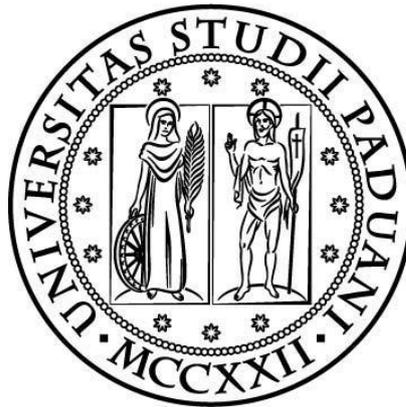


UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTÁ DI SCIENZE MM.FF.NN.
CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA
CURRICULUM BIOLOGIA GENERALE**



ELABORATO DI LAUREA

**STRATEGIE DI BIOFORTIFICAZIONE DELLE
PIANTE**

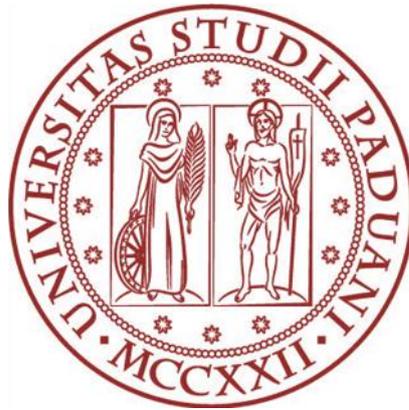
TUTOR: PROF. NICOLETTA RASCIO
Dipartimento di Biologia

LAUREANDO: ANDREA COVOLAN

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTÁ DI SCIENZE MM.FF.NN.
CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA
CURRICULUM BIOLOGIA GENERALE
(D.M. 270)**



ELABORATO DI LAUREA

**STRATEGIE DI BIOFORTIFICAZIONE DELLE
PIANTE**

TUTOR: PROF. NICOLETTA RASCIO
Dipartimento di Biologia

LAUREANDO: ANDREA COVOLAN

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

NUTRIZIONE E MALNUTRIZIONE.....	Pag. 1
STRATEGIE PER FAR FRONTE ALLA MNM.....	Pag. 1
ALCUNI AMMINOACIDI ESSENZIALI.....	Pag. 2
ACIDI GRASSI ESSENZIALI CON CATENA MOLTO LUNGA.....	Pag. 3
VITAMINA A.....	Pag. 4
VITAMINA E.....	Pag. 5
FERRO.....	Pag. 6
ZINCO.....	Pag. 8
IODIO.....	Pag.10
ACIDO FOLICO.....	Pag.11
SELENIO.....	Pag.12
OSSERVAZIONI CONCLUSIVE E PROSPETTIVE FUTURE.....	Pag.12

NUTRIZIONE E MALNUTRIZIONE

Più della metà della popolazione mondiale non ha accesso ad un'alimentazione composta da cibi freschi e deve fare affidamento al riso e alle farine cereali. Questi alimenti sono poveri di lisina, di vitamina A ed E, di acido folico, di ferro, di zinco e di selenio, e di altre sostanze essenziali per il metabolismo. Malattie spesso associate alla malnutrizione sono ad esempio la pellagra, dovuta alla carenza di triptofano, amminoacido precursore della vitamina B3 (vitamina PP, Pellagra Preventing), il beriberi, dovuto alla carenza di tiamina, vitamina B1, il rachitismo per la carenza di vitamina D, di calcio e/o fosforo, e l'anemia per un deficit di ferro. La malnutrizione per i micronutrienti (MNM) è giunta all'attenzione della comunità nutrizionale mondiale a metà degli anni '80 ed è stata individuata come un'importante sfida per la sanità pubblica nel 1990 al World Summit For Children convocato dai governi e sostenuto dalle nazioni unite con il supporto dell'UNICEF, dalla Banca Mondiale, dall'OMS (Organizzazione mondiale della sanità), dalla FAO (Food and Agriculture Organization), dall'UNDP (United Nations Development Program), dalla CIDA (Canadian International Development Agency) e dall'USAID (United States Agency for International Development). I tre obiettivi fissati in questo summit furono l'eliminazione o la significativa riduzione delle carenze di ferro, vitamina A e iodio entro il 2000, problematiche ancora lontane dall'essere superate. Nel 2001 sono stati nuovamente affrontati questi temi ed è stato fissato il Millennium Development Goals (MDGs), che punta a superare i principali problemi di sanità mondiale, come la mortalità infantile, la MNM e la mortalità materna per il 2015.

STRATEGIE PER FAR FRONTE ALLA MNM

Una dieta variegata sarebbe il modo più naturale ed efficace per integrare tutti i nutrienti necessari al nostro corpo, ma è una via improponibile per più di 3 miliardi di persone che vivono con meno di 2 dollari al giorno. Una strategia alternativa alla dieta, per contribuire alla lotta contro la malnutrizione è la Biofortificazione, che aumenta la quantità di micronutrienti assorbiti dalle piante e da queste trasferiti ai consumatori primari. La tecnica più semplice per compiere questa integrazione è quella di fertilizzare i terreni con i dovuti composti organici e inorganici. Questa tecnica ha avuto successo in diverse occasioni, ma ha risultati diversi a seconda del tipo di raccolto e del contenuto minerale proprio del suolo. A causa di queste variabili è difficile l'applicazione su larga scala. L'utilizzo di fertilizzanti ha un costo non trascurabile anche perché devono essere regolarmente applicati. Un altro approccio è quello di fare in modo che la pianta si arricchisca di nutrienti in modo "autonomo" grazie alla mutagenesi. Si cerca di inserire un insieme di caratteristiche vantaggiose che possono essere descritte complessivamente come "plasma germinale adattativo" [1]. Un esempio di organismo con alto livello nutrizionale è il mutante opaque-2 del mais arricchito in lisina. Non si tratta di mutazioni che introducono bizzarre forme o caratteristiche alla pianta. Ci sono approcci differenti a seconda che si debba

aumentare l'assorbimento dal terreno o la sintesi dei prodotti dell'organismo. I minerali sono assunti dall'ambiente e di conseguenza se desideriamo aumentare la loro concentrazione nei tessuti della pianta, dovremo generare delle mutazioni che incrementino l'assorbimento, il trasporto e l'accumulo nei tessuti utilizzabili. Per biofortificare quei composti, che sono invece sintetizzati dalla pianta, per esempio gli aminoacidi, gli acidi grassi e le vitamine, si dovrà andare ad agire sulle vie della loro sintesi. Per esempio si potrebbe cercare di eliminare composti antagonisti o inibitori della loro sintesi, introdurre nuove vie per la loro produzione, oppure aumentare i precursori chimici.

