



Università degli Studi di Napoli Federico II

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dottorato di ricerca in

**BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE
IN MEDICINA VETERINARIA**

XIX° CICLO 2003-2006

Tesi di dottorato

Destino ed effetti metabolici di DNA transgenico in conigli alimentati con soia geneticamente modificata

Candidato:
Dr. Vincenzo Mastellone

Docente guida:
**Ch.mo Prof.
Luigi Avallone**

Coordinatore:
Ch.mo Prof. Giuseppe Paino

Indice

Introduzione	2
Distribuzione mondiale delle colture GM	3
Manipolazione del DNA	5
Metodi diretti	5
Metodi indiretti	6
Piante transgeniche coltivate	9
Prima generazione	13
Seconda generazione	17
Il principio di equivalenza	22
Metodiche per l'identificazione di OGM	30
Destino del DNA	35
Stato dell'arte della ricerca	43
Scopo della ricerca	50
Metodiche e risultati	52
Discussione	83
Conclusioni	89
Bibliografia	91

Introduzione

Col termine O.G.M. (organismo geneticamente modificato) si intende: “Ogni organismo, diverso dall’uomo, il cui materiale genetico è stato alterato in modo diverso da quanto si verifica in natura con l’accoppiamento e/o la ricombinazione genica naturale” (Direttiva 2001/18/CE), ciò al fine di fargli acquisire nuove proprietà che saranno trasmissibili di generazione in generazione.

Da almeno 10.000 anni le piante coltivate vengono modificate mediante selezione di mutanti ed incroci intraspecifici ed interspecifici al fine di renderle sempre più adatte alle esigenze dell’uomo (Poli, 1997). Impiegando questi metodi tradizionali occorre circa 10-15 anni per ottenere un nuovo tipo di pianta; con l’avvento delle moderne biotecnologie che hanno reso possibile l’introduzione di geni distinti o gruppi di geni in diversi organismi, senza ricorrere ad incroci, questi tempi si sono ridotti di circa la metà.

Nonostante sin dall’antichità si impiegano processi biotecnologici per produrre alimenti come il pane, lo yoghurt, il vino ed i formaggi, sfruttando l’azione di alcuni microrganismi, l’impiego delle piante geneticamente modificate in campo alimentare ha sollevato notevoli perplessità sugli eventuali rischi per la salute del consumatore.

Tali malumori hanno comportato la necessità di regolamentare la produzione e la commercializzazione di alimenti G.M. e di definire metodi analitici per la ricerca degli stessi.

Distribuzione mondiale delle colture GM

Secondo il rapporto elaborato dall'ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) (James, 2004), l'area di coltivazione di piante GM è in continua espansione (20% in più rispetto all'anno precedente) e ha raggiunto la superficie totale di 81 milioni di ettari (figura 1).

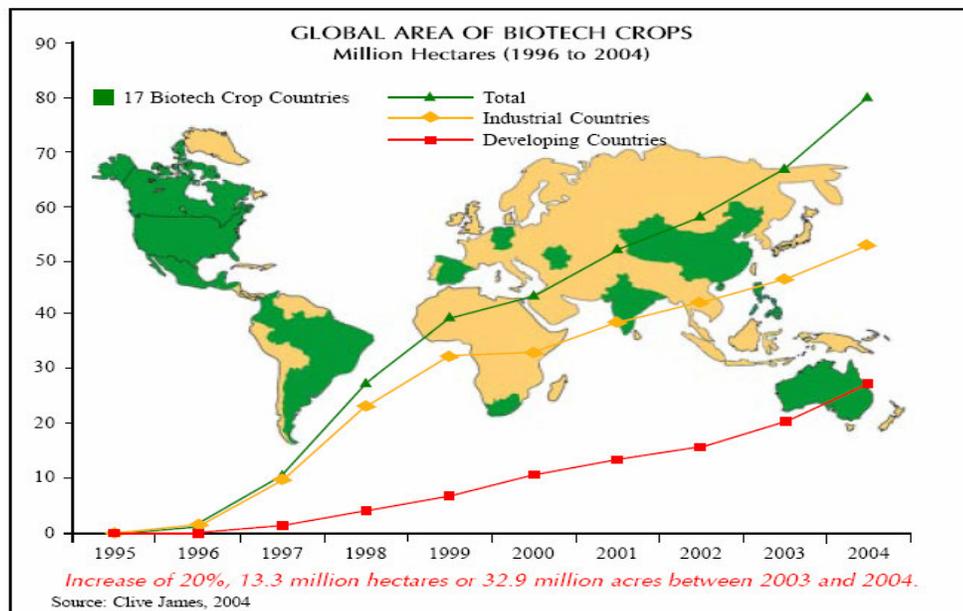


Figura 1. Superficie globale delle colture geneticamente modificate

In nove anni (dal 1996 al 2004) la superficie globale con colture GM è aumentata di 47 volte, con un incremento maggiore registrato soprattutto nei paesi in via di sviluppo (circa il 34%). Le specie vegetali GM maggiormente coltivate sono rappresentate dalla soia (48,4 milioni di ettari), dal mais (19,3 milioni di ettari), dal cotone (9 milioni di ettari) ed infine dalla colza (4,3 milioni di ettari).

La tolleranza ai diserbanti totali a base di glifosate o glufosinate ammonio è il carattere che contraddistingue gran parte delle attuali colture transgeniche. Varietà di soia, mais, colza o cotone che possiedono questa tolleranza sono state coltivate nel 2003 su 58,6 milioni di ettari, equivalenti al 72% della superficie transgenica globale. Le colture transgeniche con resistenza agli insetti sono state invece coltivate su 19,6 milioni di ettari (19% della superficie transgenica globale). Un crescente successo di mercato, infine, viene riscosso da varietà che cumulano i due caratteri transgenici (tolleranza ai diserbanti e resistenza agli insetti), presenti sia nel cotone che nel mais, che vengono attualmente coltivate su 6,8 milioni di ettari, equivalenti a circa il 9% della superficie transgenica globale.

Manipolazione del DNA

La tecnologia del DNA ricombinante ha sviluppato diversi strumenti e tecniche per dirigere la manipolazione genetica delle piante. I sistemi di introduzione del DNA e dei vettori di espressione per la trasformazione delle cellule vegetali, possono essere divisi in metodi “diretti”, che fanno uso soprattutto di protoplasti, ed “indiretti” (Figura 2).

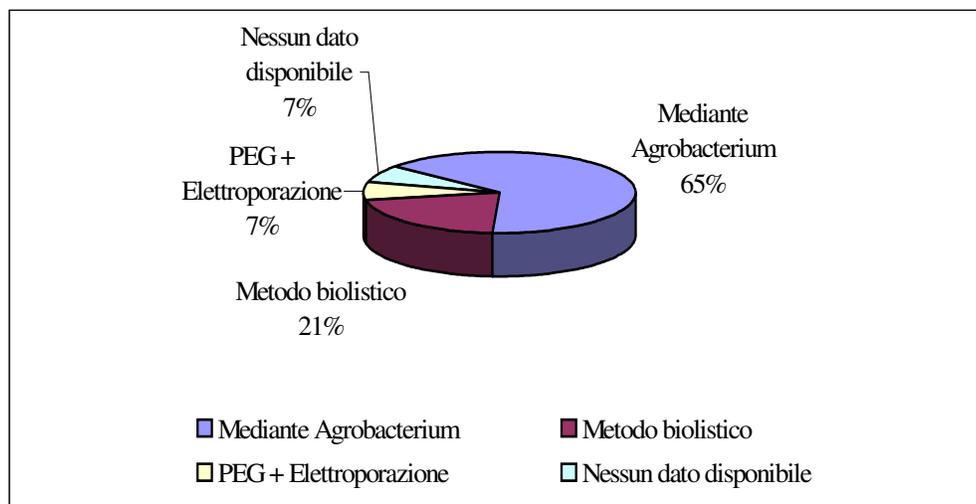


Figura 2. Metodi di trasformazione

Metodi diretti

- Elettroporazione: è un processo in cui impulsi elettrici ad elevata tensione inviati, per un breve periodo di tempo, nella membrana del protoplasto, producono pori attraverso i quali le molecole di DNA possono penetrare all'interno della cellula ed in questo modo integrarsi al suo genoma;

- Metodo PEG: questo sistema fa uso di un vettore chimico, il polietilenglicole (PEG), per trasportare il DNA estraneo nel protoplasto;
- Cannone a particelle di DNA (o tecnica biolistica): il DNA viene fatto precipitare con CaCl_2 , spermidina o polietilenglicole e precipitato su delle particelle sferiche di tungsteno o di oro. Le particelle così rivestite vengono sparate ad alta velocità con uno speciale dispositivo, detto “cannone da particelle”, che utilizza la polvere da sparo, l’aria compressa o l’elio per fornire la forza propulsiva. Grazie all’elevata velocità, i proiettili sono in grado di attraversare la parete e la membrana cellulare (Glick and Pasternak, 1999). La tecnica del bombardamento fu ideata nel 1984 ed i primi risultati positivi del suo impiego furono pubblicati da Klein *et al.* (1987) e Sanford *et al.* (1987).

Questa tecnica è utilizzata soprattutto per le piante monocotiledoni, nonostante siano in fase di elaborazione protocolli che consentono di trasformare il mais ed il riso mediante *A. tumefaciens* (Hiei, Komari and Kubo, 1997).

Metodi indiretti

Questi metodi prevedono l’impiego di vettori batterici o virali resi innocui e/o modificati precedentemente in laboratorio, in grado di infettare le piante. Questa tecnica è utilizzata soprattutto per le piante dicotiledoni.

Il vettore più largamente utilizzato è il plasmidio T_i di *Agrobacterium tumefaciens*. Quest’ultimo è un batterio tellurico gram-negativo in grado di trasformare geneticamente le piante mediante la

formazione di un tumore, detto “galla del colletto”, che interferisce con la normale crescita della pianta. L'*Agrobacterium tumefaciens* presenta, oltre al suo cromosoma, un mini-cromosoma circolare chiamato “plasmide induttore di tumore” (T_i), all'interno del quale è presente una regione specifica, detta T-DNA, che si integra nel genoma della pianta. Il T-DNA contiene sequenze che codificano la produzione di nutrienti batterici e la formazione del tumore; sono questi che vengono sostituiti con i geni di scelta della trasformazione genetica. Nel plasmidio T_i , in una regione esterna al T-DNA, vi sono i geni *vir* che regolano il trasferimento del T-DNA, producendo proteine trans-regolatrici essenziali per la trasformazione della cellula vegetale (Galun and Breiman, 1997). Esistono ulteriori geni, presenti nel cromosoma del batterio, responsabili del legame della cellula batterica alla cellula vegetale. Negli stadi iniziali di questa trasformazione, dopo aver risposto ai segnali chimici provenienti dalla superficie di una ferita posta di solito alla base del gambo della pianta, il plasmide T_i viene trasferito dal batterio alle cellule della pianta.

È importante che tutti i vettori creati a partire dal plasmidio T_i contengano particolari sequenze:

- un gene marcatore selezionabile, costituito da un proprio promotore, un terminatore ed una sequenza di poliadenilazione, in modo tale da assicurare un'espressione efficiente nelle cellule vegetali trasformate;
- un'origine di replicazione batterica del DNA;

- la sequenza al confine destro e molto spesso anche quella al confine sinistro della regione T-DNA, affinché quest'ultimo si possa integrare nel genoma della cellula ospite;
- un elemento multiplo di collegamento (*polylinker*) per facilitare l'integrazione del gene clonato nella regione tra le sequenze di confine del T-DNA.

Poiché in questi vettori di clonazione (plasmidio T_i "disarmato") non sono presenti i geni *vir*, non può avvenire il trasferimento e l'integrazione della regione T-DNA nelle cellule vegetali riceventi: per questo motivo si utilizzano i plasmidi helper (Glick and Pasternak, 1999).

Due plasmidi separati, uno contenente il gene target vicino al T-DNA disarmato, l'altro contenente i geni *vir*, vengono usati insieme. Il preciso meccanismo di integrazione del T-DNA nel DNA della cellula ospite non è ancora conosciuto (De la Riva *et al.*, 1998).

Piante transgeniche

La struttura del frammento esogeno (o costrutto genico), utilizzato per l'ottenimento di piante G.M., comprende il gene strutturale, responsabile delle nuove caratteristiche agronomiche, e delle sequenze regolatrici della sua espressione, oltre che geni marker che indicano l'avvenuta modificazione genica. Le sequenze di regolazione genica (promotore e terminatore) vengono unite al gene da inserire al fine di ottenere una corretta espressione (Figura 3).



Figura 3. Costrutto genico

1. Geni marker

I geni marker sono usati per identificare e/o selezionare specifici organismi, la loro progenie o una parte di una popolazione cellulare tra migliaia di cellule presenti in un medium di coltura. Attraverso il legame fisico del gene di interesse al gene marker, è possibile riconoscere e isolare l'organismo trasformato (van den Eede *et al.*, 2004).

L'uso del gene marker è una pratica comunemente usata in microbiologia da molti anni. Questo concetto è stato esteso, poi, anche all'ingegneria genetica applicata alle piante. Oltre ai geni per la resistenza all'antibiotico, possono essere usati, per la selezione delle cellule vegetali trasformate, i geni per la tolleranza ad erbicidi, i geni che codificano per tratti metabolici e, infine, i geni reporter.

I geni per la resistenza all'antibiotico usati come marker per le piante geneticamente modificate sollevano diverse preoccupazioni nel consumatore, in particolare per l'eventuale trasferimento genico orizzontale di questi geni dal materiale vegetale GM ai microrganismi presenti nella microflora del tratto digerente, che indurrebbe in questi ultimi un aumento del livello di resistenza verso tali antibiotici. Ciò potrebbe rappresentare un rischio per la salute umana ed animale, in quanto comprometterebbe il valore terapeutico degli antibiotici nel trattamento di determinate patologie. Questa preoccupazione è alimentata anche dal fatto che l'uso intenso di antibiotici in medicina umana e veterinaria (in questo ultimo caso anche come promotori di crescita) ha già determinato un aumento dell'antibiotico resistenza nella popolazione microbica (van den Eede *et al.*, 2004).

2. Promotori

Molti costrutti presenti nelle piante transgeniche attualmente autorizzate per la coltivazione e commercializzazione sono regolati dal promotore 35S costitutivo, cioè continuamente attivo in tutti i tessuti della pianta, proveniente dal virus del mosaico del cavolfiore (CMV) o dai derivati di questo promotore. Frequentemente presente in OGM vegetali è il promotore del gene che codifica per l'enzima nopalina sintasi di *Agrobacterium tumefaciens* (P-nos); altri derivano da varianti del promotore della ribulosio-1,5-bisfosfato carbossilasi. Ampiamente utilizzato è il P-TA29, promotore tessuto e sviluppo specifico isolato dalla pianta del tabacco (Kleter *et al.*, 2000) (figura 4).

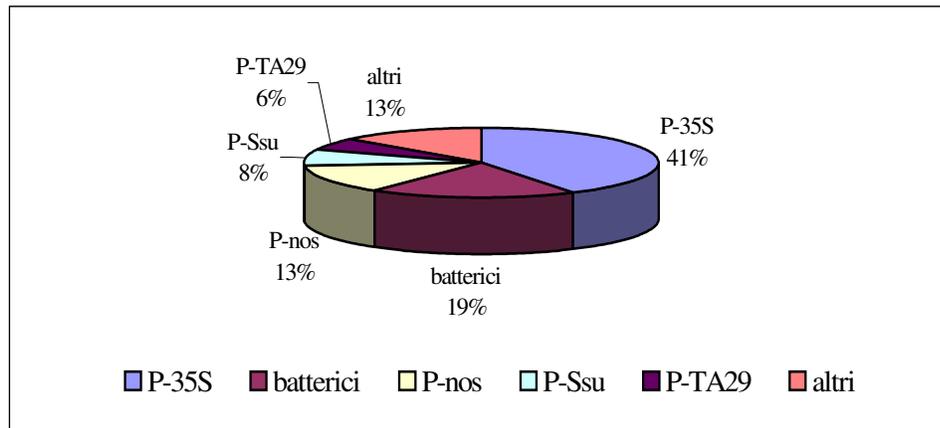


Figura 4. Principali promotori presenti nelle piante transgeniche

3. Terminatori

Il principale terminatore, utilizzato per porre fine alla trascrizione del transgene, è il *nos 3'*, isolato dall'operone che controlla la sintesi dell'enzima nopalina sintasi proveniente dall'*Agrobacterium tumefaciens*. Altri terminatori impiegati sono: quello del virus del mosaico del cavolfiore (T-35S) ed i suoi derivati; il terminatore E9 3' derivato dalla pianta del pisello; i terminatori ocs 3', Tr7 3' e tml 3', anch'essi provenienti dall'*A. tumefaciens* (Kleter, 2000) (figura 5).

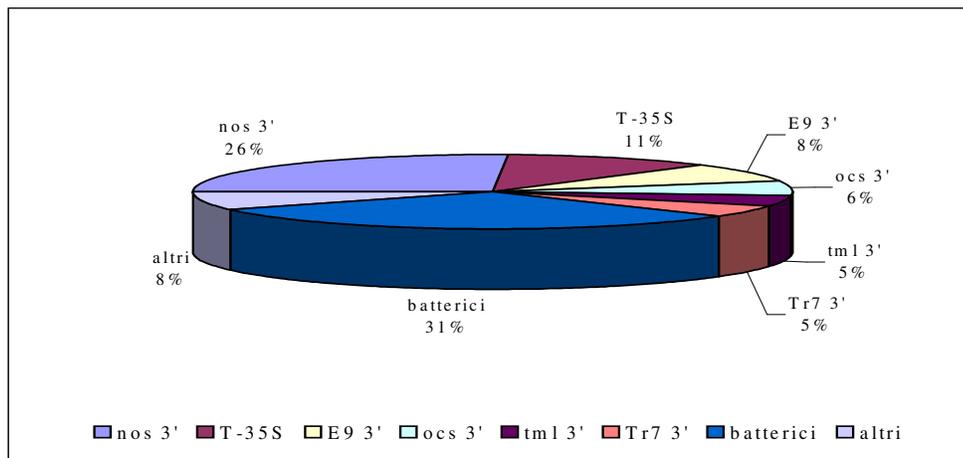


Figura 5. Principali terminatori presenti nelle piante transgeniche

4. Geni strutturali

Diversi sono i geni strutturali (tabella 1) responsabili del conferimento alla pianta trasformata di caratteristiche agronomiche utili. Sono più di 40 i geni che sono stati usati per la produzione di piante transgeniche attualmente autorizzate.

Alcuni di questi geni, come *accd*, *accS*, *sam-K* e geni che codificano per proteine leganti il virus sono presenti in un singolo prodotto ingegnerizzato geneticamente. Al contrario, altri geni si trovano in diversi eventi, quali le varianti del gene dell'endotossina Bt, proveniente dal *Bacillus thuringiensis* che conferisce resistenza ad insetti, o del gene *bar*, originariamente isolato dallo *Streptomyces hygroscopicus*; le varianti del gene *CP4 EPSPS* (5' enolpiruvilscikimate-3'-P sintetasi) che conferiscono resistenza ad erbicidi, provenienti dall'*Agrobacterium tumefaciens* ceppo CP4; il gene per la poligalatturonasi, il cui antisenso è stato utilizzato per inibire la marcescenza delle bacche di pomodoro, attraverso il blocco della degradazione della pectina (Kleter *et al.*, 2000).

Tabella 1. Alcuni esempi di geni strutturali ed il tratto espresso

Gene strutturale	Tratto espresso
cry1Ab; cry1Ac; cry 9c; cry 3A; cry1F	Resistenza agli insetti
Fosfinotricina-N-acetiltransferasi	Resistenza all'erbicida glufosinate
5'-enolpiruvilscikimate-3'-P sintetasi (EPSPS)	Tolleranza all'erbicida glifosate
Barnase ribonucleasi	Maschio sterilità
Variante dell'acetolattato sintetasi	Tolleranza all'erbicida sulfonil-urea
Delta-12 desaturasi	Semi con modificato profilo degli ac. grassi
Proteine del capsido; elicasi/replicasi	Resistenza a virus

Le biotecnologie applicate al miglioramento genetico delle piante di interesse agrario hanno immesso sul mercato mondiale i primi genotipi vegetali transgenici, essenzialmente piante “commodities”, quali mais, soia e colza, trasformate per incrementarne la resistenza a patogeni ed erbicidi.

A questi transgeni di prima generazione stanno facendo seguito nuovi eventi di trasformazione che coinvolgono un ampio range di specie vegetali modificate per innumerevoli caratteristiche di valore agronomico, qualitativo, industriale e farmacologico.

Piante transgeniche di prima generazione

a) Resistenza al glifosate

Il glifosate è un erbicida non selettivo che agisce per assorbimento attraverso le parti verdi della pianta inibendo un enzima, il 5-enolpiruvato-3-fosfoscichimato acido sintasi (EPSPS), coinvolto nella biosintesi degli aminoacidi aromatici, di alcune vitamine e di altri metaboliti secondari della pianta. Il glifosate interferisce quindi con la sintesi proteica. L'EPSPS è presente nelle piante superiori, nei batteri e nei funghi, ma non negli animali, che assumono gli aminoacidi aromatici attraverso l'alimentazione. Questo spiega la non tossicità del glifosate nei confronti dell'uomo e degli animali da allevamento, che sono privi del bersaglio biologico della molecola.

Per ottenere piante resistenti al glifosate si introducono geni codificanti per gli enzimi EPSPS, con affinità ridotta per il glifosate, o geni codificanti per enzimi che degradano il glifosate (Kleter *et al.*, 2000).

Oggi nei raccolti resistenti al glifosate, sono presenti da soli o in combinazione:

- un gene EPSPS praticamente insensibile al glifosate, isolato dall'*Agrobacterium* sp., ceppo CP4;
- un gene LBAA che codifica per l'enzima glifosate ossidoreduttasi (GOX), isolato da un microrganismo del suolo (*Achromobacter*). Questo enzima catalizza la conversione del glifosate ad aminofosfogluconico (AMPA) e glioxilate, che viene in tal modo inattivato.

b) Resistenza al glufosinate

Il glufosinate ammonio è una miscela stereo-isomerica prodotta industrialmente dai sali di ammonio di l- e d- fosfinotricina (PPT). Solo l'isomero-l presenta attività erbicida. Il glufosinate inibisce l'enzima glutammina sintasi (GS), provocando l'accumulo di ammoniaca nei tessuti della pianta (Kleter et al., 2000).

Nei raccolti modificati sono inseriti i geni *pat* o *bar* che derivano dai produttori microbici (*Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces hygroscopicus*, rispettivamente) di bialophos (un tripeptide metabolizzato da PPT) e PPT; questi geni codificano per un enzima detto fosfinotricina – acetil – trasferasi (PAT), che protegge il microrganismo contro l'azione tossica di PPT. L'enzima PAT, estremamente specifico con affinità molto bassa per i substrati oltre che per il glufosinate, catalizza l'acetilazione dell'l-fosfinotricina nella forma non attiva, N-acetil-glufosinate (Vinnemeier et al., 1995).

c) Resistenza ad altri erbicidi

Piante d'interesse zootecnico sono state trasformate con lo scopo di renderle resistenti a erbicidi biodegradabili o selettivi. Ad esempio varietà di soia sono state rese resistenti alla classe di erbicidi sulfonilurea ed il mais alla classe di erbicidi imidazolinone. Entrambe le classi di erbicidi inibiscono lo stesso step di enzimi nella sintesi di aminoacidi a catena ramificata (Day, 1996).

