo scura, da cui la denominazione “oro” (Fig.7).

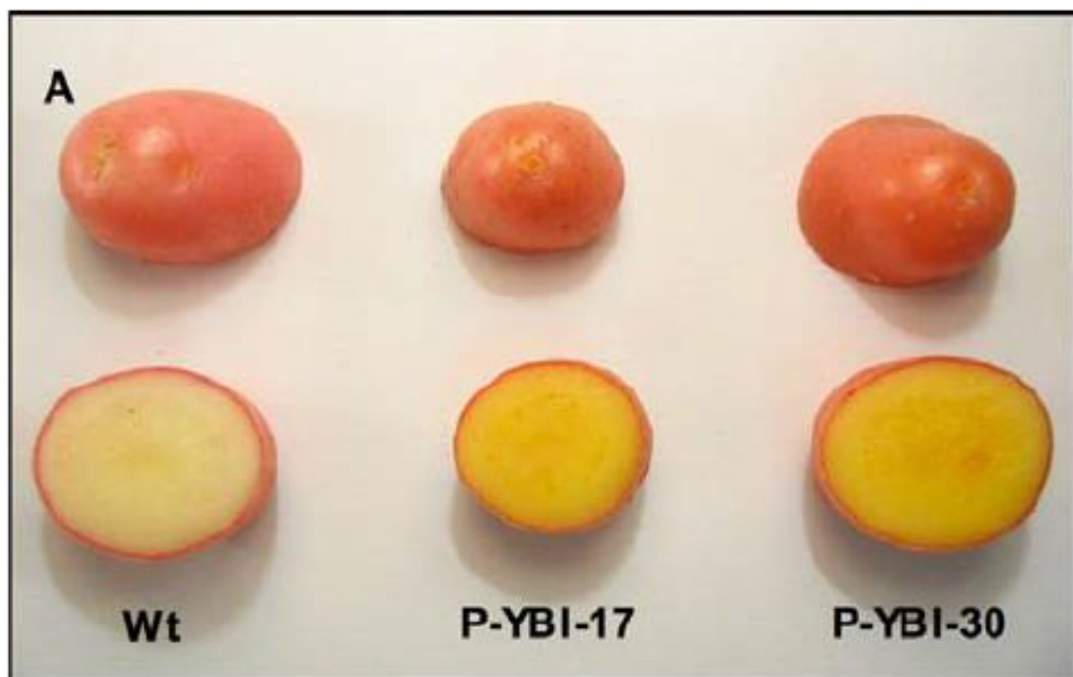


Figura 7. Colorazione fenotipica di “golden potatoes”. (da Diretto et al., 2007)

In questi tuberi è stato stimato un aumento nella concentrazione di carotenoidi fino a un valore di 114 $\mu\text{g/g}$ di peso secco e quello di β -carotene ha raggiunto i 47 $\mu\text{g/g}$ di peso secco. (Diretto et al., 2007)

La Queensland University of Technology in Australia sta attualmente sviluppando una nuova generazione di banane Karat (una specie nativa della Micronesia) arricchite in β -carotene.

Nel programma sperimentale sono state analizzate dieci varietà di banana con tecniche di cromatografia, per poi confrontarle nel loro contenuto in carotenoidi. In questo modo si è osservata una correlazione tra il contenuto di carotenoidi e la colorazione giallo-arancio della polpa (Fig.8). (Englberger et al., 2008)

Il programma, sostenuto da circa 10 milioni di finanziamento della Bill and Melinda Gates Foundation, ha l'obiettivo di coltivare le piante di banane biofortificate nelle fattorie in Uganda dove c'è una grande scarsità di cibo ed il 70% della popolazione si nutre soprattutto di frutta. In questo modo l'apporto supplementare di vitamina A potrà essere di valido aiuto nella prevenzione alla cecità.