ALCUNI AMMINOACIDI ESSENZIALI

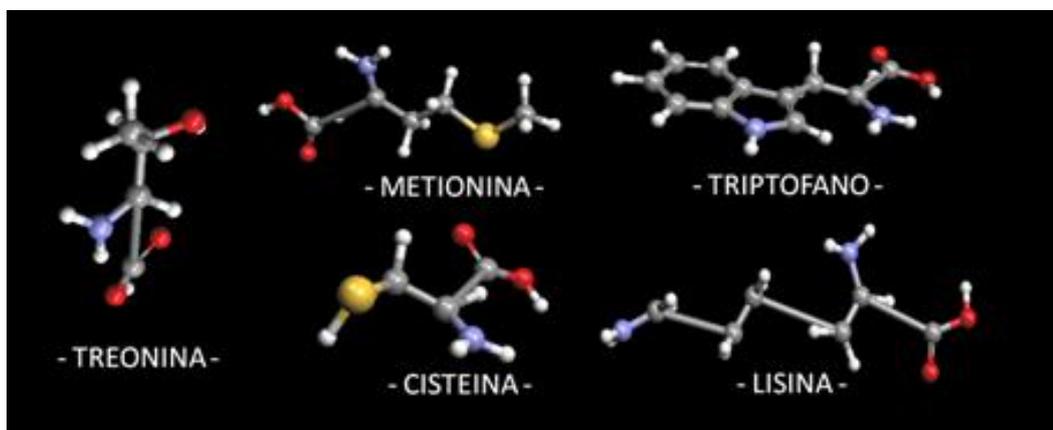


Fig.1: struttura molecolare degli aminoacidi trattati

Molte piante coltivate su larga scala, sono carenti di aminoacidi essenziali (Fig.1), cioè che non possono essere sintetizzati dall'uomo. In particolare i cereali tendono ad essere carenti in lisina e treonina mentre i legumi in metionina e cisteina. Gran parte della popolazione consuma esclusivamente questi due generi alimentari per i quali sarebbe dunque importante compiere una biofortificazione per evitare problemi di sviluppo nell'infanzia. Un semplice approccio è l'espressione di proteine di riserva ricombinanti con i profili dell'amminoacido desiderato. I primi esempi di questa metodologia includono l'espressione di legumina, una proteina di *Pisum sativum* ricca di lisina, in riso e frumento e l'espressione dell'albumina dei semi di girasole, ricca in metionina, nel lupino, un organismo modello. Similmente il gene AmA1 di *Amaranthus hypocondriacus*, che codifica per l'albumina presente nei semi, può essere espresso in patata per raddoppiare il contenuto proteico e incrementare la quantità di aminoacidi essenziali. Questa tecnica non funziona sempre efficacemente, come si può riscontrare nei tentativi condotti per far esprimere l'albumina dei semi di girasole in riso e cece. La procedura ha uno scarso influsso sul contenuto di aminoacidi contenenti zolfo (che erano oggetto degli studi), forse a causa del meccanismo regolatore che modula la componente proteica di riserva in base ai livelli di zolfo e di azoto. In piante di cassava mutate è stato riscontrato che la sintesi di proteine eterologhe procede lentamente a causa della scarsità degli aminoacidi liberi

necessari al loro assemblaggio. L'aumento della concentrazione di lisina è un obiettivo molto importante che si è cercato di raggiungere studiando mutanti di *Arabidopsis*. In tutte le piante superiori, lisina, treonina e metionina sono sintetizzate nella via dell'acido aspartico, una via molto ramificata e dalla regolazione molto fine. Due enzimi chiave sono l'aspartato chinasi (AK) il quale agisce precocemente nella via ed è inibito da lisina e treonina, e la diidropteroato sintetasi (DHPS), enzima che funziona nel ramo specifico della lisina ed è inibito solo da essa. Una versione di DHPS batterico, insensibile all'inibizione, è stata fatta esprimere in *Arabidopsis* con risultati promettenti. Grazie a questo procedimento il contenuto di lisina veniva aumentato dalle 5 alle 12 volte.

Un altro approccio portato avanti in *Arabidopsis*, sempre utilizzato per l'arricchimento in lisina, va invece a inserire un transgene che silenzia la via catabolica della lisina e permette di avere un aumento della concentrazione di lisina di 80 volte rispetto alla linea selvatica.

L'espressione di DHPS in mais aumentava i livelli dell'amminoacido libero dal 2% al 30% in concomitanza con un aumento della treonina.

Approcci simili sono stati testati anche in canola (Canadian oil low acid, una varietà di colza dal basso contenuto di acido erucico) e in semi di soia dove l'espressione della antranilato sintetasi di riso provoca una quantità di triptofano doppia rispetto a quella presente dei grani selvatici. Forse sarà possibile combinare tutti questi approcci in un'unica linea di piante per aumentare i livelli di amminoacidi e per includerli in proteine eterologhe di riserva. Questo potrebbe essere inoltre combinato con strategie che regolano il profilo delle proteine di riserva nei cereali per favorire la formazione di proteine con un alto valore nutrizionale, come la creazione di nuove versioni di mais opaque-2.