Inoltre il mais può essere ingegnerizzato per la resistenza al setoxydim, un erbicida letale per le graminacee. Dall'analisi molecolare della *Potentilla anserina* (piè di gallo) resistente, fu scoperto un gene mutante per l' α -tubulina. Il mutante resistente compare dopo l'uso prolungato dell'erbicida dinitroanilina (come trifluralin e oryzalin). L'introduzione nelle cellule di mais di tale gene conferisce resistenza *in vitro*, ma nessuna pianta è stata ancora rigenerata (Anthony *et al.*, 1998).

d) Resistenza agli insetti

Secondo alcuni autori, nonostante l'impiego degli insetticidi, almeno il 13% della produzione agricola mondiale viene danneggiata irrimediabilmente dalle infestazioni di insetti prima e dopo la mietitura (Gatehouse A.M.R and Gatehouse J.A., 1998); altri autori riportano perdite che vanno dal 20 al 30% della produzione totale (Estruch *et al.*, 1997).

La produzione biotecnologica di piante resistenti agli insetti risulta quindi particolarmente importante anche perché gli insetticidi non sono selettivi ed agiscono anche sugli insetti utili al biosistema. Inoltre, la maggior parte degli insetticidi presenta notevole impatto ambientale, con effetti nocivi su piante, animali ed uomo.

La creazione di una resistenza intrinseca riduce la necessità di utilizzare gli insetticidi, che oltre a problemi di tipo ambientale ed economico, possono comportare lo sviluppo di individui resistenti.

La tecnica del DNA ricombinante ha consentito di produrre piante transgeniche resistenti all'attacco degli insetti mediante l'inserimento di un gene del batterio *Bacillus thuringiensis*, che comprende una serie di ceppi e che codifica per una proteina insetticida cristallina, detta *Bt* o *Cry*, contenuta nei corpi parasporali del batterio. Ogni ceppo batterico produce una tossina differente che ha lo scopo di uccidere insetti specifici: ad esempio, il *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* è tossico per le larve dei lepidotteri, quali tarme e farfalle; il *B. thuringiensis* subsp. *Israelensis* uccide i ditteri; il *B. thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* agisce sui coleotteri.

L'attività insetticida della tossina è contenuta entro una struttura, detta cristallo parasporale, sintetizzata nel corso della sporulazione batterica. Solitamente il cristallo parasporale non contiene la forma attiva dell'insetticida, ma, una volta solubilizzato il cristallo, la proteina viene messa in libertà come protossina non attiva. Se l'insetto bersaglio ingerisce un cristallo parasporale, l'azione combinata del pH intestinale (7,5 - 8,0) con una specifica proteasi digestiva attiva la protossina (Glick and Pasternak, 1999). Nella sua forma attiva la tossina si inserisce nella membrana dell'epitelio intestinale dell'insetto, creando un canale ionico attraverso il quale si perde l'ATP cellulare; in poco tempo cessa il metabolismo cellulare, l'insetto non si alimenta e muore.

Le tossine insetticide dei migliaia di ceppi di *B. thuringiensis* esistenti ed isolati si possono suddividere in base all'attività

insetticida in quattro classi principali: CryI, CryII, CryIII e CryIV. Queste proteine, a loro volta, si organizzano in sottoclassi (A, B, C...) e sottogruppi (a, b, c...) in base alla sequenza di DNA del gene della tossina (Glick and Pasternak, 1999).

Piante transgeniche di seconda generazione

Numerosi nuovi geni sono stati proposti per l'ottenimento di piante G.M. trasformate per il miglioramento di caratteristiche agronomiche e qualitative.

a) Proteine insetticide batteriche

Altri geni di resistenza agli insetti sono stati isolati da microrganismi ed introdotti in piante, tra questi il gene colesterolo - ossidasi da *Streptomyces fungus* (Kleter *et al.*, 2000). Questo gene catalizza l'ossidazione dei 3-idrossisteroidi a chetosteroidi e perossido di idrogeno; bassi livelli di questo enzima nella pianta inducono un elevato livello di attività insetticida sui coleotteri nocivi del cotone (Glick and Pasternak, 1999).

Diversi ceppi di *Bacillus Cereus* e *Thuringiensis* producono proteine insetticide Vip. La proteina Vip 3A, prodotta dal *B. thuringiensis*, non presenta alcuna omologia con la proteina tossica *Bt* ed è attiva contro un ampio spettro di lepidotteri, legandosi a specifici recettori presenti nell'intestino dell'insetto bersaglio e causando lisi dell'epitelio intestinale (Estruch *et al.*, 1997).

b) Inibitori enzimatici

L'accumulo di proteine tossiche nei semi od organi vegetativi di deposito è uno dei meccanismi grazie ai quali le piante si proteggono contro gli erbivori. Esempi di proteine tossiche sono quelle che inattivano i ribosomi, le proteine antifungine, gli inibitori delle proteasi e delle amilasi, e le proteine leganti i carboidrati (Kleter *et al.*, 2000).

Gli inibitori delle proteasi sono naturalmente presenti nei legumi e nei cereali e sono indotti dall'attacco degli insetti. Esistono 4 classi di enzimi proteolitici: serina -, cisterna -, aspartico - e metallo - proteinasi; la maggior parte degli inibitori agisce sulle proteasi a serina (Franck Oberaspach and Keller, 1997). Il meccanismo di azione non è ancora ben conosciuto. L'inibizione degli enzimi digestivi nel tratto alimentare degli insetti non è il principale effetto avverso; infatti la maggior parte dei segni tossici osservati sono causati dalla delezione di aminoacidi essenziali, dovuta alla sub-secrezione degli enzimi digestivi in presenza di inibitori, ma esistono anche altri organi bersagli (Schuler *et al.*, 1998). Il trasferimento di tali geni a piante sprovviste, offre la possibilità di innalzarne i livelli di resistenza agli insetti.

c) Resistenza a parassiti e patogeni

Le malattie delle piante dovute a microrganismi e virus possono causare sostanziali danni economici ai raccolti, oltre ad essere pericolose per la potenziale produzione di micotossine.

Le pareti cellulari di patogeni fungini sono spesso sensibili all'azione di enzimi idrolitici quali chitinasi e β -glucanasi. In genotipi vegetali modificati sono stati inseriti i geni della chitinasi, in modo da

aumentare la tolleranza o la resistenza verso i funghi. Ciò può ottenersi anche introducendo altri geni che codificano per la β -glucanasi e per le proteine che inattivano i ribosomi (Schickler and Chet, 1997). Esistono, infatti, le proteine RIP (Ribosomal inhibitor protein) capaci di inattivare selettivamente i ribosomi dei funghi, permettendo così di inibire la sintesi delle proteine fungine. Un esempio è dato dalla trasformazione del tabacco con i geni RIP derivanti dall'orzo e dal mais, che conferiscono la resistenza contro l'infezione da *Rhizoctonia solani* (Jach *et al.*, 1995; Maddaloni *et al.*, 1997).

Geni di avirulenza fungini possono interagire con geni specifici presenti nelle piante ospiti. Il gene *avr9* di *Cladosporium fulvum*, ad esempio, interagisce con il gene *cf9* del pomodoro, inducendo una reazione di ipersensibilità, caratterizzata dall'attivazione del processo ossidativo e di proteine chinasi (Piedras *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999).

Una reazione simile può essere indotta anche da geni batterici di avirulenza. Ad esempio, l'interazione del gene *avrPto* prodotto da *Pseudomonas syringae* con il gene *Pto* prodotto dal pomodoro è in grado di indurre una reazione ossidativa (Chandra *et al.*, 1996).

d) Tolleranza agli stress ambientali

La produttività agricola è grandemente influenzata da fattori ambientali quali siccità, salinità, alte e basse temperature. Sono in corso numerosi studi per la produzione di piante transgeniche resistenti ai diversi stress ambientali, tuttavia, data la complessità

del problema, nessuna varietà trasformata è ancora stata proposta per la commercializzazione (Kleter *et al.*, 2000).

- Salinità e siccità

La tolleranza al sale ed alla siccità coinvolge numerosi geni che interagiscono tra loro in modo complesso. Sono state ottenute piante transgeniche ad aumentata tolleranza verso la siccità grazie ad un aumento nel contenuto cellulare di osmoliti (Bohnert and Jensen, 1996, **a**; Bohnert and Jensen, 1996, **b**; Holmberg *et al.*, 1998). Un esempio è dato dalle piante di pomodoro trasformate per l'accumulo di carboidrati come mannitolo e trealosio, che mostrano maggiore resistenza allo stress da sale e da siccità (Karakas *et al.*, 1996; Pilon *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1999).

- Congelamento

Il primo esempio di prevenzione del danno da congelamento si è avuto nel 1987, quando batteri *ice-minus* modificati geneticamente sono stati utilizzati per il trattamento di piante di fragola (Roller *et al.*, 1998).

Più recentemente, proteine anti-freezing derivanti da pesci artici sono state introdotte in diverse specie vegetali, tra cui fragola, tabacco e patata. Queste proteine inibiscono la crescita di cristalli di ghiaccio, che sono i principali responsabili del danno alle strutture cellulari. Le foglie derivanti dalle piante di patata transgeniche sembrano più resistenti alle temperature di congelamento (- 4°C), in quanto in simili condizioni mostrano diminuzione della perdita di elettroliti (Wallis *et al.*, 1997).

- Miglioramento qualitativo
Mediante le biotecnologie vegetali si sono ottenuti miglioramenti qualitativi di diversi prodotti alimentari, sia attraverso un'azione sui macro che sui micronutrienti.

Il principio di equivalenza

Per immettere un prodotto transgenico sul mercato questo deve subire una valutazione di sicurezza basata innanzitutto sul principio di sostanziale equivalenza.

Secondo questo principio, enunciato per la prima volta nel 1992 dalla FAO/WHO e successivamente sviluppato dall'OECD (OECD, 1993), le valutazioni inerenti la sicurezza d'uso dei prodotti alimentari derivanti dall'applicazione delle tecniche del DNA ricombinante devono essere effettuate, laddove possibile, prendendo come base per il confronto, la controparte tradizionale.

In generale, i potenziali rischi per la salute umana ed animale derivanti da prodotti GM sono riconducibili sia agli effetti intenzionali insiti nella modificazione genetica indotta, cioè al tratto o all'espressione intenzionalmente introdotta (gene d'interesse e gene marker), sia agli effetti non intenzionali, cioè ad effetti non previsti quali quello pleiotropico, gli eventi di mutagenesi inserzionale o gli effetti secondari sul metabolismo della pianta (Miraglia *et al.*, 1997).

La valutazione degli alimenti transgenici richiede un approccio "integrato", "a stadi" e "variabile da caso a caso".

Il rapporto FAO/WHO del 1996 (The Royal Society, 2002), che precedeva interpretazioni e cautele più recenti, specificava con cura e logica i livelli delle prove di equivalenza sostanziale. Il primo livello riguardava i prodotti derivati da OGM ma che non contengono proteine GM (es. olio di soia o di mais GM modificati per caratteri agronomici). L'equivalenza è, in questo caso, di facile verifica. Un secondo livello considerava differenze tra OGM e varietà

convenzionali per pochi e ben definiti caratteri. I controlli dovevano considerare i componenti del prodotto che si suppone siano cambiati ed essere condotti con analisi ben specificate. Nel caso di non equivalenza sostanziale era prevista un'ulteriore valutazione di sicurezza particolareggiata e approfondita.

Sull'equivalenza sostanziale la direttiva europea (Direttiva del Parlamento europeo, 2001/18/EC) riporta dettagli precisi sul tipo di prove da effettuare che riguardano: composizione chimica, valore nutritivo, allergenicità e tossicità. A queste, nel caso di sospettata non equivalenza, sono da aggiungere valutazioni tossicologiche e di alimentazione animale.

A tale scopo, in Europa la valutazione della sicurezza degli alimenti GM è regolata dalla Direttiva Novel Food 258/97 (Regolamento CE 258/97), che introduce un procedimento di quattro passaggi:

- caratterizzazione molecolare dell'inserito genico e del suo prodotto;
- valutazione delle caratteristiche fenotipiche (analisi morfologica e comportamentale in campo) e della composizione chimica;
- indagini sul potenziale allergenico
- indagini sui problemi tossicologici specifici.

La caratterizzazione molecolare comprende essenzialmente la valutazione dell'origine del DNA inserito, i dati relativi alla sua sequenza, ma anche altre informazioni di base, quali le metodiche usate per effettuare la modificazione genetica stessa. Infatti, mentre la molecola di DNA in sé non presenta alcun problema di carattere tossicologico, è di fondamentale importanza la comprensione del livello e del meccanismo d'espressione. Per tale motivo, gli effetti

indotti in un OGM dalla presenza di un transgene e del suo prodotto sono valutati inversamente a seconda che: il prodotto sia o non sia noto in relazione al suo uso come alimento; il transgene inibisca l'espressione di uno dei geni della pianta; il transgene sia coinvolto in una via metabolica o ne induca una nuova (Accademie Nazionali dei Licei e delle Scienze, 2003).

La ricerca degli effetti indotti, ma non prevedibili in base alla natura del transgene, contemplata dalla normativa europea, si rifà a una valutazione di equivalenza sostanziale degli OGM con varietà convenzionali. Le analisi suggerite riguardano componenti tossicologiche note per essere presenti nei prodotti vegetali, nonché i costituenti nutrizionali primari e non primari.

Il Nordic Council of Ministers (Nordic Council of Ministers, 1998) ha stilato un lungo elenco di composti chimici contenuti nei semi di mais, soia, cotone e colza, da analizzare nei confronti OGM vs convenzionale. Per i diversi prodotti GM già ammessi al mercato europeo, le valutazioni di equivalenza sostanziale riguardano diversi parametri nutrizionali. L'assenza di equivalenza genera la richiesta di analisi più specifiche, o la necessità di valutazioni tossicologiche protratte nel tempo (Custers, 2001).

Inoltre è necessaria una maggiore attenzione per alcune differenze tra l'alimento GM e la sua controparte tradizionale derivanti dalla modificazione genetica stessa; in questo caso sono valutate le caratteristiche del prodotto di espressione, quali: la tradizione di sicurezza d'uso; la struttura e la funzione; la mancanza di omologia con altre proteine riconosciute come tossiche o allergeniche, mediante confronto con banche dati.

Per quanto riguarda le proteine, devono essere valutati gli aspetti relativi al loro potenziale tossico ed allergenico. Occorre accertare quale sia il livello della proteina transgenica nella pianta GM e se essa è in grado di entrare o entra normalmente in contatto con l'intestino umano, perché presente negli alimenti convenzionali (Fisvell *et al.*, 1992; Toth, 1995; Schuler *et al.*, 1998).

Quindi, indipendentemente dalla loro storia d'uso sicuro in Europa i saggi tossicologici sono applicati su tutti i prodotti GM approvati per il mercato. Nel caso di transgeni senza omologia di sequenza con geni codificanti prodotti tossici o allergeni, come per il gene che conferisce la resistenza all'erbicida glifosate o per la sterilità maschile, i saggi tossicologici sono in ogni caso previsti (Custers, 2001). Se è accertato che un gene partecipa ad una via metabolica, la pianta seguirà standard di controllo tossicologici molto accurati; in caso contrario, ad esempio, per la *6-desaturasi* che aumenta la frazione di acido oleico nella soia o per la *tioesterasi* nella colza che stimola la produzione di acidi grassi a catena corta sono previsti standard meno severi (Kinney *et al.*, 1996; Dehash *et al.*, 1996).

L'ipersensibilità alimentare mediata dal sistema immunitario deriva da una normale reazione immunitaria. Le immunoglobuline IgE, che si formano con l'esposizione ripetuta all'allergene, stimolano il rilascio di mediatori tossici (istamine) che inducono la reazione allergica (Custers, 2001). Gli allergeni alimentari sono glicoproteine con un peso molecolare compreso tra i 10.000 ed i 40.000 dalton, di solito sono resistenti all'attacco acido, al trattamento a caldo e alla digestione (Taylor, 1992; Astwood *et al.*, 1996). Delle centinaia di

migliaia di proteine vegetali, solo poche centinaia sono allergeniche; le possibilità di crearne di nuove con la transgenesi sono quindi molto ridotte. La constatazione che le proteine GM rappresentano meno dello 0,4% del totale degli alimenti ingeriti – valori insufficienti per generare la reazione allergica (Astwood *et al.*, 1996; Metcalf *et al.*, 1996) – è stata comunque considerata non sufficiente per garantire la sicurezza (Taylor *et al.*, 1996). Per tale motivo gli OGM vanno valutati nella loro potenzialità allergenica (The Royal Society of Canada, 2001), in particolare quando il prodotto GM è usato in alimenti diversi, aumentando così l'esposizione del consumatore.

L'OECD ha adottato un procedimento, rivisto anche dallo FAO (FAO/WHO, 2000; 2001), di valutazione dell'allergenicità, che contempla una serie di passaggi successivi (Astwood *et al.*, 1996; Metcalf *et al.*, 1996), in modo da acquisire ulteriori informazioni sulla nuova proteina (Custers, 2001). Se il gene deriva da piante alimentari, in cui viene normalmente espresso senza dare origine ad allergia, il saggio può valutare la sola esposizione continuata al prodotto. Se la proteina ha una sequenza omologa a quella di un allergene (presenza di sei o più aminoacidi contigui identici; oppure un'omologia del 35% dell'intera proteina), essa deve essere valutata con l'uso di sieri specifici, fino, eventualmente, all'utilizzazione di saggi *in vivo*. Il potenziale allergenico di una proteina di cui non si ha notizia di allergenicità viene stabilito con prove *in vitro* (The Royal Society of Canada, 2001) e *in vivo* (quando sono disponibili soggetti umani volontari). Se la proteina è di origine batterica (Atkinson *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Knippels *et al.*, 1999) viene sottoposta a saggi di digestione e di resistenza alla denaturazione,

ma anche a prove *in vivo* (su soggetti umani volontari o in animali modello). Per quanto riguarda la soia GM con tolleranza al glifosate sono stati eseguiti test di valutazione di allergenicità dell'enzima 5'-enolpiruvil-scikimate-3'fosfato sintetasi, presente nella pianta transgenica e capace di conferire alla pianta stessa resistenza all'erbicida. Al termine della valutazione, l'enzima GM non ha presentato omologia con altri allergeni noti ed è risultato facilmente degradabile, privo di siti di glicosilazione comuni con allergeni noti, non glicosilabile nella pianta e instabile al calore (Padgett *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1996). Diverse indagini sono state effettuate al fine di valutare la sicurezza delle piante modificate geneticamente prima della loro autorizzazione. Tutti sono arrivati alla conclusione che non vi è alcuna differenza significativa tra le piante modificate geneticamente e le loro controparti convenzionali, come mais e soia (Aumatric *et al.*, 2004). In tabella 2 è riportata l'analisi chimica del mais GM (sia resistente agli insetti, Bt176 che quello resistente al glifosate, GA21) e della sua controparte isogenica. Non sono state osservate differenze tra le piante coltivate nello stesso anno, mentre differenze associate all'anno, alle condizioni climatiche o al suolo si possono osservare tra i diversi anni analizzati (Sidhu *et al.*, 2000; Barrière *et al.*, 2001).

Tabella 2. Composizione chimica del mais GA21 e del mais Bt 176

Anno	1996 (a)		1997 (a)		1998 (b)	
	C	GA21	C	GA21	C	Bt 176
Proteine, % s.s	10.05	10.05	10.54	11.05	9.3	9.5
NDF, % s.s.	11.7	10.8	9.8	9.3	-	-
Lisina, % aa	3.09	3.02	3.02	3.11	2.9	2.9

C18:2, % A.G.	58.7	58.6	61.5	61.4	57.4	57.3
(a) <i>Sidhu et al. (2000)</i> ; (b) <i>Barrière et al. (2001)</i>						

Fearing *et al.* (1997), inoltre, analizzarono i livelli di proteina insetticida, *cry1A(b)*, espressa nel mais resistente al lepidottero *Ostrinia nubilalis*. Essi trovarono che la quantità di proteina nella granella era di 8 ng per grammo di prodotto fresco mentre nelle foglie era > 1 mg per kg di prodotto fresco. Gli autori osservarono che questa quantità non poteva modificare in modo significativo la composizione chimica della pianta.

In tabella 3 è riportata l'analisi chimica della soia convenzionale e transgenica (RR). La soia resistente all'erbicida glifosate (Roundup Ready) è risultata sostanzialmente equivalente alla sua controparte convenzionale (Cromwell *et al.*, 2001).

Tabella 3. Composizione chimica (% sostanza secca) della soia RoundUp Ready (RR) e della sua controparte convenzionale (C)

Composizione	C	RR
Sostanza secca	90.3	91
PG	51.5	51.2
NDF	4.95	4.85
Lisina	3.16	3.09
Meth+Cistina	1.47	1.51

PG: proteine grezze; NDF: fibra neutro deterosa.

Il recente contendere sul significato e sull'uso dell'equivalenza sostanziale deriva dal fatto che la sua interpretazione può essere considerata come prova di sicurezza dell'OGM o, alternativamente, come omissione della valutazione di rischio ambientale e alimentare.

Questo tipo di valutazione non esclude la possibilità di eventuali rischi per l'uomo e per l'ambiente dovuti all'utilizzo di OGM e, mentre per alcuni paesi (quali Stati Uniti, Canada e Argentina) sono state considerate più che sufficienti, i Governi dei Paesi appartenenti alla Comunità Europea hanno mantenuto un atteggiamento più sostenuto, attuando le proprie scelte in base al "Principio di Precauzione". Esso implica la responsabilità delle autorità preposte di dare regole e di attuare tutte le possibili strategie per prevenire il rischio di danni gravi ed irreversibili alla specie umana, animale ed all'ambiente, qualora i dati scientifici disponibili non siano sufficienti per fare una valutazione completa del rischio (Accademie Nazionali dei Licei e delle Scienze, 2003).

Le raccomandazioni che riguardano l'applicabilità del principio di precauzione fanno riferimento, in generale, alla necessità di richiedere al proponente prove scientifiche positive di sicurezza per tutti gli OGM. Concorrono a questo scopo i recenti sviluppi della biologia molecolare: metodi di genomica, proteomica e metabolomica consentono di dare risposte precise dei cambiamenti presenti in un organismo GM rispetto ad uno convenzionale.

Metodiche per l'identificazione di OGM

La necessità di rispondere alla normativa comunitaria in materia OGM ha fatto sorgere la necessità di creare metodi di analisi in grado di discriminare tra campioni contenenti OGM rispetto a quelli "OGM-free".

La ricerca degli OGM negli alimenti viene eseguita attraverso la rilevazione delle sequenze nucleotidiche esogene (transgeniche) mediante la PCR (Reazione a Catena della Polimerasi).

PCR end-point

La ricerca mediante PCR prevede una prima fase di estrazione del contenuto genico (DNA) dall'alimento attraverso l'azione di sostanze detergenti che lisano le cellule vegetali e tutte le loro membrane. Il DNA estratto viene successivamente liberato dalle proteine, dai carboidrati e dai lipidi mediante solventi organici. A questo punto può essere sottoposto a PCR attraverso l'uso di specifici primers (oligonucleotidi sintetici) complementari a tratti del transgene inserito nel vegetale. I primers dovrebbero avere una lunghezza media vicina alle 20 paia di basi (Berry e Peter, 1984); infatti, primers troppo corti sono poco specifici, in quanto hanno alte probabilità di trovare diverse zone di complementarietà nel genoma. Inoltre, la loro funzionalità è influenzata, oltre che dalla lunghezza, anche dalla composizione, cioè dai rapporti adenina/timina (A/T) e guanina/citosina (G/C) o dalla presenza di sequenze ripetute o complementari (Hemmer, 1997).

La reazione a catena della polimerasi è una tecnica altamente sensibile e specifica, in quanto permette in poche ore di ottenere *in vitro* quantità virtualmente illimitate di segmenti di DNA bicatenario a partire da quantità estremamente limitate del campione da analizzare; per questo motivo viene anche definita “amplificazione genica”.

La reazione di amplificazione si realizza grazie alla capacità enzimatica della *DNA polimerasi I* di sintetizzare catene complementari di DNA a partire da un filamento stampo denaturato. Di solito, si utilizzano forme di DNA polimerasi termostabili, quali la *Taq* polimerasi, estratta dal batterio *Thermus aquaticus*, che consentono di organizzare la reazione in ripetizioni cicliche.

