



ISTITUTO STATALE DI ISTRUZIONE SECONDARIA SUPERIORE "G.B. Cerletti"
I.T.A. "G.B. Cerletti" - con ordinamento speciale per la viticoltura e l'enologia di CONEGLIANO TV
Sede: Via XXVIII Aprile 20, 31015 Conegliano TV- Tel. 0438/61421-61524
e-mail: scuolaenologica@isisscerletti.it - sito: www.scuolaenologica.it

MIGLIORAMENTO GENETICO DEI LIEVITI INCROCIO E MANIPOLAZIONE GENETICA



Candidato: Geronazzo Alberto
classe: 6[^]VA a.s. 2013/2014

Indice

Introduzione	2
Premesse	2
<i>I lieviti</i>	2
<i>La cellula dei lieviti</i>	2
<i>La riproduzione</i>	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
<i>La mitosi</i>	4
<i>La meiosi</i>	5
<i>Le leggi di Mendel</i>	6
<i>L'interazione tra alleli</i>	7
Il miglioramento genetico	7
Le caratteristiche enologiche	8
Ibridazione	8
<i>Premesse</i>	8
<i>La tecnica: coniugazione tra spore</i>	9
<i>Ibridazione intraspecifica e interspecifica</i>	10
<i>Esempi di lieviti in commercio ottenuti con l'ibridazione</i>	11
L'alternativa: la fusione di sferoplasti	13
<i>Premesse</i>	13
<i>La tecnica</i>	14
<i>Fattori che ne limitano l'uso</i>	14
DNA ricombinante	14
<i>Premesse</i>	14
<i>La tecnica</i>	15
<i>Lieviti in commercio ottenuti con la tecnica del DNA ricombinante</i> ..	18
<i>Fattori che ne limitano l'uso</i>	20
OGM e viticoltura	21
<i>Introduzione</i>	21
<i>Gli OGM in viticoltura</i>	21
<i>Posizione dei consumatori</i>	23
Conclusioni	24
Bibliografia/Sitografia	25

Introduzione

Nell'enologia moderna la fermentazione alcolica avviene quasi sempre ad opera di lieviti selezionati. In questo modo è possibile ottenere una fermentazione più controllata e prevedibile, evitando la produzione di composti indesiderati che possono formarsi nel caso di una fermentazione spontanea. Inoltre è possibile per il produttore mantenere la stessa qualità del vino in più partite di prodotto.

Per questi motivi, la ricerca sul miglioramento genetico dei lieviti è tra gli elementi più importanti nello sviluppo dell'enologia moderna.

Lo scopo di questa tesina è approfondire il tema del miglioramento genetico dei lieviti di uso enologico, trattando in particolare le tecniche dell'incrocio e del DNA ricombinante, essendo queste due le tecniche più studiate e che possono portare ai risultati migliori. Inoltre verranno discusse le problematiche relative ad un eventuale impiego degli OGM in Italia, dato che attualmente l'uso di questi organismi è vietato nel nostro paese, così in molti altri dell'Unione Europea.

Premesse

I lieviti

Lo studio sui lieviti risale al 1680, quando l'olandese Antony van Leeuwenhoek osservò per la prima volta questi microorganismi grazie ad un rudimentale microscopio di sua fabbricazione. Osservò i lieviti contenuti nel mosto di birra, anche se non scoprì la correlazione di questi con la fermentazione alcolica.

Fu Luis Pasteur, alla fine del XIX secolo, a dimostrare che la fermentazione alcolica è causata dai lieviti. Nel 1886 pubblicò l'opera "Studi sul vino", nella quale dimostra che sono i lieviti presenti nella buccia dell'uva a provocare la fermentazione alcolica.

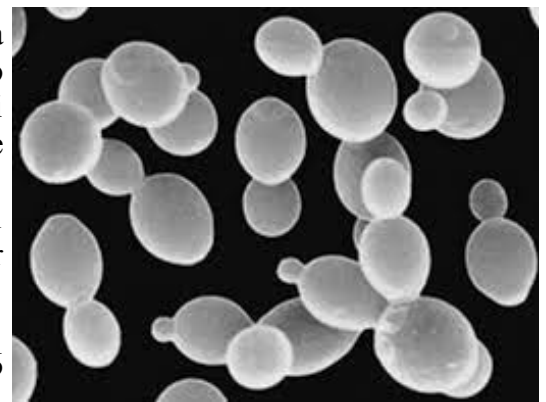
I lieviti sono stati definiti da Flegel nel 1977 come un gruppo di funghi unicellulari con cellula eucariota, che si moltiplicano per gemmazione o scissione.

Possono avere forma ellittica, sferica, globulare o apiculata.

Le cellule possiedono un elevato numero di cromosomi (16 coppie) e sono dotate di: membrana nucleare, mitocondri, reticolo endoplasmatico e vacuoli.

Tutti i lieviti di interesse enologico appartengono alla classe degli Ascomyceti. Questi rappresentano il gruppo più numeroso dei funghi, di cui fanno parte lieviti, muffe, tartufi e funghi veri e propri.

Gli ascomyceti sono caratterizzati dalla presenza di una struttura a forma di sacco, chiamata asco, che contiene le spore sessuate. In questo genere è più frequente la riproduzione sessuata (che porta alla formazione di ascospore) di quella asessuata.



Cellule di lievito (Saccharomyces cerevisiae) al microscopio elettronico

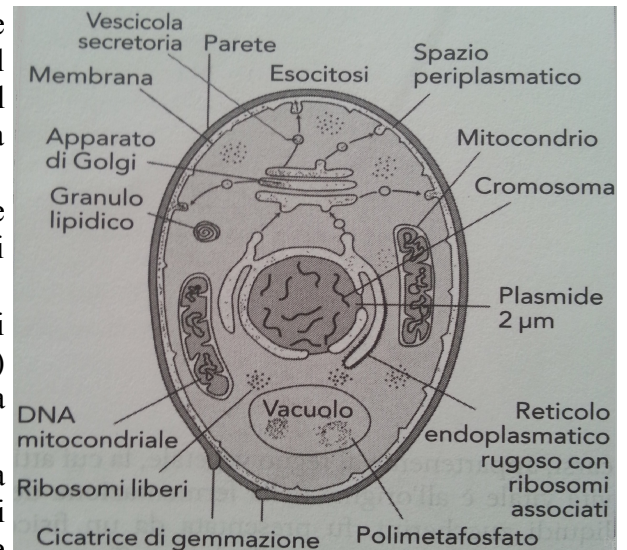
La cellula dei lieviti

La cellula ha tipicamente una forma sferica, ovale o ellittica più o meno allungata

Per quanto riguarda la struttura si possono distinguere (dall'esterno all'interno):

- Parete cellulare: non sempre indispensabile per la vitalità del fungo, ha lo scopo di proteggere dalle variazioni osmotiche, consentire l'interazione con l'ambiente e l'ospite e conferisce forma alla cellula. È composta principalmente da glucani (50-60%) e mannoproteine (25-50%).
- Membrana citoplasmatica: aderisce alla parete, è impermeabile ed è caratterizzata da sistemi di trasporto enzimatico.

- **Citoplasma:** è limitato dalla membrana, contiene la sostanza citoplasmatica di base, o citosol, nel quale sono immersi gli organuli cellulari. Nel citoplasma ci sono tutti gli enzimi necessari a svolgere la glicolisi e la fermentazione alcolica.
- **Reticolo endoplasmatico:** è un reticolo presente nel citoplasma simile a quello delle cellule degli animali e delle piante superiori.
- **Vacuoli:** nel caso dei lieviti è una sorta di magazzino, che contiene anche enzimi (proteasi) che distruggono l'impalcatura proteica della cellula (autolisi).
- **Mitocondri:** sono organuli di forma sferica o a bastoncino, che possiedono vari enzimi: alcuni capaci di ossidare vari substrati e altri che convertono l'energia liberata in ATP.
- **Ribosomi:** svolgono una funzione fondamentale nella sintesi proteica
- **Nucleo:** non visibile al microscopio ottico, è situato in prossimità del vacuolo principale. Ha la struttura tipica degli eucarioti e contiene i cromosomi.
- **Plasmidi:** elementi genici indipendenti dal nucleo che si trovano nel citoplasma. In genere questi geni sono portatori di caratteri la cui trasmissione non avviene secondo le leggi dell'ereditarietà classica.



Disegno schematico di una cellula di lievito

La riproduzione

I lieviti possono essere distinti in sporigeni e asporigeni.

Quelli sporigeni (di cui fa parte *Saccharomyces cerevisiae*) possono, a seconda delle condizioni ambientali, riprodursi anche per sporificazione.

Quelli asporigeni invece si riproducono solo per gemmazione e in qualche caso per scissione.

In ogni caso, durante la fase attiva della fermentazione alcolica, i lieviti si riproducono in maniera asessuata.

Riproduzione asessuata:

- **Per gemmazione:** Il nucleo della cellula si sposta verso la membrana, si distende, si divide, dando origine a una piccola gemma sulla superficie della cellula. Questa cresce rapidamente per dare origine ad una cellula-figlia che può o meno staccarsi dalla cellula-madre e che si riprodurrà a sua volta per gemmazione. Un solo lievito può così molto rapidamente produrre milioni di cellule. È il metodo di riproduzione che caratterizza la maggior parte dei lieviti.
- **Per scissione:** Il nucleo si distende e si divide in due; contemporaneamente si avvia, a livello della membrana, una separazione che porta alla formazione di due cellule.

Riproduzione sessuata:

- Quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli (come ad esempio temperature non adeguate, mancanza di elementi nutritivi, ambiente molto aerato ecc...), il lievito cessa di moltiplicarsi e alcuni di essi si trasformano in aschi. Il nucleo subisce due divisioni successive; ciascuno dei nuclei-figli si circonda di citoplasma e si forma un ascospora. Un asco contiene solitamente 4 ascospore (aploidi) che si trovano in uno stato di vita rallentato e che riprenderanno la loro vita attiva solo quando le condizioni ambientali saranno favorevoli. In *Sacch. cerevisiae* le spore aploidi presentano due tipi sessuali: **a** e **α** (alfa). Dall'unione di spore di sesso opposto possono formarsi cellule diploidi. Le ascospore rappresentano il metodo di sopravvivenza dei lieviti durante i periodi avversi.