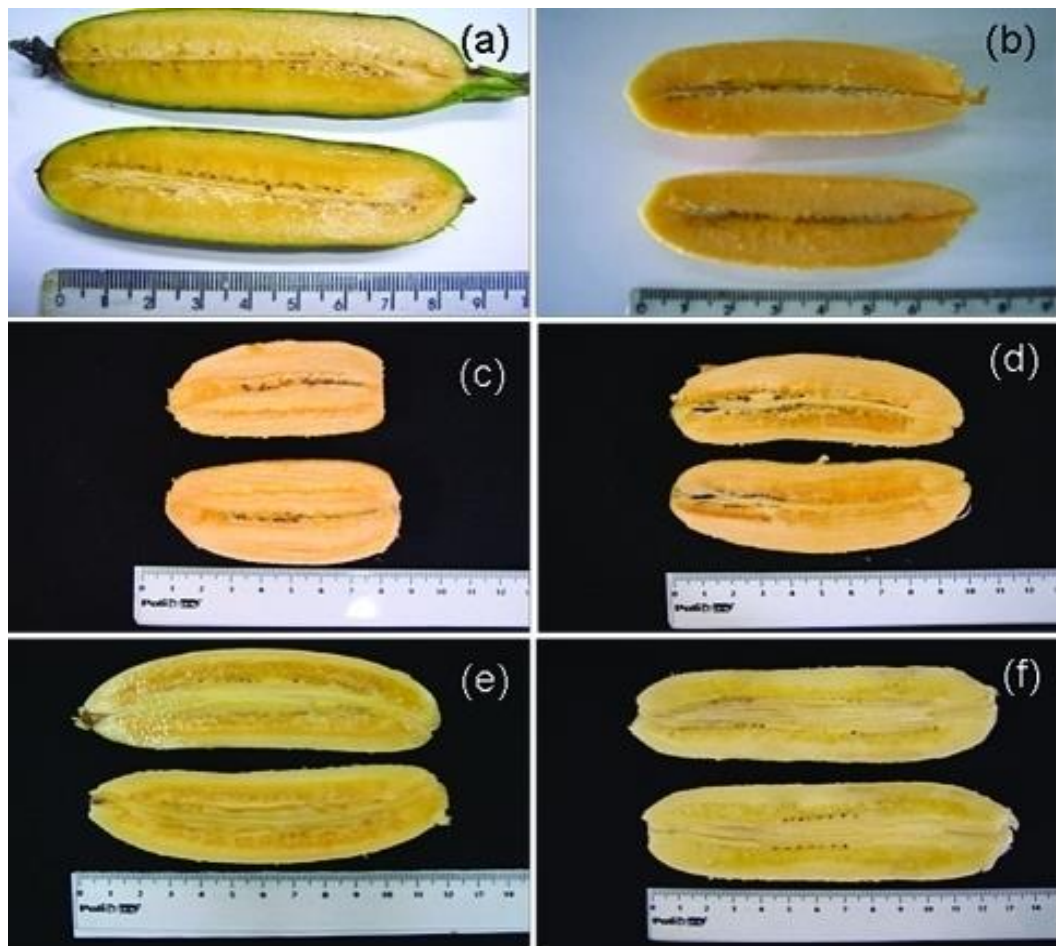


Figura 8. Banane con diversi livelli di arricchimento di β -carotene.

3. FITONUTRIENTI NEL MIGLIORAMENTO DELLO STATO DI SALUTE UMANA

E' noto che i radicali liberi svolgono azioni deleterie sul metabolismo delle cellule e sul loro stato di salute. Tra i radicali liberi si trovano le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste si formano durante alcune reazioni redox, durante la riduzione incompleta dell'ossigeno o durante l'ossidazione dell'acqua.

Le ROS comprendono il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), il radicale ossidrilico (HO^{\cdot}) e il radicale perossidrilico (O_2H^{\cdot}). Tutte queste specie reattive dell'ossigeno danneggiano molti componenti cellulari attraverso l'ossidazione di proteine, lipidi e acidi nucleici. La specie che provoca la maggior parte dei danni alle biomolecole è OH^{\cdot} e il principale motivo di tossicità dell' H_2O_2 e dell' $O_2^{\cdot-}$ è determinato proprio dalla loro capacità di generare OH^{\cdot} . I danni provocati nelle cellule dal radicale ossidrilico sono molteplici, perché esso reagisce con quasi tutti i tipi di molecole organiche presenti nelle cellule viventi. La reattività dell' OH^{\cdot} è così alta che esso attacca immediatamente qualsiasi molecola biologica nelle sue vicinanze producendo radicali secondari di variabile reattività. Oltre all'ossidazione e carbonilazione dei residui aminoacidici delle proteine e alla perossidazione dei lipidi di membrana, uno dei danni maggiori che questo radicale induce nelle cellule è dovuto alla sua interazione con il DNA. OH^{\cdot} , infatti, è capace sia di sottrarre che aggiungere elettroni alle basi azotate e al deossiribosio, con la conseguente produzione di radicali che possono determinare diversi tipi di alterazioni dell'acido nucleico, come la rottura dei filamenti o la generazione di mutazioni. (Buchanan et al., 2003)

Gli antiossidanti sono enzimi o sostanze capaci di contrastare l'azione lesiva delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e pertanto esercitano un'azione protettiva sull'integrità delle cellule. Una capacità antiossidante efficace è quella dimostrata da una serie di composti fenolici sintetizzati da numerose piante di interesse alimentare.

3.1. Composti fenolici

La maggior parte dei metaboliti secondari prodotti dalle piante possono essere classificati in tre gruppi principali: terpenoidi, alcaloidi e composti fenolici. In questo elaborato verranno trattati solamente alcuni esempi dell'ultima classe sopracitata.

I composti fenolici possono essere semplici (es.: acidi benzoici, acidi cinnammici e cumarine) o complessi (es: stilbeni, catechine e flavonoidi).

La molecola di base per la loro costruzione è un acido aromatico derivato dall'aminoacido fenilalanina, grazie all'azione dell'enzima fenilalanina ammoniacalasi (PAL) (Fig.9).