In particolare, la miscela di reazione deve comprendere, oltre alla *Taq* polimerasi: i quattro desossiribonucleotidi (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); opportune concentrazioni saline ($MgCl_2$) e pH; e oligonucleotidi che funzionano da inneschi o “primer” per l'attività enzimatica.

La PCR si compone tipicamente di 30-50 cicli, ognuno dei quali è suddiviso in tre fasi:

1. Denaturazione: il DNA bicatenario viene scisso in due filamenti monocatenari separati mediante riscaldamento (94 °C).
2. Attacco: la temperatura viene abbassata per permettere ai primers (oligonucleotidi specifici che vengono sintetizzati in laboratorio) di appaiarsi alle sequenze complementari del DNA stampo monocatenario. Questa temperatura è un parametro

variabile capace di determinare la specificità della reazione e dipende dalla sequenza e dalla lunghezza dei primers.

3. Allungamento: la temperatura viene portata a 72°C che rappresenta la temperatura ottimale per l'attività della *Taq* polimerasi. In questa fase l'enzima si lega in corrispondenza dei primers ed inizia a sintetizzare il DNA, sfruttando la presenza dei deossiribonucleotidi liberi in soluzione. In questo modo si determina la polimerizzazione di nuove catene complementari.

La PCR "end-point" è il metodo ufficiale utilizzato per l'amplificazione di acidi nucleici. Il suo limite sta nel fatto di poter dare solo una risposta di tipo qualitativo e non quantitativo.

Infatti, la necessità di adeguarsi alle direttive legislative europee ed italiane (2001/18 CE), che prevedono, per vaste categorie di alimenti finiti, l'obbligo di etichettatura di prodotti contenenti o derivanti da OGM ha reso necessario la predisposizione di metodologie analitiche in grado di rilevare la presenza delle componenti transgeniche in termini percentuali.

PCR real time

La PCR quantitativa (PCR real time) è una tecnica basata sugli stessi principi della PCR "end-point" ma, a differenza di quest'ultima, è in grado di misurare la concentrazione iniziale di una sequenza target in un qualsiasi campione.

In particolare, il sistema real time impiegato presso il nostro laboratorio è in grado di identificare organismi geneticamente modificati, è specifico per l'analisi quantitativa degli stessi ed è

fornito di software per la completa gestione ed analisi dei dati sperimentali. Esso, inoltre, prevede la progettazione di coppie di sonde e primers (Primer Express 2.1) nonché l'automazione del confronto dei risultati e la normalizzazione dei dati mediante parametri matematici definiti dall'operatore.

Il software pertanto, interfacciato con il sistema di formazione a distanza DVLN, consente da parte di ogni discente l'interpretazione dei risultati relativi alla identificazione e alla quantificazione di frammenti di DNA modificato in campioni di origine animale e vegetale. Tali indagini trovano giustificata motivazione soprattutto al fine di valutare la sicurezza dei prodotti transgenici immessi sul mercato alimentare (Aumatric *et al.*, 2004). L'integrità del DNA, infatti, rappresenta il fattore chiave per un ipotetico trasferimento genico orizzontale (HGT) del DNA ricombinante dagli alimenti geneticamente modificati (GM) alla microflora intestinale. Chowdhury *et al.* (2003), Duggan *et al.* (2003) e Einspanier *et al.* (2004) in prove effettuate rispettivamente su suini, ovini e bovini trovarono che il DNA vegetale ingerito non veniva totalmente degradato durante il processo digestivo. Risulterebbe pertanto possibile estrarre dagli organi e dai tessuti animali DNA vegetale: brevi sequenze sono state amplificate nel sangue, nel tessuto muscolare e in diversi organi del pollo (Klotz *et al.*, 2002) e nel sangue di bovini (Klotz e Einspanier, 1998) mentre risultati negativi sono stati ottenuti per le uova, il latte nonché per gli organi ed i tessuti di bovini (Einspanier *et al.*, 2001; Phipps *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda i suini, l'amplificazione di sequenze di DNA vegetale ha fornito dati sia positivi (Reuter e Aulrich, 2003) che negativi (Klotz *et al.*,2002).

In ogni caso i risultati di tali indagini potrebbero essere stati influenzati dai trattamenti fisici e chimici subiti dagli alimenti somministrati agli animali. Forbes *et al.* (1998), infatti, osservarono che alcuni processi tecnologici degli alimenti esercitano notevole influenza sull'integrità del DNA vegetale.

Destino metabolico del DNA

Nell'uomo, la quantità di acidi nucleici ingerita quotidianamente varia in funzione degli alimenti che costituiscono la dieta (tabella 4). Infatti, mentre quelli di origine animale sono caratterizzati da elevati contenuti di DNA e di RNA, i tessuti vegetali ne presentano livelli inferiori. I contenuti maggiori sono stati ritrovati nei batteri, nei lieviti e nei funghi, grazie al loro elevato tasso di crescita (Jonas D.A. *et al.*, 2001). La quantità di RNA e DNA ingeriti con la dieta dipende inoltre dal trattamento subito dai singoli alimenti; secondo quanto riportato da Doerfler e Schubert (1997), essa sarebbe normalmente compresa nel range di 0.1 - 1 grammo/die.

Tabella 4. Contenuto in acidi nucleici (g/kg s.s.) in diversi alimenti (Herbel e Montag, 1987; Lassek e Montag, 1990)

Alimento		RNA	DNA
Vitello	Fegato	22.9 (21.2 – 23)	17.3 (17.1 – 20.2)
Manzo	Fegato	22.1 (21.4 – 22.8)	19.5 (18.9 – 20)
	Cuore	6.1	5.3
	Milza	17.9 (16.3–19.1)	32.6 (32.2–50.1)
	Polmone	15.5	32.2
	Pancreas	87.9 (73.6–102.1)	16.2 (14.4 – 18)
	Linfonodo	33 (28.5 – 37.5)	100.9(86.7–115.2)
Maiale	Fegato	32.1 (31.2 – 35.5)	14.8 (14.4 – 18.1)
	Rene	15.5 (15.1 – 15.9)	17.6 (17 – 18.2)
	Cuore	9.4	6.9
	Linfonodo	26.5 (25.2 – 27.8)	68.5 (66.7 – 70.3)
	Pancreas	71.4 (64.9 – 77.9)	21.2 (18.8 – 23.6)
Cavallo	Muscolo	10.8	9.2
Tonno		1.7	0.8
Merluzzo		4.7	0.3
Segale		1.3 (1.1 – 1.4)	0.7 (0.6 – 0.8)
Frumento		1.1 (1.0 – 1.1)	0.6
Avena		3	-
Orzo		3.2	-
Lenticchie		3.9 (3.8 – 3.9)	0.8 (0.7 – 0.8)
Broccoli	Freschi	20.6	5.1

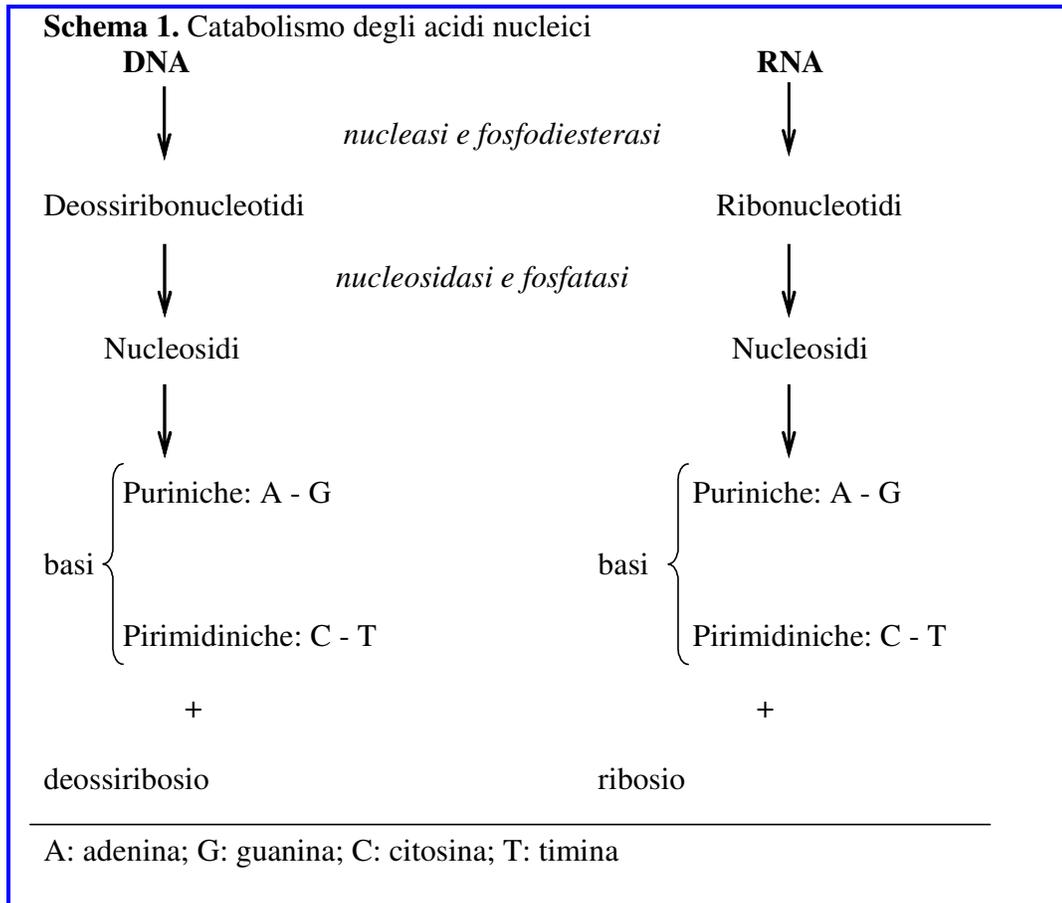
Cavolo cinese	Congelato	14.6	2
Cavolfiore	Fresco	14.5	2.8
Spinaci	Congelati	14	2.6
Foglie di prezzemolo	Fresche	8.1	2.7
Patata	Fresca	1.4	1
Cipolla	Fresca	2.6	0.7
Avocado	Fresca	1.5	0.6
Lievito		66.2	6.0
Funghi di Ostrica		24.1	1.4
Boleto (giallo)		23.1	1
Boleto (giallo)	Essiccato	16	1
Champignon		20.5	0.9
Fungo di castagna		21.1	1.4

Gli enzimi coinvolti nell'idrolisi del DNA sono rappresentati da due endonucleasi: *DNAsi I* e *DNAsi II*. La prima, con un'attività ottimale a pH neutro, è in grado di distruggere il DNA a doppia elica ed è prodotta principalmente dalle ghiandole salivari, ma anche dal pancreas, dal fegato e dalle cellule del Paneth del piccolo intestino. La *DNAsi II*, che agisce ad un pH ottimale tra 5.2 e 6.4, è anch'essa secreta dal pancreas ed è attiva principalmente sui lisosomi dei fagociti, coinvolti nell'intenso catabolismo del DNA così come nella frammentazione del DNA genomico durante l'apoptosi (Yamanaka *et al.*, 1974).

Il metabolismo degli acidi nucleici di origine alimentare ha inizio con la conversione nel tratto gastro-intestinale delle nucleoproteine ad opera di enzimi proteolitici (Caver e Walzer, 1995). Gli acidi nucleici sono a loro volta degradati ad opera delle nucleasi specifiche ad una miscela di mono-, di-, tri- e poli-nucleotidi. I polinucleotidi sono ulteriormente idrolizzati a nucleotidi da fosfodiesterasi nella membrana dell'orletto a spazzola delle cellule intestinali. I nucleotidi, invece, sono deaminati ad opera di nucleotidasi e fosfatasi alcaline

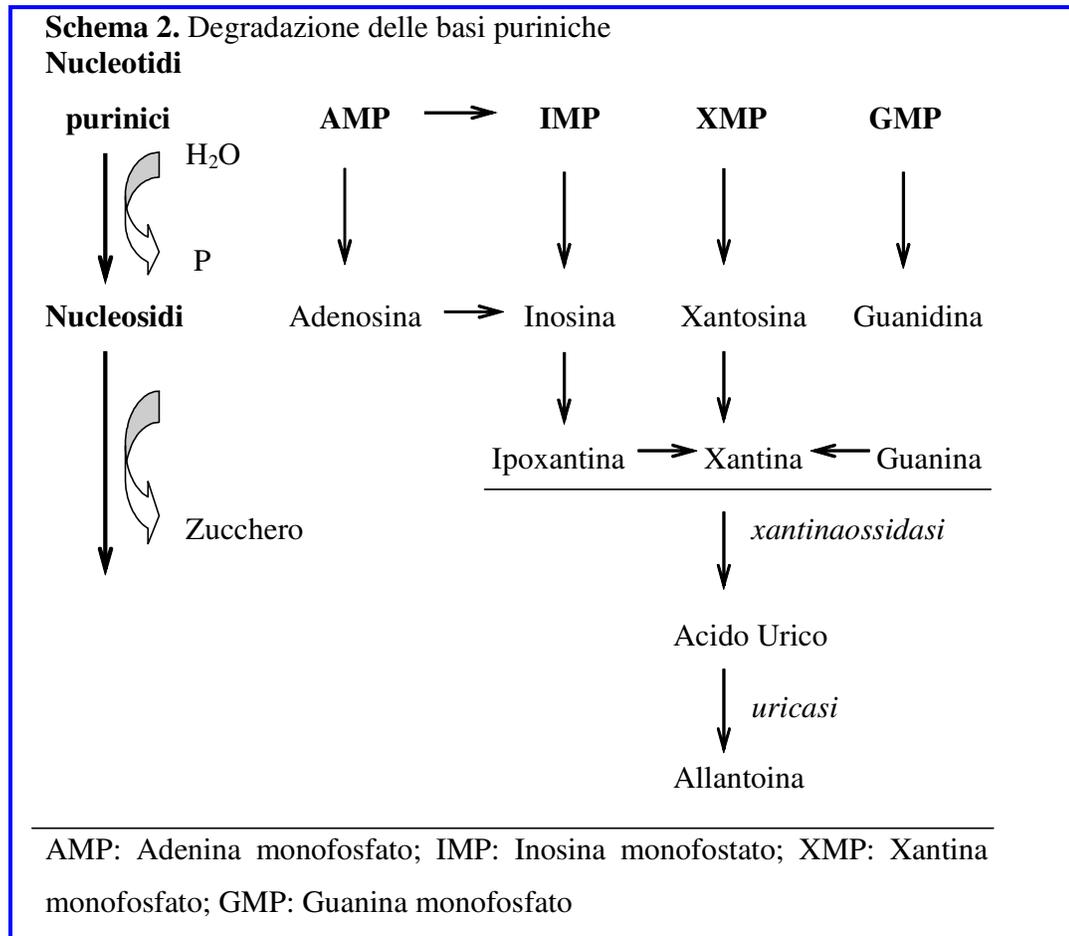
a nucleosidi che, una volta assorbiti dagli enterociti, sono catabolizzati ad opera delle nucleosidasi in basi azotate, basi libere ed altri metaboliti quali zuccheri e fosfati impiegati nei pathways cellulari biosintetici (Sonoda e Tatibana, 1978). In particolare, il trasporto dei nucleosidi negli enterociti avviene attraverso meccanismi di diffusione facilitata e mediata da trasportatori Na^+ -dipendenti specifici (Bronk e Hastewell, 1987; Jarvis, 1989). La regione prossimale del piccolo intestino ha una grande capacità di assorbimento. Una volta assorbiti, la maggior parte dei nucleosidi e delle basi sono rapidamente degradati negli enterociti, ed i prodotti catabolici come l'acido urico sono escreti con le urine e nell'intestino (Salati *et al.*, 1984).

Le nucleosidasi sono rappresentate soprattutto da fosforilasi che rompono i legami glicosidici per produrre purine, poche pirimidine e (deossi) ribosio-1-fosfato. Le pirimidine non subiscono l'azione degli enzimi intestinali e le ribosil-pirimidine sono assorbite intatte ed utilizzate per la sintesi degli acidi nucleici dei tessuti. Le nucleosidasi rompono rapidamente le inosine (ribosil-ipoxantine) e le guanosine. Le adenosine sono convertite mediante l'adenosina deaminasi ad inosine, ed il risultato netto porta a purine che sono intensamente catabolizzate ad acido urico. Le fosforilasi nucleiche sono responsabili della decomposizione delle basi libere. La xantinossidasi nella mucosa del piccolo intestino ossida la maggior parte delle basi puriniche ad acido urico (Montag *et al.*, 1989). Per opera dell'enzima uricasi, quest'ultimo viene convertito in allantoina (schemi 1 e 2).



Nei poligastrici, la degradazione degli acidi nucleici di origine alimentare avviene principalmente nel rumine attraverso l'azione delle nucleasi microbiche. A tale processo fa seguito un'intensa sintesi di acidi nucleici di origine microbica che rappresentano più dell'85% di quelli che giungono nel piccolo intestino (McAllan, 1982). Infatti, Topps e Elliot (1965) somministrando a 4 gruppi di montoni forniti di cannula ruminale, 16 diete caratterizzate da livelli proteici compresi tra 2.6 e 10% e da 4 differenti contenuti in energia digeribile, notarono che le diete a più elevato contenuto energetico e a maggiore contenuto di carboidrati facilmente fermentescibili, favorendo la moltiplicazione dei microrganismi ruminanti,

determinavano maggiore escrezione di derivati purinici (acido urico e allantoina) e maggiore concentrazione di acidi nucleici nel liquido ruminale.



Questi autori dedussero, inoltre, che gli acidi nucleici nel liquido ruminale sono di origine microbica, in quanto ne osservarono le massime concentrazioni immediatamente prima dei due pasti giornalieri, allorché maggiore è l'incidenza della flora batterica sul contenuto ruminale. Fu trovata, infine, una correlazione altamente

significativa tra contenuto ruminale di acidi nucleici e azoto escreto sotto forma di acido urico e allantoina.

A conferma di quanto trovato da questi autori vanno citati i risultati ottenuti da Smith e McAllan (1970) che, in vitelli e vacche alimentati con diete a differente contenuto in azoto, rilevarono nel liquido ruminale rapporti tra RNA e DNA simili a quelli riscontrati nei batteri ruminanti, ma non correlati a quelli delle diete. Inoltre, fu notato che gli acidi nucleici puri introdotti nel rumine venivano rapidamente degradati. Osservazioni queste che indussero anche questi autori a concludere che gli acidi nucleici presenti nel liquido ruminale sono in massima parte di origine microbica e, pertanto, i prodotti della loro degradazione possono rappresentare un indicatore della produzione di proteine microbiche.

McAllan (1980), infine, in bovini alimentati con diete a base di fieno e mangimi concentrati, trovò che più dell'80% del DNA presente a livello duodenale era digerito prima del passaggio al grosso intestino; lo stesso autore suggerì che più del 95% degli acidi nucleici viene degradato completamente nell'apparato digerente.

Nonostante l'intenso catabolismo, indagini effettuate su animali indicano che solo il 2 - 5% dei nucleotidi della dieta sono incorporati nei pools dei tessuti, in particolare nel piccolo intestino, nel fegato e nel muscolo scheletrico (Burridge *et al.*, 1976).

Schubbert *et al.* (1994) riportano che soltanto una quota inferiore allo 0.1% di DNA del fago M13 ingerito veniva ritrovata come frammenti (tra i < 200 e i 976 paia di basi, bp) nel sangue, nel fegato ed in diverse cellule della milza di topo.

Tali risultati assumono notevole importanza alla luce della crescente preoccupazione da parte del consumatore circa il destino metabolico del DNA proveniente da alimenti geneticamente modificati (GM). A tal fine, diverse organizzazioni internazionali, quali il WHO (1991) e la US-FDA (1992), hanno dichiarato che, poiché sia l'uomo che gli animali hanno da sempre consumato quantità significative di DNA di origine alimentare, anche l'ingestione di DNA modificato non comporterebbe alcun rischio per la salute (Beever e Kemp, 2000). La modificazione genetica indotta nelle piante consiste, infatti, nel riassortimento delle sequenze dei nucleotidi, lasciandone invariata struttura e caratteristiche chimiche. Il DNA derivato dagli OGM (DNA ricombinante) risulta chimicamente equivalente ad ogni altro DNA, e la sua unicità deriva solamente dalle differenze indotte nella sua sequenza. I costituenti del DNA ricombinante sono, inoltre, legati dagli stessi legami covalenti (N-glicosidi e fosfodiesteri) e non covalenti (idrogeno e π -interazione) di ogni altro DNA (Jonas D.A. *et al.*, 2001).

Assumendo che dopo l'ingestione di un alimento GM nell'intestino non avviene alcuna degradazione, Beever e Kemp (2000) tentarono di stimare la massima ingestione possibile di DNA ricombinante/DNA totale, tenendo in debito conto la quantità di sostanza secca ingerita e la proporzione dei singoli alimenti costituenti la dieta. Essi conclusero che per una bovina in lattazione di 600 kg di peso vivo, che consuma 24 kg di sostanza secca/die, se il 40% deriva da insilato di mais GM ed il 20% da granella di mais GM, la quantità totale di DNA ingerita è di circa 608 mg al giorno (circa i 2/3 di 1 grammo di DNA sono consumati in un giorno).

Considerando che il genoma del mais è di circa 2.5 bilioni di coppie di basi (bp), con un inserto transgenico di 4000 bp, la frazione di DNA GM nella dieta ammonterebbe a $1/234000$, ovvero allo 0.00042% dell'ingestione totale di DNA della dieta.

Successivamente, Beever e Phipps (2001) rielaborarono i risultati su esposti e calcolarono una ingestione giornaliera di DNA pari a 57.3 g. Assumendo che tutto il mais è di origine transgenica, ciò corrisponderebbe ad un'ingestione di DNA transgenico pari a 54 $\mu\text{g}/\text{die}$, equivalenti a 0.000094% dell'ingestione totale di DNA. Chiaramente, tali quantità sono piccole ed irrilevanti, ma non possono essere ignorate se il nuovo DNA sopravvive alla digestione e mantiene l'intera integrità funzionale.

Stato dell'arte della ricerca

Numerose ricerche sono state effettuate nell'uomo e in diverse specie animali allo scopo di valutare la sopravvivenza del DNA nel tratto gastro-intestinale e la presenza di frammenti genici in diversi tessuti e organi.

Uomo

Martin-Orúe *et al.* (2002), mediante simulazione *in vitro*, dimostrarono che, mentre nessuna frammentazione del DNA si osservava in ambiente gastrico per la soia e per il mais GM, incubando il solo DNA estratto dalla prima, questo veniva ivi degradato per circa l'80%. Nel piccolo intestino, entrambi gli alimenti GM venivano quasi totalmente degradati, con diverse velocità. Il mais inoltre presentava un processo di tipo bifasico, con l'85% rapidamente degradato e la restante parte che subiva la frammentazione a velocità nettamente inferiore.

Netherwood *et al.* (2004) somministrarono a 7 volontari ileostomizzati una dieta contenente soia resistente al glifosate (gene *epsps*, 5-enolpiruvil-scikimate-3-fosfato sintasi, proveniente dall'*Agrobacterium tumefaciens* specie CP4) e PEG 4000 (quest'ultimo come marcatore per determinare la quantità di alimento che attraversava il piccolo intestino). Più del 60% del marcatore fu recuperato dai campioni di digesta. Il transgene veniva recuperato da tutti gli ileostomizzati, sebbene la quantità in grado di sopravvivere attraverso il piccolo intestino risultò altamente variabile tra i soggetti (probabilmente per differenze sia nel titolo di *DNasi I*

che nella frammentazione a livello gastrico). Inoltre, allo scopo di verificare se la soia GM era in grado di sopravvivere anche al passaggio attraverso un tratto gastro-intestinale completo, 12 volontari sani furono alimentati con la stessa dieta; mentre il 90-98% del marcatore fu recuperato nelle feci, il DNA transgenico non venne ritrovato. Ciò dimostrerebbe che nel grande intestino avviene la degradazione completa del DNA.