Esiste poi, a seconda del ciclo vitale del lievito, una distinzione tra ceppi omotallici ed eterotallici:

- Eterotallici: Le spore prodotte sono di due sessi distinti: **a** e **α** (*alfa*). Esse sono vegetative e stabilmente aploidi. Le spore di sesso opposto si possono unire per formare un ibrido diploide. Dato che non è possibile la coniugazione tra spore della stessa coltura, gli ibridi sono sempre eterozigoti.
- Omotallici: dopo la germinazione delle spore, in un lasso di tempo più o meno lungo, si verifica il fenomeno dell'autodiploidizzazione, cioè la spora da aploide diventa diploide. Questo singolare comportamento può essere spiegato dalla presenza del gene *HO* (da *homotallism*), che provoca l'inversione del tipo sessuale di una spora durante la gemmazione della cellula madre. La teoria è in parte confermata dal fatto che il gene *HO* è assente nelle spore con un tipo sessuale stabile.
In seguito al cambio di sesso della spora, questa può combinarsi con un'altra presente nell'asco della cellula madre, per creare un ibrido omozigote, dato che deriva dall'unione di due cellule aploidi uguali.

Saccharomyces cerevisiae

Dal punto di vista enologico riveste particolare interesse il genere *Saccharomyces*, appartenente alla classe degli ascomiceti, e in particolar modo la specie *Saccharomyces cerevisiae*, che è in assoluto il lievito più utilizzato in enologia, data la sua altissima vigoria fermentativa, l'alto potere alcoligeno, l'adattabilità alle più varie condizioni e l'ottima resistenza all' SO_2 e agli altri antisettici.

Questa specie è caratterizzata da cellule globose, ellittiche o cilindriche. Il lievito può essere presente come un insieme di cellule singole, appaiate o riunite per formare catene o aggregati. *Saccharomyces cerevisiae* fa parte dei lieviti sporigeni, ovvero quelli che si possono riprodurre anche per sporificazione, a seconda delle condizioni ambientali. La maggior parte dei ceppi è omotallica. La riproduzione asessuata avviene per gemmazione multilaterale.

La mitosi

La mitosi è un processo di divisione cellulare che assicura che ciascuna delle cellule figlie riceva un corredo cromosomico diploide identico a quello della cellula madre. Questo procedimento è quello coinvolto nella gemmazione (o nella scissione) dei lieviti.

La mitosi è preceduta dall'interfase durante la quale si ha la duplicazione del DNA e dei cromosomi che da $2n$ divengono $4n$. Seguono quindi le quattro fasi della mitosi:

- Profase : I filamenti di DNA si organizzano in strutture dall'aspetto di bastoncelli, i cromosomi. Ogni cromosoma possiede una strozzatura, che viene detta centromero. La duplicazione del DNA è già avvenuta.
- Metafase: La membrana nucleare gradualmente scompare e i cromosomi restano liberi nel citoplasma, mentre delle strutture (dette centrioli) migrano ai due poli opposti della cellula, formando un fascio di fibre che assume la forma di un "fuso", il cosiddetto fuso mitotico. Le coppie di cromatidi si muovono su un piano immaginario che taglia a metà la cellula detto piano equatoriale. In questa fase i cromosomi raggiungono il massimo grado di visibilità al microscopio, a causa della loro forte spiralizzazione. Ciò ne facilita l'osservazione.
- Anafase: In questa fase i due cromatidi di ciascun cromosoma si separano e si spostano lungo le fibre del fuso, uno verso un polo della cellula e l'altro verso il polo opposto. In questo modo ciascuna metà cellula riceve un uguale numero di cromatidi.

- **Telofase:** Ciascun gruppo di cromatidi viene circondato da una nuova membrana nucleare, quindi i cromatidi cominciano a decondensarsi e a formare i due nuclei figli. In ciascuna cellula figlia compare anche il nucleolo. Alla fine di questa fase ciascuna cellula figlia avrà una copia di ciascun cromosoma e, quindi, un patrimonio cromosomico completo.

Alla fine del ciclo cellulare si ha la separazione delle cellule figlie per mezzo del processo chiamato citodieresi.

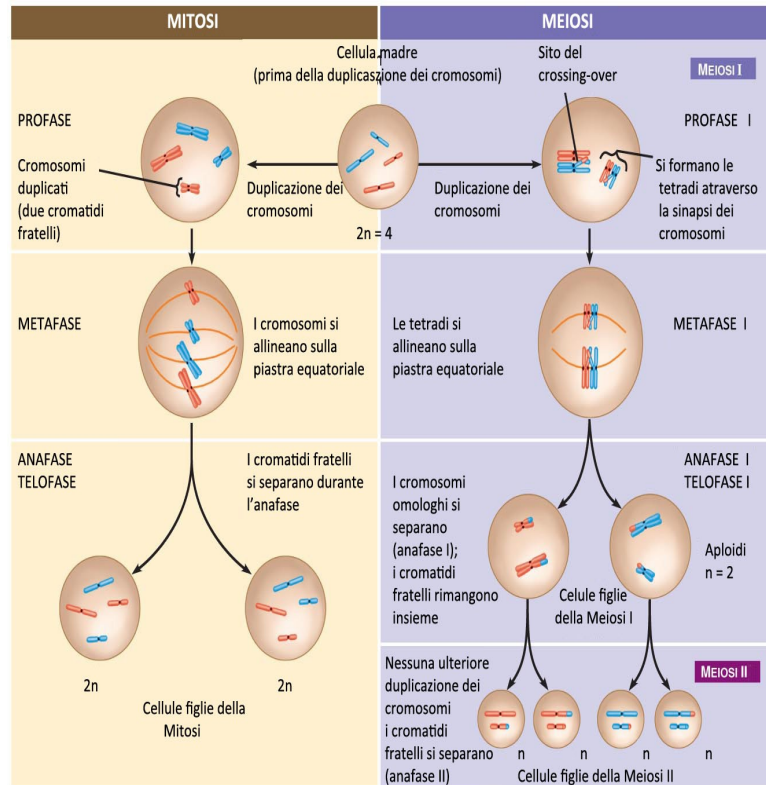
La meiosi

La meiosi è il tipo di divisione cellulare che genera cellule figlie aploidi, contenenti solo un membro di ciascuna coppia di cromosomi. Il processo genera diversità genetica in quanto ciascuna delle cellule figlie riceve un set differente di alleli. I lieviti sporigeni usano questo processo per creare le cellule figlie che verranno contenute nell'asco.

La meiosi avviene secondo due fasi principali, dette rispettivamente prima e seconda divisione meiotica, o meiosi I e meiosi II:

- **Prima divisione meiotica:** In sintesi, nella prima divisione meiotica si evidenziano i cromosomi, ciascuno costituito da due cromatidi. Questi cromosomi, dopo aver subito alcuni processi durante la profase (in particolare il crossing-over, ovvero con lo scambio di porzioni di DNA tra cromatidi di due cromosomi omologhi), si portano al piano equatoriale della cellula. Qui, senza dividersi nei due cromatidi, si attaccano alle fibre del fuso per migrare verso i due poli in modo tale che, di ogni coppia di cromosomi omologhi, una si dirige verso un polo e l'altra al polo opposto. A conclusione della prima divisione meiotica, si hanno così due cellule, ciascuna con la metà esatta dei cromosomi omologhi.
- **Seconda divisione meiotica:** La seconda divisione meiotica non è preceduta da alcuna duplicazione del DNA. I cromosomi, costituiti da due cromatidi, si portano all'equatore e si attaccano alle fibre del fuso; i due cromatidi di ciascun cromosoma si separano migrando ai poli. Si formano così quattro cellule, ciascuna con un corredo aploide di cromosomi e con un diverso assortimento dei cromosomi di origine materna e paterna. Durante questa separazione vi è una distribuzione indipendente dei cromosomi paterni e materni per cui, alla fine, vi sarà un diverso assortimento dei cromosomi nelle quattro cellule figlie.

Da un punto di vista genetico, la meiosi assume una grande importanza perché rappresenta il modo in cui possono formarsi nuove combinazioni di geni e, quindi, rende possibile la variabilità genetica tra individui della stessa specie. Infatti, già con il crossing-over, avviene una prima modificazione dell'assortimento dei geni rispetto a quello della cellula madre. Inoltre anche la divisione dei due cromosomi omologhi avviene in modo casuale: ciò significa che non è prestabilito il polo della cellula verso cui migrerà ciascun cromosoma. Dunque, a partire da una cellula madre, si formano



Mitosi e meiosi a confronto

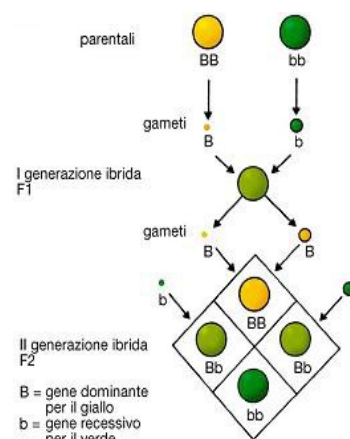
con la prima divisione meiotica due cellule aploidi che sono geneticamente differenti tra loro e diverse da qualsiasi altra coppia di cellule che derivano dalla stessa cellula madre. La variabilità genetica, assicurata anche dai meccanismi di mutazione spontanea, assume un ruolo essenziale nei processi evolutivi, secondo il concetto di selezione naturale.

Le leggi di Mendel

Gregor Mendel a metà dell'Ottocento scoprì le leggi che governano la trasmissione ereditaria dei caratteri monofattoriali, cioè controllati da un singolo gene, detti anche caratteri mendeliani semplici. Le leggi di Mendel, che trovano la loro base biologica nel processo della meiosi, sono le seguenti

- 1^a legge di Mendel o legge dell'uniformità della prima generazione ibrida

Essa afferma che l'incrocio tra individui della generazione parentale (o generazione P), ciascuno omozigote per due alleli diversi di uno stesso gene (ad es. BB x bb) e che quindi differisce dall'altro genitore per una caratteristica (ad esempio colore giallo o verde), dà una progenie, detta generazione F1, costituita da individui tutti identici tra loro (tutti eterozigoti). Ciascun genitore della generazione parentale è una linea pura, cioè è omozigote per quel carattere (ad esempio AA). Una linea pura è, infatti, un insieme di individui, il cui incrocio dà origine ad individui sempre con lo stesso carattere dei genitori. La base fisica dell'uniformità degli individui della F1 è costituita dal fatto che i due genitori BB e bb, essendo omozigoti, producono, il primo, solo gameti B e, il secondo, solo gameti b. Ne consegue che gli individui della F1 sono tutti eterozigoti Bb, tutti uguali tra loro.

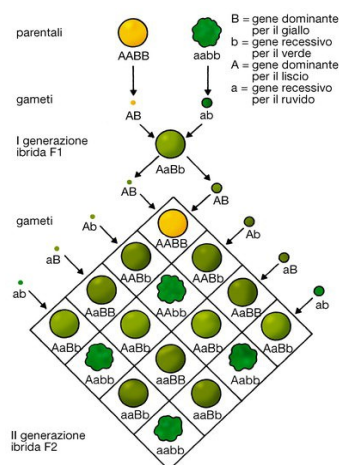


1^a e 2^a legge di Mendel

- 2^a legge di Mendel o legge della segregazione

Essa afferma che l'incrocio tra individui eterozigoti (Bb x Bb) dà una progenie (detta generazione F2), in cui compaiono genotipi diversi in rapporti genotipici definiti e costanti: 1/4 BB, 1/2 Bb e 1/4 bb. La base fisica della II legge di Mendel è data dal fatto che nell'individuo eterozigote Bb i due alleli (B e b) si separano (segregano) l'uno dall'altro durante la formazione dei gameti. Ogni individuo della F1 quindi, essendo eterozigote, produce 1/2 gameti B e 1/2 b. Ne consegue che in F2 nasceranno ad es. figli BB con frequenza 1/2 x 1/2 = 1/4.