ACIDI GRASSI ESSENZIALI CON CATENA MOLTO LUNGA (VLC-PUFAs)

Gli acidi grassi sono un altro importante obiettivo della biofortificazione a causa del loro ruolo a livello cardiovascolare, nella risposta infiammatoria e nella regolazione della pressione sanguigna. Sono noti molti enzimi coinvolti nella sintesi e nella degradazione di questi composti e sono già state intraprese diverse strade per la loro biofortificazione. Aumentare i livelli dell'acido linoleico, ed in particolare dell'acido α -linoleico, vorrebbe dire fornire il substrato per la formazione di molti acidi grassi essenziali a catena molto lunga, come l'acido arachidonico (ARA), l'acido eicosanpentonico (EPA) e l'acido docosanesaenoico (DHA) i quali si trovano solitamente nel pesce. Uno studio pubblicato nel 2004 dal gruppo di Qi, B., descrive come sono stati fatti esprimere costitutivamente tre transgeni in *Arabidopsis*, per aumentare il livello di EPA e ARA rispettivamente del 3% e del 6,6% del totale di acidi grassi presenti nei tessuti. La linea transgenica finale è stata ottenuta con tre cicli di trasformazione, con i geni codificanti per la $\Delta 9$ -elongasi, la $\Delta 8$ -desaturasi e la $\Delta 5$ -desaturasi, in modo da trasferire una via non presente nelle piante selvatiche. Altri studi per aumentare il

livello degli acidi grassi, con specifici promotori agenti sulle vie convenzionali, hanno portato ad un aumento complessivo del 25%. ARA ed EPA però rappresentano ancora solo meno dell'1%. Usando la $\Delta 6/\Delta 5$ -desaturasi di Zebrafish, una $\Delta 6$ -elongasi di diptero e producendo EPA per successive conversioni in DHA mediante enzimi dell'alga *Pavlova salina*, è stato possibile ricostruire la via della DHA in piante transgeniche di Arabidopsis. Similmente, è stato possibile portare la concentrazione di DHA al 3% del totale degli acidi grassi, usando la $\Delta 6$ -elongasi del fungo *Mortierella alpina* e aggiungendo la ω -3 desaturasi microsomale proveniente dal fungo *Saprolegnia diclina* per massimizzare l'accumulo di n-3 VLC-PUFAs. Fino ad oggi, i risultati con più successo provengono da studi nei quali la via della biosintesi di VLC-PUFA era ricostruita in *Brassica juncea* sostenendola con ω -3 desaturasi di *Phytophthora infestans*, con $\Delta 12$ -desaturasi di *Calendula officinalis* e aciltransferasi del fungo marino *Thraustochytrium aureum*.

In ciascuno di questi studi, si è riscontrata un'impressionante crescita del flusso attraverso la via di VLC-PUFA, guidata da un accumulo di ARA e EPA. I livelli di DHA rimangono però ancora bassi e questo potrebbe riflettere la scarsa efficienza con cui EPA viene allungato e/o desaturato. Ciò forse indica una competizione fra vie alternative coesistenti nella pianta. Un'osservazione più accurata di queste vie, dell'antagonismo fra di esse, dei feedback e delle ramificazioni, permetterà in futuro lo sviluppo di piante con alti livelli di DHA e di altri acidi grassi essenziali.

VITAMINA A

Con il termine vitamina A (Fig.2) si intende un composto a 20 atomi di carbonio appartenente al gruppo dei carotenoidi (retinale, retinolo e suoi esteri, e l'acido retinoico), che svolgono un ruolo essenziale nella

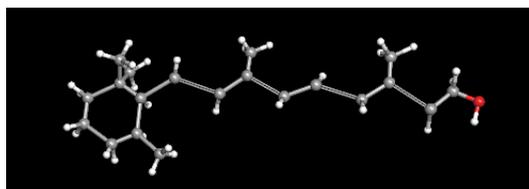


Fig.2: struttura molecolare della vitamina A

visione, nella risposta immunitaria, nella crescita delle cellule epiteliali, nella crescita delle ossa, nella riproduzione, nella protezione degli epitelii di rivestimento degli occhi, nello sviluppo embrionale, e nella regolazione dei geni negli adulti. Uno dei primi sintomi della carenza di vitamina A è la cecità notturna. Possono seguire alterazioni strutturali della congiuntiva e della cornea (xeroftalmia, keratomalacia), infiammazioni e infezioni che possono infine degenerare in una cecità irreversibile. La depressione del sistema immunitario aumenta la gravità del morbillo e della diarrea, con un conseguente aumento della mortalità infantile di 9 volte. Spesso la morte colpisce prima della comparsa di xeroftalmia. Si stima che ogni anno circa 127 milioni di bambini in età prescolare siano affetti da carenza di vitamina A. 250.000-500.000 sono colpiti da cecità e metà di questi muore nei 12 mesi dopo aver perso la vista. Il 90% della mortalità infantile mondiale annua, più di 9 milioni di decessi, è concentrata in soli 42 paesi