Topo

Diversi studi sono stati condotti sul topo utilizzando sia DNA fagico che quello presente in alimenti. Schubbert *et al.* (1994) recuperarono, da topi alimentati con DNA proveniente dal batteriofago M13mp18, circa l'1 - 2% del DNA dall'intestino e dalle feci fino a 7 ore e lo 0.1 - 0.01% dal sangue fino a 8 ore dall'ingestione. In uno studio successivo, Schubbert *et al.* (1997), utilizzando topi alimentati allo stesso modo, recuperarono circa il 5% del DNA fagico (100 - 1700 bp) nelle feci e in diversi tratti intestinali. Inoltre, frammenti di 712 bp dell'M13mp18 furono ritrovati nei leucociti periferici. Attraverso ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), fu possibile rilevare che essi erano localizzati esclusivamente nei nuclei delle cellule (in circa 1 su 1000 cellule bianche del sangue tra le 2 e le 8 ore dopo l'ingestione e nelle cellule della milza e del fegato dopo 24 ore). I dati ottenuti evidenziavano che il DNA estraneo attraversava l'epitelio della parete intestinale, raggiungeva i leucociti delle placche di Peyer ed era trasportato attraverso il sangue periferico ai leucociti e quindi alla milza e al fegato. Risultati simili sono stati ottenuti quando topine gravide venivano alimentate

per 2 settimane con DNA del batteriofago M13 contenente il gene per la proteina fluorescente verde (GFP) (Schubbert *et al.*, 1998). La presenza del DNA estraneo (830 bp) fu evidenziata, mediante FISH, nei nuclei di cellule di vari organi del feto e dei topi appena nati. La presenza del DNA plasmidico nelle cellule suggeriva un'eventuale trasmissione transplacentare. Infine, fu evidenziata l'associazione del DNA plasmidico con entrambi i cromatidi in rare cellule di soli 3 feti e anche la presenza di DNA estraneo fino a 3 mesi dalla nascita. Hohlweg e Doerfler (2001) seguirono il destino del gene cloroplastico "rubisco" (1,5-bifosfato carbossilasi) contenuto nella soia somministrata a topi. Frammenti di 337 e di 1516 bp sono stati amplificati 1 e 3 ore dopo l'ingestione dai contenuti gastrici e dal cieco, rispettivamente; frammenti del gene sono stati anche ritrovati dopo 49 ore nei diversi tratti dell'intestino e, in pochi casi, fino a 121 ore nel cieco. Questi risultati dimostravano che il DNA vegetale era in grado di sopravvivere più a lungo nell'ambiente gastrointestinale rispetto al DNA fagico, utilizzato da Schubbert *et al.* nelle indagini esposte in precedenza. Inoltre, gli autori rilevarono la presenza di frammenti di 337 bp del gene cloroplastico nel fegato e nella milza mentre nessun frammento del gene codificante per la proteina fluorescente verde (GFP) fu ritrovato nella milza, nel fegato e nella coda di topi che per 8 generazioni avevano ricevuto per via orale DNA del batteriofago M13mp18. Tali risultati erano quindi in contrasto con quelli di Schubbert *et al.* (1998) che avevano ipotizzato un eventuale trasferimento transplacentare.

Ovino

Duggan *et al.* (2003), nel liquido ruminale di pecora, rilevarono la presenza del frammento di 1914 bp del gene Bt codificante per la proteina *cry1A(b)* proveniente dal *Bacillus thuringiensis* fino a 5 ore dopo l'ingestione di granella di mais GM. Al contrario questo non fu rilevato in animali alimentati con insilato proveniente dallo stesso mais GM. Frammenti più piccoli (211 bp) del transgene *cry1A(b)* furono invece amplificati 3 e 24 ore dopo l'ingestione rispettivamente di insilato e di granella di mais GM.

Pollo

La presenza di DNA cloroplastico (199 bp) in diversi campioni (muscolo della gamba, del petto e dell'ala; stomaco) di carcasse di polli prelevati in supermercati fu rilevata da Klotz *et al.* (2002).

Khumnirdpetch *et al.* (2001), in polli alimentati con soia GM, non ritrovarono, anche dopo 7 settimane dall'ingestione, frammenti del gene *cp4epsps* nel muscolo, nella pelle e nel fegato. Secondo gli autori, ciò dimostrava che la sequenza transgenica della soia GM viene metabolizzata a livello intestinale.

Einspanier *et al.* (2001) cercarono sequenze di 199 e 532 bp del gene cloroplastico e di 189 bp del gene Bt in diversi tessuti (muscolo, fegato, milza e rene) e nelle uova di polli alimentati con diete contenenti mais convenzionale o transgenico. Furono ritrovati solo frammenti di 199 bp in tutti i tessuti esaminati, eccetto che nelle uova. Al contrario, Aeschbacher *et al.* (2002) rilevarono in polli alimentati con mais GM, oltre a frammenti del gene *ivr* (invertasi, 226 bp) anche quelli del gene Bt nel fegato, nella milza e nel muscolo.

In indagini successive, Tony *et al.* (2003) e Jennings *et al.* (2003, a) non riuscirono a ritrovare, in polli alimentati con mais convenzionale o con mais GM, alcun frammento di DNA esogeno. Va tuttavia rilevato che, in entrambi i casi, era stata effettuata la ricerca di frammenti genici di diversa lunghezza.

Nei polli alimentati con mais GM, Chambers *et al.* (2002) ritrovarono il gene marcatore per la resistenza all'ampicillina nel gozzo (100% dei casi) e nello stomaco (40% dei casi), ma non nel contenuto intestinale. La sopravvivenza di questo gene marker non risultò diversa da quella degli altri geni della pianta, per cui gli autori conclusero che è molto improbabile che i batteri presenti a livello intestinale di polli alimentati con mais GM possano acquisire la resistenza agli antibiotici.

Maiale

Klotz *et al.* (2002), in maiali alimentati con mais convenzionale e GM, ritrovarono soltanto frammenti di DNA cloroplastico (199 bp) fino a 6, 8, 12 e 4 ore dopo l'ingestione, rispettivamente, nel contenuto gastrico, nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo e ciò fu ascritto al fatto che, mentre il gene *cry1A(b)* è presente in singola copia nel genoma del mais, quello cloroplastico lo è in maggiore quantità, risultando quindi più facilmente rintracciabile. Nessun frammento di DNA fu tuttavia rilevato nel muscolo, nel fegato, nella milza, nei linfonodi e nel sangue dei maiali esaminati.

Chowdhury *et al.* (2003) rivelarono, invece, specifiche sequenze geniche del mais convenzionale - 242 bp, *zeina*; 226 bp, *invertasi*; 1028 bp, rubisco - nei contenuti gastrico ed intestinale e frammenti

di quello transgenico - 110-437 bp del gene *cry1A(b)* – nel solo contenuto intestinale di maiali alimentati con mais transgenico.

Reuter e Aulrich (2003), infine, ritrovarono dopo 24 ore dall'ingestione, frammenti di 211 bp del gene Bt oltre che nel contenuto intestinale anche in quello gastrico di maiali alimentati con mais convenzionale e GM; in diversi tessuti (fegato, rene, milza, ghiandole linfatiche, ovaie, muscolo) e nel sangue riuscirono, invece, a rilevare solo frammenti del gene rubisco (140 bp) ad alto numero di copie.

Jennings *et al.* (2003, b) non ritrovarono frammenti di 272 bp della regione codificante per il transgene *cp4epsps* e di 198 bp del gene *le1* endogeno codificante per la lectina di soia nel muscolo di maiali alimentati con soia convenzionale o Roundup Ready (RR), tollerante al glifosate. Questi risultati sono in accordo con quelli riportati da altri autori sul destino del gene *cp4epsps* in altre specie (Klotz e Einspanier, 1998).

Bovino

Klotz e Einspanier (1998), in bovine che ricevevano soia RR e convenzionale, rilevarono nei leucociti frammenti di DNA cloroplastico, mentre non riuscirono a rintracciare frammenti del gene *cp4epsps* nel sangue e nel latte.

In bovine alimentate con insilato di mais convenzionale o transgenico, Einspanier *et al.* (2001) trovarono piccoli frammenti del gene rubisco (199 bp) e del gene Bt (189 bp) nel chimo e nella fase liquida e solida del duodeno. Frammenti di DNA cloroplastico di 199 bp furono ritrovati nei linfociti, mentre nei tessuti (muscolo, fegato,

milza e rene) e nel latte non fu rintracciato alcun frammento di DNA cloroplastico (199 e 532 bp) e di transgene Bt.

Phipps *et al.* (2003) ritrovarono frammenti di DNA dei geni a singola copia (*lectina* di soia, 240 bp, e proteina *del gruppo ad alta mobilità* del mais, 209 bp) e dei transgeni (Bt di 203 bp e *cp4epsps* di 171 bp) nella sola fase solida del contenuto ruminale e di quello del duodeno di bovine da latte che ricevevano mais e soia GM. Nel sangue e nel latte non fu invece rilevato alcun frammento transgenico, in accordo con i risultati di Klotz e Einspanier (1998), Faust (2000), Einspanier *et al.* (2001), Phipps e Beever, (2001), Phipps *et al.* (2002), ma soltanto il gene ad alto numero di copie "rubisco" (199 bp). Tale presenza veniva ascritta al possibile trasferimento del gene dal tratto gastrointestinale al sangue oppure ad una eventuale contaminazione durante il prelievo dei campioni di latte.

Infine, Einspanier *et al.* (2004), in bovine alimentate con insilato di mais GM, rilevarono frammenti del gene cloroplastico (199 bp; ad alto numero di copie: >1000 copie/cellula) nel rumine, nell'abomaso, nel digiuno e nel colon (in quantità significativamente maggiori nei primi due compartimenti), mentre non fu ritrovato alcun frammento dei geni specie-specifici *ivr* e *zeina* (226 e 275 bp, rispettivamente; a medio numero di copie) e di quello della tossina Bt (211 bp).

Scopo della ricerca

Per ottenere una pianta geneticamente modificata è necessario isolare il potenziale gene d'interesse e, dallo studio dettagliato della sua funzione, arrivare alla sua clonazione in un vettore di trasformazione. Attraverso diversi metodi di trasformazione il gene d'interesse è quindi introdotto ed integrato nel genoma della pianta target, insieme con un gene "marker" utilizzato per l'identificazione dei trasformati. Il risultato finale è la modificazione della pianta originaria attraverso l'introduzione mirata di un nuovo gene che conferisce alla pianta stessa nuove caratteristiche.

Per tale motivo, particolare preoccupazione è rivolta al destino del DNA e delle proteine derivate dalla sequenza genica inserita.

Diversi quesiti sono ancora da risolvere:

1. i frammenti di DNA modificato o le proteine potrebbero essere trasferiti ed accumulati nell'organismo di animali che sono stati alimentati con piante GM e nei prodotti (latte, carne ed uova) da loro forniti?
2. Il DNA del gene introdotto o modificato in una specie vegetale, se trasferito agli animali che la consumano, potrebbe causare effetti avversi sulla loro salute?
3. Il consumo di specie vegetali geneticamente modificate o di prodotti di origine animale provenienti da animali alimentati con piante GM potrebbe portare ad effetti avversi sulla salute dell'uomo?

In questo contesto, lo scopo della nostra ricerca è stato quello di:

- valutare la presenza di frammenti di DNA GM in conigli alimentati con soia GM
- valutare la presenza di alterazioni metaboliche tramite l'esplorazione di attività enzimatiche organo specifiche

Metodiche e risultati

Prelievo campioni

L'indagine è stata effettuata su 20 conigli bianchi di Nuova Zelanda (BNZ) di età media di 70 ± 5 giorni (peso vivo medio di 2 ± 0.90 kg), equamente distribuiti tra i sessi, allevati in gabbie individuali e suddivisi in due gruppi omogenei (C e T). Entrambi i gruppi sono stati alimentati con una dieta costituita per l'80% da un mangime completo del commercio sotto forma di *pellets* e per il 20% da farina di estrazione di soia (soia f.e.). Mentre per il gruppo A è stata utilizzata soia f.e. di tipo convenzionale, al gruppo B è stata somministrata una soia RoundUp Ready (RR), caratterizzata dalla presenza del gene *epsps* (codificante per l'enzima 5-enolpiruvato-3-fosfocichimato acido sintasi), isolato dall'*Agrobacterium tumefaciens* ceppo CP4, in grado di rendere la pianta resistente all'azione dell'erbicida glifosate.

Da tutti gli animali, subito prima della macellazione, si è provveduto a prelevare in condizioni sterili 10 ml di sangue in provette vacutainer contenenti sodio citrato. Sui campioni, trasportati a $+4^{\circ}\text{C}$ in laboratorio, si è provveduto immediatamente all'estrazione del DNA. Un'altra provetta vacutainer di sangue è stata centrifugata a 3000 *g* per ottenere il siero.

Successivamente sono stati prelevati campioni di tessuto muscolare (coscio sinistro), di parenchima epatico, renale, splenico e cardiaco, nonché dei contenuti del duodeno, del cieco e dell'ampolla rettale (feci). Tutti i campioni sono stati conservati in tubi sterili, trasportati a $+4^{\circ}\text{C}$ in laboratorio e conservati a -20°C .

Estrazione del DNA

A partire da campioni di sangue, tessuto muscolare, parenchima epatico, renale e splenico, nonché da campioni dei contenuti del duodeno, del cieco e dell'ampolla rettale (feci), è stato estratto il DNA. Al fine di poter verificare la presenza di sequenze vegetali nel DNA estratto dai campioni di origine animale in esame, sono stati scelti, come campioni di controllo: soia f.e. convenzionale e Roundup Ready (RR).

Composizione chimica centesimale e verifica della presenza della sequenza transgenica

In tabella 5 è riportata la composizione chimica secondo lo schema Weende, e le frazioni dei glucidi di struttura secondo Van Soest *et al.* (1991) della farina di estrazione di soia convenzionale e di quella transgenica che è risultata sostanzialmente sovrapponibile, in accordo con quanto riportato da Cromwell *et al.* (2001) e da Tudisco *et al.* (2004).

Tabella 5. Composizione chimica (% s.s.) della soia f.e. convenzionale e Roundup Ready impiegate

	PG	EE	FG	Ceneri	NDF	ADF	ADL
Soia	54,4	25,0	4,09	7,09	15,7	13,96	2,04
Soia GM	53,6	24,8	4,34	6,92	12,5	15,19	3,79

PG: proteine grezze; EE: estratto etereo; FG: fibra grezza; NDF: fibra neutro detersa; ADF: fibra acido detersa; ADL: lignina acido detersa

In figura 6 sono riportati i risultati della reazione di amplificazione su campioni di DNA estratto da soia f.e. transgenica e convenzionale mediante l'uso della coppia di primers 35S-1 e 35S-2 (CEN, 2000).

I campioni 2, 3 e 4, estratti da soia f.e. GM, hanno prodotto l'amplificato atteso di 195 bp, mentre i campioni di DNA (1 e 5) estratto da genotipi di soia non transgenica non hanno prodotto alcun amplificato.

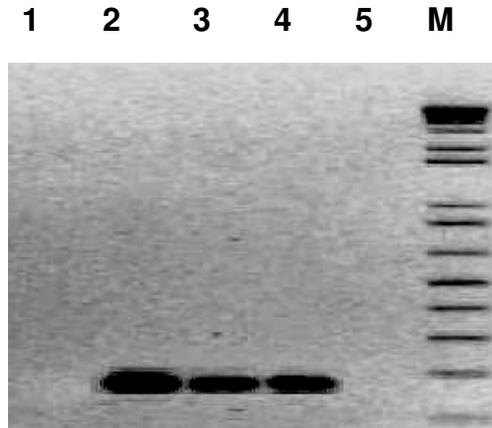


Figura 6. Analisi elettroforetica di amplificazione di farina di estrazione di soia convenzionale e transgenica, utilizzando i primers specie-specifici 35S-1 e 35S-2

L'ordine dei campioni è il seguente: 1 = f.e. soia convenzionale; 2, 3 e 4 = f.e. soia transgenica; 5 = f.e. soia convenzionale; M = 100 bp DNA ladder

Lettura spettrofotometrica

La concentrazione del DNA in ogni campione è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm, utilizzando il coefficiente di estinzione a 260 nm $\epsilon^{0.1\%} = 20$. Dal rapporto tra i valori dell'assorbanza a 260 e 280 nm è stato calcolato anche il grado di purezza rispetto al contenuto di proteine (rapporto ottimale 1.8-2.0).

Nelle tabelle 6, 7 e 8 sono riportati i risultati relativi all'efficienza di estrazione del DNA e al contenuto in proteine contaminanti nei campioni di sangue, tessuto muscolare, organi e dei contenuti dei

diversi tratti intestinali, prelevati dal gruppo di conigli alimentati con soia convenzionale (gruppo C) e da quelli che ricevevano soia transgenica (gruppo T). I risultati ottenuti si riferiscono alla media delle tre estrazioni indipendenti per ogni metodo.

Le rese, espresse in µg di DNA/25mg di campione, sono molto simili per entrambi i gruppi e si distribuiscono in un ampio range (tabella 6). In particolare, i campioni di milza hanno dato le rese migliori (tra 12,75 e 162,50 µg), quelli del tessuto muscolare le peggiori (tra 1 e 7,50 µg) ma sufficienti per l'allestimento di reazioni di PCR.

Tabella 6. Resa in acidi nucleici totali e valutazione della contaminazione in proteine di estratti da muscolo, rene, milza, fegato e cuore (gruppo C-T)

n. coniglio	Muscolo		Rene		Milza		Fegato		Cuore	
	µg DNA/25mg	µg / µl proteine								
Gruppo C										
1	2,75	0,15	6,00	0,62	98,25	0,82	45,50	0,34	7,75	0,33
2	2,25	0,12	9,75	0,60	12,75	1,90	6,50	0,65	5,75	0,37
3	2,25	0,10	16,25	0,35	25,75	0,17	26,00	0,52	4,50	0,41
4	1,00	0,09	4,25	0,70	67,00	1,02	16,50	0,21	3,75	0,82
5	2,25	0,06	8,25	0,33	151,50	1,80	52,00	0,18	5,25	0,40
6	4,50	0,05	27,25	0,55	118,75	1,12	24,75	0,19	17,00	0,60
7	3,00	0,04	12,25	1,12	85,15	0,37	21,00	0,89	15,12	0,37
8	2,56	0,12	17,15	0,60	27,00	1,04	28,00	0,41	5,50	0,89
9	4,00	0,08	25,50	0,40	102,50	1,12	22,50	0,21	13,75	0,65
10	3,75	0,17	14,45	0,65	54,00	0,98	21,75	0,34	14,00	0,65
Gruppo T										
1	3,50	0,12	17,25	0,60	77,50	1,50	25,50	0,41	4,00	0,82
2	4,00	0,08	18,00	0,44	45,00	2,50	64,25	0,15	6,50	0,55
3	5,50	0,06	11,75	0,70	65,50	1,90	47,50	0,24	14,25	0,21
4	3,00	0,11	11,75	0,85	84,25	0,55	16,00	0,16	9,75	0,60
5	6,50	0,13	19,00	0,55	112,00	2,58	33,75	0,30	18,50	0,21
6	7,50	0,11	13,50	0,21	162,50	3,10	40,75	0,65	31,75	0,32
7	4,55	0,08	21,00	0,40	47,50	2,12	66,00	0,32	7,75	0,60
8	6,00	0,05	18,75	0,60	68,75	3,04	34,87	0,21	29,50	0,32
9	7,25	0,07	14,00	0,21	113,79	2,35	38,75	0,21	30,00	0,32
10	5,75	0,11	12,55	0,34	73,50	2,65	54,50	0,18	16,56	0,21

Le rese in DNA sono risultate comprese nel range 5,75-22,3 μg di DNA/200 μl di campione (tabella 7).

Tabella 7. Resa in acidi nucleici totali e valutazione della contaminazione in proteine di estratti da campioni di sangue per il gruppo C e T

Sangue										
<i>Gruppo C</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg DANN/25mg	13,0	8,0	9,7	8,0	8,0	22,0	14,0	17,8	8,5	10,0
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteine	0,18	0,07	0,07	0,03	0,06	0,16	0,13	0,32	0,1	0,03
<i>Gruppo T</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
μg DANN/25mg	7,5	11,0	22,3	5,75	8,75	16,8	14,5	18,3	8,8	11,4
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ proteine	0,04	0,1	0,21	0,05	0,09	0,26	0,11	0,22	0,07	0,18

Infine, i campioni del contenuto duodenale e cecale prelevati dal gruppo C hanno fornite rese, espresse in μg di DNA/100 mg di campione, leggermente superiori rispetto a quelle registrate per il gruppo T, che è risultato anche possedere contenuti di proteine contaminanti più elevati (tabella 8).

L'estrazione di DNA dalle feci prelevate dall'ampolla rettale di entrambi i gruppi di coniglio ha presentato rese migliori (11,25-65 μg di DNA/250 mg di campione) rispetto agli altri due contenuti, ma leggere differenze sono emerse tra il gruppo C e quello T: in particolare, il primo ha fornito rese migliori, sia in termini di quantità che di qualità, rispetto al secondo (tabella 8).

Tabella 8. Resa in acidi nucleici totali e valutazione della contaminazione in proteine di estratti dal duodeno, cieco e feci per il gruppo C e T

n. coniglio	Duodeno		Cieco		Feci	
	µg DNA/ 100mg	µg/µl proteine	µg DNA/ 100mg	µg/µl proteine	µg DNA/ 250mg	µg/µl proteine
<i>Gruppo C</i>						
1	8,25	0,10	53,75	0,20	36,25	0,10
2	20,5	0,16	53,00	0,25	45,00	0,10
3	2,00	0,13	31,75	0,13	57,75	0,15
4	3,00	0,10	44,25	0,11	65,00	0,10
5	3,75	0,15	38,75	0,12	39,00	0,21
6	0,25	0,16	24,50	0,11	16,00	0,08
7	6,55	0,18	46,50	0,25	32,75	0,21
8	4,50	0,14	39,50	0,12	40,00	0,22
9	0,75	0,16	25,00	0,19	18,00	0,20
10	17,5	0,10	51,00	0,12	44,50	0,21
<i>Gruppo T</i>						
1	3,00	0,32	21,50	0,11	23,00	0,23
2	2,75	0,30	15,50	0,17	24,50	0,65
3	2,75	0,28	38,75	0,25	36,25	0,17
4	0,50	0,20	13,75	0,32	11,25	0,18
5	3,75	0,20	23,25	0,11	49,25	0,60
6	3,00	0,32	24,50	0,64	33,50	0,13
7	3,25	0,26	18,50	0,32	44,00	0,12
8	4,00	0,35	28,75	0,12	52,50	0,18
9	2,89	0,40	24,50	0,54	23,00	0,14
10	0,90	0,22	14,20	0,44	12,53	0,18

Un indice della purezza di una preparazione di acidi nucleici è dato dal rapporto 260/280 nm ottenuto dalla lettura spettrofotometrica del campione stesso. In tabella 9 sono riportati i rapporti 260/280 nm ottenuti dopo lettura allo spettrofotometro per il gruppo C e T. Per entrambi i gruppi, i valori ottenuti per i campioni di sangue, tessuto muscolare e contenuti del duodeno sono per la maggior parte dei

casi inferiori a 1,7. Al contrario, tutti gli altri campioni hanno fornito rapporti superiori a 1,7, ad indicare una buona qualità degli estratti.