- 3^a legge di Mendel o legge dell'assortimento indipendente



3^a legge di Mendel

Essa afferma che nell'incrocio tra individui che differiscono per due caratteri controllati ciascuno da coppie alleliche localizzate su cromosomi diversi (ad es., AaBb x AaBb), le due coppie di alleli si assortiscono indipendentemente. Si formano quindi da ogni genitore gameti AB, Ab, aB e ab, ciascuno con frequenza 1/4 (25%). Si ottiene quindi una progenie con fenotipi AB, Ab, aB e ab in rapporto di 9:3:3:1. La base fisica della III legge di Mendel consiste nel fatto che l'assortimento (segregazione) di una coppia di cromosomi omologhi è casuale e indipendente dalla segregazione di un'altra coppia di cromosomi omologhi.

L'interazione tra alleli

Dato che di uno stesso gene possono esistere due o più alleli e che in un individuo possono essere presenti due alleli diversi di uno stesso gene, il fenotipo risultante dipenderà dalla interazione tra i due alleli.

Le interazioni tra alleli possono essere di:

- dominanza completa, quando un allele, detto allele dominante, maschera completamente l'espressione dell'altro allele, detto allele recessivo. Ne deriva che il fenotipo dell'individuo omozigote dominante (AA) è indistinguibile da quello dell'eterozigote (Aa). Ad es. gli individui della F1, in caso di dominanza completa, hanno lo stesso fenotipo di uno dei due genitori, cioè fra i due caratteri che si incontrano, uno solo prevale. In caso di dominanza completa, nella II legge di Mendel si ottengono rapporti di segregazione fenotipica (fenotipi A e a).
- codominanza, quando in un eterozigote (Aa) entrambi gli alleli si manifestano fenotipicamente, cioè vengono espressi entrambi.
- dominanza incompleta o dominanza intermedia, quando il fenotipo dell'individuo eterozigote (Aa) è intermedio tra quello dei due omozigoti (AA e aa). Un esempio classico è il colore del fiore *Bella di notte*.

La teoria cromosomica dell'ereditarietà dei caratteri stabilisce che i geni sono localizzati sui cromosomi. Quindi la trasmissione dei geni da una cellula somatica ad un'altra oppure da una generazione all'altra è dovuta alla trasmissione dei cromosomi. Da qui, l'importanza di studiare i cromosomi e il loro comportamento durante la mitosi e la meiosi.

Nel caso della selezione dei lieviti è importante considerare se il carattere/i oggetto di miglioramento sono provocati da un allele dominante o recessivo.

Il miglioramento genetico

Per miglioramento genetico si intende il processo di modifica del patrimonio genetico di un qualsiasi essere vivente, al fine di migliorare le caratteristiche utili all'uomo. Quindi, nel caso specifico dei lieviti, ottenere le caratteristiche tecnologiche e qualitative desiderate.

Il miglioramento genetico dei lieviti riguarda quasi esclusivamente la specie *Saccharomyces cerevisiae*, date le sue ottime caratteristiche tecnologiche di partenza.

Per questa ragione, le tecniche descritte sono tutte riferite al miglioramento genetico di questa specie (salvo diversa indicazione). Il miglioramento genetico quindi si può ottenere con questi metodi:

- selezione clonale
- mutazione
- ibridazione
- fusione di sferoplasti
- DNA ricombinante

È necessario specificare che la selezione non si può considerare un vero e proprio miglioramento genetico, in quanto non viene modificato il genoma di partenza.

Per definizione, un lievito selezionato è un ceppo di una particolare specie che viene isolato, in quanto in possesso di caratteristiche note e programmate, al fine di conseguire un determinato risultato enologico.

In ogni caso, il materiale di partenza per il miglioramento genetico è un ceppo di lievito selezionato, del quale si conoscono le caratteristiche. La selezione è quindi una parte fondamentale del miglioramento genetico.

Le caratteristiche enologiche

Per valutare le caratteristiche enologiche dei lieviti, e quindi selezionare i ceppi più adatti a svolgere la fermentazione alcolica, si prendono come riferimento i caratteri tecnologici e qualitativi.

I caratteri tecnologici influiscono sull'andamento dei processi fermentativi. Sono quelli che permettono di tenere sotto controllo l'andamento della fermentazione, rendendola programmabile e prevedibile.

I caratteri qualitativi influenzano le caratteristiche chimiche del vino. Questi sono legati alla produzione di composti secondari e di composti che derivano dalla modificazione o conversione dei costituenti del mosto.

CARATTERI TECNOLOGICI	CARATTERI QUALITATIVI
Potere fermentativo (alcol tolleranza) Vigore fermentativo Resistenza all' SO ₂ Modalità di sviluppo: <ul style="list-style-type: none"> • polverulento (a cellule disperse) • a catene (aggregati) • flocculento • con potere schiumogeno • con potere filmogeno (flor) Sviluppo a basse temperature Sviluppo ad alte temperature Carattere killer	Produzione di composti secondari: <ul style="list-style-type: none"> • glicerolo • acido succinico • acido acetico • aldeide acetica • n-propanolo • isobutanolo • alcol amilico attivo • alcol isoamilico • β-feniletanolo Produzione di composti solforati: <ul style="list-style-type: none"> • idrogeno solforato (H₂S) • anidride solforosa (SO₂) Azione sull'acido malico Attività enzimatiche <ul style="list-style-type: none"> • attività β-glicosidasi • attività esterasica • attività proteolitica • capacità autolitica

Ibridazione

Premesse

I primi studi sull'ibridazione risalgono al 1938, e sono stati compiuti da Winge e Laustsen.

Questa tecnica sfrutta la capacità degli ascomiceti di creare spore quando si trovano in condizioni ambientali e nutrizionali ostili, come ad esempio carenza di zuccheri fermentescibili, carenza di fonti di azoto o forte aerazione. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* ha un asco che contiene 4 spore aploidi. In questa specie le cellule aploidi sono di due sessi, che vengono indicati come: **a** e **α**. Ogni asco quindi contiene due ascospore **a** e due **α**.

L'unione di due ascospore con sesso differente danno origine a un nuovo ceppo diploide che assumerà quindi le caratteristiche dei genitori. L'ibridazione in laboratorio per tanto è un processo naturale. Si deve però distinguere l'ibridazione tra ceppi eterotallici e tra quelli omotallici.

Nel primo caso si coniugano le cellule aploidi dei due genitori; è quindi sufficiente mettere nello stesso terreno di coltura le due sub-colture aploidi da ibridare e controllare che avvenga effettivamente la coniugazione.

Per i ceppi omotallici invece è necessaria la coniugazione tra spore, che è un processo più lungo e complicato. Per ibridare un ceppo omotallico con uno eterotallico invece si usa l'accoppiamento diretto cellula-spora, dove si incrocia una spora prodotta dal ceppo omotallico con una cellula aploide del ceppo eterotallico.

La maggior parte dei ceppi delle specie di interesse enologico, e in particolar modo quelli di *Saccharomyces cerevisiae*, sono omotallici. Per tanto verrà approfondita solo la parte relativa alla coniugazione tra spore.

La tecnica: coniugazione tra spore

In laboratorio per ibridare due lieviti omotallici si procede innanzitutto a individuare i ceppi che si desiderano ibridare. Questi poi vengono piastrati in un terreno di coltura che favorisce la sporificazione.

Per verificare lo stato di omozigosi dei caratteri che si desiderano ibridare, si ricorre all'analisi delle tetradi. Questo processo è utile per valutare l'ereditarietà dei caratteri senza arrivare alla seconda generazione. Si procede innanzitutto separando le spore contenute nell'asco tramite micromanipolatore, per evitare che avvenga l'autodiploidizzazione. Le 4 spore poi vengono fatte germinare. Si ottengono 4 colture di cui si possono determinare le caratteristiche.

Il micromanipolatore è un dispositivo che viene utilizzato per interagire fisicamente con un campione al microscopio, dove è necessario raggiungere un tale livello di precisione dei movimenti che non può essere realizzato a mano libera. Il posizionamento nelle tre dimensioni è estremamente preciso, spesso con una risoluzione inferiore al μm .

Una volta ottenute le spore e verificato l'omozigosi tramite analisi delle tetradi, si procede all'ibridazione. Vengono prelevati dagli aschi le due spore da ibridare, quindi con l'ausilio del micromanipolatore si appaiano le due spore in una microgoccia di mezzo nutritivo, dove si accoppiano. L'ibrido viene quindi fatto sviluppare in un altro terreno di coltura e fatto nuovamente sporificare. Si esegue poi l'analisi delle tetradi sui 4 discendenti per selezionare quello in cui è avvenuta correttamente la trasmissione dei caratteri interessati.

Utilizzando un programma di ibridazione specifico è possibile introdurre nuove e specifiche caratteristiche nei nuovi ceppi ibridi, come ad esempio la capacità di fermentare con concentrazioni zuccherine molto alte.

A partire dagli anni '90 è iniziata la produzione e la diffusione di ceppi di lievito ibridi, con una larga diffusione in commercio.

Come nella selezione classica, tutti i lieviti ottenuti con questa tecnica devono essere valutati, per selezionare quelli che verranno utilizzati nelle prove di microvinificazione per verificare l'effettivo miglioramento delle caratteristiche tecniche del nuovo ceppo di lievito.

La sperimentazione fatta con questo metodo è quindi molto lunga e laboriosa.

Negli ultimi anni invece i ceppi di lievito sono selezionati attraverso procedure intensive, che coinvolgono contemporaneamente un gran numero di lieviti, siano essi selezionati o ibridi.

Presso l'Institute for Wine Biotechnology di Stellenbosch (Sud Africa) è stato messo a punto un sistema per velocizzare la fase di sperimentazione.

Questo metodo si basa su un accoppiamento di massa (non possibile con i ceppi omotallici), seguito da procedure di arricchimento fatte attraverso la tecnica della fermentazione in continuo.

Nel dettaglio, si scelgono due ceppi di lievito che possiedono le caratteristiche che si desiderano combinare. Questi vengono indotti quindi alla sporulazione.



Esempio di utilizzo di un micromanipolatore

Le spore ottenute vengono poi sottoposte ad un accoppiamento di massa, che avviene perciò in modo casuale e porta ad una quantità praticamente infinita di combinazioni dei due patrimoni parentali.