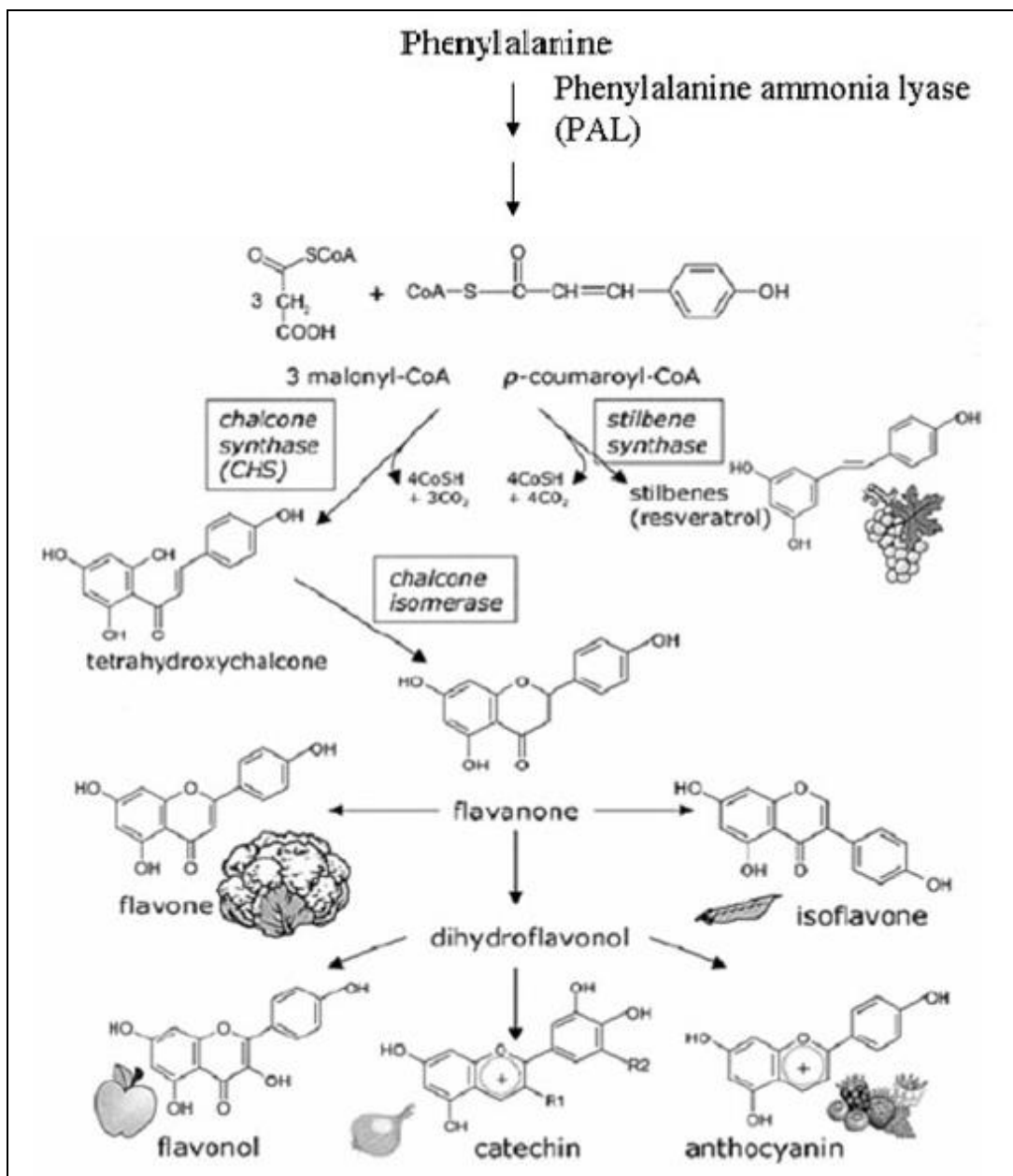


Figura 9. Via di biosintesi di alcuni composti fenolici.

I numerosi composti fenolici che derivano da complesse e specifiche vie biosintetiche svolgono diversi ruoli importantissimi nelle piante. Alcuni, come le cumarine, sono deterrenti alimentari contro gli erbivori, altri, come i lignani, servono come difesa dai patogeni, altri ancora, come la lignina, rafforzano meccanicamente la parete cellulare. Composti fenolici possono avere anche attività allelopatica e possono influenzare negativamente la crescita di piante vicine. (Buchanan et al., 2003)

Una categoria di composti fenolici è quella degli stilbeni le cui molecole sono formate da due anelli benzenici separati da un ponte di etano o di etene (Fig.10). Il ruolo fisiologico nelle piante è legato alla loro funzione come regolatori della crescita e come molecole di difesa contro l'attacco di patogeni.

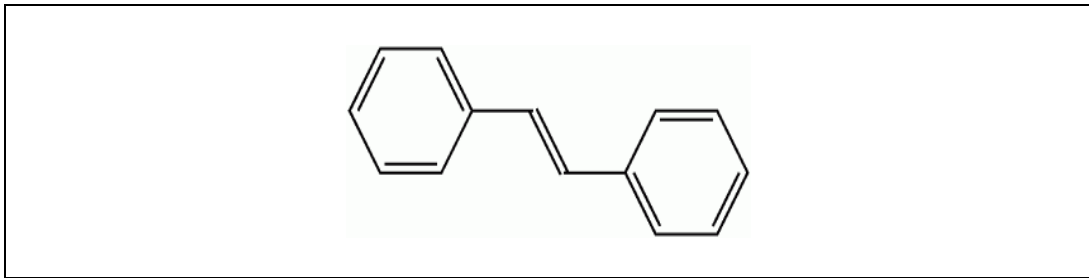


Figura 10. *Struttura chimica di base di uno stilbene.* (da Maffei, 2003)

Tra i composti fenolici più importanti vi sono i flavonoidi che sono caratterizzati dalla presenza di due anelli aromatici uniti da un anello eterociclico formatosi a seguito della ciclizzazione di un residuo propanico.

Questa classe di metaboliti secondari è comune a tutte le piante. I flavonoidi possono essere suddivisi in sottoclassi a seconda del grado di ossidazione: flavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli, isoflavoni e antocianine (Fig.9).

Ai flavonoidi appartiene la sottoclasse delle antocianine, i cui agliconi antocianidine sono importanti pigmenti attrattori di animali impollinatori, caratteristici degli aromi e dei colori di fiori e frutti (Fig.11). (Maffei, 2003)

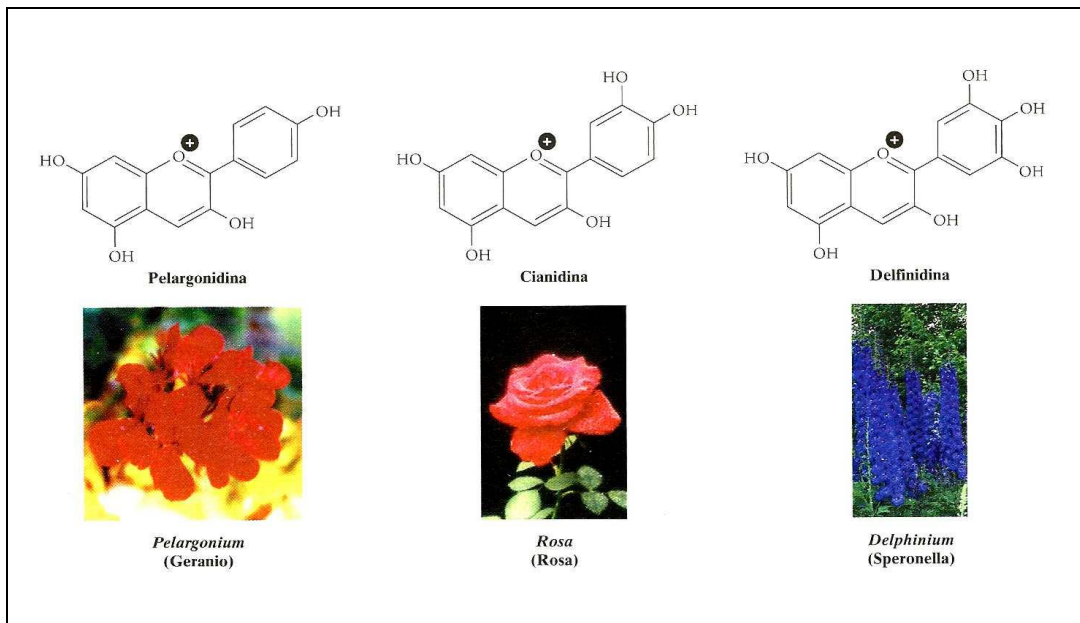


Figura 11. *Esempi di antocianidine responsabili del colore dei fiori.* (da Buchanan et al., 2003)