Tabella 9. Rapporto 260/280nm di estratti di acidi nucleici (gruppo C e T)

n. coniglio	Sangue	Muscolo	Rene	Milza	Fegato	Cuore	Duodeno	Cieco	Feci
<i>Gruppo C</i>									
1	1,67	1,56	1,70	1,74	1,71	1,68	1,68	1,77	1,76
2	1,66	1,62	1,70	1,72	2,00	1,66	1,75	1,78	1,77
3	1,58	1,64	1,72	1,72	1,87	1,62	1,40	1,82	1,83
4	1,68	1,70	1,65	1,70	1,81	1,90	1,30	1,76	1,77
5	1,68	1,75	1,65	1,75	1,65	1,75	1,30	1,80	1,78
6	1,67	1,62	1,67	1,80	1,70	1,72	1,00	1,74	1,70
7	1,65	1,70	1,70	1,75	1,80	1,70	1,56	1,80	1,82
8	1,66	1,80	1,65	1,72	1,80	1,66	1,66	1,70	1,70
9	1,68	1,71	1,70	1,80	1,80	1,69	1,20	1,75	1,74
10	1,67	1,68	1,70	1,76	1,85	1,70	1,70	1,80	1,70
<i>Gruppo T</i>									
1	1,69	1,60	2,32	171,00	1,84	1,65	1,20	1,62	1,60
2	1,74	1,56	1,72	1,73	1,74	1,67	1,30	1,56	1,67
3	1,64	1,61	1,93	1,75	1,70	1,73	1,20	1,75	1,82
4	1,60	1,66	1,75	1,75	1,70	1,68	1,50	1,77	1,71
5	1,68	1,70	1,72	1,77	1,70	1,76	1,20	1,73	1,75
6	1,78	1,72	1,78	1,75	1,70	1,66	1,30	1,77	1,70
7	1,70	1,65	1,78	1,77	1,74	1,70	1,55	1,67	1,70
8	1,70	1,70	1,80	1,75	1,72	1,70	1,60	1,70	1,70
9	1,69	1,68	1,72	1,71	1,74	1,68	1,50	1,76	1,77
10	1,70	1,66	1,72	1,73	1,70	1,70	1,65	1,70	1,80

Real time PCR e Primers

Le amplificazioni sono state effettuate con lo strumento real time PCR, dotato di un software per gestire i dati. Lo strumento è stato programmato per effettuare i seguenti passaggi termici:

- 5 minuti a 50°C;
- 10 minuti a 94°C;
- 40 cicli costituiti da:
 - 20 secondi a 95°C;
 - 1 minuto a 60°C.

Inoltre, tutte le reazioni sono state sottoposte ad un protocollo di dissociazione come previsto dal software per analizzare le curve di melting. Sono stati scelti i seguenti primers universali (alto numero di copie), vegetale ed animale, rispettivamente (tabella 10): Clor1/Clor2, che amplificano per una piccola regione del t-RNA della leucina (*trnL*), presente come gene housekeeping di riferimento nei genotipi convenzionali e transgenici ed utilizzato per avere un marcatore in grado di valutare la presenza di DNA vegetale (Terzi *et al.*, 2004); UNIV P/UNIV Q, che amplificano per una regione conservata del gene mitocondriale codificante per l'**rRNA 16S** di mammifero (Sawyer *et al.*, 2004), utilizzato per verificare l'efficienza della PCR. Per quanto riguarda i primers specie-specifici (basso numero di copie), (tabella 26): Le1-5/Le1-3, che amplificano per il gene endogeno della **lectina** di soia (Kuribara *et al.*, 2002); 35S-1/35S-2, che amplifica per una regione del promotore **35S** del virus del mosaico del cavolfiore (CMV) (documento CEN, 2000) per la soia f.e. transgenica.

Tabella 10. Coppie di primers utilizzate per la PCR end point e la ricerca di geni specifici

Primer	Sequenza 5'-3'
Clor1	TTCCAGGGTTTCTCTGAATTTG
Clor2	TATGGCGAAATCGGTAGACG
UNIV P	GGTTTACGACCTCGATGTTG
UNIV Q	CCGGTCTGAACTCAGATCAC
Le1-5	GCCCTCTACTCCACCCCA
Le1-3	GCCCATCTGCAAGCCTTTT
35S-1	GCTCCTACAAATGCCATCA
35S-2	GATAGTGGGATTGTGCGTCA

Per verificare l'amplificabilità del DNA estratto dai diversi campioni, sono state allestite reazioni di PCR real time con sonda SYBR® GREEN utilizzando la coppia di primers UNIV P/UNIV Q, che amplifica per una regione conservata del gene mitocondriale codificante per l'rRNA 16S di mammifero (Sawyer *et al.*, 2004). L'identificazione dei prodotti della PCR è stata eseguita attraverso analisi delle curve di *melting* ottenute a fine reazione (figura 7).

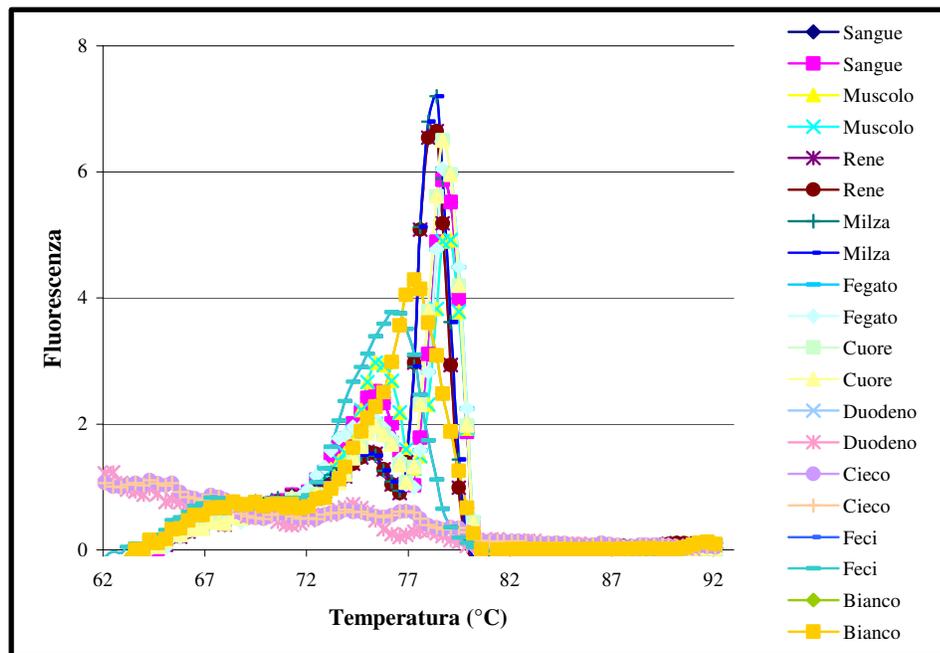


Figura 7. Curve di melting ottenute con la coppia di primers UNIV P e UNIV Q; Bianco: controllo negativo

Sugli stessi campioni è stata ricercata la sequenza del gene cloroplastico (*trnL*) ad alto numero di copie (Terzi *et al.*, 2004).

In dettaglio, la figura 8 evidenzia la presenza del DNA cloroplastico nella maggior parte dei campioni di DNA analizzati, in particolare nel

rene, nel fegato, nel muscolo, nella milza e nel sangue dei due gruppi di conigli.

Infine, sequenze cloroplastiche sono state ritrovate soprattutto nel contenuto dell'ultimo tratto dell'intestino (ampolla rettale).

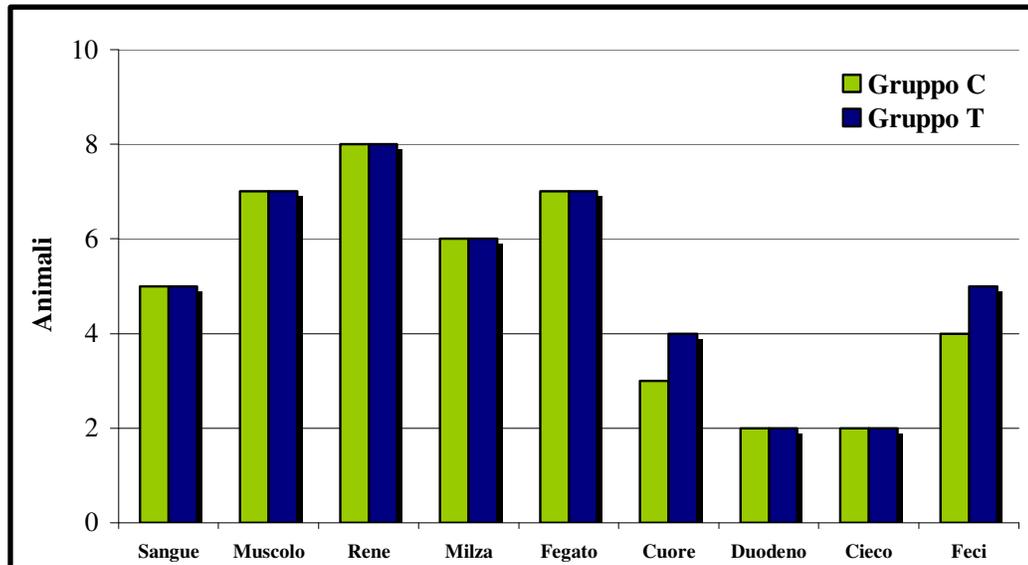


Figura 8. Ricerca della sequenza cloroplastica mediante la coppia di primers Clor1 e Clor2 nei diversi campioni del gruppo C e T

Per la ricerca della sequenza vegetale ad alto numero di copie sono state analizzate le curve di *melting* (figura 9 e 10) ottenute con la coppia di primers Clor1/Clor2 rispettivamente per il gruppo C e T.

In dettaglio, le figure evidenziano la presenza della sequenza cloroplastica nei campioni di DNA estratto da muscolo ed organi, sequenza che non sempre è presente nel sangue.

Per i campioni di DNA estratto dal contenuto intestinale, è, invece, possibile osservare la presenza di tale sequenza soprattutto nelle feci.

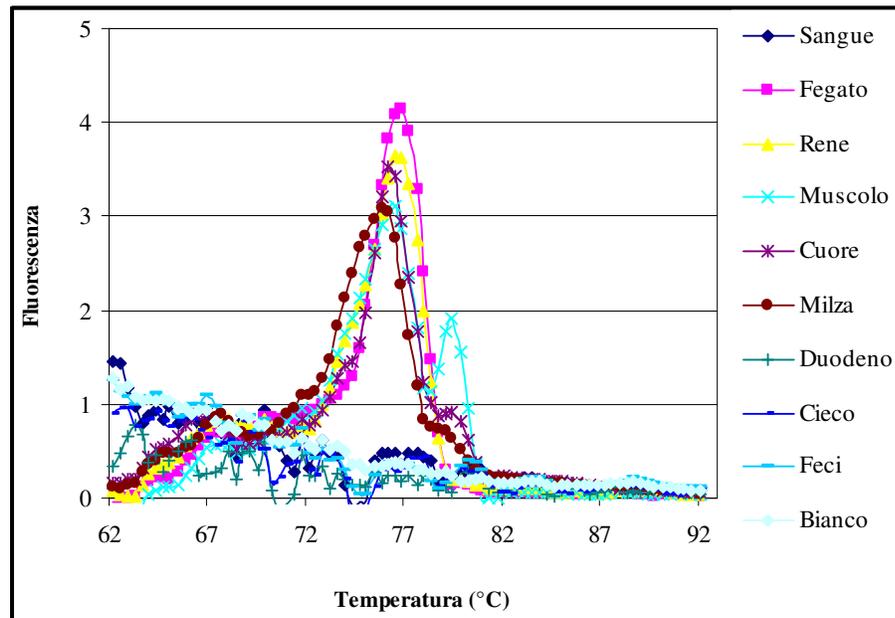


Figura 9. Curve di *melting* ottenute con la coppia di primer Clor1/Clor2 per il gruppo C; Bianco: controllo negativo

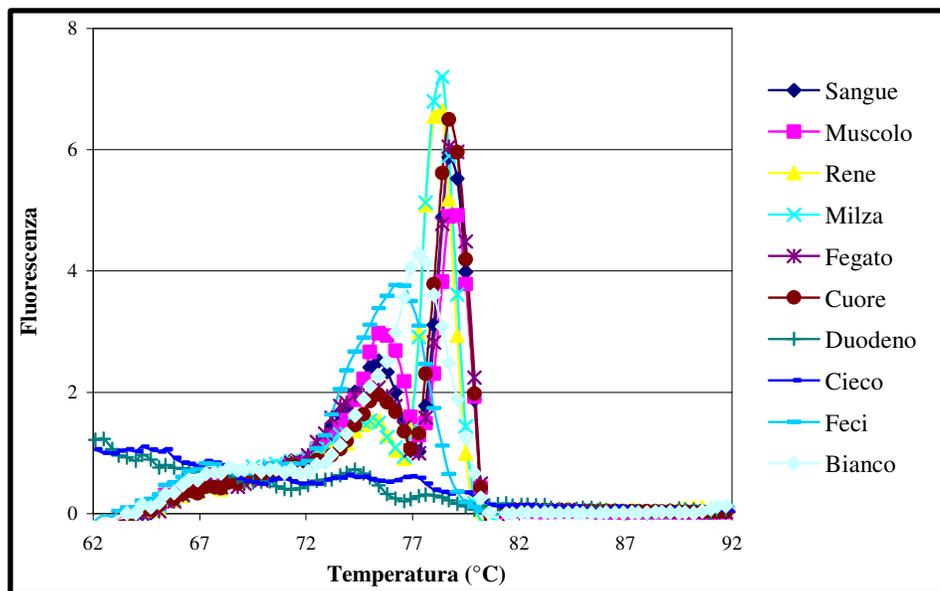


Figura 10. Curve di *melting* ottenute con la coppia di primer Clor1/Clor2 per il gruppo T; Bianco: controllo negativo

Sono state allestite, infine, una serie di reazioni di PCR real time con sonda SYBR® GREEN per l'identificazione di sequenze specie-specifiche a partire dai campioni risultati positivi per la presenza della sequenza cloroplastica. Nessuna reazione di amplificazione con le due coppie di primers (Le1-5 e Le1-3 e 35S-1 e 35S-2) è stata ottenuta sui campioni prelevati dai conigli alimentati con la soia f.e. convenzionale (gruppo C) e con quella transgenica (gruppo T).

In figura 11 sono riportate alcuni esempi di curve di amplificazione ottenute dai campioni provenienti dai conigli appartenenti al gruppo C, utilizzando la coppia di primers Le1-5 e Le1-3 (Kuribara *et al.*,2002).

In nessun campione è stato possibile amplificare la sequenza corrispondente alla lectina di soia, che invece è risultata presente nel campione di controllo di soia f.e.

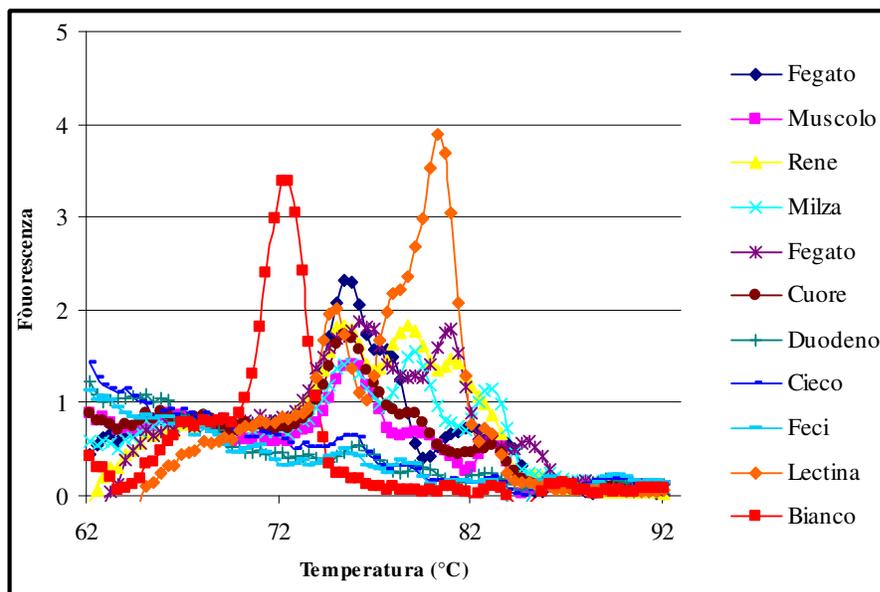


Figura 11. Curve di *melting* ottenute con la coppia di primers Le1-5 e Le1-3 per il gruppo C; Bianco: controllo negativo

Infine, per l'identificazione del promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore, è stata utilizzata la coppia di primers 35S-1 e 35S-2 (figura 12).

In nessun campione, proveniente dal gruppo di conigli alimentato con soia f.e. geneticamente modificato, è stato possibile osservare la curva di amplificazione, presente solamente nel campione di controllo (soia f.e. transgenica).

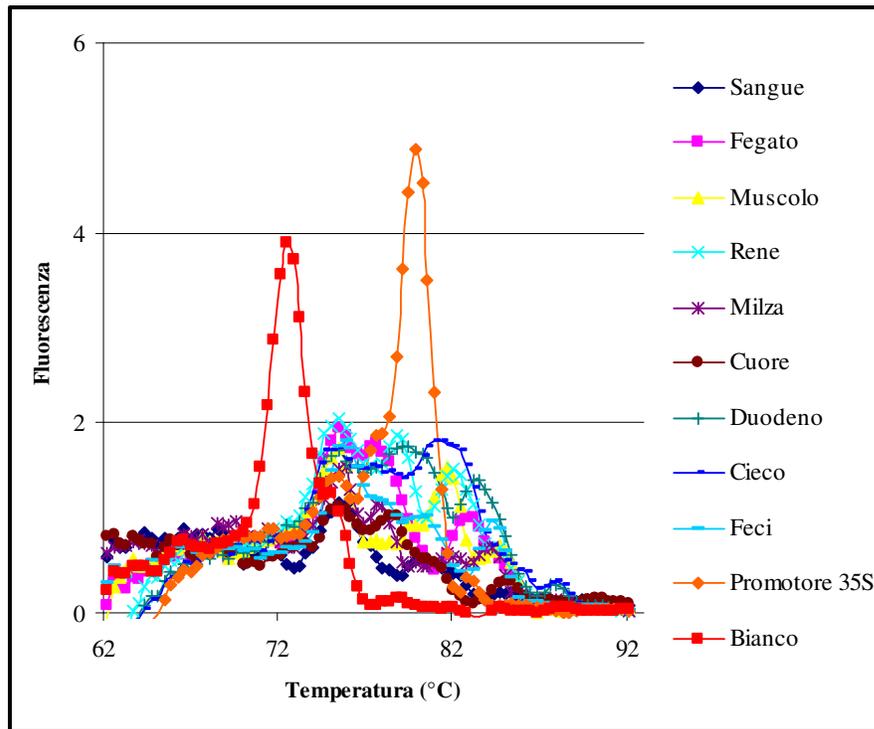


Figura 12. Curve di *melting* ottenute con la coppia di primers 35S-1 e 35S-2 per il gruppo T; Bianco: controllo negativo

Attività enzimatiche

Le attività enzimatiche sono state valutate nel siero ed in omogenati di tessuto. A tal scopo, un grammo di tessuto è stato posto in un buffer contenente (in mM): 280 mannitolo, 10 KCL 1 MgCl₂, 0,2 Pefabloc SC, 10 Hepes, e successivamente portato a pH 7.0 con Tris.

I campioni sono stati omogenati (Ultra-Turrax) e successivamente centrifugati a 10000 x g per 10 minuti, il surnatante è stato utilizzato per le analisi.

L'attività degli enzimi aspartatoaminotransferasi (AST), alaninaminotransferasi (ALT), creatinasi (CK), gamma glutamyltransferasi (GGT), fosfatasi alcalina (ALP) e lattico deidrogenasi (LDH) sono state determinate spettrofotometricamente utilizzando reagenti della Spinreact SA.

I risultati sono stati espressi come media±deviazione standard. Le differenze nei livelli enzimatici tra i gruppi sono state analizzate utilizzando lo Student's T test. Le attività enzimatiche seriche nei due gruppi non hanno mostrato differenze significative. La figura 13 mostra i livelli enzimatici riscontrati nel cuore, muscolo scheletrico, rene e fegato. Differenze statisticamente significative ($P \leq 0,05$) sono state rilevate nel rene per ALT, GGT ed LDH. Quest'ultima risultava statisticamente aumentata anche nel cuore dei conigli alimentati con soia transgenica. Nessuna differenza statistica è stata trovata nel fegato e nel muscolo scheletrico.

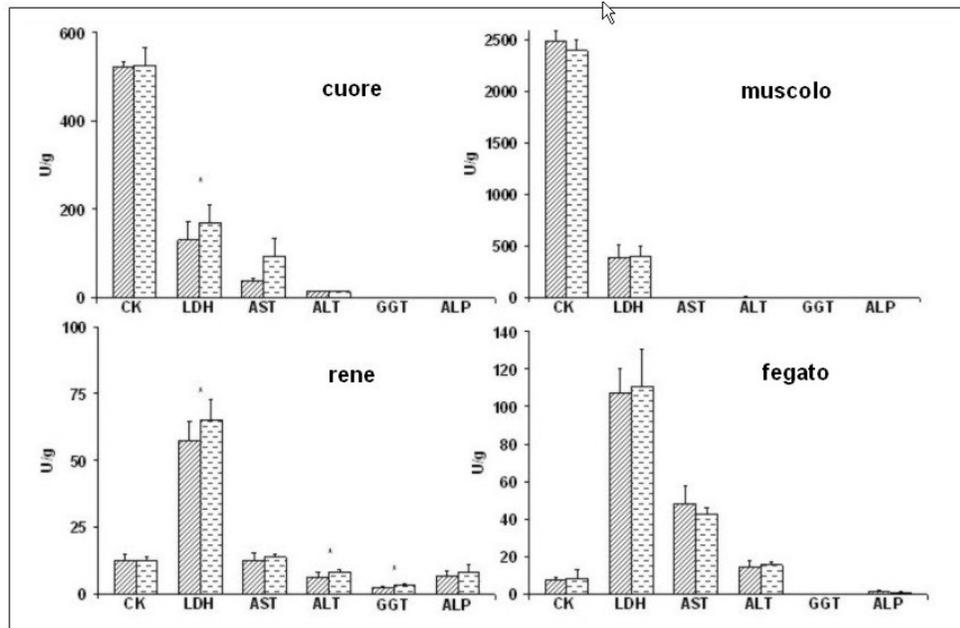


Figura 13. Livelli enzimatici riscontrati nel cuore, muscolo scheletrico, rene e fegato

La tabella 11 mostra la distribuzione relativa agli isoenzimi LDH nel siero e nei tessuti.

Tabella 11. Distribuzione relativa agli isoenzimi LDH nel siero e nei tessuti

Tessuto	gruppo	LDH totale	Distribuzione degli isoenzimi LDH (U/g)				
			LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
siero (U/L)	C	614,8±204,2	15,6±6,4	31,8±10,3	37,8±10,8	139±33,2	390,6±146,4
	T	646,8±189,6	17,3±4,3	34,9±12,6	40,2±11	154,9±42,6	399,5±122,8
cuore (U/g)	C	129,9±34,6	122,5±31,9	3,9±2,1	1,5±1,1	0,9±0,5	1,1±0,5
	T	168,8±19,2*	153,5±18*	6,6±1,4*	2,7±1,6	1,9±2,2	1,9±1,7
muscolo (U/g)	C	385,3±127,3	-	-	-	-	385,3±127,3
	T	398,9±107,1	-	-	-	-	398±107,1
rene (U/g)	C	57,5±6,8	34,4±4	13,4±1,2	6,1±0,9	1,6±0,8	1,6±0,9
	T	65,2±7,3*	41,4±4,6*	15,1±2,3	5±1,6	1,3±0,5	1,3±0,5
fegato (U/g)	C	107,5±12,6	54,9±5,9	20,4±2,5	13,1±3,5	9,9±3,9	9,3±3,9
	T	110,5±19,8	63,7±10,3*	19,6±4,6	12,5±3,3	5,3±3,5*	7,4±4,1

*P<0.05 vs controllo

Differenze significative ($P \leq 0,05$) tra il gruppo di controllo e quello trattato sono state evidenziate per il cuore (LDH1 e LDH2), per il rene (LDH1) e per il fegato (LDH1 e LDH4).