L'intera coltura ibrida viene poi sottoposta all'operazione di arricchimento, con una fermentazione in continuo. Scegliendo i parametri della fermentazione è possibile selezionare i ceppi di lievito che corrispondono alle caratteristiche ricercate. Per esempio si può mantenere un grado alcolico elevato, un'alta concentrazione zuccherina, basse temperature e via dicendo.

Per ogni criterio scelto, la fermentazione in continuo è mantenuta nelle condizioni definite per un periodo di circa 3-4 settimane, provocando così una selezione naturale dei lieviti che riescono ad adattarsi.

I lieviti ibridi che superano questa fase vengono ulteriormente sperimentati con prove di microvinificazione.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che con questa tecnica è possibile ridurre notevolmente i tempi necessari all'ibridazione e selezione di nuovi ceppi, conseguendo nel contempo notevoli miglioramenti delle caratteristiche di interesse enologico.

Questa tecnica non è considerata manipolazione genetica, dato che deriva da un processo svolto normalmente dai lieviti. Per questo motivo possono essere prodotti e commercializzati liberamente a differenza dei lieviti GM (geneticamente modificati).

Ibridazione interspecifica e intraspecifica

Con ibridazione intraspecifica si intende l'incrocio tra due ceppi della stessa specie

La coltura ibrida in questo caso può produrre spore e, per conseguire l'obiettivo del miglioramento genetico, si esaminano le spore per trovare gli individui dotati delle caratteristiche desiderate.

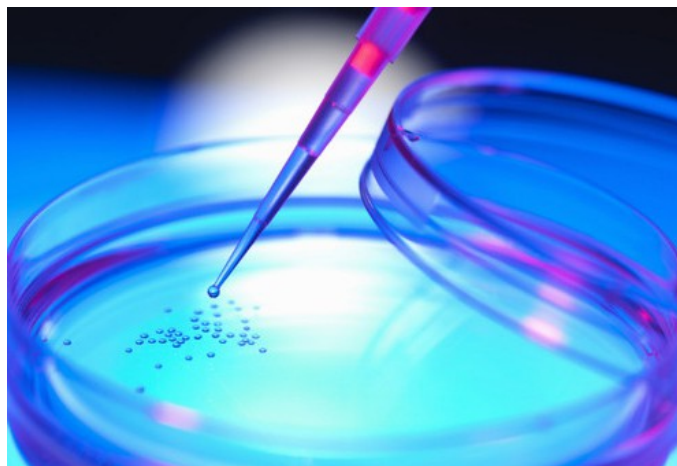
Spesso i lieviti di interesse enologico presentano anomalie nella loro ploidia (ovvero il numero delle serie omologhe di cromosomi) e per questa ragione possono avere difficoltà di sporulazione.

È pertanto necessario selezionare un numero molto elevato di potenziali ceppi parentali quando si cerca di creare un lievito con caratteristiche specifiche. Questa tecnica è stata utilizzata con successo dal microbiologo Romano nel 1985. Egli creò un lievito flocculante della specie *S. cerevisiae* non produttore di H_2S da utilizzare per la produzione di vini spumanti, ibridando un ceppo flocculante con uno non produttore di H_2S .

Una delle limitazioni consiste nel fatto che incrociando ceppi della stessa specie, non si introducono caratteristiche nuove, ma si migliorano e combinano solo quelle presenti naturalmente in quella determinata specie di lievito. Per introdurre caratteri nuovi, cioè non presenti normalmente, è necessario ricorrere alla manipolazione genetica o all'ibridazione interspecifica. Il grande vantaggio dell'ibridazione intraspecifica è la possibilità di reincrociare gli ibridi di prima generazione, dato che sono fertili.

Con ibridazione interspecifica si intende l'incrocio tra ceppi di specie differenti. Questo è possibile solo se le due specie hanno un grado di affinità sufficientemente alto. Gli ibridi prodotti però non sono in grado di sporificare, essendo di fatto sterili, quindi il lievito migliorato geneticamente può essere esclusivamente un ibrido di prima generazione. Pertanto l'ibridazione interspecifica non consente di proseguire il miglioramento oltre la prima generazione, costituendo di fatto un grosso limite di questa tecnica.

Nel caso dell'ibridazione interspecifica i risultati finali sono meno prevedibili, ma è possibile introdurre caratteri nuovi all'interno di una specie. Inoltre i ceppi ibridi sono più stabili e vigorosi dei lieviti parentali.



Alcuni ibridi di questo tipo sono stati ottenuti incrociando *S. cerevisiae* con *S. uvarum*, oppure con *S. pradoxus*. Zambonelli nel 1993 ha ottenuto degli ibridi incrociando *S. cerevisiae* con *S. uvarum*, che hanno prodotto vini con sottoprodotti a concentrazioni che si collocano circa a metà tra quelle prodotte dai ceppi parentali. I tratti fondamentali dei ceppi *S. uvarum*, come ad esempio la capacità di sintetizzare acido malico e di produrre basse quantità di acido acetico, sono rimaste presenti negli ibridi, ma in misura minore.

Questi lieviti sono stati utilizzati con successo per sostituire ceppi di *S. uvarum* che producevano vino con un acidità eccessiva o con concentrazioni inaccettabilmente alte di glicerolo e p-feniletanolo.

Altri ibridi interspecifici sono stati ottenuti da Rainieri nel 1998 e 1999, incrociando ceppi di *S. cerevisiae* isolati dal siero di latte con ceppi di *S. uvarum*. Riuscì a ottenere alcune colture che possedevano una combinazione di tutte le caratteristiche enologiche desiderate provenienti da entrambi i ceppi parentali. Inoltre, alcuni dei tratti che hanno reso i ceppi parentali inadatti alla vinificazione, erano assenti.

Questi ibridi hanno mantenuto la caratteristica più utile del ceppo siero di *S. cerevisiae*, ovvero la notevole capacità di ridurre l'acido malico, e anche uno dei tratti più utili di *S. uvarum*, cioè la produzione molto basse di acido acetico.

Un grave fattore limitante dell'ibridazione è l'impossibilità di programmare la combinazione delle caratteristiche trasmesse dai genitori alle cellule figlie; il risultato finale è in gran parte opera del caso. Inoltre alcuni caratteri di interesse enologico sono dati da alleli non dominanti, ovvero recessivi. Questi caratteri non vengono sempre espressi dai ceppi ibridi, anche se i geni codificanti quel determinato carattere sono stati trasmessi. Viceversa può accadere che una caratteristica non desiderata possa essere determinata da un allele dominante. È il caso del potere schiumogeno di alcune specie di lievito. Si è notato infatti che gran parte degli ibridi eredita questo carattere negativo ai fini enologici.

Esempi di lieviti in commercio ottenuti con l'ibridazione

L'ibridazione è un processo molto frequente in natura e viene adottato dai lieviti nel caso in cui condizioni ambientali dovessero essere avverse. L'applicazione di questa tecnica in laboratorio è pertanto relativamente semplice. Inoltre gli ibridi hanno il vantaggio di essere stabili nel tempo e, in genere, di essere più vigorosi dei ceppi parentali.

Come già specificato, l'ibridazione intraspecifica ha il grande limite di poter combinare solo le caratteristiche di ceppi appartenenti alla stessa specie.

Per questo motivo la tecnica più interessante e che può portare a risultati migliori è l'ibridazione interspecifica, dove è possibile superare la barriera della specie. Serve però precisare che è necessario utilizzare due specie con un grado di affinità sufficientemente alto, limitando di fatto la gamma di caratteri che possono essere combinati.

Tra le più grandi aziende a livello mondiale, quelle maggiormente attive nel campo dell'ibridazione dei lieviti sono: Anchor yeasts (Lallemand group), Laffort e Dal Cin.

Sono poi particolarmente interessanti i ceppi interpecifici Anchor exotics SPH (prodotto da anchor yeasts-lallemand) e S6U (prodotto da Dal Cin).

ANCHOR YEAST - LALLEMAND

L'azienda Anchor Yeast è stata fondata nel 1923 in Sud Africa. Per molti anni è stata tra le aziende leader nella produzione di lieviti per la panificazione, per uso enologico e altre bevande fermentate. Nel 2006 questa azienda è stata acquistata dalla società canadese Lallemand, specializzata nella produzione e commercializzazione di lieviti e batteri. Questo gruppo attualmente è il più attivo nella ricerca nel campo



dell'ibridazione dei lieviti. Infatti è stata la prima società e marchio produttore di lievito per uso enologico nel mondo, a commercializzare ceppi ibridi ottenuti in laboratorio.

Il primo ibrido commercializzato è stato creato dal Dipartimento di Microbiologia dell'Università di Stellenbosch in Sudafrica (IWBT), ed è stato denominato VIN 13.

Il successo di questo ceppo ha aperto la strada alla commercializzazione di altri cinque ibridi intraspecifici da parte della Anchor Yeasts. Quattro di questi ibridi (NT 202, NT 50, NT 116, NT 112) sono stati creati dall'ARC Infruitec-Nietvoorbij Stellenbosch (Sudafrica) e uno (VIN 2000) dall'Istituto per le Biotecnologie Enologiche (IWBT), Università di Stellenbosch, Sudafrica.

- Anchor VIN 13

Si tratta di un incrocio fra due differenti sub-specie di *S. cerevisiae*, che viene comunque considerato come un ibrido intraspecifico. Il ceppo VIN 13 è stato il primo ibrido ad essere commercializzato da Anchor Yeast, nel 1991.

Migliora gli aromi volatili tiolici (frutto della passione, pompelmo, uva spina) e produce esteri (frutta esotica, floreale). È consigliato per fermentazioni in serbatoi di acciaio inox a basse temperature producendo vini bianchi complessi e strutturati. Viene raccomandato per la produzione di: Traminer, Gewürztraminer, Riesling, Chardonnay, Trebbiano, Cortese, Soave, Verdicchio, Müller Thurgau, Lugana, Malvasia, Moscato. È consigliato in modo particolare per l'elaborazione di vini rosati, di spumanti e frizzanti.



- Anchor NT 50

NT 50 è frutto del programma d'ibridazione di lieviti dell'ARC Infruitec-Nietvoorbij, dell'Istituto di ricerca della vite e del vino del Consiglio di Ricerca Agricola di Stellenbosch, in Sudafrica.

Questo ceppo migliora, nei vini rossi, gli aromi di frutta rossa (fragola, lampone e ciliegia), di bacche nere (mora e ribes nero) e di spezie. Può essere impiegato per vini destinati o meno all'affinamento in legno. È particolarmente idoneo per la produzione di Merlot, Teroldego, Valpolicella, Chianti, Aglianico, Cannonau, Sangiovese e Morellino.