I composti fenolici prodotti dalle piante ed acquisiti dall'uomo con la dieta sono una classe di preziosi fitonutrienti. Le specie reattive dell'ossigeno, così come quelle dell'azoto, indicate nell'insieme come RONS, possono peggiorare

patologie degenerative tra cui malattie cardiovascolari, disagi neurodegenerativi, infiammazioni croniche, cancro, invecchiamento dei tessuti.

I fitonutrienti fenolici, anche se con una bassa biodisponibilità, contribuiscono direttamente a sopprimere alcune vie di segnalazione cellulare attivate in risposta allo stress ossidativo dalla formazione delle RONS.

I flavonoidi, ad esempio, mostrano un'attività protettiva del tratto intestinale, con effetti antispasmodici, antisecretivi, antidiarroici, antiulcera, e con proprietà battericida.

Le capacità antiossidanti dei flavonoidi giocano un ruolo diretto negli effetti gastro-protettivi. Tuttavia il metabolismo dei flavonoidi partecipa anche alla attenuazione delle patologie gastriche, come ulcere e infiammazioni intestinali.

Altri esempi degli specifici effetti dei fitonutrienti fenolici sono le interazioni degli isoflavonoidi con i recettori degli estrogeni, che potrebbero abbassare significativamente l'incidenza delle forme di cancro dovute ad ormoni steroidei. Uno studio fatto su una comunità asiatica, che consuma un'alta quantità di soia nella dieta, ha rilevato un abbassamento dell'incidenza di cancro alla prostata del 25% e di cancro al seno del 10%. (Martin et al., 2011)

Ulteriori esempi delle funzionalità dei fitonutrienti fenolici includono gli effetti cardioprotettivi riscontrati nel vino rosso. Il vino rosso contiene vari livelli dello stilbene resveratrolo (che verrà trattato più avanti), oltre a flavonoli, antocianine e catechine, che hanno tutti effetti antiossidanti.

Gli effetti cardioprotettivi di questi fenoli includono un miglioramento delle funzioni dell'endotelio, una riduzione del livello di colesterolo LDL (Low Density Lipoprotein), l'abbassamento della pressione sanguigna e un'inibizione della aggregazione piastrinica.

Il contenuto dei fitonutrienti fenolici nelle diverse piante alimentari può essere ricavato analizzando i diversi gruppi di metaboliti.

Per esempio, le antocianine si ritrovano in elevate quantità in molte bacche e verdure con pigmentazione blu o rossa. Tuttavia le forme di antocianine variano da specie a specie. Tali differenze sono dovute al numero di gruppi idrossilici nella molecola, al livello di metilazione di ogni gruppo idrossile, alle unità glucidiche legate alla molecola e alla posizione del legame, ma anche alla natura degli acidi alifatici o aromatici legati agli zuccheri.

Ci sono differenze nella biodisponibilità nelle diverse forme di composti fenolici. L'assorbimento delle antocianine, ad esempio, è influenzato dalla glicosilazione e acilazione così come anche dalle modifiche fisico-chimiche che l'alimento subisce durante il processo digestivo. Tutte queste variabilità rendono difficile l'esatta predizione delle proprietà benefiche di un dato nutriente in uno specifico alimento.

Una dieta raccomandata dovrebbe quindi identificare e quantificare i diversi metaboliti della pianta, considerare i loro processi produttivi, la loro biodisponibilità e la loro efficacia una volta assunti.

Un interessante studio ha fatto emergere che fenoli purificati aggiunti alla dieta non hanno gli stessi effetti di promozione della salute, che invece si riscontrano nei fitonutrienti contenuti negli alimenti.

E' stato dimostrato che le antocianine derivate da fonti alimentari (succo di arancia rossa) erano in grado di ridurre lo sviluppo di adipociti in un topo nutrito con una dieta ricca di grassi. Più specificamente, una dieta con cibi ricchi di antocianine, come succo di arancia rossa e mirtilli, portava anche alla riduzione di insulina e all'abbassamento del livello di glicemia nel sangue. Questi effetti, invece, non si osservavano quando venivano aggiunte alla dieta solo antocianine purificate.

Ne risulta che il contesto nutrizionale può influenzare gli effetti dei composti fenolici che, una volta assunti, possono agire sinergicamente. La diversa efficacia riportata nell'esempio precedente, in cui le antocianine del succo dell'arancia rossa limitavano il peso del topo sottoposto ad una dieta ricca di grassi, mentre le antocianine purificate non avevano lo stesso impatto sul peso, è data presumibilmente dal fatto che le antocianine nel succo d'arancia possono interagire sinergicamente con altri metaboliti. (Martin et al., 2011)

Poiché troppo spesso i livelli di fitonutrienti fenolici che si trovano nei cibi convenzionali sono insufficienti per promuovere un miglioramento della salute, sono in atto progetti di ricerca allo scopo di creare nuove coltivazioni di piante con modificazioni genetiche che ne permettano l'arricchimento in fitonutrienti.

Di seguito vengono riportati esempi di biofortificazione di piante relativamente a due diversi fitonutrienti fenolici: antocianine e resveratrolo.