poveri. Una combinazione di interventi nutrizionali semplici ed efficaci come un'alimentazione complementare, la somministrazione di vitamina A e la supplementazione di zinco potrebbero prevenire circa il 25% di queste morti. Gli umani possono sintetizzare la vitamina A in presenza della molecola precursore, il β -carotene (conosciuto anche come provitamina A), un pigmento trovato in molte piante ma non nei grani dei cereali come riso e frumento. Perciò è stata escogitata una strategia per introdurre la via metabolica desiderata nell'endosperma di riso per facilitare la sintesi del β -carotene. Lo spunto iniziale fu lo sviluppo di una linea di riso che esprimesse la fitoene sintetasi di narciso (*Narcissus pseudonarcissus*), capace di accumulare nell'endosperma il precursore della vitamina A. Successivamente venne sviluppata la varietà "Golden Rice", grazie all'espressione di due enzimi di narciso ed uno del batterio *Erwinia uredovora*, per ricostruire la via interna che mette in grado la cellula di accumulare il β -carotene, il quale conferisce una colorazione dorata. Nella linea migliore, il grano contiene più di 1,5 μ g di β -carotene per grammo di peso secco. Questo riso dorato è stato realizzato con l'inserimento di soltanto due enzimi ricombinanti (fitoene sintetasi di narciso e fitoene desaturasi di *Erwinia uredovora*). Recentemente, una seconda varietà di riso dorato nella quale la fitoene sintetasi di narciso è stata sostituita con l'enzima omologo più efficiente del mais, ha ottenuto come risultato un aumento del contenuto in β -carotene di 23 volte (più di 37 μ g g⁻¹). Questo approccio ha permesso simili progressi anche in altre piante da raccolto, incluse le "patate gialle", i "cavolfiori arancioni", carote con più β -carotene nel fittone e pomodori con la via metabolica del β -carotene. Una varietà di patata, recentemente sviluppata, contiene fitoene sintetasi, fitoene desaturasi e licopene β -ciclastasi di *Erwinia herbicola* ed è in grado di accumulare 114 μ g di carotenoidi e 47 μ g di β -carotene per grammo di peso secco. Questi studi hanno dimostrato che la ricerca di geni coinvolti nell'espressione di β -carotene permette di compiere profondi cambiamenti nei livelli di immagazzinamento di questa molecola. Una recente biofortificazione, operata su patata, permette di avere metà del fabbisogno giornaliero di β -carotene raccomandato con una porzione di 250g, (assumendo che un tasso realistico di conversione del β -carotene a retinolo è di 6:1), a differenza del golden rice criticato per la grande quantità di riso che sarebbe necessario consumare per avere gli stessi effetti.

VITAMINA E

Mentre la vitamina A è una singola molecola, la vitamina E (Fig.3) è un gruppo di otto composti idrofobici (noto come "vitameri"), il più importante dei quali è l' α -tocoferolo. Nella dieta, la vitamina E è ottenuta principalmente attraverso i semi, e la sua funzione nel corpo è quella di prevenire l'ossidazione e la polimerizzazione degli acidi grassi insaturi.

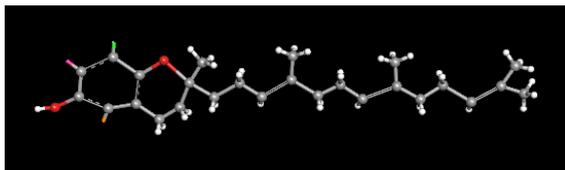


Fig.3: struttura molecolare generale della vitamina E

La carenza di vitamina E porta ad un deperimento generale, alla degenerazione dei reni e all'infertilità. Nelle piante, la sintesi del tocoferolo richiede un input da due percorsi metabolici. Studi su *Arabidopsis* hanno dimostrato che i livelli di vitamina E assimilabile, possono essere accresciuti con un aumento della quantità totale di vitamina E o spostando il flusso metabolico verso il tocoferolo. Shintani e Della Penna, nel 1998 [1], hanno fatto esprimere geni che codificano la γ -tocopherolo metiltransferasi (γ -TMT) in *Synechocystis* PCC6803 e in *Arabidopsis*, nei semi di *Arabidopsis*, causando un passaggio radicale da γ/δ a α/β -tocopherolo. Questo ha dimostrato che l'aumento della vitamina E attiva nelle piante era possibile senza alterare i suoi livelli totali. Per contro, l'espressione della prenilttransferasi acido omogentisico di *Arabidopsis* (TPM) produce una quantità doppia di vitamina E rispetto a quella presente nei semi normali. L'espressione del gene *tyrA* di *Escherichia coli*, che codifica un enzima a doppia funzione (mutasi corismato e prefenato deidrogenasi), porta invece ad un aumento fino a tre volte del livello normale di vitamina E. Uno studio recente si basa sull'espressione contemporanea di più geni in soia. In questo caso, sono stati utilizzati i geni di *Arabidopsis* codificanti la 2-metil-6-phytylbenzoquinol (MPBQ) metiltransferasi e G-TMT. La soia transgenica ha mostrato un aumento significativo dell'attività totale della vitamina E (cinque volte superiore a quella di piante wild-type), che è attribuibile principalmente ad un aumento di otto volte dei livelli di α -tocopherolo. Recentemente, alcune colture sono state progettate in modo da accumulare anche altre vitamine, tra cui folati e ascorbato (vitamina C).

FERRO

Più di un terzo della popolazione mondiale soffre di anemia, causata, nella metà dei casi, da carenza di ferro. Questo deficit influisce negativamente sullo sviluppo cognitivo, sulla resistenza alle infezioni, sulla capacità di lavorare e sulla gravidanza. I bambini di madri anemiche soffrono di un ritardo nella crescita, dispongono di basse riserve di ferro e ne richiedono di più di quello fornito dal latte materno. Si stima che 800.000 decessi all'anno siano imputabili alla carenza di ferro. Le commissioni internazionali si sono poste l'obiettivo di ridurre di un terzo la carenza di ferro nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, entro l'anno 2010, rispetto ai livelli del 2000. Quest'obiettivo però è probabilmente irraggiungibile. Sebbene quello dell'ingegneria metabolica sia l'approccio più adatto per fortificare le piante con sostanze organiche, per i minerali è necessario seguire un'altra strada perché essi non sono sintetizzati nelle piante, ma sono ottenuti dall'ambiente circostante. Strategie transgeniche per aumentare il contenuto minerale delle piante coltivate si sono concentrate principalmente su ferro e zinco (che sono più frequentemente carenti nella dieta umana) e hanno utilizzato due approcci distinti: (I) aumentare l'efficienza di assorbimento e di trasporto nei tessuti, e (II) aumentare la quantità di minerale biodisponibile accumulato nella pianta, vale a dire quanto di questo è assimilabile dopo la digestione [2]. Una considerazione particolare da fare per il ferro è che, anche se

Fe (III) è la forma più abbondante di ferro nel suolo, le piante non lo possono assorbire in questo stato (Fig.4). Per la conversione del Fe (III) in Fe (II) e vengono quindi usate due strategie differenti. La prima strategia (I) è utilizzabile per molte piante e comporta l'espressione e il posizionamento a livello della membrana di Fe (III) riduttasi e il successivo assorbimento di Fe (II). Proteine di trasporto specifiche vengono poi utilizzate per assorbire, attraverso le radici, il minerale, che è trasportato attraverso lo xilema ai tessuti "sink", come le foglie, sotto forma di complessi con nicotianamina, più specificamente come chelato di Fe (II). La sovraespressione di alcune di tali proteine di trasporto e di chelanti, promuove l'accumulo di metalli. Gli sforzi per aumentare l'assorbimento del ferro nelle radici per modificazione genetica, si sono concentrati sulla strategia I, per esempio, attraverso l'espressione di proteine di trasporto del ferro.