Verifica della sequenza cloroplastica amplificata

Per verificare la sequenza, i prodotti di amplificazione sono stati analizzati nel seguente modo:

1. Estrazione del DNA dal gel d'agarosio

prodotti di amplificazione (circa 20 μ l) ottenuti con la coppia di primers Clor1 e Clor2, a partire da sangue, tessuto muscolare ed organi di tutte e tre le prove sono stati caricati su gel d'agarosio 2.5% in TBE 1x per verificarne la specificità. Ai campioni sono stati aggiunti circa 3 μ l di loading buffer 6x (Bromphenol blue – Xylene cyanole dye solution). Il campione così ottenuto è analizzato su gel con un marcatore di peso molecolare noto (1 kb DNA Ladder), per poter valutare la lunghezza delle bande.

L'agarosio è stato sciolto in TBE 1x (89 mM Tris borato, pH 8.3, 0.2 mM EDTA) e lasciato raffreddare in apposito stampo con idoneo pettine per la formazione dei pozzetti. Durante la preparazione dei gel è stato aggiunto anche bromuro di etidio (EtBr), per visualizzare mediante esposizione a luce ultravioletta le bande sul gel.

L'elettroforesi è stata effettuata in celle elettroforetiche orizzontali, applicando un voltaggio di 100 volts per circa 1 ora. Quindi, il gel è stato osservato direttamente su transilluminatore UV, corredato di software; e l'immagine del gel è stata digitalizzata mediante una telecamera.

La banda corrispondente al prodotto di amplificazione è stata individuata mediante transilluminatore ed è stata, quindi, ritagliata dal gel d'agarosio e, successivamente, si è provveduto all'estrazione del DNA utilizzando un kit.

Il pezzetto di gel ottenuto è stato posto in tubo da microcentrifuga da 1.5 ml cui sono stati aggiunti 10 µl di tampone di legame alla membrana per ogni 10 mg di gel ritagliato (precedentemente pesato). Una volta che il gel si è completamente sciolto a 60°C, la miscela è stata inserita nella colonna presente nel kit e lasciata per 1 minuto a temperatura ambiente.

Previa centrifugazione per 1 minuto a 7000 rpm, la colonna è stata lavata due volte con 700 µl e 500 µl di tampone di lavaggio disciolto in etanolo e, quindi, centrifugata prima per 1 minuto e poi per 5 minuti a 7000 rpm. In seguito, sono stati aggiunti 50 µl di H₂O distillata sterile e, dopo centrifugazione per 1 minuto a 7000 rpm, il DNA estratto, completamente purificato, è stato raccolto in provetta sterile da 1.5 ml.

Nelle figure 14, 15, 16 e 17 sono riportate alcuni esempi di prodotti di amplificazione ottenuti con la coppia di primers Clor1 e Clor2 rispettivamente per i campioni di bufalo, conigli della prima e quelli della seconda prova. La banda è stata ritagliata dal ogni gel e, successivamente, si è provveduto all'estrazione del DNA.

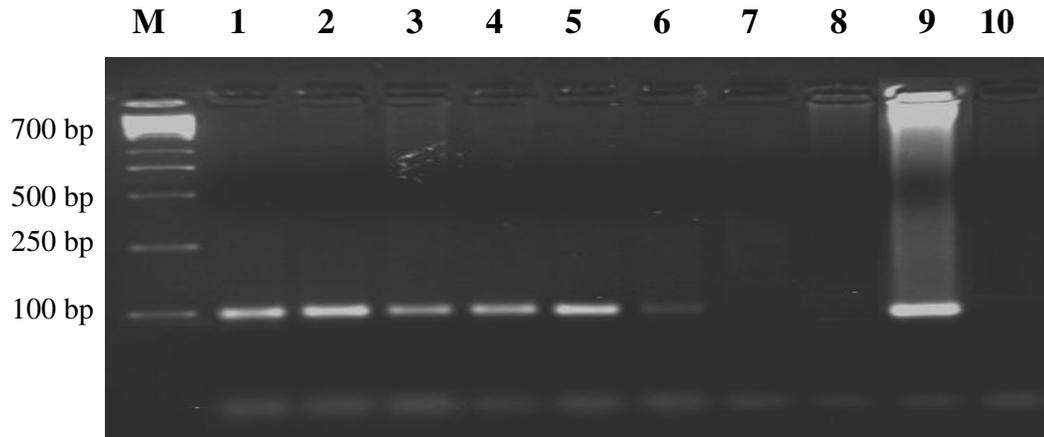


Figura 14. Analisi elettroforetica di amplificazione di campioni di bufalo, utilizzando la coppia di primers Clor1 e Clor2
 L'ordine dei campioni è il seguente: M = 1 kb DNA ladder; 1 = sangue; 2 = muscolo; 3 = rene; 4 = fegato; 5 = milza; 6 = contenuto ruminale; 7 = contenuto del tratto digiuno-ileo; 8 = contenuto del tratto del grosso intestino; 9 = mais; 10 = controllo negativo

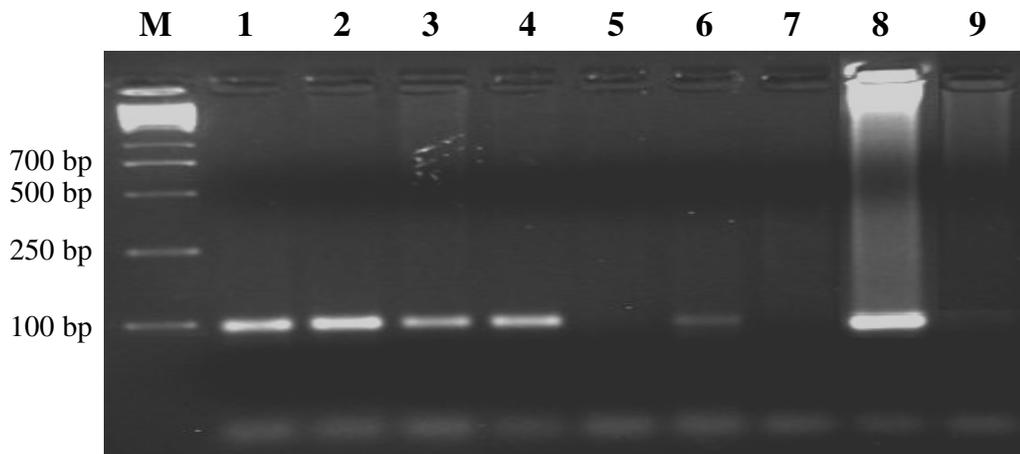


Figura 15. Analisi elettroforetica di amplificazione di campioni di conigli del gruppo M, utilizzando i primers Clor1 e Clor2
 L'ordine dei campioni è il seguente: M = 1 kb DNA ladder; 1 = fegato; 2 = muscolo; 3 = rene; 4 = milza; 5 = sangue; 6 = feci; 7 = contenuto cecale; 8 = mais; 9 = controllo negativo

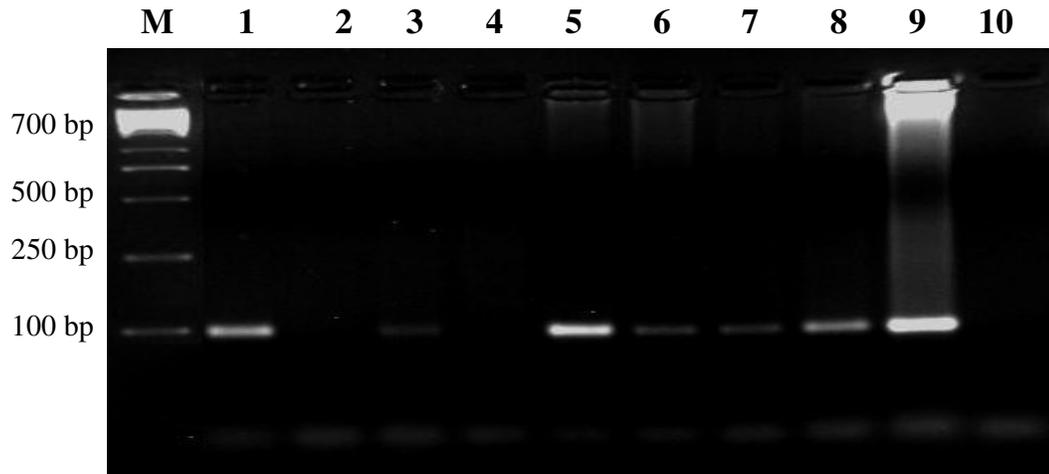


Figura 16. Analisi elettroforetica di amplificazione di campioni di conigli del gruppo C, utilizzando la coppia di primers Clor1 e Clor2
L'ordine dei campioni è il seguente: M = 1 kb DNA ladder; 1 = fegato; 2 = contenuto del digiuno; 3 = contenuto cecale; 4 = feci; 5 = muscolo; 6 = rene; 7 = sangue; 8 = milza; 9 = mais; 10 = controllo negativo

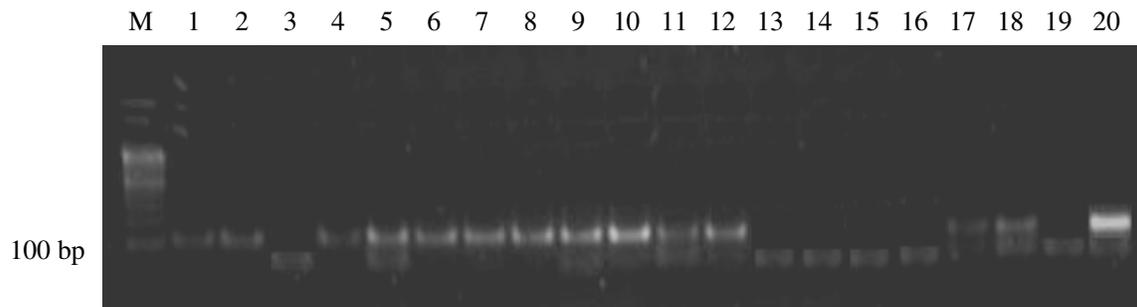


Figura 17. Analisi elettroforetica di amplificazione di campioni di conigli del gruppo A e B, utilizzando i primers Clor1 e Clor2
L'ordine dei campioni è il seguente: M = 100 bp DNA ladder; 1 = muscolo A; 2 = milza A; 3 = sangue A; 4 = cuore A; 5 = fegato A; 6 = rene A; 7 = cuore B; 8 = fegato B; 9 = rene B; 10 = milza B; 11 = sangue B; 12 = muscolo B; 13 = duodeno A; 14 = duodeno B; 15 = cieco A; 16 = cieco B; 17 = feci A; 18 = feci B; 19 = controllo negativo; 20 = soia f.e.

2. Preparazione dei campioni al sequenziamento

Le reazioni per il sequenziamento sono state preparate usando Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA). Il kit sfrutta le proprietà dell'enzima AmpliTaq DNA PolymeraseFS, variante dell'enzima *Thermus aquaticus* DNA polymerase, e contiene i reagenti sotto elencati:

- A-Dye Terminator marcato con dichloro (R6G);
- C-Dye Terminator marcato con dichloro(ROX);
- G-Dye Terminator marcato con dichloro(R110);
- T-Dye Terminator marcato con dichloro(TAMRA);
- Deossinucleosidi trifosfati (dATP, dCTP, dITP, dUTP);
- AmpliTaq DNA Polymerasi, FS;
- MgCl₂
- Tris-HCl buffer, pH 9.0.

I desossiribonucleotidi marcati si legano a strutture contenenti donatori di fluorescina, collegate a specifici accettori. Il donatore di fluorescina è ottimizzato per assorbire l'energia di eccitazione degli ioni argon del laser del sequenziatore.

Per ogni reazione sono stati utilizzati:

- 1 ng di DNA plasmidico;
- 4 µl di Terminator Ready Reaction Mix;
- 4 µl di buffer 2.5x (5 mM MgCl₂, 200 mM Tris pH 9);
- 3 µl di primer Clor1;
- H₂O a volume (20 µl).

I campioni, così preparati, sono stati amplificati in un thermal cycler. Il programma applicato prevede 25 cicli con i seguenti passaggi termici:

- 10 secondi a 96 °C;
- 5 secondi a 50 °C;
- 4 minuti a 60 °C.

Al termine della reazione, i campioni sono stati purificati con un sistema di filtrazione Multiscreen. Tale sistema prevede l'impiego di piastre da 96 pozzetti, dotate di membrana filtrante, cui viene aggiunta resina Sephadex G-50, in grado di trattenere i soli nucleotidi liberi e non DNA. Le piastre di filtrazione MultiScreen complete di resina sono state prima idratate con 300 µl di H₂O sterile per almeno 3 ore e, successivamente, centrifugate per 5 minuti a 2200 rpm. L'H₂O d'idratazione è stata raccolta in una seconda piastra, identica alla prima ma priva di filtri, posta immediatamente al di sotto. Dopo centrifugazione (per 5 minuti a 2200 rpm), la piastra è stata posta su una terza piastra sterile, per il recupero dei campioni purificati.

Sul Sephadex sono stati caricati prima 20 µl di H₂O sterile e successivamente i campioni da purificare. Si è centrifugato nuovamente per 5 minuti a 2200 rpm. I campioni così ottenuti sono stati posti in tubi opportunamente numerati ed essiccati su evaporatore rotante. Ai campioni sono stati aggiunti 20 µl di TSR, un denaturante contenente formammide. Ciascun campione è stato agitato su vortex accuratamente, in modo da ottenerne la completa risospensione. I campioni sono stati quindi denaturati in un thermal

cycler ad una temperatura di 92°C per 3 minuti, in modo da evitare l'appaiamento delle copie di DNA a singolo filamento. Dopo la denaturazione, i campioni sono stati conservati a +4°C.

Sequenziamento

Il sequenziamento è stato effettuato avvalendosi di un sequenziatore automatico capillare, utilizzando il polimero POP-6 e capillari di tipo 310 Genetic Analyzer (5-47 cm x 50 µm) a tale scopo sono state eseguite le seguenti operazioni.

1. Preparazione dello strumento

- accurato lavaggio con H₂O distillata filtrata di tutte le parti della macchina destinate ad ospitare il polimero durante la successiva elettroforesi;
- posizionamento del capillare;
- caricamento buffer di corsa (310 Genetic Analyzer Buffer, PE Applied Biosystem) negli alloggiamenti all'estremità libera del capillare;
- calibrazione dello strumento;
- pre-riscaldamento.

2. Preparazione dei files

Nel software Data Collection dello strumento sono contenute le informazioni circa le caratteristiche della corsa elettroforetica, quali durata (40'), temperatura (60°C) e voltaggio (15000 v).

E' stata preparata, per ogni corsa, una Sample Sheet, che consente di associare il nome del campione alla sua posizione

nel vassoio di caricamento ed una Injection List, che specifica l'ordine di corsa dei campioni, il modulo e le condizioni di corsa per ogni iniezione.

3. Caricamento dei campioni.

I campioni, preparati come già descritto, sono stati collocati negli appositi alloggiamenti del vassoio di caricamento, fissati e parzialmente chiusi. Il vassoio è stato quindi posizionato all'interno dello strumento.

4. Corsa elettroforetica.

Al raggiungimento delle condizioni prefissate di temperatura e funzionalità del laser, i campioni sono stati iniettati in modo sequenziale, secondo l'ordine stabilito dall'operatore, nel capillare e sottoposti a corsa elettroforetica. L'iniezione del campione è avvenuta mediante alto voltaggio. Il POP-6 era rinnovato dopo ogni corsa iniettandolo nel capillare automaticamente. I dati sono stati rilevati in tempo reale quando i campioni, durante la corsa elettroforetica, attraversavano la finestra del capillare, attraverso la quale il laser può eccitare i fluorofori dei campioni. La fluorescenza emessa è stata rilevata da una camera simultaneamente per tutte le lunghezze d'onda comprese tra 525 e 680 nm. Tali dati grezzi sono stati raccolti dal software Data Collection dello strumento ed immagazzinati nell'hard disk: poiché i campioni sono stati caricati individualmente, ad ognuno corrispondeva un sample file.

5. Elaborazione dei dati.

I dati così raccolti sono stati analizzati mediante il software DNA Sequencing Analisi, in grado di nominare le basi e identificarne l'ordine; tale software inoltre evidenzia eventuali ambiguità, quali la simultanea presenza di due basi nella stessa posizione.

Dopo l'analisi, il software produce due tipi di files:

- un Sample file, che contiene, per ogni campione, le informazioni scritte nel Sample Sheet, i dati grezzi relativi alla corsa ed i dati elaborati come cromatogramma e sequenza;
- un SEQ file, che mostra la sola sequenza che può essere trasformata a sua volta in diversi formati, quali, per esempio, il formato FASTA, conveniente per analisi di omologia in banca dati.

Analisi di omologia di sequenza

La sequenza del gene cloroplastico *trnL* in formato FASTA è stata confrontata con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nelle banche dati internazionali per la ricerca di omologia di sequenza. La ricerca è stata effettuata utilizzando il programma BLAST (Altschul et al., 1997), con l'algoritmo BLASTN sulle sequenze nucleotidiche non ridondanti di EMBL, GenBank, DDBJ.

I risultati della ricerca sono riportati in figura 18, in cui è indicata la distribuzione dei 100 migliori allineamenti ottenuti tra la sequenza sottoposta ad analisi e tutte le sequenze contenute nel GenBank. Uno score tra 80 e 200 è stato considerato indicativo di omologia significativa. Le sequenze che hanno prodotto allineamenti significativi si riferiscono al gene vegetale tRNA della Leucina (*trnL*), confermando l'identità supposta delle bande amplificate su gel.



results of BLAST

BLASTN 2.2.10 [Oct-19-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1101056613-32324-183049744696.BLASTQ4

Query=

(53 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
2,725,056 sequences; 12,295,241,066 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

[Taxonomy reports](#)

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

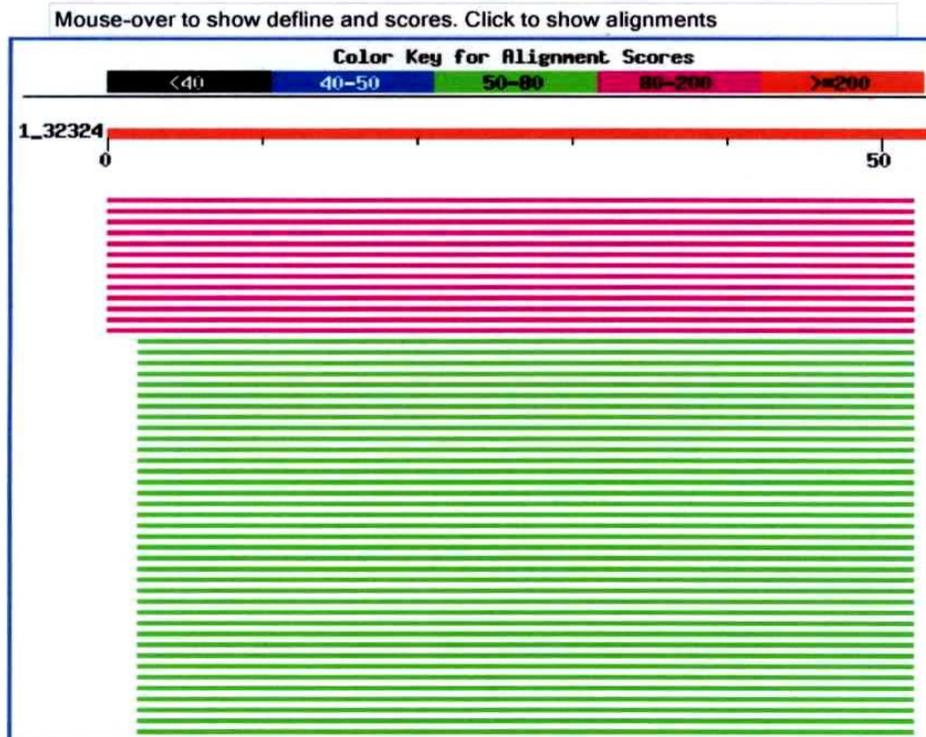


Figura 18. Ricerca di omologia in GenBank (continua)

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gi 40714434 dbj AB113793.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714437 dbj AB113796.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714436 dbj AB113795.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714435 dbj AB113794.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714433 dbj AB113792.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714432 dbj AB113791.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714431 dbj AB113790.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714430 dbj AB113789.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714429 dbj AB113788.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714428 dbj AB113787.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714427 dbj AB113786.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714426 dbj AB113785.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 40714425 dbj AB113784.1 	<i>Tristicha trifaria</i>	chloroplast ...	<u>84</u>	2e-14
gi 45771905 emb AJ551271.1 BPO551271	<i>Buddleja polystachya</i>	c...	<u>80</u>	4e-13
gi 45581226 emb AJ550528.1 LTR550528	<i>Lyperia tristis</i>	chloro...	<u>80</u>	4e-13
gi 45581225 emb AJ550527.1 LTR550527	<i>Lyperia tristis</i>	chloro...	<u>80</u>	4e-13
gi 45581223 emb AJ550525.1 LGR550525	<i>Limosella grandiflora</i>	...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023601 emb AJ621123.1 	<i>Lyperia antirrhinoides</i>	chloropl...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023600 emb AJ621122.1 	<i>Stilbe vestita</i>	chloroplast trnT...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023599 emb AJ621121.1 	<i>Stilbe rupestris</i>	chloroplast tr...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023598 emb AJ621120.1 	<i>Stilbe ericoides</i>	chloroplast tr...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023597 emb AJ621119.1 	<i>Retzia capensis</i>	chloroplast trn...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023596 emb AJ621118.1 	<i>Nuxia oppositifolia</i>	chloroplast...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023595 emb AJ621117.1 	<i>Nuxia oppositifolia</i>	chloroplast...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023594 emb AJ621116.1 	<i>Nuxia floribunda</i>	chloroplast tr...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023593 emb AJ621115.1 	<i>Nuxia congesta</i>	chloroplast trnT...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023592 emb AJ621114.1 	<i>Nuxia congesta</i>	chloroplast trnT...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023591 emb AJ621113.1 	<i>Kogelbergia verticillata</i>	chloro...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023589 emb AJ621111.1 	<i>Ixianthes retzioides</i>	chloroplas...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023588 emb AJ621110.1 	<i>Halleria ovata</i>	chloroplast trnT...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023587 emb AJ621109.1 	<i>Halleria lucida</i>	chloroplast trn...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023586 emb AJ621108.1 	<i>Halleria elliptica</i>	chloroplast ...	<u>80</u>	4e-13
gi 41023585 emb AJ621107.1 	<i>Campylostachys cernua</i>	chloropla...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650850 emb AJ719191.1 	<i>Fadogia elskensii</i>	chloroplast p...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650490 emb AJ620184.1 	<i>Vangueria madagascariensis</i>	chlo...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650489 emb AJ620183.1 	<i>Vangueriopsis</i>	cf. longiflora Lu...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650488 emb AJ620182.1 	<i>Canthium stenosepalum</i>	chloropla...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650487 emb AJ620181.1 	<i>Vangueria parvifolia</i>	chloroplas...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650486 emb AJ620180.1 	<i>Vangueria infausta</i>	chloroplast ...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650485 emb AJ620179.1 	<i>Vangueria apiculata</i>	chloroplast...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650483 emb AJ620177.1 	<i>Tapiphyllum cinerascens</i>	chlorop...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650482 emb AJ620176.1 	<i>Scyphochlamys revoluta</i>	chloropl...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650481 emb AJ620175.1 	<i>Rytigynia senegalensis</i>	chloropl...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650480 emb AJ620174.1 	<i>Canthium mrimaense</i>	chloroplast ...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650479 emb AJ620173.1 	<i>Rytigynia fuscotulosa</i>	chlorop...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650478 emb AJ620172.1 	<i>Canthium bugoyense</i>	chloroplast ...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650477 emb AJ620171.1 	<i>Rytigynia bagshawei</i>	chloroplast...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650476 emb AJ620170.1 	<i>Robynsia glabrata</i>	chloroplast t...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650475 emb AJ620169.1 	<i>Pyrostria phyllantoidea</i>	chlorop...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650472 emb AJ620166.1 	<i>Pygmaeothamnus zeyheri</i>	chloropl...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650470 emb AJ620164.1 	<i>Psydrax</i>	sp. A Luke and Luke 903...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650469 emb AJ620163.1 	<i>Psydrax schimperiana</i>	chloroplas...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650468 emb AJ620162.1 	<i>Psydrax parviflora</i>	chloroplast ...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650467 emb AJ620161.1 	<i>Psydrax obovata</i>	chloroplast trn...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650465 emb AJ620159.1 	<i>Psydrax locuples</i>	chloroplast tr...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650464 emb AJ620158.1 	<i>Psydrax livida</i>	chloroplast trnT...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650463 emb AJ620157.1 	<i>Psydrax kraussioides</i>	chloroplas...	<u>80</u>	4e-13
gi 55650462 emb AJ620156.1 	<i>Pseudopeponidium asosa</i>	chloropl...	<u>80</u>	4e-13

Figura 19. (continua)

☐ >[gi|40714437|dbj|AB113796.1](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: TA225 (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1147

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 533 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 482

☐ >[gi|40714436|dbj|AB113795.1](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: TA195(the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1132

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 519 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 468

☐ >[gi|40714435|dbj|AB113794.1](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: MD-03(the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1176

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 533 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 482

☐ >[gi|40714433|dbj|AB113792.1](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: MX-01 (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1165

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 524 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 473

Figura 19. (continua)

>[gi|40714432|dbj|AB113791.1|](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: MX-B (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1164

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 525 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 474

>[gi|40714431|dbj|AB113790.1|](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: MX-A (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1164

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 525 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 474

>[gi|40714430|dbj|AB113789.1|](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: BR-29 (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1193

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 533 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 482

>[gi|40714429|dbj|AB113788.1|](#) *Tristicha trifaria* chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: BR-22 (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1165

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||

Figura 19. (continua)

```

>gi|40714428|dbj|AB113787.1| Tristicha trifaria chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: BR18 (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1168

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 529 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 478

>gi|40714427|dbj|AB113786.1| Tristicha trifaria chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: BR-09 (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1166

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 524 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 473

>gi|40714426|dbj|AB113785.1| Tristicha trifaria chloroplast gene for trnL, cc
specimen_voucher: BR-01 (the University of Tokyo
Herbarium)
Length = 1165

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 51/53 (96%), Gaps = 1/53 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1 cctaccaaggctcaatncaattaagtccgtagacgtctaccgatttcgccata 53
|||||
Sbjct: 526 cctaccaaggctcaatccaattaagtccgtag-cgtctaccgatttcgccata 475

```

Figura 19. Ricerca di omologia in GenBank

Discussione

Efficienza di estrazione di DNA

Allo scopo di verificare le caratteristiche quali-quantitative degli acidi nucleici presenti nei campioni in esame, è stata effettuata una preventiva valutazione dell'efficienza di estrazione del DNA.