3.1.1. Piante biofortificate in antocianine

Le antocianine sono polifenoli che offrono protezione contro il cancro, le malattie cardiovascolari e le malattie degenerative legate all'età. Inoltre, possono avere attività antinfiammatoria, proteggere la vista e ridurre obesità e diabete. Questi effetti benefici dipendono dalla quantità di antocianine che si assumono con la dieta. Tuttavia i livelli di questa classe di pigmenti, che si trova comunemente in frutta e verdura, potrebbero non essere adeguati per ottenere benefici ottimali.

Il pomodoro rappresenta un importante alimento con buoni livelli di flavonoidi, tra cui le antocianine. Anche se la maggior parte dei pomodori coltivati produce un basso livello di antocianine nel frutto, il pomodoro è un eccellente candidato per l'arricchimento transgenico di flavonoidi, data la sua diffusione a livello mondiale.

I fattori di trascrizione che regolano l'espressione dei geni implicati in una specifica via biosintetica sono strumenti utili per ingegnerizzare le piante allo scopo di potenziare la produzione di metaboliti che derivano da tale via. Il fattore di trascrizione che regola la produzione di antocianine nel pomodoro è codificato del gene *ANT1* la cui sovra-espressione si manifesta in una colorazione viola della buccia e degli strati cellulari sottostanti.

La sovra-espressione di due geni (*Lc* e *CI*) codificanti fattori di trascrizione che controllano la biosintesi di antocianine nel mais, determina, nei frutti di pomodoro transgenico in cui sono stati inseriti questi due geni, un aumento dei livelli di flavonoidi (130 µg/g di peso fresco). Inaspettatamente, però, non è stato notato accumulo di antocianine nei frutti delle piante trasformate. Questo può essere spiegato dalla specificità delle proteine regolatrici della biosintesi delle

antocianine e dimostra la necessità di individuare fattori di trascrizione appropriati.

In una ricerca di questo tipo sono stati selezionati due geni della pianta *Antirrhinum majus* (bocca di leone): il gene *Delila* (*Del*) che codifica il fattore di trascrizione helix-loop-helix e *Roseal* (*Ros1*) che codifica il fattore di trascrizione MYB, che induce la biosintesi di antocianine nei fiori della bocca di leone.

In un esperimento del 2008 condotto da Butelli e collaboratori è stato preparato un vettore binario e i transgeni di interesse inseriti nel genoma delle piante di pomodoro sono stati ereditati stabilmente per cui, attraverso l'impollinazione incrociata, sono stati trasferiti alla generazione successiva, senza perdita del fenotipo. I frutti transgenici si sono sviluppati normalmente e hanno iniziato a mostrare visibili segni di pigmentazione viola alla fine della maturazione. La pigmentazione si è intensificata rapidamente in pochi giorni. Inizialmente essa era associata al tessuto vascolare e si è poi estesa rapidamente alla buccia e all'intera polpa del frutto di pomodoro (Fig.12).



Figura 12. A sinistra: Pianta di pomodoro contenente i geni *Del* e *Ros1*.

A destra: differenza della pigmentazione del frutto tra i ceppi selvatico e *Del/Ros*. (da Butelli et al., 2008)

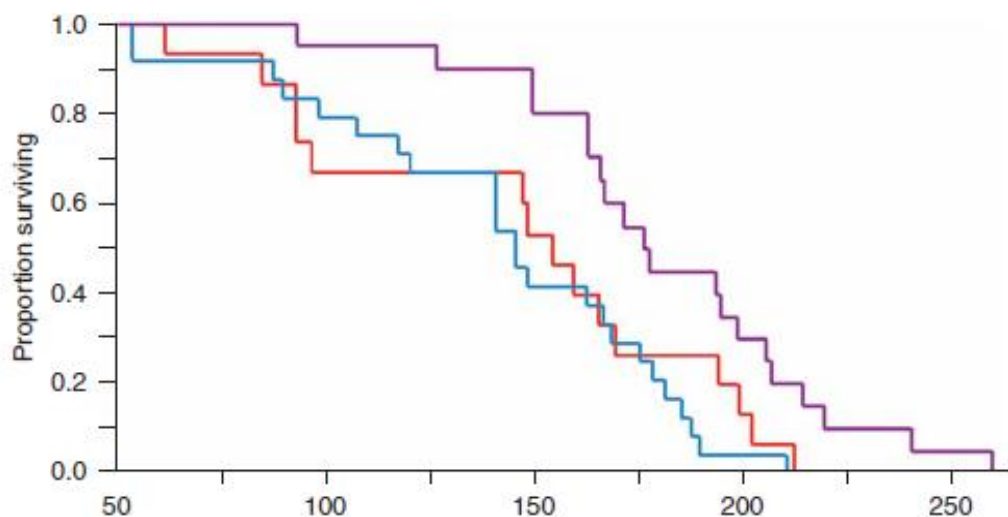
Analizzando le nuove piante transgeniche è risultato che l'espressione dei geni *Del* e *Ros1* aveva effettivamente aumentato il livello di trascrizione di tutti i geni codificanti gli enzimi necessari per la sintesi di antocianine. Inoltre si è osservata anche l'espressione di due geni che intervengono nel trasporto delle antocianine all'interno del vacuolo.

La differenza nell'attività totale negli antiossidanti tra la forma transgenica e il ceppo selvatico (wild type) è stata ricavata dall'analisi dell'attività antiossidante idrofilica e lipofilica. L'attività della frazione idrosolubile contenente antocianine nella linea transgenica è risultata essere tre volte superiore di quella di controllo.

Nessuna differenza, invece, è stata rilevata tra i due tipi di pianta nella frazione liposolubile. (Butelli et al., 2008)

Test per investigare i livelli di antocianine sufficienti per produrre condizioni migliorative della salute nel contesto della dieta sono stati condotti su topi da laboratorio. Questi sono stati nutriti con un supplemento di pomodoro in polvere per verificarne la potenzialità anticancerogena.