La seconda strategia (II), valida per graminacee, molte erbe e quindi anche per i cereali, comporta la secrezione di sostanze chelanti, chiamate fitosiderofori, che si legano a Fe (III) prima dell'assorbimento. L'accumulo di ferro può essere rafforzato dalla produzione di alti livelli di fitosiderofori; per esempio, l'espressione dei geni *naat-A* e *naat-B* codificanti per nicotianamina transferasi (enzimi coinvolti nella biosintesi dei fitosiderofori) in riso e orzo ha comportato un aumento dell'assorbimento del ferro. Sembra che ci siano alcuni punti d'incontro tra le vie del ferro e le vie di trasporto dello zinco, perché le piante transgeniche e quelle mutanti con sovraespressione della Fe (III) riduttasi e dei trasportatori del ferro, mostrano anche un maggiore accumulo di zinco. Questo trova conferma anche nell'aumento nella sintesi della nicotianamina con la mobilitazione di entrambi i metalli nel tessuto vascolare. Così, la sovraespressione di nicotianamina sintasi porta anche ad un accumulo di ferro e zinco; per esempio, l'espressione di *HvNAS1* di orzo nel tabacco (*Nicotiana tabacum*) raddoppia le concentrazioni di ferro e di zinco nelle foglie.

Il secondo approccio alla biofortificazione minerale è quello di far esprimere proteine ricombinanti che consentano ai minerali di essere conservati in una forma biodisponibile, come per esempio con la sovraespressione di ferritina di soia nel riso grazie a un promotore endosperma-specifico. La proteina ferritina rappresenta la forma in cui il ferro viene immagazzinato. Questi chicchi di riso, hanno da 3 a 4.4 volte i livelli di ferro del wild-type. La concentrazione di ferro è stata anche misurata nei grani decorticati, perché i minerali si perdono durante la pulitura, ma i livelli di ferro (e zinco) erano ancora superiori a quelli in grani wild-type non decorticati. D'altra parte, l'uso di un promotore costitutivo per l'espressione della ferritina, ha portato a elevati livelli di ferro nelle foglie delle piante di riso transgenico, ma non nei grani, a causa dei livelli di espressione della ferritina che sono superiori nei tessuti vegetativi. L'importo complessivo del ferro e degli altri minerali nelle piante, è un fattore determinante per la qualità degli alimenti. La cosa più importante resta però la quantità di ferro biodisponibile e quanto bene esso sia assorbito dall'intestino umano. L'acido fitico è un composto "antinutrizionale" che chela i minerali e riduce la loro biodisponibilità intestinale.

Pertanto, è stato sviluppato un approccio combinato che coinvolge sia l'espressione di ferritina sia di fitasi (un enzima fungino che scompone il fitato), questo progetto è stato portato avanti nel riso e nel mais. I chicchi di riso manifestano il doppio dell'importo di ferro dei wild-type, e simulazioni di digestione e assorbimento utilizzando endosperma di mais, hanno dimostrato che in essi era aumentata la quantità di ferro biodisponibile. Per raggiungere il massimo livello di ferro biodisponibile è quindi necessario combinare più strategie.

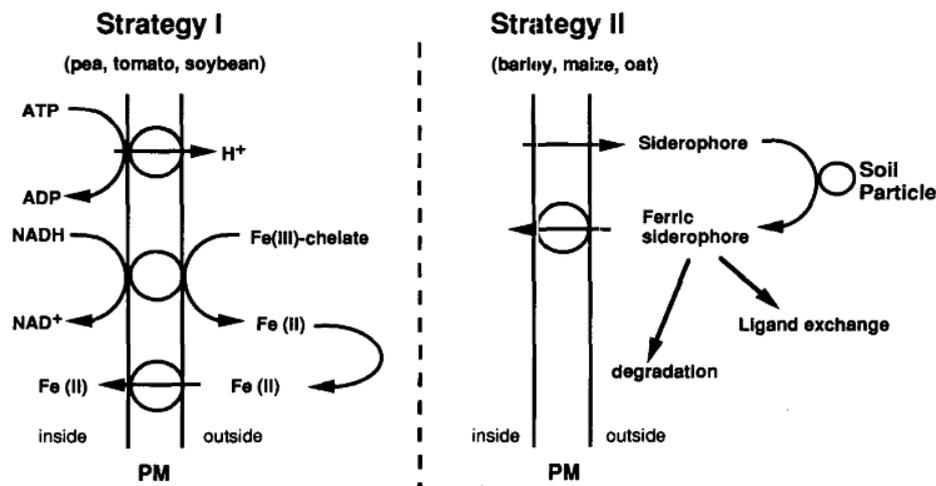


Fig.4: modelli di assorbimento del ferro nelle piante superiori (da Cuerinot and Yi [2])

ZINCO

Lo zinco è coinvolto nella sintesi dell' RNA e del DNA, ed è un costituente di molti enzimi essenziali per la crescita cellulare e la differenziazione. Mentre una lieve carenza di zinco è comune in tutto il mondo, un terzo della popolazione mondiale, che vive in paesi a basso reddito, soffre di una grave deficienza di questo minerale secondo l'International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG). La carenza di zinco porta ad una crescita ridotta, ad una disfunzione del sistema immunitario, ad esiti negativi della gravidanza, e ad uno sviluppo neuro-comportamentale anormale. La carenza di zinco è direttamente legata alla gravità e alla frequenza degli episodi di dissenteria, che rappresenta una delle più grandi cause di morte infantile. Il fatto che la carenza di zinco sia un grosso problema di sanità mondiale, è stato anche messo in evidenza dall'OMS e dalla FAO.