Tra i diversi campioni - sangue, tessuto muscolare, organi e contenuto dei diversi tratti dell'apparato gastro-enterico - gli organi hanno fornito le rese maggiori. Tra gli organi, la milza ha fornito sempre le rese maggiori, probabilmente per l'elevata presenza in essa di linfociti. I campioni di muscolo provenienti dagli animali che avevano ricevuto con la dieta la soia geneticamente modificata hanno fornito rese migliori. Molto elevate sono risultate le rese di estrazione in questi ultimi campioni con valori mediamente superiori per il gruppo nella cui dieta era presente farina di estrazione di soia convenzionale (40,8 vs 22,32 µg di DNA/100 mg nel cieco e 39,42 vs 30,98 µg di DNA/250 mg nelle feci, rispettivamente per i gruppi A e B). Questi ultimi risultati appaiono in contrasto con quanto registrato per i campioni di muscolo dove i migliori risultati si sono ottenuti nel gruppo alimentato con soia GM.

L'efficienza di estrazione è quindi stata influenzata dalla tipologia del campione, permanendo comunque variabilità anche tra campioni uguali prelevati da animali differenti.

Ricerca della sequenza cloroplastica ad alto numero di copie

La ricerca della sequenza cloroplastica (100 bp), nel tessuto muscolare e nei diversi organi ha fornito risultati positivi. Gli studi

effettuati in merito su altre specie monogastriche hanno fornito risultati contrastanti. Infatti, mentre Klotz *et al.* (2002) e Einspanier *et al.* (2001) rilevarono sequenze cloroplastiche di 199 bp nel muscolo, nel fegato, nella milza e nel rene di polli, Tony *et al.* (2003) e Jennings *et al.* (2003, a) non riuscirono a ritrovare in questa specie animale alcun frammento di DNA esogeno. Va tuttavia rilevato che, in entrambi questi ultimi due casi, la ricerca era stata effettuata su frammenti genici di diversa lunghezza.

Risultati non omogenei vengono riportati anche per la specie suina. Infatti, la ricerca del DNA cloroplastico di 199 bp fornì risultati negativi nel muscolo, nel fegato, nella milza, nei linfonodi e nel sangue (Klotz *et al.*, 2002), mentre il gene *rubisco* (140 bp) ad alto numero di copie fu ritrovato in diversi tessuti (fegato, rene, milza, ghiandole linfatiche, ovaie, muscolo) e nel sangue (Reuter e Aulrich, 2003).

Nella specie cunicola la sequenza è stata rilevata in circa la metà degli animali, ma nei campioni prelevati da tutti i tratti intestinali esaminati.

La presenza di DNA cloroplastico (199 bp) è stata messa in evidenza da Klotz *et al.* (2002) nel contenuto gastrico dei polli. Questi stessi autori ritrovarono frammenti di 199 bp anche nel contenuto gastrico, nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo di maiali, rispettivamente fino a 6, 8, 12 e 4 ore dopo l'ingestione. Chowdhury *et al.* (2003), infine, rivelarono nei contenuti gastrico ed intestinale di maiali alimentati con mais convenzionale il gene *rubisco* di 1028 bp.

Ricerca di sequenze specie-specifiche

Allo scopo di seguire il DNA specie specifico nel sangue, nei tessuti, negli organi e nel contenuto dei diversi tratti gastro-intestinali, la ricerca delle sequenze specie-specifiche ha previsto l'impiego di due coppie di primers in grado di amplificare per piccoli frammenti di geni a singola copia (< 200 bp) presenti nel genoma vegetale della farina di estrazione di soia (soia f.e.) convenzionale e transgenica: Le1-5/Le1-3, che amplificano per il gene della *lectina* (118 bp) e 35S-1/35S-2, che codificano per il promotore 35S di CMV (195 bp). La banda di 118 bp è stata amplificata solo nel campione di controllo di soia f.e., mentre in tutti i campioni provenienti da entrambi i gruppi di animali non è stato possibile mettere in evidenza tale sequenza. Analogamente, la coppia di primers 35S-1/35S-2 non ha prodotto alcun amplicone di 195 bp nei campioni prelevati dai soggetti del gruppo che riceveva farina di estrazione di soia Roundup Ready, mentre quest'ultima ha fornito risultati positivi all'analisi PCR. Anche Khumnirdpetch *et al.* (2001) in polli alimentati con soia GM, non riuscirono a ritrovare frammenti del gene *cp4epsps* nel muscolo, nella pelle e nel fegato. Analogamente, Einspanier *et al.* (2001), in polli alimentati con diete contenenti mais Bt non riuscirono a mettere in evidenza la sequenza *cry1Ab* di 189 bp in diversi organi e nelle uova. Al contrario, nella stessa specie animale, Aeschbacher *et al.* (2002) rilevarono frammenti del gene Bt nel fegato, nella milza e nel muscolo, così come in polli alimentati con mais GM, Chambers *et al.* (2002) ritrovarono il gene marcatore per la resistenza all'ampicillina nel gozzo (100% dei casi) e nello stomaco (40% dei casi), ma non nel contenuto intestinale. La sopravvivenza di questo gene marker non risultò maggiore di quella degli altri geni della pianta, per cui gli

autori conclusero che è molto improbabile che i batteri presenti a livello intestinale dei polli alimentati con mais GM possano acquisire la resistenza agli antibiotici.

Klotz *et al.* (2002), in maiali alimentati con mais GM, non ritrovarono il gene *cry1A(b)* nel contenuto gastrico, nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo dopo, rispettivamente, 6, 8, 12 e 4 ore dall'ingestione; gli autori attribuirono tale risultato negativo al fatto che il transgene è presente in singola copia nel genoma del mais. Al contrario, Chowdhury *et al.* (2003) rivelarono frammenti di 110 - 437 bp del gene *cry1A(b)* nel contenuto intestinale di maiali alimentati con mais Bt11. Reuter e Aulrich (2003), inoltre, ritrovarono dopo 24 ore dall'ingestione, frammenti di 211 bp del gene Bt oltre che nel contenuto intestinale anche in quello gastrico di maiali alimentati con mais GM.

In questo contributo sperimentale, pertanto, negli stessi campioni nei quali è stato possibile mettere in evidenza la sequenza cloroplastica di 100 bp, non si è riusciti a rilevare né il frammento del gene a singola copia *lectina* né il promotore 35S. Tali risultati sono in accordo con quanto riportato da Phipps *et al.* (2003) che, nel latte e nel sangue di bovine, amplificarono la sequenza cloroplastica ma non frammenti di DNA, convenzionale o transgenico, a singola copia. Questi autori, come suggerito da Artim *et al.* (2001), ascrissero tale fenomeno proprio al diverso numero di copie presenti nel genoma vegetale: risulterebbe, infatti, più semplice ritrovare sequenze a copia multipla. Essi, inoltre, non esclusero che la variabilità dei risultati potesse dipendere anche dalla metodica utilizzata. E' pertanto probabile che il risultato negativo da noi

ottenuto possa essere in parte dovuto all'impiego della PCR end point, laddove nei primi due contributi è stata utilizzata la PCR real time, caratterizzata da una maggiore sensibilità rispetto alla prima. Non appare, infine, da escludere che al nostro risultato negativo abbia contribuito anche il tipo di alimento esaminato. Infatti, la ricerca è stata effettuata su un sottoprodotto, quale la farina di estrazione di soia, che ha subito un processo termico. Tale ipotesi è confortata da analoghi risultati ottenuti per la soia f.e. da Jennings *et al.* (2003, b), Klotz e Einspanier (1998) e Phipps *et al.* (2003).

Attività enzimatica

I livelli degli enzimi nel siero non hanno mostrato differenze significative, il che sembrerebbe indicare l'assenza di sofferenze di organo negli animali trattati. Tale risultato è in linea con quegli autori che affermano che l'alimento GM può essere utilizzato per l'alimentazione animale o umana senza significativi rischi per la salute. Di contro, le analisi enzimatiche relative alle attività tissutali mostrano un quadro differente. Come riportato nei risultati, le differenze significative si riscontravano principalmente nel rene, mostrando livelli più elevati di LDH, ALT e GGT negli animali trattati. La mancata alterazione dei livelli serici non permette di rilevare un danno cellulare di entità significativa ma, piuttosto, consente di ipotizzare una alterazione del metabolismo cellulare a livello renale. Inoltre, la LDH è risultata significativamente aumentata anche nel cuore, ancora una volta in presenza di concentrazioni seriche fisiologiche. La distribuzione degli isoenzimi LDH rafforza questo risultato, mostrando differenze significative per LDH1 e LDH2 nel

cuore e LDH1 nel rene. Inoltre, un significativo aumento di questo isoenzima è stato anche rilevato nel fegato, nonostante non fossero state trovate differenze significative per l'attività totale dell'enzima in questo organo.

L'attività della LDH1, quindi, è risultata significativamente aumentata in tre degli organi testati ma, l'assenza di un incremento dei livelli serici suggerisce che tale risultato non indichi uno stato di sofferenza cellulare, piuttosto una alterazione del metabolismo. La LDH1 (H4) favorisce la conversione del lattato in piruvato ed è presente a livello del reticolo sarcoplasmatico, in prossimità dei granuli di glicogeno, ed a livello della membrana mitocondriale. La formazione intracellulare del lattato, invece, è attribuita alla LDH5. L'aumento esclusivo della LDH1, quindi, potrebbe indicare una maggiore necessità di conversione in piruvato destinato poi all'utilizzazione mitocondriale.

Nel loro complesso, i risultati indicano una maggiore sintesi di LDH1 e quindi, potenzialmente, una diversa espressione del gene che ne codifica la formazione. Attribuire tale risultato ad un'alterazione genica indotta da una integrazione di frammenti di DNA geneticamente modificato sarebbe chiaramente una speculazione eccessiva ma, sicuramente, i dati suggeriscono che lo studio degli effetti metabolici degli OGM richiede indagini più approfondite. A sostegno di questa tesi, ricordiamo che altri autori hanno mostrato che, in seguito a diete OGM, è possibile rilevare significative modificazioni ultrastrutturali dei componenti nucleari generalmente attribuibili ad un incremento del metabolismo cellulare (Malatesta et al, 2002).

Conclusioni

I risultati delle indagini da noi condotte al fine di valutare l'integrità del DNA vegetale di origine alimentare nel coniglio, specie per la quale, al momento della stesura della presente tesi di Dottorato, non esisteva in merito alcun dato bibliografico, consentono di effettuare le seguenti considerazioni conclusive:

- l'efficienza di estrazione del DNA vegetale risulta notevolmente influenzata dalla provenienza del campione. Rese molto diverse sono, infatti, state registrate nei campioni di organo, rispetto a quelli di tessuto muscolare e di sangue, così come differenze sono state rilevate tra i contenuti dei diversi tratti dell'apparato gastro-intestinale. Non è inoltre da trascurare la diversa risposta ottenuta per campioni uguali prelevati da animali di specie diversa, e, nell'ambito della stessa specie, da animali differenti;
- per quanto riguarda il sangue, al fine di ottenere rese di estrazione del DNA più favorevoli, è consigliabile operare su campioni freschi. Meno efficiente, infatti, è risultata l'estrazione dai campioni congelati;
- i processi tecnologici degli alimenti che prevedono l'impiego di fonti di calore contribuiscono alla degradazione del DNA in essi contenuto e di questo va tenuto debito conto quando si vogliono effettuare questo tipo di ricerche;
- le sequenze di geni a singola copia (quali sono tutti i transgeni) risultano attualmente ancora di difficile rilevazione rispetto a quelli multicopia. Le preoccupazioni di una larga fascia di consumatori nei riguardi del destino del DNA transgenico ingerito con gli

alimenti GM emergono soprattutto in relazione a quest'ultimo punto. Se è vero, infatti, che l'intensa frammentazione del DNA durante il processo digestivo dei monogastrici e dei ruminanti sembrerebbe escludere la possibilità della sopravvivenza di geni integri, potenzialmente capaci di essere coinvolti in processi di ricombinazione omologa, secondo qualcuno i risultati negativi nella ricerca dei transgeni nei tessuti animali, sono da attribuire alle metodiche di analisi la cui sensibilità potrà essere ancora migliorata;

- gli animali alimentati con soia GM, pur non evidenziando segni clinici evidenti o significative alterazioni dei profili metabolici, hanno mostrato un'alterazione nella produzione locale di LDH suggerendo che la ricerca sui possibili effetti metabolici di una dieta GM debba essere approfondita. In questo senso, i nostri risultati suggeriscono che un'accurata analisi enzimatica potrebbe essere utile per rilevare gli effetti della dieta OGM sul metabolismo cellulare anche in assenza di segni clinici e biochimici.

Bibliografia

- Accademie Nazionali dei Licei e delle Scienze (2003). *Le biotecnologie vegetali e le varietà OGM*. Rapporto della commissione congiunta delle Accademie Nazionali dei Licei e delle Scienze, 1-66.
- Aeschbacher K., Meile L., Messikommer R. and Wenk C. (2002). *Influence of genetically modified maiza on performance and product quality of chickens*. Proc. Soc. Nutr. Physiol., 11: 196.
- Agnina C. e Maletto S. (1979). *Tecnica mangimistica*. Ed. Esculapio
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acid Research, 25: 3389-3402.
- Artim L., Charlton S., Dana G., Faust M., Glenn K., Hartnell G., Hunst P., Jennings J. e Shillito R. (2001). *Animal performance trials with bt crops. Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its environmental impact*. Austr. Nat. Univ. of Canberra, S61 (Abstr.). www.animalbiotechnology.org/abstc.org
- ASPA - Commissione Valutazione Alimenti (1980). *Valutazione degli alimenti di interesse zootecnico. Analisi chimica*. Zoot. Nutr. Anim., 6: 19-34.
- Astwood J.D., Leach J.N., Fuchs R.L. (1996). *Stability of food allergens to digestion in vitro*. Nat. Biotechnol., 14: 1269.

- Atkinson H.A.C., Johnson I.T., Gee J.M., Grigoriadou F., Miller K. (1996). *Brown Norway rat model of food allergy: Effect of plant components on the development of oral sensitization*. *Fd. Chem. Toxic.*, 34: 27.
- Aumatric A. (2004). *Safety assessment and feeding value for pigs, poultry and ruminant animals of pest protected (Bt) plants, herbicide tolerant (glyphosate, gluphosinate) plants: interpretation of experimental results observed worldwide on GM plants*. *It. J. of Anim. Sci.*, 2 (3): 107-121.
- Avallone L., Lombardi P., Florio S., d'Angelo A., Bogin E. (1996) Age-dependent variations of lactate dehydrogenase and creatine kinase activities in water buffalo calf serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 34(12):961-4, 1996.
- Barrière Y., Vérité R., Brunschwing P., Surault F. and Emile J.C. (2001). *Feeding value of corn silage estimated with sheep and dairy cows is not altered by genetic incorporation of Bt176 resistance to Ostrinia nubilalis*. *J. Dairy Sci.*, 84: 1863-1871.
- Beever D.E. and Kemp C.F. (2000). *Safety issue associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures*. *Nutr. Abstr. Rev.*, 70 (3): 175-182.
- Beever D.E. and Phipps R.H. (2001). *The fate of plant DNA and novel proteins in feeds for farm livestock: a United Kingdom perspective*. *J. Anim. Sci.*, 79 (Suppl. E): E290-E295.
- Berry A.J. and Peter J.B. (1984). *DNA probes for infectious disease*. *Diagn. Med.*, 7: 62-72.

- Beuvink J.M.W. (1993) *Measuring and modelling in vitro gas production kinetics to evaluate ruminal fermentation of feedstuff*. Tesi di dottorato di ricerca, ID-DLO, Lelystad, NL.
- Beuvink J.M.W. e Kogut J. (1993) *Modelling gas production kinetics of grass silage incubated with buffered ruminal fluid*. J. Anim. Sci., 71:1041-1046.
- Beuvink J.M.W. e Spoelstra S.F. (1992) *Interactions between substrate, fermentation end-products buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen organism in vitro*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 505-509.
- Beuvink J.M.W., Spoelstra S.F., Hogendorp R.J. (1992) *An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid*. Netherlands J. Agri. Sci., 40:401-407.
- Blümmel M. e Ørskov E.R. (1993) *Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle*. Anim. Feed Sci. and Technol., 40:109-119.
- Bottero M.T., Civera T., Anastasio A., Turi R.M. and Rosati S. (2002). *Identification of cow's milk in Buffalo cheese by duplex polymerase chain reaction*. Journal of Food Protection, 65 (2): 362-366.
- Broer I., Dröge-Laser W., Gerke M. (1996). *Examination of the putative horizontal gene transfer from transgenic plants to agrobacteria*. In: *Transgenic organisms and biosafety, horizontal gene transfer, stability of DNA and expression of transgenes*, E.R. Schmidt, T. Hankeln (Ed.), Springer Verlag, Heidelberg: 67-70.

- Bronk J.R., Hastewell J.G. (1987). *The transport of pyrimidines into tissue rings cut from rat small intestine*. J. Physiol., 382: 475-488.
- Bryan, L.E. (1984). *Antimicrobial Drug Resistance*. Academic, Orlando.
- Burrige P.W., Woods R.A., and Henderson J.F. (1976). *Utilisation of dietary nucleic acid purines for nucleotide and nucleic acid synthesis in the mouse*. Can. J. Biochem., 54: 179-190.
- Burrit E.A., Bittner A.S., Street J.C., Anderson M.J. (1984) Correlations of phenolic acids and xylose content of cell wall whit *in vitro* dry matter digestibility of three maturing grasses. *J. Dairy Sci.*, 67:1209-1213.
- Calabrò S., Infascelli F., Bovera F., Moniello G., Piccolo V. (2001) *In vitro* degradability of three forages: fermentation kinetics and gas production of NDF and neutral soluble fraction of forages. *J. of the Science of Food and Agriculture*, 82, 222-229.
- Caver J.D., Walker W.A. (1995). *The role of nucleotides in human nutrition*. Nutr. Biochem., 6: 58-72.
- Chambers P.A., Duggan P.S., Heritage J. and Forbes J.M. (2002). *The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49: 161-164.
- Cheetham B.F., Katz M.E. (1995). *A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants*. Mol. Microbiol., 18: 201-208.

- Chiter A., Forbes J.M., Blair G.E. (2000). *DNA stability in plant tissues: implications for the possible transfer of genes from genetically modified food*. FEBS Letters, 481: 164-168.
- Chowdhury E.H., Kuribara H., Hino A., Sultana P., Mikami O., Shimada N., Guruge K.S., Saito M, Nakajima Y. (2003). *Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11*. J. Anim. Sci., 81: 2546-2551.
- Cone J.W., Van Gelder A.H., Visscher G.J.W., Oudshoorn L. (1996) Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. and Techn.*, 61:113-128.
- Cromwell G.L., Lindemann M.D., Randolph J.H., Stanisiewski E.P., Hartnell G.F. (2001). *Soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing pigs*. J. Anim. Sci., 79 (Suppl. 1.): 1318.
- Custers R. (2001). *Safety of genetically engineered crops*. VIRB publication (Ed.), Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology.
- DANMAP (1997). *Consumption of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark*. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme, Danish Zoonosis Centre, Danish Institute for Food and Veterinary Research, Copenhagen.

http://www.dfvf.dk/files/filer/zoonosecentret/publikationer/danmap/danmap_1997.pdf.

- DANMAP (2001). *Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark*. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme, Danish Zoonosis Centre, Danish Institute for Food and Veterinary Research, Copenhagen.
http://www.dfvf.dk/files/filer/zoonosecentret/publikationer/danmap/danmap_1997.pdf.
- Danner D.B., Deich R.A., Sisco K.L., Smith H.O. (1980). *An eleven base-pair sequence determines the specificity of DNA uptake in Haemophilus transformation*. *Gene*, 11: 311-318.
- Davies D.R., Theodorou M.K., Baughan J., Brooks A.E., Newbold J.R. (1995) An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds. *Ann. de Zoot.*, 44 (Suppl 1):36.
- Davies J., Smith D.I. (1978). *Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents*. *Annual Review of Microbiology*, 32: 469–518.
- de Vries J., Meier P. and Wackernagel W. (2001). *The natural transformation of the soil bacteria Pseudomonas stutzeri and Acinetobacter sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 196: 211-215.
- de Vries J., Wackernagel W. (1998). *Detection of nptII (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by*

- marker-rescue transformation*. *Molecular and General Genetics*, 257: 606–613.
- Dehash K., Edwards P., Hayes T., Cranmer A.M., Fillet J. (1996). *Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB2, a thioesterase cDNA from Cuphea hookeriana*. *Plant Physiol.*, 110: 203-210.
 - Deymer D. (1981) Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agri. and Envir.*, 6: 295-337.
 - Doerfler W., Schubbert R. (1997). *Fremde DNA im Säugersystem*. *Deutsches Ärzteblatt*, 94: 51-52.
 - Dubnau D. (1991). *Genetic competence in Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55: 395-424.
 - Dubnau D. (1999). *DNA uptake in bacteria*. *Annual Review of Microbiology*, 53: 217-244.
 - Dubnau D., Cirigliano C. (1972). *Fate of transforming DNA following uptake by competent Bacillus subtilis IV. The endwise attachment and uptake of transforming DNA*. *Journal of Molecular Biology*, 64: 31-46.
 - Duggan P.S., Cambers P.A., Heritage J., Forbes J.M. (2003). *Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep*. *British J. of Nutrition*, 89: 159-166.
 - Einspanier R., Klotz A., Kraft J., Aulrich K., Poser R., Schwägele F., Jahreis G., Flachowsky G. (2001). *The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigative cattle and chicken fed recombinant plant material*. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 129-134.