Tramite l'ingegneria genetica, in alcuni topi sono stati inattivati (knockout) geni che proteggono dal cancro, rendendo perciò gli animali ricettivi di ogni genere di tumore. Topi così modificati sono stati chiamati $Trp53^{-/-}$ perché privi del gene $Trp53$, per cui non potevano più produrre la proteina p53 "guardiano del genoma" che lo difendeva dal cancro. Pertanto questi topi $Trp53^{-/-}$ erano destinati ad ammalarsi e morire a circa 120-180 giorni di età. Nell'esperimento specifico è stata valutata la durata della vita media di tre diversi gruppi di topi $Trp53^{-/-}$: topi a dieta normale senza l'apporto di polvere di pomodoro, topi con il 10% della dieta consistente in polvere di pomodoro rosso e topi con il 10% della dieta consistente in polvere di pomodoro viola (Fig.13).



Senza pomodoro: 142.0 +/- 8.7 gg in media, 211 gg massimo (n = 24)

con pomodoro rosso: 145.9 +/-12.6 gg in media, 213 gg massimo (n = 15)

con pomodoro viola: 182.2 +/- 8.6 gg in media, 260 gg massimo (n = 20)

Figura 13. Effetto della dieta sulla durata della vita media di topi $Trp53^{-/-}$. (da Butelli et al., 2008)

Il confronto, riportato in figura 13, evidenzia l'aumento della durata della vita media dei topi $Trp53^{-/-}$ nutriti con pomodoro rosso o con pomodoro viola rispetto ai topi nutriti con la dieta priva di pomodoro. Si può notare anche l'aumento della vita media dei topi $Trp53^{-/-}$ nutriti con pomodoro viola rispetto a quella dei topi nutriti con pomodoro rosso:

- pomodoro rosso su dieta abituale: + 2.7%
- pomodoro viola su pomodoro rosso: + 24.9%
- pomodoro viola su dieta abituale: + 28.3%

I risultati ottenuti con il pomodoro ingegnerizzato che produce alti livelli di antocianine dimostrano chiaramente un sostanziale effetto di protezione contro la progressione del cancro nei topi *Trp53^{-/-}* quando questi composti fenolici sono inclusi nella loro dieta regolare. Si ritiene che gli effetti benefici delle antocianine siano dovuti all'attivazione del sistema di difesa endogeno antiossidante. Pertanto le antocianine agirebbero indirettamente sulla progressione del tumore maligno, ritardandone i danni ossidativi. (Butelli et al., 2008)

La ricerca condotta sui topi supporta l'idea che anche per l'uomo vi siano effetti positivi a lungo termine di una dieta con alti livelli di antocianine, per esempio con consumo di mirtilli, lamponi, more, ribes.

I pomodori geneticamente modificati potrebbero sostanzialmente contribuire ad arricchire la dieta con antiossidanti idrofilici e dunque la loro assunzione potrebbe essere ampiamente adottata come strategia di medicina preventiva. E' infatti da considerare che il pomodoro è un alimento ampiamente utilizzato in molti cibi di consumo comune (ne è un esempio il passato di pomodoro) e persino nei fast-food (ketchup, pizza, salse varie). Questo largo consumo consentirebbe quindi di raggiungere anche la parte di popolazione non attenta a una dieta salutare, realizzando così una promozione della salute senza una sostanziale modificazione dello stile alimentare. (Martin et al., 2011)

3.1.2. Piante biofortificate in resveratrolo

Il resveratrolo gioca un ruolo importante nella prevenzione di una serie di condizioni patologiche nell'uomo, come malattie cardiovascolari, disordini neurodegenerativi e carcinogenesi. Esso, inoltre, inibisce l'aggregazione delle piastrine del sangue e mostra attività antiestrogenica.

Studi epidemiologici confermano gli effetti positivi di una dieta ricca di questo tipo di antiossidante. Tuttavia, il resveratrolo è assente o presente solo a bassi livelli nelle piante alimentari. La manipolazione del metabolismo secondario delle piante, quindi, può portare a un incremento dei suoi livelli.

Il resveratrolo (Fig.14) appartiene alla classe degli stilbeni, ma la sua biosintesi è limitata a poche specie di piante comunemente usate per il consumo alimentare umano tra cui: uva, mirtilli, more, arachidi e cavolfiore. L'uva rossa è probabilmente la più importante risorsa di resveratrolo, che si accumula nella buccia degli acini e si può ritrovare nel vino, anche se nel vino rosso la quantità di resveratrolo è relativamente bassa (0.3-7 mg/l).

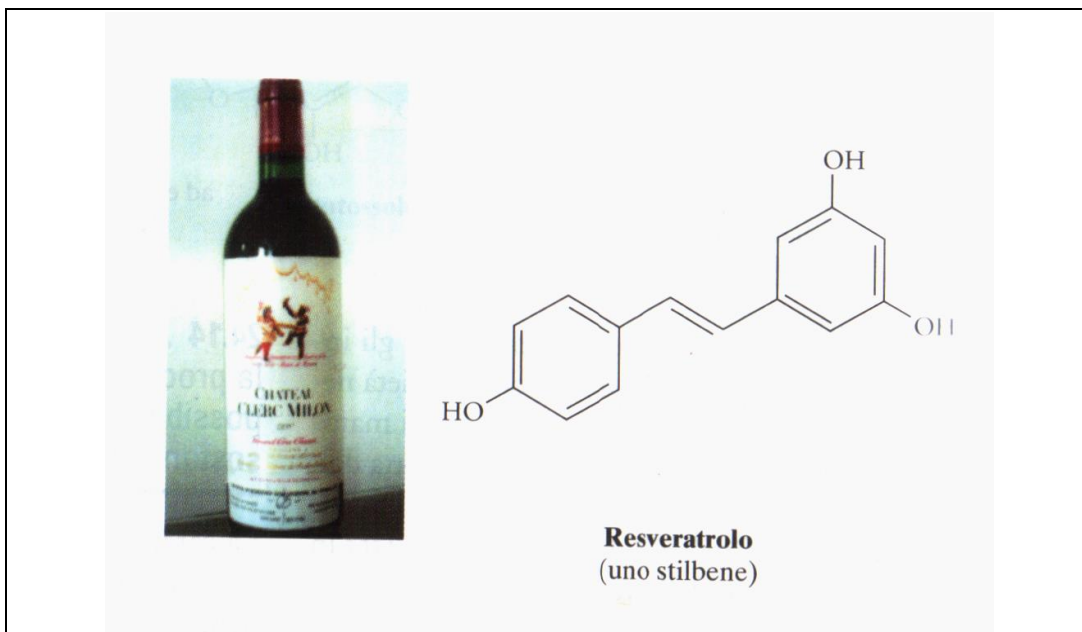


Figura 14. Formula dello stilbene resveratrolo, presente anche nel vino rosso (da Buchanan et al., 2003)