Per ferro e zinco è possibile ottenere concentrazioni minerali elevate in quanto sono già presenti alcune varietà di piante selvatiche con varianti genotipiche che consentono un maggior immagazzinamento. Il farro selvatico mostra una variazione nelle concentrazioni di questi metalli piuttosto ampia. I passaggi chiave per aumentare la concentrazione di ferro e zinco nel frumento sono il trasferimento di particolari geni e la mobilitazione delle riserve dalle foglie verso i

chicchi. Recenti studi hanno dimostrato che il locus *gpc-BL* del farro selvatico, controlla sia il contenuto proteico del grano che la concentrazione di Fe e Zn nel grano. Questo locus codifica per un fattore di trascrizione chiamato NAC (NAM-B1) che accelera la senescenza e rimobilitazione dei nutrienti (N, Fe e Zn) delle foglie per favorire lo sviluppo dei grani. Il genoma del frumento contiene tre geni NAM, ma una moderna varietà di grano usato per il pane, in cui è stato inserito un allele per una NAM-B1 non funzionale, che causa ritardo nella senescenza delle foglie, ha livelli di proteine, di Fe e di Zn più bassi rispetto al farro selvatico. Ora si stanno sviluppando quindi alleli ad alta resa da sostituire al locus *gpc-BL* di frumento. La biofortificazione agronomica dello zinco è necessaria anche per quei terreni con scarsa disponibilità di Zn, che rappresentano quasi la metà delle aree coltivate a cereali del mondo. Poiché la maggior parte delle riserve di Fe e Zn sono localizzate nello strato aleuronico dei semi, che viene rimosso mediante decorticazione o lucidatura, è importante verificare che la biofortificazione abbia effettivamente aumentato la concentrazione di questi minerali nell'endosperma, ed abbia aumentato la loro biodisponibilità (Fig.5) [3].

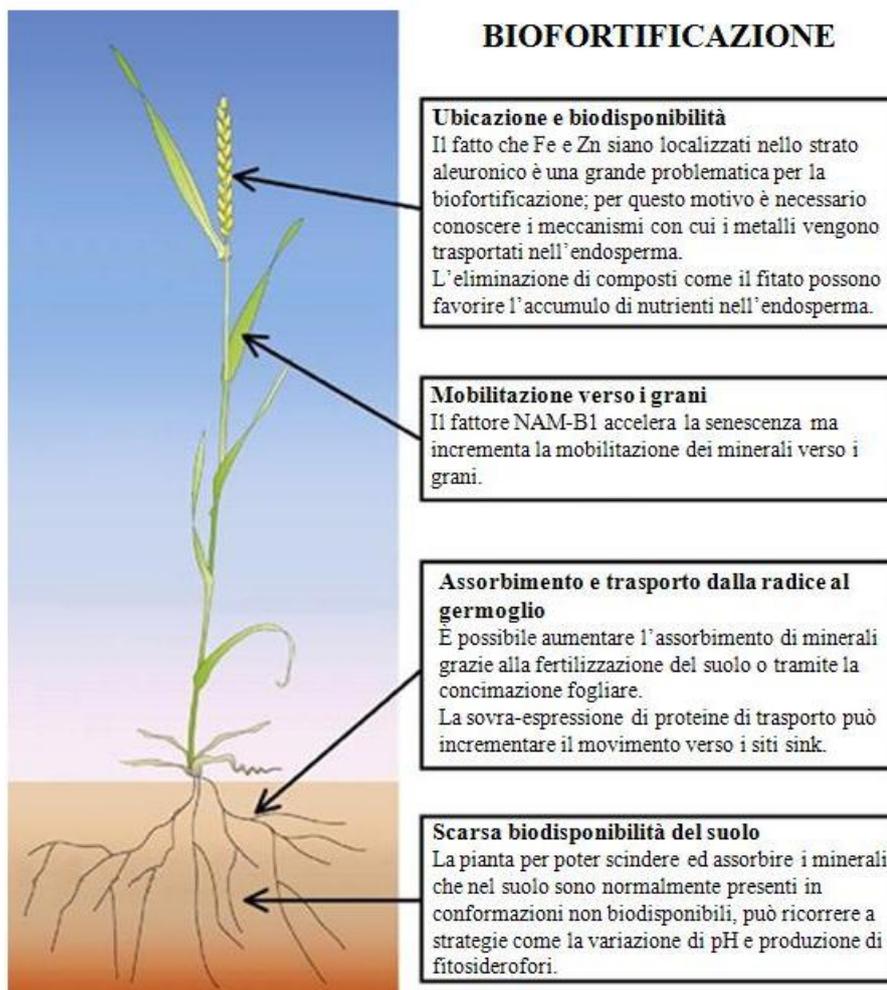


Fig.5: Osservazioni sulla biodisponibilità (parzialmente modificato da Zhao e McGrath; 2009)

Il fitato che si accumula nello strato aleuronico dei semi è il fattore che diminuisce maggiormente la biodisponibilità di Fe e Zn. Ridurre il livello di fitato nel frumento e nei legumi è possibile ma si ottiene l'effetto indesiderato di un basso rendimento della pianta, e di difficoltà nella germinazione. Un'alternativa è quella di far esprimere nell'endosperma dei cereali la fitasi di altri microorganismi come *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus*, o ancora più efficacemente delle fitasi termostabili in modo che l'enzima possa resistere alle elevate temperature durante la cottura o ad altre trasformazioni che potrebbero distruggere la fitasi. Dei test compiuti su animali da laboratorio hanno effettivamente dimostrato una maggior biodisponibilità di Zn nel grano transgenico contenente fitasi termostabile.