- Einspanier R., Lutz B., Rief S., Berezina O., Zverlov V., Schwarz W., Mayer J. (2004). *Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize*. Eur. Food Res. Technol., 218: 269-273.
- El Shazly K. e Hungate R. E. (1965) Fermentation capacity as a measure of net growth of rumen microorganisms. *Appl. Microb.*, 13:62-69.
- EU (2001). Direttiva 2001/18(CE del Parlamento europeo e del Consiglio europeo del 12 Marzo 2001 *sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati e che abroga la direttiva 90/220/CEE del Consiglio*. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, L106, 1-39.
- FAO/WHO (2000). *Safety aspects of genetically modified foods of plant origin*. Report of Joint FAO/WHO Consultation. FAO/WHO, Rome.
- FAO/WHO (2001). *Evaluation of allergenicity of genetically modified foods*. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. FAO/WHO, Rome.
- Faust M.A. (2002). *New feeds from genetically modified plants: the US approach to safety for animals and the food chain*. Livestock Production Science, 74: 239-254.
- Fearing P.L., Brown D., Vlachos D., Meghji M., Privalle L. (1997). *Quantitative analysis of CryIA(b) expression in Bt maize plant, tissues and silage and stability of expression over successive generation*. Mol. Breeding, 3: 169-176.
- Fisvell R.B., Dart E., Fuchs R.L., Fraley R.T. (1992). *Selectable marker genes: safe for plants?*. Biotechnology, 10: 141-144.

- Forbes J.M., Blair G.E., Chiter A., Perks S. (1998), *Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation*. U.K. MAFF Report CS0116.
- Garfinkel D.J., Simpson R.B., Ream L.W., White F.F., Gordon M.P., Nester E.W. (1981). *Genetic analysis of crown gall; fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis*. Cell, 27: 143-153.
- Gebhard F., Smalla K. (1998). *Transformation of Acinetobacter sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA*. Applied and Environmental Microbiology, 64: 1550-1554.
- Gritz L., Davies J. (1983). *Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 25: 179-188.
- Groot J.C.J., Cone J.W., Williams B.A., Debersaques F.M.A., Latinga E.A. (1996) Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feedstuffs. *An. Feed Sci. and Techn.*, 64:77-89.
- Haldrup A., Petersen S.G., Okkels F.T. (1998). *The xylose isomerase gene from Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent*. Plant Molecular Biology, 37: 287-296.
- Harrison L.A., Baily M.R., Naylor M.W., Ream J.E., Hammond B.G., Nida D.L., Burnett B.L., Nickson T.E., Mitsky T.A., Taylor M.L., Fuchs R.L., Padgett S.R. (1996). *The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-*

phosphate synthase from Agrobacterium sp. Strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mics. J. Nutr., 126: 728.

- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. and Williams P.M. (1996). *Real Time Quantitative PCR.* PCR Methods & Application, 6 (10): 986-994.
- Hemmer W. (1997). *Foods derived from genetically modified organism and detection methods.* BATS–Report 2/97, BATS, Clarastrasse 13, 4058, Switzerland.
- Herbel W., Montag A. (1987). *Nucleo-compounds in protein rich food.* Z. Lebensm. Unters. Forsch., 185: 119-122.
- Hernandez M., Duplan M.-N., Berthier G., Vaïtilingom M., Hauser W., Freyer R., Pla M., Bertheau Y. (2004). *Development and comparative validation of four for real-time polymerase chain reaction system for specific detection and quantification of Zea mays L..* J. Agric. Food Chem., 52: 4632-4637.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S. and Griffith R. (1992). *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.* Biotechnology, 10: 413-417.
- Hohlweg U. and Doerfler W. (2001). *On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice.* Mol. Genet. Genomics, 265: 225-233.
- Holland P. M., Abramson R. D., Watson R. and Gelfand D.H. (1991). *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 88: 7276-7280.

- Hollingshead S., Vapnek D. (1985). *Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase*. Plasmid, 13: 17-30.
- Hupfer C., Mayer J., Hotel H., Sachse K., Engel K.-H. (1999). *The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize*. Eur. Food Res. Technol., 209: 301-304.
- Ippen-Ihler K. (1989). *Bacterial Conjugation*. In: *Gene transfer in the environment*. S.B. Levy e R.V. Miller (Eds.), McGraw-Hill Publishing Company, NY: 1-32.
- Ippen-Ihler K. e Skurray R.A. (1993). *Genetic organization of transfer-related determinants on the sex factor F and related plasmids*. In: *Bacterial Conjugation*. D.B. Clewell (Ed.), Plenum Press, NY: 23-51.
- Ito K., Inagaki-Ohara K., Murosaki S., Nishimura H., Shimokata T., Torli S., Matsuda T., Yoshikai Y. (1997). *Murine model of IgE production with predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvants*. Eur. J. Immunol., 27: 3427-3432.
- James C. (2004). *Global status of commercialized transgenic crops: 2003*. ISAAA (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application) Briefs, 30: Preview; ISAAA: Ithaca, NY.
- Jarvis S.M. (1989). *Characterisation of sodium-dependent nucleoside transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles*. Biochim. Biophys. Acta, 979: 132-138.
- Jennings J.C., Albee L.D., Kolwyck D.C., Surber J.B., Taylor M.L., Hartnell G.F., Lirette R.P. and Glenn K.C. (2003) a. *Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and*

transgenic protein in muscle from broilers fed YielGrad borer corn. Poultry Science, 82: 371-380.

- Jennings J.C., Kolwyck D.C., Kats S.B., Whetsell A.J., Surber J.B., Cromwell G.L., Lirette R.P. and Glenn K.C. (2003) b. *Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal.* J. Anim. Sci., 81: 1447-1455.
- Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S.G., Brunstedt J., Okkels F.T. (1998). *Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet.* Molecular Breeding, 4: 111-117.
- Johnson R.R. (1963) *In vitro* rumen fermentation techniques. *J. Anim. Sci.*, 22:792-800.
- Jonas D.A., Elmadfa I., Engel K.-H., Heller K.J., Kozianowski G., König A., Müller D., Narbonne J.F., Wackernagel W., Kleiner J. (2001). *Safety consideration of DNA in food.* An. Nutr. & Metab., 45: 235-254.
- Karch H., Schwarzkopf A. and H. Schmidt (1995). Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected examples). *J. Microbiol. Methods.* 23: p. 55-73.
- Karch H., Schwarzkopf A. and Schmidt H. (1995). *Amplification methods in diagnostic bacteriology (selected examples).* J. Microbiol. Methods, 23: 55-73.
- Khazaal K., Dentinho M.T., Riberio J.M., Ørskov E.R. (1993) A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* apparent digestibility vivo and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.*, 57:105-112.

- Khazaal K., Dentinho M.T., Riberio J.M., Ørskov E.R. (1995) A prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre components, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. *J. Anim. Sci.*, 61:527-538.
- Khumnirdpetch V., Intarachote U., Treemanee S., Tragoonroong S., Thummabood S. (2001). *Detection of GMOs in the broilers that utilized genetically modified soybean meals as a feed ingredient*. In: "Plant & Animal Genome IX Conference, Town and Country Hotel, San Diego", San Diego, California, USA.
- Kinney A.J. (1998). *Manipulating flux through plant metabolic pathways*. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 173-178.
- Kleter G.A., Noordam M.Y., Kok E.J., Kuiper H.A. (2000). *New Developments in Crop Plant Biotechnology and their Possible Implications for Food Product Safety*. RIKILT Report 2000.004. RIKILT-Institute for Food Safety, Wageningen.
- Klotz A., Einspanier R. (1998). *Nachweis von Novel-Feed im Tier? Beeinträchtigung des Verbrauchers von Fleisch oder Milch ist nicht zur waten*. *Mais*, 3: 109-111.
- Klotz A., Mayer J., Einspanier R. (2002). *Degradation and possible carry over of feed DNA monitored in pigs ad poultry*. *Eur. Food Res. Technol.*, 214: 271-275.
- Knippels L.M.J., Penninks A.H., Smith J.J., Houben G.F. (1999). *Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin sensitized Brown Norway rats; further characterization of a rat food allergy model*. *Tox. Appl. Pharm.*, 158: 161.

- Kocabiyik D., Perlin M.H. (1992). *Altered substrate specificity by substitutions at Tyr218 in bacterial aminoglycoside 3'-phosphotransferase-II*. FEMS Microbiology Letters, 72: 619-624.
- Krech A.B., Wurz A., Stemmer C., Feix G., Grasser K.D. (1999). *Structure of genes encoding chromosomal HMG1 proteins from maize*. Gene, 234: 45-50.
- Kuiper H.A. (1999). Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. 10: p. 339-349.
- Kuiper H.A., König A., Kleter G.A., Mammes W.P., Knudsen I. (2004). *Concluding remarks*. Food and Chemical Toxicology, 42: 1195-1202.
- Kunkel T., Niu Q.W., Chan Y.S., Chua N.H. (1999). *Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation*. Nature Biotechnology, 17: 916-919.
- Kuribara H., Shindo Y., Matsuoka T., Takubo K., Futo S., Aoki N., Hirao T., Ariyama H., Goda Y., Toyoda M., Hino A. (2002). *Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean*. J. of AOAC Int., 85 (5): 1077- 1089.
- Lassek E., Montag A. (1990). *Nucleic-acid components in carbohydrate-rich food*. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 190: 17-21.
- Lee L.G., Connel C.R. and Bloch W. (1993). *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probs*. Nucleic Acids Research, 21: 3761-3766.
- Li X.M., Schoflaid B.D., Huang C.K., Klainer G.I., Sampson H.A. (1999). *A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity*. J. Allergy Clin. Immunol., 103: 208.

- Lorenz M.G., Wackernagel W. (1994). *Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment*. Microbiol. Rev., 58: 563-602.
- Lüthy J. (1999) Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control*. 10: p. 359-361.
- Mahony J.B., Luinstra K.E., Waner J., McNab G., Hobranzka H., Gregson D., Sellors J.W. and Chernesky M.A. (1994). *Interlaboratory agreement study of a double set of PCR plasmid primers for detection of Chlamydia trachomatis in a variety of genitourinary specimens*. J. Clin. Microbiol., 32: 87-91.
- Mahony J.B., Luinstra K.E., Waner J., McNab G., Hobranzka H., Gregson D., Sellors J.W. and M.A. Chernesky (1994) Interlaboratory agreement study of a double set of PCR plasmid primers for detection of *Chlamydia trachomatis* in a variety of genitourinary specimens. *J. Clin. Microbiol.* 32: p. 87-91.
- Margolin P. (1987). *Generalized transduction*. In: *Escherichia coli and salmonella typhimurium*. F.C. Neidhardt et al. (Eds.), ASM Washington: 1154-1168.
- Martín-Orúe S.M., O'Donnell A.G., Ariño J., Netherwood T., Gilbert H.J. and Mathers J.C. (2002). *Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maiza in human intestinal simulations*. British J. Nutrition, 87: 533-542.
- McAllan A.B. (1980). *The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers*. Br. J. Nutr., 44: 99-112.
- McAllan A.B. (1982). *The fate of nucleic acids in ruminants*. Proc. Nutr. Soc., 41: 309-317.

- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. (1979) The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agri. Sci. Camb.*, 93:217-222.
- Mercer D.K., Scott K.P., Bruce-Johnson W.A., Glover L.A., Flint H.J. (1999). *Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium Streptococcus gordonii DL1 by plasmid DNA in human saliva*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 6-10.
- Mercer D.K., Scott K.P., Melville C.M., Glover L.A., Flint H.J. (2001). *Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 200: 163-167.
- Metcalf D.D., Astwood J.D., Townsend R., Sampson H.A., Taylor S.L., Fuchs R.L. (1996). *Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants*. *Crit. Rev. Fd. Science Nutr.*, 36 (Suppl.): S165.
- Meyer R. (1995). *Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the FlavrSavr™ tomato as an example*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 201 (6): 583-586.
- Miraglia M., Onori R., Brera C. (1997). *La sicurezza d'uso degli alimenti derivati dalle biotecnologie*. *Tecnologie Alimentari*, 6: 102-108.
- Montag A., Kölling I., Jänicke S., Benkmann S., Lou N. (1989). *Purine base contents in food*. *Akt. Ernähr.*, 14: 243-247.
- Mullis K.B., Ferré F. and Gibbs R.A. (1990). *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. *Scientific American*, April: 56-65.

- Mullis K.B., Ferré F. e Gibbs R.A. (1994). *The Polymerase chain reaction*. Birkäuser-Verlag, Basel.
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S. and Pfaller M.A. (2000). *Microbiologia*. EdiSES.
- Nap J.P., Bijvoet J., Stiekema W.J. (1992). *Biosafety of kanamycinresistant transgenic plants*. *Transgenic Research*, 1: 239-249.
- Netherwood T., Martín-Orúe S.M., O'Donnell A.G., Gockling S., Graham J., Mathers J.C. and Gilbert H.J. (2004). *Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract*. *Nature Biotechnology*, 22 (2): 204-209.
- Nielsen K.M., van Weerelt M.D.M., Berg T.N., Bones A.M., Hagler A.N. and van Elsas J.D. (1997). *Natural transformation and availability of transforming DNA to Acinetobacter calcoaceticus in soil miscrocosms*. *App. Env. Microbiol.*, 63 (5): 1945-1952.
- Nordic Council of Ministers (1998). *Safety Assessment of Noval Food Plants*. Nordic Working Group of Food Toxicology and Risk Evaluation, Tema Nord, 591.
- O'Hara M., Hozumi S. e Ohki K. (1974) Studies on the mode of gas production in artificial rumen and its application to the evaluation of feedstruffs IV. On the role of bicarbonate buffer for the gas production. *Japanese J. Zoot. Sci.*, 45:1-7.
- OECD (1993). *Safety evaluation of Foods derived by modern biotechnology: Concepts and Principles*. Organization of Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- Orlando C., Pinzani P. and Pazzagli M. (1998). *Developments in quantitative PCR*. Clin. Chem. Lab. Med., 36 (5): 255-269.
- Padgett S.R., Taylor N.B., Nida D.L., Baily M.R., MacDonald J., Holden L.R., Fuchs R.L. (1996). *The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans*. J. Nutr., 126: 702.
- Palmen R., Vosman B., Buijsman P., Breek C.K., Hellingwerf K.J. (1993). *Physiological characterization of natural transformation in Acinetobacter calcoaceticus*. J. of Gen. Microbiol., 139: 295-305.
- Pell A.N. e Schofield P. (1993) Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 76:1063-1073.
- Phipps R.H. and Beever D.E. (2001). *Detection of transgenic DNA in bovine milk: results for cows receiving a TMR containing Bt insect protected maize grain (MON810)*. Proc. Int. Anim. Agric. and Food Sci. Conf., Indianapolis, IN, p. 476.
- Phipps R.H., Beever D.E., Humphries D.J. (2002). *Detection of transgenic DNA in milk from cows receiving herbicide tolerant (CP4EPSPS) soybean meal*. Livestock Production Science, 74: 269-273.
- Phipps R.H., Deaville E.R. and Maddison B.C. (2003). *Detection of transgenic and endogenous plant DANN in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood, and feces of lactating dairy cows*. J. Dairy Sci., 86: 4070-4078.
- Pietrzak M., Shillito R.D., Hohn T., Potrykus I. (1986). *Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after*

- protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucleic Acids Research*, 14: 5857–5868.
- Prescott L.M., Harley J.P. and Klein D.A. (1995). *Microbiologia*. Ed. italiana, Zanichelli.
 - Proctor G.N., Rownd R.H. (1982). *Rosanilins: indicator dyes for chloramphenicol-resistant enterobacteria containing chloramphenicol acetyltransferase*. *Journal of Bacteriology*, 150: 1375-1382.
 - Regolamento CE 258/97 del 27.01.97. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, serie L*, n° 43 del 14.02.97.
 - Reuter T. and Aulrich K. (2003). *Investigations on genetically modified maize (Bt-maize) in pig nutrition: fate of feed-ingested foreign DNA in pig bodies*. *Eur. Food Res. Technol.*, 216: 185-192.
 - Reuter T., Aulrich K., Berk A. and Flakowsky G. (2002) *Investigations on GM maize in pig nutrition: chemical composition and nutritional evaluation*. *Arch. Anim. Nutr.*, 56:22-31.
 - Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et al. (1985). *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 230: 1350-1354.
 - Salati L.M., Gross C.J., Henderson L.M., Saviano D.A. (1984). *Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-monophosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine*. *J. Nutr.*, 114: 753-760.

- Sawyer J., Wood C., Shanahan D., Gout S., McDowell D. (2003). *Real-time PCR for quantitative meat species testing*. Food Control, 14: 579-583.
- Schlüter K., Fütterer J. and Potrykus I. (1995). *Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (Erwinia chrysanthemi) occurs – if et all – at an extremely low frequency*. Biotechnology, 13: 1094-1098.
- Schofield P., Pitt R.E., Pell A.N. (1994) Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.*, 72:2980-2991.
- Schubbert R., Hohlweg U., Renz D. and Doerfler W. (1998). *On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus*. Mol. Gen. Genet., 259: 569-576.
- Schubbert R., Lettmann C. and Doerfler W. (1994). *Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice*. Mol. Gen. Genet., 242 (5): 495-504.
- Schubbert R., Renz D., Schmitz B. and Doerfler W. (1997). *Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can covalently linked to mouse DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 961-966.
- Schuler T.H., Poppy G.M., Kerry B.R., Denholm I. (1998). *Insect-resistant transgenic plants*. Tibtech, 16: 168-175.
- Sidhu R.S., Hammond B.G., Fuchs R.L., Mutz J.-N., Holden L.R., George B. and Olson T. (2000). *Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant*

- corn is equivalente to that of conventional corn (Zea mays L.). J. Agric. Food Chem., 48: 2305-2312.*
- Smith R.H. and McAllan A.B. (1970). *Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen, and the fate of dietary nucleic acids.* Br. J. Nutr., 24: 545-556.
 - Sonoda T., Tatibana M. (1978). *Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice.* Biochim. Biophys. Acta, 521: 55-66.
 - Taylor S., Lahrer S.(1996). *Principles and characteristics of food allergens.* Critical reviews in Food Science and Nutrition, 36: S91-S118.
 - Taylor S.L. (1992). *Chemistry and detection of food allergens.* Food Technol., 39: 146.
 - Terzi V, Infascelli F., Tudisco R., Russo G., Stanca A.M. e Faccioli P. (2004). *Quantitative detection of Secale cereale by real-time PCR amplification.* LWT, 37: 239-246.
 - Terzi V., Malnati M., Barbanera M., Stanca A.M., Faccioli P. (2003). *Development of analytical system based real time PCR for Triticum specie specific determination quantitative of bread wheat contamination in semolina and pasta.* J. Cereal Sci., 38: 86-94.
 - Terzi V., Pisani R., Marzaliano N., Locatelli G and M. Malnati (1999). *Determinazione quantitativa della presenza di organismi geneticamente modificati in farine alimentari mediante "real time deyection PCR". XLIII Convegno Annuale S.I.G.A. 22-25/09/99, Molveno (TN).*

- The Royal Society (2002). *Genetically modified plants for food use and human health - an update*. Policy document 4/02. ISBN 0854035761.
- The Royal Society of Canada (2001). *Elements of precaution: recommendations for the regulation of food biotechnology in Canada*. The Royal Society of Canada, Ottawa, Ontario,
- Theodorou M.K. (1993) A new laboratory procedure for determining the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Ciencia e Invest. Agr.*, 20:332-344.
- Tony M.A., Butschke A., Broll H., Grohmann L., Zagon J., Halle I., Dänicke S., Schauzu M., Hafez H.M. e Flachowsky G. (2003). *Safety assessment of Bt 176 maize in broiler nutrition: degradation of maize-DNA and its metabolic fate*. *Arch. Anim. Nutr.*, 57 (4): 235-252.
- Toth B. (1995). *Mushroom toxins and cancer (Review)*. *Internat. J. Oncol.*, 6: 137-145.
- Trei J., Hale W.H., Theurer B. (1970) Effect of grain processing on in vitro gas production. *J. Anim. Sci.*, 30:825-831.
- Tudisco R, Infascelli F., Zicarelli F, Faccioli P, Terzi V. (2002) Evaluation of current analytical methods for GMO detection in animal feeds. *I Conv. Int. di Biotecnologie applicate alle Scienze morfo-funzionali Veterinarie, Napoli 17-18 maggio*.
- Tudisco R., Calabrò S., Terzi V., Cutrignelli M.I., Bovera F., Piccolo V., Zicarelli F., Piccolo G., Infascelli F. (2004). *In vitro fermentation kinetics of some genetically modified feeds*. IInd International Meeting on Veterinary morfo-functional Biotechnologies, Real Orto Botanico, Napoli, Italy, 1-3/07/04, 68.

- Tyagi S. (1996). *Taking DNA probes into a protein world*. Nat. Biotechnol., 14 (8): 947-948.
- Tyagi S. and Kramer F.R. (1996). *Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization*. Nat. Biotechnol., 14(2): 347-382.
- US Food and Drug Administration (1992). *Statement of Policy: foods derived from new plant varieties; notice*. Federal Register, 57 (104): 22984-23004.
- Vařtilingom M., Pijnenburg H., Gendre F. and P. Brignon (1999). Real – Time Quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.* 47: p. 5261-5266.
- van den Eede G., Aarts H., Buhk H.-J., Corthier G., Flint H.J., Hammes W., Jacobsen B., Midtvedt T., Van der Vossen J., Von Wright A., Wackernagel W., Wilcks A. (2004). *The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants*. Food and Chemical Toxicology, 42: 1127-1156.
- Van Soest P.J., Robertson J. B., Lewis B. A. (1991). *Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition*. J. Dairy Sci., 74: 3583-3595.
- Weisberg R.A. (1987). *Specialized transduction*. In: *Escherichia coli and salmonella typhimurium*. F.C. Neidhardt et al. (Eds.), ASM Washington: 1169-1176.
- Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T. and Little S. (1999). *Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence*. Nat. Biotechnol., 17 (8): 804-807.

- Whittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A. and Rasmussen R.P. (1997). *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. *Biotechniques*, 22: 130-138.
- Wolcott M.J. (1992). *Advances in nucleic-acid based detection methods*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 5: 370-386.
- World Health Organization (1991). *Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology*. Report of Joint FAO/WHO Consultation. WHO, Geneva.
- World Health Organization (1993). *Health Aspects of Marker Genes in Genetically Modified Plants*. Report of a WHO Workshop, WHO/FNU/FOS/93.6. World Health Organisation, Geneva, 1-12.
- Yamanaka M., Tsubota Y., Anai M., Ishimatsu K., Okumura M., Katsuki S.-O., Takagi Y. (1974). *Purification and properties of acid deoxyribonucleasas of human gastric mucosa and cervix uteri*. *J. Biol. Chem.*, 249: 3884-3889.