Numerosi studi hanno rivelato che il resveratrolo possiede numerose attività biologiche, tra cui le attività antiossidanti (superiori a quelle della vitamina C), antinfiammatorie, e antiaggreganti piastriniche (contro l'arteriosclerosi), oltre alla funzione di modulazione del metabolismo lipoproteico. Il resveratrolo, inoltre, protegge dal diabete, aiuta a prevenire la formazione di tumori ed ha effetto antivirale. Esso inibisce la replicazione dei virus e viene visto come potenziale strumento per terapie contro influenza, epatite virale e AIDS.

Tutto ciò fa del resveratrolo un composto prezioso che potrebbe potenzialmente contribuire all'aumento della vita media dell'uomo. La tradizione racconta che il segreto di lunga vita di Matusalemme fosse in parte legato al consumo quotidiano di vino rosso.

Studi sperimentali condotti alla Harvard University di Boston hanno dimostrato che, effettivamente, la somministrazione di resveratrolo con la dieta portava all'allungamento della vita media di topi.

Tuttavia l'efficacia del resveratrolo studiata *in vivo* è discordante da quella *in vitro*, a causa della limitata concentrazione assumibile con l'alimentazione. Le dosi necessarie per produrre gli effetti sopracitati hanno fatto sorgere varie discussioni sugli effetti ottenibili con le concentrazioni che si possono realmente raggiungere *in vivo*.

Sono stati fatti studi su animali per studiare la biodisponibilità degli stilbeni, e in particolare del resveratrolo, forniti con la dieta. La maggior parte degli studi ha indicato che la biodisponibilità del resveratrolo assunto oralmente con la dieta è molto bassa, perché il suo assorbimento è limitato e il suo metabolismo è rapido. In più esso interagisce con vari metaboliti e minerali formando, ad esempio, il resveratrolo glucoronide e il resveratrolo solfato, che ne abbassano ulteriormente la disponibilità.

Tramite l'ingegneria metabolica si sono sperimentati sistemi per migliorare la composizione e incrementare il livello di questo polifenolo in piante di interesse alimentare. In uno studio del 2012 condotto da Giovinazzo e collaboratori sono stati utilizzati i geni *STS* (stilbene sintasi) che codificano per la biosintesi del resveratrolo per produrre piante transgeniche. Due geni *STS* selezionati dalla vite (*Vitis vinifera*) sono stati trasferiti in diverse colture vegetali per incrementarne i valori nutrizionali. Ne è risultato che la maggiore sintesi di resveratrolo, ottenuta in tal modo, era utile anche alle piante poiché ne aumentava la resistenza a stress biotici e abiotici, così come a stress prodotti da funghi patogeni e da radiazioni UV.

Nel caso di un pomodoro transgenico ottenuto con l'inserzione nel genoma dei geni *STS* è stato rilevato che la sintesi del resveratrolo aumentava le proprietà antiossidanti del frutto, come anche il contenuto di ascorbato e glutatione (che sono tra i principali antiossidanti delle piante). Questo risultato suggerisce la rilevanza complessiva dell'espressione dei geni *STS*, capaci di migliorare la resistenza a malattie e a produrre colture con valori nutrizionali qualitativamente maggiori.

Una comparazione qualitativa e quantitativa delle differenti piante transgeniche che sintetizzano il resveratrolo è resa molto difficile dal fatto che vengono utilizzati differenti metodi analitici per l'analisi di questo stilbene. Comunque risulta che il contenuto di stilbeni e di resveratrolo dipende fortemente dalla specie della pianta in questione, dal contenuto dei diversi pool endogeni di enzimi o precursori, e anche dalle differenze nella via metabolica secondaria.

La variabilità del contenuto in resveratrolo potrebbe dipendere anche dai tessuti e organi presi in considerazione e dallo stadio di sviluppo del frutto. (Giovinazzo et al., 2012)

4. CONSIDERAZIONI FINALI

Le tecniche di ricombinazione del DNA applicate in agricoltura sono capaci di rivoluzionare le pratiche agricole tradizionali, sviluppando così nuove linee genetiche, con numerosi vantaggi che non sono offerti dalle piantagioni naturali.

Le ricerche nel campo della biotecnologia applicata alle piante alimentari, comunque, sono sempre correlate a test e controlli sulla sicurezza alimentare. In America i test su cibi geneticamente modificati sono controllati da tre agenzie governative: USDA (United States Department of Agriculture), EPA (US Environmental Protection Agency) e FIDA (Food and Drug Administration).

È importante che le professioni sanitarie che si occupano di diete e nutrizione siano aggiornate sulle ricerche biotecnologiche, così che informino anche il consumatore e lo indirizzino nelle scelte alimentari più adatte per la propria dieta.

Diventa urgente, ad esempio, far arrivare alla popolazione il messaggio che si dovrebbe aumentare il consumo di alimenti ricchi di fitonutrienti ed è indispensabile proporre diete con basi scientifiche sul collegamento tra fitonutrienti e salute. Alla popolazione dovranno anche essere fornite spiegazioni chiare sul fatto che con le modifiche genetiche si può arricchire il contenuto in fitonutrienti in piante alimentari di uso comune per un miglioramento della qualità

della vita. Non sarà più necessario, ad esempio, ricercare i costosi e poco consumati mirtilli per avere antiossidanti, ma si potranno ottenere quelle stesse antocianine da un pomodoro biofortificato che si ritrova persino nella pizza, nel ketchup e in altri fast foods.