- Anchor Exotics SPH



Questo ceppo di lievito riveste una particolare importanza in quanto è stato il primo ibrido interspecifico al mondo ad essere stato messo in commercio. Nasce dalla combinazione delle specie *Saccharomyces cerevisiae* e *Sacch. paradoxus*.

S. paradoxus ha la capacità di degradare parzialmente l'acido malico (alcuni ceppi fino al 38%) e possiede anche attività pectolitica, due caratteristiche solitamente non riscontrate nei lieviti *S. cerevisiae*.

Dalle sperimentazioni su Chardonnay, Falanghina, Trebbiano di Lugana, Inzolia (Ansonica) è emerso che questo lievito favorisce l'espressione degli aromi varietali e in particolare quelli fruttati. Nei rossi invece si evidenzia l'elevata produzione di glicerolo e di aromi complessi e persistenti. Un'altra caratteristica è la bassa resa nella conversione zuccheri/alcol, data la maggiore produzione di glicero. Questa particolare caratteristica può essere sfruttata per la produzione di vini con un basso grado alcolico.

LAFFORT

Nata a Bordeaux nel 1895, la Società Laffort è tra le aziende più grandi a livello mondiale nella produzione di lieviti enologici.

Laffort è ancora oggi fortemente caratterizzata da un legame molto stretto con la ricerca, collaborando anche con la facoltà di enologia di Bordeaux.

È proprio dalla collaborazione con questa azienda che sono nati i due ceppi ibridi che vengono attualmente commercializzati (*Zymaflore X 5* e *RX 60*).



- Zymaflore X 5

Ottenuto per ibridazione intraspecifica, questo ceppo di lievito aumenta la produzione di aromi varietali, come i tioli volatili, e la produzione di aromi fermentativi (esteri). Si adatta bene a condizioni fermentative difficili, come le basse temperature e la bassa torbidità in fermentazione. Viene consigliato in particolare per le vinificazioni in bianco.

- Zymaflore RX 60

Anche questo ceppo è stato ottenuto per ibridazione intraspecifica. L'azienda evidenzia le eccellenti capacità fermentative, la produzione elevata di aromi e l'ottima resistenza all'etanolo. Viene consigliato per la vinificazione in rosso, per ottenere vini fruttati, colorati e rotondi, con un aroma ricco ed equilibrato.

DAL CIN

Fondata dal dott. Gildo Dal Cin, la società nasce a Milano nel 1949, ed è stata la prima in assoluto a cimentarsi nella ricerca e nella produzione industriale di tutta la gamma delle specialità enologiche.

Dagli anni Sessanta, inizia a costruire sul territorio filiali commerciali (Verona e Modena).

Aprire e sfruttare cave di farina fossile in Toscana e di bentonite nell'isola di Ponza; mette a punto processi produttivi per la lavorazione di perlite e cellulosa, registrando brevetti e tecnologie innovative.

Negli anni Novanta inizia la costituzione di un Gruppo multinazionale e stringe rapporti di collaborazione e joint-ventures con partner italiani ed esteri. Apre poi nuove filiali tra cui quella di Conegliano.

È importante ricordare questa azienda in particolare, essendo stata la prima azienda in Italia a produrre un ceppo interspecifico di lievito, il ceppo S6U.

- S6U

Questo ceppo interspecifico di lievito è stato ottenuto in Italia, dall'istituto sperimentale di enologia di Velletri. È un incrocio naturale tra *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*.

Quest'ultima specie è un parente stretto di *S. cerevisiae*, e dal punto di vista enologico si distingue per la vigoria fermentativa a basse temperature.

I vini fermentati con S6U sono caratterizzati dalla scarsissima produzione di composti solforati, i bassi tenori di acidità volatile e di sottoprodotti che combinano l'anidride solforosa.

Inoltre questo ceppo aumenta la produzione di glicerolo, che contribuisce alla rotondità e morbidezza del vino, e si evidenzia inoltre una maggiore produzione di acidi, specialmente succinico e malico.

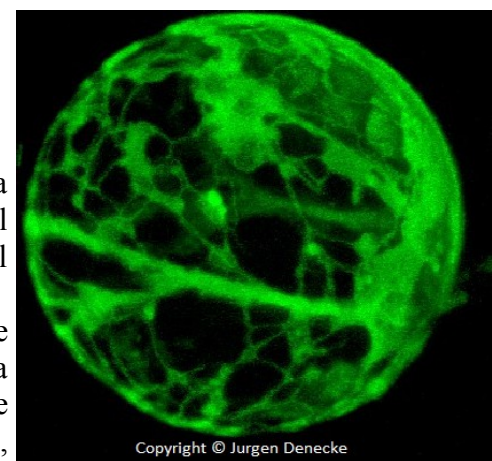
Questo ceppo è particolarmente adatto per la fermentazione di uve appassite. In Italia infatti è stato sperimentato nella produzione di Amarone della Valpolicella, con eccellenti risultati.

L'alternativa: la fusione di sferoplasti

Premesse

La parete cellulare dei batteri e dei lieviti può essere disgregata da appositi enzimi che idrolizzano i polisaccaridi di base: il lisozima nel caso dei batteri e la elicasi (chiamato anche zimolasi o liticasi) nel caso dei lieviti.

Se le cellule private della parete sono messe in una soluzione isotonica con il citoplasma, le cellule rimangono avvolte dalla sola membrana e assumono una forma sferica. Le cellule vengono definite protoplasti se la parete è completamente distrutta (caso dei batteri),



Ricostruzione 3D di uno sferoplasto

oppure sferoplasti se rimangono frammenti della parete (caso dei lieviti).

Gli sferoplasti dei lieviti sono perfettamente vitali, se si trovano in soluzione isotonica rispetto al citoplasma, e hanno la capacità di riformare la parete quando si trovano in condizioni ideali. Inoltre essi sono anche in grado di moltiplicarsi e di fondersi (ibridarsi) tra loro, con sferoplasti che possono essere sia della stessa specie che di specie differenti.

La tecnica

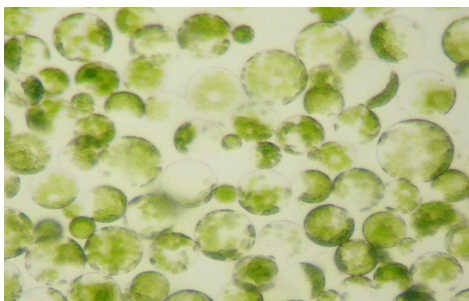
I primi studi sulla tecnica della fusione di sferoplasti, applicata ai lieviti, risalgono al 1976 (Svoboda 1976; van Solingen e van der Plaats 1977; Yamamoto e Fukui 1977).

Per ottenere gli sferoplasti si prelevano delle cellule giovani, facendole sviluppare su un mezzo di coltura liquido (nella maggior parte dei casi YPD). Vengono poi raccolte e lavate per centrifugazione. Quindi sono sospese in una soluzione di sorbitolo con concentrazione da 0,8 a 1,2 M (molare) e tamponate a pH 7,5. La soluzione di sorbitolo è isotonica rispetto al citoplasma e consente agli sferoplasti di conservarsi integri. Alla sospensione viene poi aggiunto l'enzima zimolasi (elicasi), che dopo incubazione a 30 °C per un'ora, provoca la lisi della parete cellulare. Dopodiché gli sferoplasti sono lavati tramite centrifugazione per eliminare l'enzima e possono essere conservati per 24 ore a 4 °C senza perdite di vitalità.

Per fondere gli sferoplasti i due ceppi vengono sospesi in una soluzione al 40% di polietilene glicole (PEG), in presenza di CaCl₂ e tamponata a pH 7,5. Dopo circa 30 minuti la soluzione è centrifugata e il materiale viene sospeso nuovamente in sorbitolo.

In questo tempo la fusione è avvenuta, indotta dalla presenza di PEG (il cui ruolo specifico non è ancora ben noto). Si esegue infine una semina in piastra su terreno YPD agarizzato e supplementato con sorbitolo. Si può quindi procedere con l'analisi della colonia, al riconoscimento e isolamento dei prodotti di fusione e alla loro caratterizzazione.

Fattori che ne limitano l'uso



Protoplasti di cellule di foglia di petunia

Questa tecnica è stata usata per l'ottenimento di nuovi ceppi per birrifico e, nel settore enologico, per l'introduzione del carattere killer in ceppi criotolleranti di *Saccharomyces cerevisiae*.

Inizialmente sembrava che per la sua semplicità e applicabilità ad ogni tipo di ceppo, questa tecnica avrebbe potuto aprire interessanti prospettive nel campo del miglioramento genetico dei lieviti enologici. Tuttavia il metodo pone molti problemi in fase di riconoscimento dei prodotti di fusione e produce ceppi non stabili. In definitiva la fusione di sferoplasti non ha dato i risultati attesi e la tecnica attualmente è stata abbandonata.

DNA ricombinante

Premesse

La tecnica del DNA ricombinante è una tecnica non convenzionale di miglioramento genetico, che permette lo scambio di caratteristiche tra individui anche molto distanti tra loro, dal punto di vista genetico.

È teoricamente possibile lo scambio di geni tra specie non appartenenti allo stesso regno, come ad esempio l'introduzione di un gene di origine animale in un vegetale. Con questa tecnica si producono organismi che sono definiti "organismi geneticamente modificati" (OGM).

Per definizione, gli OGM sono organismi nei quali parte del genoma è stato modificato tramite ingegneria genetica. Non sono pertanto considerati organismi geneticamente modificati tutti quegli esseri viventi il cui patrimonio genetico è stato modificato in seguito a processi spontanei, o indotti dall'uomo tramite alcune tecniche che non rientrano nella definizione data dalla normativa di

riferimento (ad esempio l'uso di radiazioni ionizzanti o mutageni chimici).

La prima molecola di DNA chimerica è stata prodotta nel 1972, mentre i primi organismi geneticamente ingegnerizzati sono stati i batteri nel 1973 ed i topi nel 1974.

In enologia, e in particolare nel settore della microbiologia enologica, lo studio sulla tecnica del DNA ricombinante è iniziata solamente nel 1990.

Attualmente le ricerche su questo argomento sono svolte in tutto il mondo, ma il maggior impegno e rilievo in questo senso lo riveste l'Università di Stellenbosch in Sud Africa e, in minor parte, l'Università di Montpellier in Francia.

Lo scopo principale dell'ingegneria genetica nel campo della microbiologia enologica, è introdurre in *S. cerevisiae*, prerogative proprie di altre specie, sia di lievito che di batteri, come ad esempio la capacità di svolgere la fermentazione malo-lattica.

In linea di principio si cerca di far coprire al lievito più o meno tutti gli stadi della vinificazione, dove gli enzimi commerciali e i batteri giocano un ruolo chiave, come ad esempio la produzione di aromi particolari o la degradazione delle pectine e proteine.

