

RELAZIONE FINALE RICERCA CORRENTE 2011

“Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute”

Titolo del progetto: CARATTERIZZAZIONE VARIETALE DI FRUMENTO (*TRITICUM AESTIVUM*) D'INTERESSE ALIMENTARE PER L'INDIVIDUAZIONE DI UN GENE ENDOGENO DI RIFERIMENTO PER LA RICERCA DI OGM E PER LA VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA LIPOSSIGENASI IN RELAZIONE ALLA PRESENZA DI MICOTOSSINE

N. identificativo progetto: IZS LT 14/11 RC

Responsabile Scientifico:

Dr. Ugo Marchesi

Sommario

Work-package 1

L'Unità di Ricerca di Biochimica e Biologia Molecolare dell'Università di Teramo ha analizzato l'attività catalitica della lipossigenasi (LOX) vegetale in farine di grano tenero (*Triticum aestivum*) al fine di delucidare il ruolo di questi enzimi nei meccanismi di difesa delle piante, in particolare per quanto attiene le infezioni fungine che producono micotossine. Pertanto, in questo lavoro è stata l'attività catalitica dell'enzima in diverse *cultivar* al fine di individuare un'eventuale correlazione tra l'attività della LOX endogena e la presenza di micotossine fungine. I semi sono stati campionati dal CREA (Consiglio di ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) e macinati dall'IZS (Istituto zooprofilattico sperimentale) Lazio - Toscana.

Dal confronto tra le sequenze amminoacidiche della LOX-1 di soia e della LOX di frumento è stata ottenuta un'omologia di sequenza di circa il 52.24 % tra i due enzimi. Pertanto, è stato possibile sviluppare per la prima volta un metodo di identificazione della LOX nel frumento mediante Western blot impiegando un anticorpo monoclonale anti-LOX di soia. In tutti i campioni analizzati è stata in tal modo evidenziata l'effettiva presenza della LOX e, successivamente, ne è stata valutata l'attività catalitica specifica mediante analisi spettrofotometrica. L'attività specifica della LOX è risultata significativamente diversa nei vari campioni analizzati. Per verificare se le variazioni evidenziate potessero essere modulate dal trattamento di concia subito o se fossero riconducibili ad eventuali alterazioni generalizzate di tutti i sistemi enzimatici presenti nella farina di grano dovute ad alterazioni chimico-fisiche dei semi, si è analizzata anche l'attività specifica di un enzima costitutivo. In particolare, si è analizzata l'attività della glucosio 6-fosfato deidrogenasi (G6PDH), della via dei pentosi fosfati. I risultati hanno dimostrato che le differenze riscontrate nella LOX non dipendono da alterazioni chimico-fisiche dei semi o da variabili dipendenti dai protocolli di estrazione degli enzimi. Infatti, l'enzima G6PDH presenta un'attività specifica paragonabile in tutti i campioni analizzati. Inoltre, è stata ulteriormente dimostrata la presenza dell'attività della LOX mediante l'impiego di un inibitore specifico irreversibile, l'acido eicosatetraenoico (ETYA). Presi nel loro insieme, i risultati del progetto dimostrano per la prima volta una variabilità intrinseca dell'attività enzimatica della LOX nelle diverse *cultivar*, sia prima che dopo il trattamento di concia. Tuttavia, il confronto tra l'attività specifica della LOX nei campioni trattati e non trattati suggerisce che la concia dei semi possa ridurre l'attività dell'enzima, modulando in tal modo il pathway della LOX. Presi nel loro insieme i dati suggeriscono la presenza di una maggiore contaminazione fungina nei campioni che presentano una più bassa attività lipossigenasica. La variabilità di attività specifica riscontrata nelle diverse varietà di grano potrebbe dipendere da caratteristiche biochimico-metaboliche intrinseche alle varie *cultivar* dovute o alla presenza di polimorfismi genetici o di modificazioni epigenetiche che potrebbero aver determinato una modulazione nell'espressione del gene della LOX.

In conclusione, tali risultati suggeriscono un possibile impiego della LOX sia come eventuale *biomarker* di contaminazione fungina, ma anche nella selezione di *cultivar* di frumento maggiormente resistenti alle micotossine.

Work-package 2

Il frumento o grano costituisce una delle specie di maggiore interesse agronomico ed alimentare a livello mondiale. Appartenente al genere *Triticum*, il frumento tenero (*Triticum aestivum*) è la specie più diffusa fra i cereali coltivati per uso alimentare, anche in virtù della considerevole adattabilità, di diverse varietà, ai climi rigidi. Ciò fa sì che l'areale di coltivazione di questa specie si estenda a latitudini inospitali per altre colture cerealicole. Il grano duro (*Triticum durum*), benché sia poco diffuso a livello mondiale rispetto al frumento tenero, è un cereale che fornisce la materia prima principalmente all'industria delle paste alimentari e del pane.