Ancor più, la biofortificazione di piante di ampio interesse alimentare può portare ottimi vantaggi per combattere la malnutrizione da carenza di microelementi di cui soffrono vaste popolazioni dei paesi sottosviluppati. In particolare, questi vantaggi riguardano il rapporto costo\beneficio. Riguardo al rifornimento di vitamina A, considerando ad esempio un tempo di 10 anni, il costo per coltivare nuove specie biofortificate è stimato attorno ai 4 milioni di dollari per ogni varietà. Tale costo rappresenta solo lo 0.2% della spesa attualmente sostenuta per il supplemento di vitamina A fornito alle popolazioni, conservando le colture tradizionali. (Zhao & Shewry, 2011)

Per ottimizzare le ricerche finalizzate alla biofortificazione delle piante mirata al miglioramento della salute umana è estremamente importante incoraggiare la collaborazione fra operatori che possono lavorare a stretto contatto: coltivatori, biotecnologi, chimici, nutrizionisti, medici, epidemiologi. Purtroppo tale collaborazione è di difficile attuazione perché i ricercatori delle varie categorie, oltre a parlare linguaggi scientifici diversi, spesso si pongono obiettivi diversi per i loro esperimenti. Tuttavia, una ricerca interdisciplinare sarebbe la soluzione ideale per porre le basi di un nuovo campo di indagine basato sulla promozione della salute umana attraverso il miglioramento delle piante alimentari. Inoltre, sarebbe necessario che queste nuove ricerche fossero finanziate da fondi pubblici, per evitare che il miglioramento di certe proprietà delle piante di interesse diventi di esclusivo utilizzo da parte di un qualche marchio privato che ne sponsorizza gli studi. (Martin et al., 2011)

È confortante che gli obiettivi della sicurezza alimentare del XXI secolo si stiano indirizzando verso lo sviluppo di ricerche sulla biofortificazione di piante di interesse alimentare che possono salvaguardare la salute umana, con il fine di perseguire il miglioramento della qualità della vita.

BIBLIOGRAFIA

S. Al-Babili and P. Beyer, Golden Rice – five years on the road – five years to go?, *Trends in Plant Science*, 10: 565-573, 2005.

R. Blomhoff and H.K. Blomhoff, Overview of retinoid metabolism and function, *Journal of Neurobiology*, 66: 606-630, 2005.

B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones, *Biochimica e Biologia Molecolare delle Piante*, Zanichelli, Bologna, 2003, pp. 1261.

E. Butelli, L. Titta, M. Giorgio, H. P. Mock, A. Matros, S. Peterek, E.G.W.M. Schijlen, R. D. Hall, A. G. Bovy, J. L. and C. Martin, Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors, *Nature Biotechnology*, 26: 1301-1308, 2008.

G. Diretto, S. Al-Babili, R. Tavazza, V. Papacchioli, P. Beyer and G. Giuliano, Metabolic Engineering of Potato Carotenoid Content through Tuber-Specific Overexpression of a Bacterial Mini-Pathway, *PLoS ONE*, 2, e350, 2007.

L. Englberger, R.B.H. Wills, B. Blades, L. Dufficy, J. W. Daniells and T. Coyne, Carotenoid content and flesh color of selected banana cultivars growing in Australia, *Food and Nutrition Bulletin*, 27: 281-291, 2006.

T. B. Fitzpatrick, G. J. C. Basset, P. Borel, F. Carrari, D. Della Penna, P. D. Fraser, H. Hellmann, S. Osorio, C. Rothan, V. Valpuesta, C. Caris-Veyrat and A. R. Fernie, Vitamin Deficiencies in Humans: Can Plant Science Help?, *Plant Cell*, 24: 395-414, 2012.

G. Giovino, I. Ingrosso, A. Paradiso, L. De Gara and A. Santino, Resveratrol Biosynthesis: Plant Metabolic Engineering for Nutritional Improvement of Food, *Plant Foods Human Nutrition*, 67: 191-199, 2012.

B. Lonnerdal, Genetically Modified Plants for Improved Trace Element Nutrition, *Journal of Nutrition*, 133: 1490-1493, 2003.

M. Maffei, *Metabolismo e prodotti secondari delle piante*, Utet, Torino, 2003, pp. 350.

J. E. Mayer, W. H. Pfeiffer and P. Beyer, Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition, *Current Opinion in Plant Biology*, 11:166-170, 2008.

C. Martin, The interface between plant metabolic engineering and human health, *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 344-353, 2013.

C. Martin, E. Butelli, K. Petroni and C. Tonelli, How Can Research on Plants Contribute to Promoting Human Health?, *Plant Cell*, 23: 1685-1699, 2011.

National Research Council, *Environmental Effects of Transgenic Plants: The Scope and Adequacy of Regulation*, Washington, DC: The National Academies Press, 2002.

D. C. Sands, C. E. Morris, E. A. Dratz and A. Pilgeram, Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods, *Plant Science.*, 117: 377-389, 2009.

P. J. White and M. R. Broadley, Biofortifying crops with essential mineral elements, *Trends in Plant Science*, 10: 586-593, 2005.

L. Yan and P. S. Kerr, Genetically Engineered Crops: Their Potential use for improvement human nutrition, *Nutrition Reviews*, 60: 135-41, 2002.

F. J. Zhao and S. P. McGrath, Biofortification and phytoremediation, *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 373-380, 2009.

F. J. Zhao and P. R. Shewry, Recent developments in modifying crops and agronomic practice to improve human health, *Food Policy*, 36: 94-101, 2011.

Sitografia delle immagini

Figura 1. www.harvestplus.org/content/nutrients

Figure 2, 3, 5. www.who.int/vmnis

Figura 4. www.chimica-online.it/organica/vitamine/vitamina-A

Figura 6. rt.com/shows/documentary/golden-rice-gmo-people-031

Figura 8. www.takepart.com/article/2014/06/18/gmo-super-bananas-are-here-0

Figura 9. www.darapri.it/immagini/nuove_mie/esercitazioni/flavanoli