IODIO

Lo iodio è un componente degli ormoni tiroidei. La carenza di questa sostanza può causare diversi disagi, e, da sola, rappresenta la più grande causa di danni cerebrali nel feto e nei neonati, e dello sviluppo psicomotorio ritardato nei bambini. Gozzo e cretinismo sono le manifestazioni più visibili della carenza di iodio. Si stima che quasi un miliardo di persone soffra di gozzo, e che più della metà degli affetti viva in Asia. Circa 16,5 milioni di persone nel mondo soffrono di cretinismo, ed è probabile che altri 49,5 milioni soffrano di forme meno gravi, con effetti sul cervello ancora da quantificare.

La principale risorsa per l'assunzione dello iodio è rappresentata dalla dieta ed in particolare dal pesce. La quantità di iodio varia invece nelle verdure a seconda dei terreni su cui sono coltivate, ma è spesso troppo scarsa rispetto ai fabbisogni umani. L'introduzione dello iodio nel sale risulta una strategia ampiamente diffusa ed accettata per sopperire alla mancanza dello iodio nella dieta umana. Nonostante ciò, l'utilizzo del sale iodato è ancora poco diffuso in Europa, ed anche in Italia solo una minoranza della popolazione acquista sale iodato. Occorre ricordare, inoltre, che l'assunzione di sale, anche se iodato, deve essere comunque limitata in relazione al rischio di malattie cardiovascolari.

L'incremento della concentrazione dello iodio nei vegetali per la produzione di alimenti funzionali sta rappresentando un settore di studio di particolare interesse e con un mercato potenziale. In Cina, per esempio, diverse sperimentazioni su risaie in acqua iodata hanno portato alla riduzione delle patologie dovute alla carenza dello iodio [6]. In Italia, recenti sperimentazioni hanno sviluppato una procedura che ha portato ad ottenere e a commerciare patate arricchite in iodio mediante biofortificazione agronomica: lo iodio, apportato alle piante di patate mediante concimazione fogliare, viene traslocato ed efficacemente accumulato nei tuberi in quantità funzionali alla dieta, ovvero per un contenuto minimo del 15% della RDA (Recommended Daily Allowance) su 100 grammi di prodotto fresco (Direttiva 90/496/CEE del 24/09/90)

ACIDO FOLICO

L'acido folico, o vitamina B9 (Fig.6), è un coenzima essenziale per il metabolismo. Un deficit di acido folico è associato al rischio di concepire neonati con difetti al tubo neurale, come la spina bifida, l'anencefalia, e ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari, di

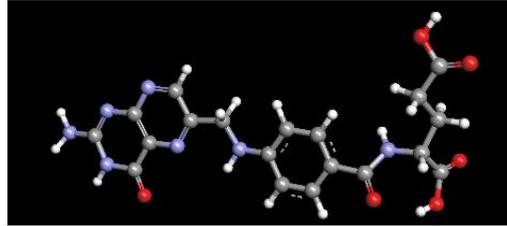


Fig.6: struttura molecolare dell'acido folico

cancro e di alterazioni delle funzioni cognitive negli adulti. Nel 1998, negli Stati Uniti è stata resa obbligatoria la fortificazione della farina di frumento con acido folico ed è stata riscontrata una riduzione significativa dei difetti al tubo neurale [4]. La carenza di folati provoca anche un'anemia megaloblastica, diffusa durante la gravidanza e che spesso aggrava l'anemia per carenza di ferro già esistente. Deficit di acido folico causano più di 200.000 gravi difetti alla nascita, ogni anno. I folati sono molecole tripartite composte da pteridina, p-aminobenzoato (p-ABA) e da un residuo di glutammato. La sintesi della pteridina avviene nel citosol mentre quella del p-ABA all'interno di plastidi. Le varie subunità sono poi trasportate all'interno del mitocondrio dove vengono condensate per formare diidropteroato che verrà poi coniugato al glutammato (fig 7).

L'acido folico, presente nelle piante e assumibile con la dieta, è una molecola molto labile, tanto che nei 6 giorni dopo la raccolta dei frutti di *Pisum sativum* (mantenuti a temperatura ambiente) si ha una perdita del 50% del nutriente. È una molecola idrofila e facilmente assimilabile, però è necessario consumare alimenti freschi o ben conservati. Inizialmente, tentativi per aumentare i livelli di acido folico nel pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) e in *Arabidopsis*, puntavano alla sovraespressione della GTP cicloidrolasi I (GCHI), enzima che partecipa alla sintesi della pteridina. In questo modo è stata raggiunta una quantità di pteridina 140 volte superiore rispetto alla linea selvatica. Anche aumentando la quantità di questo precursore, la sintesi di acido folico rimane comunque vincolata dalla limitata quantità di p-ABA nei plastidi.

Per questo motivo, è stata portata avanti la produzione di piante in cui il gene GCHI e il gene ADC per la aminodeossicorismato sintasi (un enzima chiave per la formazione del p-ABA) sono stati sovraespressi contemporaneamente, aumentando così i livelli di entrambi i precursori. I frutti di queste piante, contengono fino

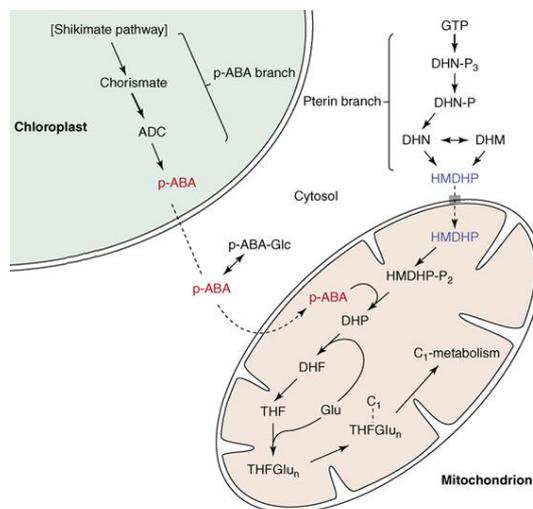


Fig.7: sintesi dell'acido folico (Bekaert, 2007)

a 20 volte l'importo di acido folico presente nella linea selvatica, mantenendo però un'elevata quantità di precursori. L'accumulo di pteridina, che nei mammiferi è legata a condizioni di stress, può essere dannoso per la salute umana e quindi questa linea non può essere utilizzata. È stata perciò compiuta un'ulteriore modifica a questa linea. Mettendo GTPCH I e ADCS sotto il controllo di un forte promotore endosperma-specifico, i livelli dei precursori sono stati mantenuti bassi, mentre si è raggiunto un aumento di 100 volte dei livelli di acido folico [5].