Negli anni '90 la Monsanto, una delle principali multinazionali operanti nel settore delle biotecnologie, avviò un programma di sviluppo di varietà di frumento tenero geneticamente modificato (GM) tolleranti all'erbicida glifosato. La multinazionale, una volta completato l'iter sperimentale, non giunse mai a commercializzare tali varietà. Tuttavia, diversi anni dopo (2013) la presenza di esemplari residuali di frumento GM in un campo dell'Oregon fu rilevata da un ricercatore dell'Oregon State University e poi confermata da approfondimenti condotti dalla United States Department of Agriculture (USDA). Successivamente, sempre negli Stati Uniti, l'Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) ha reso nota la presenza in campo di grano geneticamente modificato non autorizzato, e l'informazione è stata trasmessa anche alla Commissione Europea, ed agli stati membri dell'Unione Europea che hanno deciso di avviare controlli a campione su partite di grano tenero di importazione dagli Stati Uniti, allo scopo di verificare l'eventuale consistenza del fenomeno.

In merito a tale emergenza, trattandosi di un OGM non autorizzato e non essendo a disposizione un metodo di rilevazione, il Laboratorio Europeo di Riferimento per alimenti e mangimi GM (EURLGMFF)

ha dato delle indicazioni su come procedere nelle analisi. Per ciò che concerne il sistema taxon specifico idoneo per *Triticum aestivum*, l'EURL ha proceduto esplorando la letteratura disponibile relativamente all'identificazione del grano per poter distinguere in particolare il grano tenero dal grano duro. Sulla base del documento EURL i due sistemi real time PCR descritti nei lavori di Matsuoka et al del 2012, che ha come bersaglio l'elemento genetico ssII-D che codifica per una proteina con attività amido sintetasica, e di Ida et al del 2005, con sequenza bersaglio sul gene waxy-D1 che codifica per l'enzima amido sintasi legata ai granuli (granule-bound starch synthase GBSS), sembrano essere buoni candidati.

Nell'ambito del progetto, l'unità operativa 5, collocata presso il Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), dopo aver effettuato un censimento delle cultivar circolanti sul territorio nazionale italiano appartenenti al genere *Triticum*, con particolare riguardo per la specie *Triticum aestivum* (grano tenero), ha proceduto alla raccolta di campioni di semi da semina per le successive fasi di confronto analitico. Per valutare la stabilità varietale dei due sistemi endogeni waxy-D1 e ssII-D, sopra descritti, sono state analizzate sedici varietà di grano tenero. Tali sistemi in real time PCR sono stati confrontati anche mediante PCR digitale nella piattaforma digital droplet PCR (ddPCR), una delle tecniche di PCR quantitativa più recenti e più promettenti. Si tratta di un metodo di indagine basato sulla quantificazione assoluta del numero di copie della sequenza bersaglio di PCR presenti nel campione analizzato, senza necessità di costruire le curve di calibrazione, invece necessarie per le quantificazioni in Real Time PCR. Dai dati ottenuti, il numero di copie di sequenza bersaglio sembra rimanere stabile per le diverse cultivar analizzate.

Per ciò che concerne le metodiche real time PCR, che ad oggi rappresenta ancora la metodica d'elezione per l'analisi di OGM, i due metodi waxy ed ssII-D sono stati confrontati attraverso differenti parametri di validazione, come previsto dal documento "Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing" quali la specificità,

l'efficienza di PCR (slope ed R_2), il limite di quantificazione e la precisione.

La specificità è stata valutata su DNA estratto da patata, mais, riso, colza, soia, cotone ed entrambe i sistemi mostrano il 100% di specificità per l'identificazione del frumento tenero. Nelle tabella 1 sono mostrati i valori di slope ed R_2 ottenuti per ogni varietà: dai valori di Ct ottenuti in real time e dal numero di copie ottenuto in ddPCR sono state costruite 16 curve di calibrazione. Per ciò che concerne la precisione i due metodi mostrano lo stesso andamento di deviazione standard di ripetibilità nell'ambito del range dinamico di utilizzo in real time (5 diluizioni 1:4 a partire da 300 ng di DNA). Infine i sequenziamenti delle regioni bersaglio di PCR dei due metodi su tutte le 16 varietà non hanno mostrato eventuali SNPs (single nucleotide polymorphism) nelle zone di appaiamento di primer e probe.

I due metodi sembrano essere quindi equivalenti per il loro utilizzo come metodo di riferimento taxon specifico per una eventuale analisi quantitativa di frumento transgenico. Tuttavia il sistema waxy mostra una letteratura più ampia a riguardo, che evidenzia la stabilità di tale bersaglio in termini di numero di copie e di conservazione della sequenza anche in diverse varietà di frumento coltivate in paesi extracomunitari (Cina e USA).