L'uso di questi organismi in Italia non è consentito e finora l'impiego degli OGM nel settore del vino ha incontrato l'opposizione dell'opinione pubblica europea, dei consumatori e di molti viticoltori; un'opposizione superiore a quella presente in altri settori dell'agricoltura. Si possono citare, come esempi, il manifesto contro le viti OGM promosso in Italia dall'Associazione Città del Vino e poi, passando alla Francia, il movimento di opposizione alle sperimentazioni in pieno campo sulle viti OGM da parte dell'Inra (l'Institut National de la Recherche Agronomique), sostenuto da alcune tra le più prestigiose cantine del mondo (come Romanée Conti e Chateau Latour), riunite nell'associazione Terre et Vin du Monde.

Per i viti-viticoltori in generale, ma in particolar modo per quelli biologici, è essenziale avere a disposizione sul mercato lieviti e batteri selezionati su cui ci sia la garanzia che non provengono da manipolazione genetica. Da questo punto di vista si può notare che sempre più aziende forniscono in modo esplicito la garanzia dell'assenza di OGM nei loro prodotti.

Anche da parte di studiosi che non sostengono il metodo biologico, emergono dubbi e perplessità sul conto dei lieviti OGM. Affermano infatti che risulta poco comprensibile l'impegno sul piano della ricerca "quando alcune delle ingegnerizzazioni più interessanti sono sostitutive di pratiche enologiche molto semplici e lecite. È il caso, ad esempio, della idrolisi delle pectine e della liberazione dei monoterpeni." (Zambonelli, 2003).

Inoltre alcuni dei caratteri trasferiti ai lieviti geneticamente modificati finora creati, come la capacità acidificante, l'elevata produzione di glicerolo o la disacidificazione attraverso la fermentazione malo-alcolica, sono posseduti anche da alcuni ceppi di *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e loro ibridi, che sono già disponibili in commercio e funzionano con efficacia (Zambonelli, 2004).

La tecnica

Il grande vantaggio di questa tecnica è la possibilità di introdurre in un ceppo di lievito un carattere specifico, derivante anche da una specie molto distante e non affine, senza influire sulle altre proprietà del lievito.

La metodologia principale e più diffusa del DNA ricombinante si può dividere nelle seguenti fasi:



Ricostruzione 3D della doppia elica del DNA

INDIVIDUAZIONE DEL CARATTERE

Innanzitutto si procede ad individuare in un qualsiasi microrganismo (sia esso lievito o batterio) il carattere di interesse enologico, legato ad una determinata attività metabolica, che si desidera inserire in *S. cerevisiae*. In genere si sceglie un carattere proveniente da un'altra specie, dato che altrimenti si potrebbe ricorrere all'ibridazione intraspecifica.

Le attività metaboliche in questione sono dovute alla sintesi di specifici enzimi, la cui produzione è codificata da un gene, ovvero un porzione del DNA.

Lo studio procede poi con l'analisi in laboratorio della proteina enzimatica e con la determinazione della sequenza di amminoacidi che compone quella determinata proteina. Da qui poi si può ricavare la sequenza di basi azotate, quindi riconoscere il gene interessato.

SEPARAZIONE DEL GENE

Si procede a rendere disponibile e separato da ogni altro, il gene da trasferire (gene target). Uno dei metodi più utilizzati è sintetizzare in vitro il gene target in grandi quantità.

Si usa la tecnica di reazione a catena della polimerasi, cioè la tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction). Conoscendo la sequenza di nucleotidi, o almeno individuandone le estremità, è possibile sintetizzare in vitro oligonucleotidi della sequenza complementare, cioè i primers.

Se si applica una temperatura sufficiente a denaturare il DNA aprendone la doppia elica, i primers, in presenza di basi azotate in una specifica soluzione tampone, innescano la reazione dell'enzima polimerasi. Questo enzima dispone le basi azotate nell'esatta sequenza complementare alla sequenza del frammento di DNA (gene) target. In pratica l'area di DNA che viene delimitata dai primers viene utilizzata come una sorta di stampo per la sintesi del gene.

Il processo viene ripetuto più volte fino ad accumulare una grande quantità del gene oggetto di interesse.

INSERIMENTO DEL GENE NEL DNA PLASMIDICO VETTORE

Una volta ottenuti i frammenti di DNA, si procede all'inserimento di questi in un DNA plasmidico che funge da vettore, generalmente utilizzando quello di *Escherichia coli*. Questa operazione inizia linearizzando, cioè aprendo, il plasmide di *E. coli* con enzimi specifici (endonucleasi di restrizione). Quindi si salda il frammento di DNA che si desidera inserire agli estremi del plasmide, attraverso l'enzima ligasi. Il nuovo plasmide viene quindi reintrodotta in *E. coli*, reso preventivamente idoneo ad accettarlo. Questa fase viene definita trasformazione batterica ed ha lo scopo di mantenere il plasmide.

ISOLAMENTO DEL DNA PLASMIDICO E INSERIMENTO NEL LIEVITO

Questa fase consiste nell'isolamento del DNA plasmidico dal resto della cellula batterica, inserendolo poi nella cellula di lievito. Questa fase prende il nome di trasformazione del lievito, e si effettua agendo sulla parete cellulare del lievito per via enzimatica (elicasi), rendendola permeabile al plasmide. Una volta introdotto il plasmide il lievito prende il nome di cellula trasformata.

Le cellule trasformate vengono messe nelle condizioni di formare colonie e fra queste si selezionano le cellule contenenti il plasmide con il nuovo frammento di DNA precedentemente inserito. Per rendere possibile il riconoscimento è necessario usare plasmidi portatori di altri caratteri, che possano essere facilmente riconoscibili e compatibili con *S. cerevisiae*. I lieviti ottenuti poi vengono sottoposti ad accurate analisi ed accertamenti al fine di verificare la presenza del gene desiderato e l'assenza di interferenze con altri caratteri propri della specie.

Questa, anche se è la più diffusa, è solo una delle applicazioni della tecnica del DNA ricombinante. È anche possibile eliminare uno o più geni non desiderati, attraverso la tecnica dall'eliminazione dei geni o "gene destruction", oppure l'amplificazione di un carattere già presente con la sovraespressione o "overexpression".

In tabella, i risultati ottenuti applicando la tecnica del DNA ricombinante

OBIETTIVO	STRATEGIA	RIFERIMENTI
MIGLIORAMENTO DELLE PRESTAZIONI FERMENTATIVE		
Utilizzo efficiente di zucchero	Sovraespressione di HXT permeasi della famiglia <i>S. Cerevisiae</i> per migliorare l'assorbimento dello zucchero	Riouetal (1999)
Miglioramento dell'assimilazione dell'azoto	Creazione di un lievito di vino mutato contenente un gene recessivo (ure2, repressore dei geni coinvolti nella conversione della prolina glutammato) per aumentare l'assimilazione dell'abbondante offerta di prolina nel succo d'uva	Salmone e Barre (1998)
Maggiore tolleranza ai prodotti antimicrobici	Aumento della resistenza al rame, integrando il gene CUPI (codifica per una proteina di lega di rame) in diversi siti del genoma per consentire ai lieviti del vino di tollerare un elevato residuo di rame.	Fogeletal (1983) Henderson et al. (1985)
CHIARIFICAZIONE DEL VINO		
Riduzione intorbidamento proteine	Sovraespressione di PEP4, gene codificante per la proteasi vacuolare A, per attivare la proteasi stessa, normalmente inattiva	Lourens (1992)
Prevenzione intorbidamento da polisaccaridi	Coespressione del gene <i>pepE</i> che produce la pectato-liasi, da <i>Erwinia chrysanthemi</i> , e il gene <i>pehL</i> che produce una poligalatturonasi da <i>Erwinia carotovora</i> , per permettere al lievito di degradare le polipeptine. Coespressione del gene <i>endo-pl,4-glucanasi</i> da <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , l' <i>endo-pM,3-1,4-glucanasi</i> (INI1) da <i>Bacillus subtilis</i> , il gene <i>cellodestrinasi</i> (CELI) da <i>Rutri nococcusflavefaciens</i> , il gene <i>cellobioidrolasi</i> (CBHI) da <i>Phanerochaeta chrysosporium</i> e il gene <i>cellobiase</i> (BOLI) da <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> , introdotto in <i>S. cerevisiae</i> consentendo al lievito di degradare i glucani in modo efficiente.	Laing e Pretorius (1993) van Rensburg et al. (1997-1998)
MIGLIORAMENTO DELLE QUALITÀ ORGANOLETTICHE		
Rilascio di terpenoidi dell'uva	Espressione del gene 3-glucosinasi (BOLI) derivante da <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> nel <i>S. Cerevisiae</i> per migliorare gli aromi del vino. Espressione del gene <i>b-1, 4-glucanasi</i> derivante da <i>Trichoderma longibranchiatum</i> in lieviti per uso enologico, per migliorare l'intensità aromatica del vino. Sovraespressione del gene <i>exo-b-1,3 glucanase</i> derivante da <i>S.cerevisiae</i> e introduzione nello stesso lievito del gene <i>endo-b-1,4-glucanase</i> . Il gene <i>endo-p-1,3-1,4-glucanasi</i> derivante da <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , il gene <i>endo-p-1,3-1, 4-glucanasi</i> derivante da <i>Bacillus subtilis</i> e il gene <i>arabinofuranosidasi</i> per aumentare il carattere varietale delle uve moscate.	van Rensburg et al. (1997, 1998) Pérez-González et al. (1993) Crousera (1996)

Maggiore produzione di esteri volatili	Sovraespressione del gene dell'acetiltransferasi (AFT1), fondamentale nella sintesi degli esteri per aumentare la presenza di etil-acetato, iso-amil-acetato e B-fenil-etil acetato, per migliorare i sentori di fruttato nei vini e nei distillati.	Lilly et al. (2000)
Maggiore produzione di glicerolo	Sovraespressione del gene GPD1 (glicerolo-3-fosfato deidrogenasi citosolica), l'enzima limitante della formazione di glicerolo, espressione del FPS1, codifica per una proteina canale che funge da facilitatore del trasporto di glicerolo, per aumentare la produzione di glicerolo, e la cancellazione di ALD6 e ALD7, geni che codificano per acetaldeide deidrogenasi per evitare l'eccessiva concentrazione di acetato prodotto per bilanciare la sovrapproduzione di glicerolo.	Remize et al. (1999)
REGOLAZIONE DELL'ACIDITÀ DEL VINO		
Riduzione dell'acidità per i vini prodotti nei climi temperati	Coespressione del gene malolattica (mleS) da <i>Lactococcus lactis</i> e del gene malato permeasi (mae1) dal <i>Schizosaccharomyces pombe</i> in <i>S. cerevisiae</i> per indurre la fermentazione malolattica. Coespressione del gene dell'enzima malico (mae2) dal <i>S. pombe</i> e gene malato permeasi (mae1) da <i>S. pombe</i> in <i>S. cerevisiae</i> per indurre la fermentazione malo-alcolica.	Bonyetal. (1997) Volschenk et al. (1997)
L'acidificazione dei vini prodotti in climi più caldi	Costruzione di un ceppo di <i>S. cerevisiae</i> contenente il gene laticodeidrogenasi (LDH) dal <i>Lactobacillus casei</i> espresso sotto il Controllo dell'alcol deidrogenasi del lievito, gene per promuovere la conversione di glucosio ad acido lattico.	Dsquinetal. (1999)
Lieviti nel vino che producono peptidi antimicrobici	Espressione di due batteriocine a <i>S. cerevisiae</i> , uno che codifica una pediocina (Peda) dal <i>Pediococcus acidilactici</i> e uno che codifica una leucocin (iCab) da <i>Leuconostoc carnosum</i> per costruire un ceppo di lievito battericida.	Schoemanefa/. (1999)

Lieviti in commercio ottenuti con la tecnica del DNA ricombinante

ML01

Il lievito di partenza è il ceppo Prise de Mousse S92 di *S. cerevisiae*, nel quale il Professore Van Vuuren, dell'Università della British Columbia (Canada), ha inserito due nuovi geni: quello che decodifica la produzione dell'enzima malolattico e quello che regola la produzione della proteina atta al trasporto del malato (permeasi). Con l'inserimento di questi geni è stato possibile creare un lievito in grado di svolgere simultaneamente le fermentazioni alcolica (FA) e malo-lattica (FML).