SELENIO

Il selenio è un “non metallo” che nell'uomo è presente in piccole quantità. La sua presenza è importante per contrastare l'invecchiamento, per mantenere l'elasticità dei tessuti, per eliminare sostanze fortemente ossidanti e per mantenere la mobilità degli spermatozoi.

Le piante possono assorbire questa sostanza dal suolo grazie anche a microorganismi ad esse associati presenti nella rizosfera.

Semplicemente fertilizzando il suolo con selenio è possibile aumentare di 10 volte i livelli di questo nutriente in ortaggi come la patata e la cipolla.

Il selenio è altamente biodisponibile quando si trova nel suolo sotto forma di selenato (SeO_4^{2-}), che viene assorbito come tale. Purtroppo non si conoscono ancora bene le quantità di selenio tollerate dalla pianta e quali conseguenze potrebbe avere l'accumulo prodotto da questo metalloide. Esperimenti condotti su *Arabidopsis thaliana* hanno mostrato come il selenio venga incorporato sotto forma di seleniocisteina (SeCys) e seleniometionina (SeMet) causando alterazioni nella struttura delle proteine. Per aumentare la tolleranza di una pianta è possibile trasferire il gene per l'enzima seleniocisteina metiltransferasi (SMT) di *Astragalus bisulcatus* (una pianta con alta tolleranza), in piante con bassa tolleranza. La SMT metila la SeCys formando metilseleniocisteina, una molecola non usata per la formazione di proteine e non dannosa per la pianta [1].

OSSERVAZIONI CONCLUSIVE E PROSPETTIVE FUTURE

La malnutrizione è una sfida importante, in particolare nei paesi in via di sviluppo, dove le misure che sono all'ordine del giorno nei paesi sviluppati (dieta varia, regimi di fortificazione e integratori alimentari) sono in gran parte assenti. Strategie transgeniche di biofortificazione potrebbero contribuire ad alleviare la malnutrizione anche se si stanno facendo ulteriori lavori per individuare e manipolare le vie metaboliche dei principali micronutrienti, per migliorare il più possibile il grado di fortificazione nutrizionale. Anche altri nutrienti, oltre a quelli trattati, possono essere presi come obiettivo; ad esempio le vitamine B, minerali come magnesio e calcio. L'integrazione di più miglioramenti nutrizionali all'interno della stessa pianta d'élite, senza interrompere le sue vie metaboliche endogene, necessarie per la crescita della pianta (ad esempio la sintesi degli aminoacidi), è uno degli obiettivi per il futuro. Questo dovrebbe essere raggiunto

in modo tale da garantire l'espressione stabile del transgene, di generazione in generazione.

Ci sono poi anche problemi di regolamentazione e di "pubblica percezione" da superare, come l'attuale percezione negativa degli alimenti geneticamente modificati in alcune parti del mondo. Questa deve essere superata esclusivamente attraverso l'esposizione di ragioni scientifiche e indipendentemente da interessi socio-politici ed economici regionali. Ciò può essere fatto per esempio attraverso la supervisione di commissioni sponsorizzate da enti indipendenti ed imparziali.

Se pensiamo che una capsula di vitamina A giunge nei paesi più poveri ad un costo 10 volte superiore a quello di produzione, a causa della spesa di distribuzione e di logistica, è facile capire come gli aiuti alimentari portati dalle varie associazioni umanitarie, siano costosi e non sostenibili a lungo termine. Se venissero invece regolamentate e approvate colture transgeniche, con solo una parte dei finanziamenti attualmente devoluti, necessari per la ricerca e lo sviluppo della linea transgenica stabile, sarebbe possibile avere un aumento nella quantità di aiuti di 5-8 volte, con la possibilità anche di un auto-sostentamento [4].

L'obiettivo principale è che il rafforzamento nutrizionale delle colture venga messo a disposizione di coloro che ne hanno più necessità, senza vincoli di proprietà, intellettuali e licenze restrittive, che spesso nell'occidente sono in atto per fini commerciali. L'ingegneria genetica da sola non può eliminare la malnutrizione, ma può fornire un significativo contributo per approcci integrati, che comprendono la comune selezione vegetale, il miglioramento delle pratiche agricole, gli sforzi socio-economici per eliminare la povertà e migliorare il benessere delle persone più povere del mondo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] **Changfu Zhu, Shaista Naqvi, Sonia Gomez-Galera, Ana M. Pelacho, Teresa Capell and Paul Christou.** Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends in Plant Science*; 12:1360-1385. **2007**
- [2] **Mary Lou Cuerinot and Ying Yi.** Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiology*; 104:815-820. **1994**
- [3] **Fang-Jie Zhao and Steve P McGrath.** Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology*; 12:373–380. **2009**
- [4] **Jorge E Mayer, Wolfgang H Pfeiffer and Peter Beyer.** Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current Opinion in Plant Biology*; 11:166–170. **2008**
- [5] **Samir Bekaert, Sergei Storozhenko, Payam Mehrshahi, Malcolm J. Bennett, Willy Lambert, Jesse F. Gregory III, Karel Schubert, Jeroen Hugenholtz, Dominique Van Der Straeten and Andrew D. Hanson.** Folate biofortification in food plants. *Trends in Plant Science*; 13:28-35. **2008**
- [6] **Mackowiak CL, Grossl PR.** Iodate and iodide effects on iodine uptake and partitioning in rice grown in solution culture. *Plant and Soil*; 212:135-143. **1999**