L'enzima malolattico, ha bisogno di NAD + e Mn 2+ per svolgere la sua funzione. Grazie a questo enzima i batteri possono trasformare l'acido L(-) malico in acido L(+) lattico, senza passare per composti intermedi.

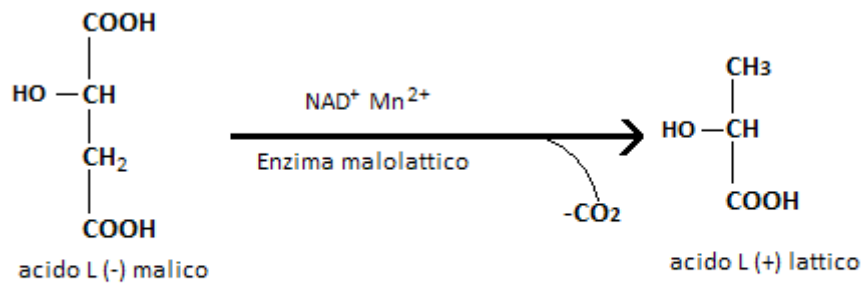
Per fare produrre l'enzima malico a *S. cerevisiae*, è stato inserito il gene mleS, proveniente dal batterio *Oenococcus oeni*, che è comunemente usato nelle colture starter per la FML.

Il gene mae1 invece è stato estratto da *Schizosaccharomyces pombe*, e decodifica la produzione di una permeasi, atta al trasporto dell'acido malico (sotto forma di malato).

Si è dimostrato che quest'ultimo enzima è assolutamente necessario per ottenere una completa degradazione dell'acido malico, dal momento che un ceppo con solo il gene mleS (decodificante la produzione dell'enzima malolattico) riusciva a degradare solo il 45% di questo acido.

Il tasso di trasporto dell'acido malico però è fortemente influenzato dal numero di copie del gene

mae1. Per questo motivo nel ceppo ML01 ne sono state inserite varie copie, riuscendo così ad ottenere un lievito in grado di degradare completamente l'acido malico.



Biochimismo FML con enzima malolattico

Le modifiche apportate a questo lievito permettono di modulare la fermentazione malo-lattica e prevenire la produzione di ammine biogene, sostanze che possono provocare mal di testa, allergie e palpitazioni.

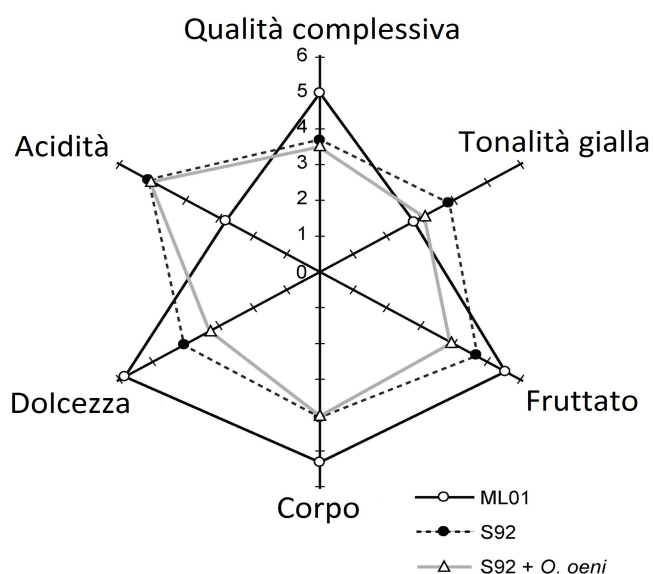
È stato anche evidenziato che non contiene marcatori di resistenza agli antibiotici e contiene la produzione di carbammato di etile.

Per quanto riguarda l'uso del ceppo ML01, gli aspetti positivi evidenziati sono:

- risparmio di tempo dato che le due fermentazioni (FA e FML) sono simultanee
- riduzione dei rischi per la salute, data la minore produzione di ammine biogene e di carbammato di etile
- riduzione dei rischi di deterioramento del vino

Sono però emerse anche alcune perplessità quali:

- cambiamenti nell'aroma del vino rispetto ad una FML operata da batteri lattici
- possibili rischi ambientali
- rifiuto da parte del consumatore



Nel grafico a lato si possono notare le differenze qualitative tra le fermentazioni condotte con il ceppo ML01, il parentale S92, e S92 abbinato a *O. oeni*, dal quale deriva il gene che produce l'enzima malo-lattico.

Disponibile dal 2006, il lievito ML01 è stato approvato da Health Canada per uso commerciale e attualmente è legale anche negli Stati Uniti e in Sud Africa.

Si ricorda che a differenza dell'Unione Europea, le norme statunitensi e canadesi non prevedono l'indicazione della presenza di ingredienti geneticamente modificati in etichetta.

ECMo01

Deriva dal ceppo Davis 522 di *S. cerevisiae*, che è un lievito normalmente utilizzato in enologia.

È stato creato in Canada, ed è stato introdotto nel lievito la capacità di produrre l'enzima urea amidoliasi, che ha la funzione di idrolizzare l'urea. Lo scopo è di tipo salutistico perché dall'urea deriva il carbammato di etile, che è un composto cancerogeno e mutageno.

I nuovi geni introdotti derivano tutti da *S. cerevisiae*. In particolare il gene DUR1,2 codifica la produzione dell'enzima urea amidoliasi e deriva dal ceppo TCY1.

Il gene PGK1 invece assicura l'espressione del gene DUR1,2 e deriva dal ceppo AB972. Come marcatore è stato usato il plasmide recante il gene Tn5Ble che conferisce la resistenza all'antibiotico phleomycin. Per verificare l'effettivo passaggio dei nuovi geni è sufficiente testare la capacità dei lieviti di svilupparsi su un terreno selettivo contenente phleomycin.

La stabilità genetica è stata dimostrata per più di 100 generazioni in assenza di pressione selettiva. Questa caratteristica è importante per tutti i lieviti selezionati, ma nel caso di ceppi OGM riveste un'importanza fondamentale.

In via teorica, sarebbe stato possibile ottenere il ceppo di *S. cerevisiae* ECMo01 con la tecnica dell'incrocio intraspecifico, dato che i geni inseriti provengono dalla stessa specie. Il fatto che sia stata preferita l'ingegneria genetica, dimostra che il DNA ricombinante è una valida alternativa all'ibridazione, con in più l'enorme vantaggio di poter scegliere i caratteri da inserire.

Gli studi sull'affidabilità di questo lievito prima della messa in commercio sono stati condotti dalla Canadian Environmental Protection. Si è testato l'impatto su uomo e ambiente, confermando la non pericolosità per la salute umana. Una delle maggiori preoccupazioni per quanto concerne l'uso di OGM è la dispersione e diffusione nell'ambiente, ma è stato dimostrato (con un test su alcuni vigneti) che questi ceppi hanno una scarsa competitività con gli altri microorganismi.

Fattori che ne limitano l'uso

La ricerca condotta sui lieviti OGM, in particolare nell'Università di Stellenbosch ha evidenziato i possibili vantaggi legati all'utilizzo dei lieviti geneticamente modificati, come ad esempio gli effetti positivi sulla salute del consumatore, già citati nei casi dei ceppi transgenici di *S. cerevisiae* ML01 e ECMo01.

Infatti è possibile ridurre la produzione di sostanze negative quali le ammine biogene o il carbammato di etile e aumentando quella di sostanze positive come resveratrolo e altri polifenoli; oppure la riduzione del tenore alcolico troppo elevato che caratterizza i vini prodotti in alcuni paesi. Dato che la tecnica del DNA ricombinante è abbastanza recente, i ceppi creati con successo sono molto pochi; inoltre la ricerca è penalizzata dalle forti restrizioni legali, e anche dal fatto la maggior parte dei consumatori europei rifiuta gli OGM e non sono favorevoli alla ricerca in questo campo.

La stessa posizione è condivisa dalla maggior parte dei produttori europei, ma è doveroso precisare che esiste una minoranza interessata all'argomento, anche se attualmente nessuno è interessato ad un possibile uso di questi lieviti, in quanto si temono le reazioni negative da parte dei consumatori.

Inoltre, ci sono perplessità sulla competitività dei ceppi GM. Proprio perché modificati rispetto ad alcune attività metaboliche, potrebbero non mantenere un elevato vigore fermentativo, necessario per competere con le colture già presenti nel mosto, anche se questo aspetto non stato completamente confermato.

Esiste anche il timore per cui la diffusione di lieviti GM sul mercato possa portare alla produzione di vini molto standardizzati e simili tra loro.

OGM in viticoltura

Introduzione



La normativa sugli OGM è generale, ovvero non prevede norme particolari per singolo comparto produttivo, per cui la viticoltura è sottoposta alle stesse regole.

La normativa di riferimento comunitaria è la direttiva 2001/18/CE (e successive modifiche), che è stata quindi recepita dall'Italia con il decreto legislativo 224 del 2003.

Attualmente in Italia è fatto divieto di coltivare OGM se non a scopo di ricerca scientifica.

Esiste però anche un regolamento che sancisce la possibilità di commercializzare OGM, purché etichettati come tali.

Gli OGM in viticoltura

In viticoltura (ed enologia) non c'è una forte richiesta di legalizzazione degli OGM come in altri settori dell'agricoltura. In Italia si preme in particolare per consentire la coltivazione di mais, colza e soia manipolati geneticamente, che sono già consentiti e diffusi in altre nazioni, specialmente negli Stati Uniti, Brasile e Argentina.

La quasi totalità dei viticoltori rifiuta le viti transgeniche, ritenendo che possano essere un pericolo per un settore particolare come l'enologia, dove il vino viene spesso associato alla tradizione e considerato un "prodotto naturale". Data la tendenza attuale dei consumatori di vino italiani, ovvero di totale rifiuto dei prodotti OGM, i produttori sono frenati dalla possibile reazione negativa da parte di questi.

Esistono inoltre forti dubbi riguardo alle influenze negative che possono avere le viti transgeniche sulle denominazioni di origine (DOP, DOC e DOCG).

L'agronomo Maurizio Gily, vicino all'associazione "Slowfood", ha verso gli OGM una posizione critica: "Noi di Slowfood abbiamo catalogato 580 vitigni italiani, di cui 350 iscritti nel registro nazionale. Si calcola che, in tutto, i vitigni in Italia siano più di mille, contro i 200 circa della Francia. Con tutta questa varietà c'è bisogno di creare vitigni transgenici? Inoltre in natura esiste già una gran varietà di mutazioni. Per esempio, il Pinot bianco, nero e grigio è, dal punto di vista genetico, praticamente la stessa cosa". Secondo Maurizio Gily quindi non ha senso tentare di migliorare la vite con l'ingegneria genetica, in quanto esiste già una vastissima scelta di varietà e loro cloni. Piuttosto sarebbe meglio preservare la biodiversità.

Soprattutto ritiene che i rischi siano sproporzionati ai vantaggi, almeno per la maggior parte degli obiettivi che si pongono i ricercatori nel campo degli OGM. A suo parere non ha senso modificare la vite per ottenere modesti miglioramenti della qualità dell'uva. Per quanto riguarda le virosi invece vi sono già sistemi di contenimento efficaci anche senza ricorrere al transgenico. La resistenza alle malattie crittogamiche potrebbe essere interessante, ma la genetica in questo campo ha ottenuto finora scarsi risultati.

Per Maurizio Gily le modifiche al portinnesto possono essere molto più interessanti, perché permetterebbero di ottenere importanti risultati, per esempio nella lotta ai fitoplasmi, e in più non vanno a toccare la pianta fruttifera.

Un'altra perplessità è data dalla presenza di tecniche alternative. Ad esempio grazie al sequenziamento del genoma, oggi si possono fare incroci in modo molto più veloce e sicuro, inserendo dei marcatori nel DNA della pianta, laddove sappiamo esservi i geni che ci interessa trasferire. Questi marcatori funzionano come delle sorte di spie, che segnalano il passaggio del gene desiderato dalla sorgente alla pianta di destinazione. È un sistema utile soprattutto per specie, come la vite, che richiedono tre o più anni di tempo prima di dare frutti. In questo modo si possono fare incroci tradizionali avendo conferma dell'avvenuto passaggio dei geni ancor prima che la pianta cresca. Questo accelera notevolmente i lavori senza ricorrere al transgenico.

Si deve anche evidenziare che le tecniche di ingegneria genetica sono più semplici da applicare nei lieviti, dei quali si conoscono bene le modalità di riproduzione e la struttura del genoma. Nel caso di un organismo complesso come la vite invece questo risulta più difficile. Il motivo principale è la complessità della struttura del DNA rispetto ad un organismo unicellulare quali i lieviti, che rende più difficile l'individuazione dei geni che si desiderano modificare. C'è anche un rischio maggiore di alterare la i meccanismi fisiologici della pianta, causandone la cattiva crescita o la morte.

Sono poche le viti OGM create con successo finora. Un esempio recente proviene dalla Cina, dove l'equipe di Yuejin Wang dell'università Northwest Agricultural and Forestry ha messo a punto una vite che produce una quantità di resveratrolo sei volte oltre la norma. Gli scienziati per creare questa vite hanno preso il gene stilbene sintetasi, presente nel DNA della vite cinese della specie *Vitis pseudoreticulata* e lo hanno introdotto nel DNA della nostra *Vitis vinifera*. L'obiettivo principale è di creare grappoli più resistenti ai funghi grazie all'azione di questo stilbene. Ma il risultato mediatico è un un altro, dato che vengono pubblicizzati solo i possibili vantaggi dal punto di vista salutistico. Le proprietà positive del resveratrolo già si conoscono, ma non è ancora ben chiaro che effetti può avere un'elevata concentrazione di questa sostanza nel vino e la quantità che giornalmente si dovrebbe assumere per trarne gli effetti benefici.

Riassumendo, si possono individuare i seguenti aspetti positivi e negativi riguardo all'uso di OGM in viticoltura:

PRO

- induzione alla resistenza, con conseguente minore uso prodotti fitosanitari, quindi riduzione dell'impatto ambientale
- migliore adattabilità alle condizioni pedo-climatiche
- maggiore produzione
- miglioramento della qualità dell'uva
- resistenza agli stress ambientali
- possibilità di ottenere acini apireni (più utile nel caso delle uve da tavola)

CONTRO

- rischio di trasmissione dei geni nuovi a piante affini
- perdita di biodiversità
- selezione di insetti, funghi, virus e batteri resistenti
- rischio di aumento delle allergie (*non ancora verificato*)
- rischio di trasmissione di batteri resistenti agli antibiotici, dalla pianta all'uomo (*non ancora verificato*)

I lieviti invece, essendo molto più semplici, sono anche più facili da manipolare. Esistono già alcuni ceppi (i già citati lieviti ML01 e ECMo01), che però in Europa non sono consentiti e trovano l'opposizione sia dei consumatori che dei produttori.

La posizione dei consumatori



Esempio di slogan anti-OGM

Dall'ultimo rapporto di Eurobarometro, riguardo alla posizione dei consumatori sul consumo e sulla vendita di OGM, emerge la paura verso tutto quello che è nuovo, diverso o proiettato verso il futuro.

La maggior parte dei consumatori (1 su 3 circa) si dichiara sfavorevole all'uso di organismi transgenici. Questa ideologia è in gran parte data dalla enorme pressione mediatica attuata dalle aziende e da alcune associazioni ambientaliste sui consumatori. Si tratta spesso di una campagna scorretta, che fa leva su idee e informazioni non veritiere.

Lo si può notare nello slogan di Greenpeace della figura accanto, che ha un approccio volutamente emotivo, senza alcun fondamento scientifico.

La posizione generale dei consumatori europei emerge chiaramente dai seguenti dati (fonte: Eurobarometro).

Il 54% degli intervistati percepisce come pericoloso il cibo OGM, contro il 30% che non lo considera affatto dannoso. Il 61% degli intervistati dice di sentirsi a disagio con cibi OGM, mentre il 29% non lo è.

Guardando nel dettaglio le categorie contrarie agli OGM però, si nota che sono più scettiche le donne (64% contrarie) rispetto agli uomini (57% contrari), sono più a disagio i credenti (63%) rispetto ai non credenti (54%), ma bisogna evidenziare che si tratta soprattutto di persone anziane. Se le stesse domande vengono rivolte a giovani tra i 15 ed i 24 anni solo il 48% è a disagio mentre il 39% non lo è.

Insomma le nuove generazioni sono molto più tolleranti ed aperte alle innovazioni, ma i pregiudizi giocano ancora un ruolo determinante.

Dallo stesso rapporto si può notare che un organismo cisgenico (con geni provenienti da specie tra di loro affini) è molto più accettato di uno transgenico, dato che si considera più "naturale".

Per capire meglio questa posizione si può prendere come esempio il pomodoro-pesce, uno degli OGM più discusso e più usato nella campagna contro questi organismi. Nel 1991 dei ricercatori tentarono di rendere il comune pomodoro più resistente alle gelate. Si presero delle "proteine anticongelanti", presenti naturalmente in molti organismi resistenti alle basse temperature.

I ricercatori sono riusciti ad identificare il gene codificante la produzione della proteina antigelo in un pesce artico. La loro speranza era di riuscire a conferire al pomodoro la resistenza al freddo, che l'avrebbe protetto dalle gelate e dal freddo dei magazzini di stoccaggio.



Si riuscì alla fine a riprodurre e trasferire il gene, ma i risultati non furono quelli attesi, perché il pomodoro non era resistente al freddo e l'esperimento non andò oltre. Molti però cominciarono a diffondere la falsa notizia secondo la quale questo OGM fosse in vendita, alcuni addirittura sostennero che causò gravi allergie ad alcuni consumatori allergici al pesce. Lo stesso tipo di propaganda fu quella attorno alla fragola-pesce,

che è in assoluto l'OGM di cui si è più discusso. Questa fragola però non è mai esistita e non si è mai nemmeno tentato di produrla.

Sono questi due gli organismi transgenici maggiormente usati nella propaganda, perché provocano repulsione: è rivoltante l'idea di una fragola o di un pomodoro misto al pesce. Lo scopo è appunto usare esempi completamente inventati oppure stravolgere gli esempi reali, ottenendo un forte impatto sul consumatore, per creare repulsione e diffondere un messaggio sbagliato.

Si ricorda che il codice genetico è universale, e tutti gli organismi viventi hanno tantissimi geni in comune. Ad esempio tra il DNA umano e quello di uno scimpanzé c'è solo il 2% di differenza; inoltre condividiamo il 60% dei geni della mosca della frutta. Non è propriamente corretto distinguere i “geni del pomodoro” dai “geni del pesce” o i geni animali da quelli vegetali.

Per questa ragione la repulsione maggiore degli OGM transgenici rispetto a quelli cisgenici è puramente ideologica, dato che a livello di DNA le differenze non sono così apprezzabili.

Conclusioni

Le tecniche di miglioramento genetico dell'ibridazione e della manipolazione genetica sono finora quelle che possono portare ai risultati migliori dal punto di vista qualitativo. L'ibridazione intraspecifica, anche se di semplice applicazione, non può eguagliare i miglioramenti ottenibili con l'ibridazione interspecifica. Quest'ultima tecnica però non può essere applicata a tutte le specie, dato che si deve tener conto dell'affinità genetica, limitando in questo modo le caratteristiche tecnologiche e qualitative introducibili in un ceppo di lievito. L'ingegneria genetica invece consente di introdurre (oltre che eliminare e amplificare) molti più caratteri, con una buona precisione e selettività. Purtroppo gli studi in questa direzione procedono a rilento e in Italia sono ostacolati dall'opinione pubblica che si oppone. Anche l'Unione Europea è molto cauta sull'argomento, anche se alcuni organismi ingegnerizzati sono già stati autorizzati.

Si è evidenziato che le nozioni sugli OGM di gran parte dei consumatori sono parecchio approssimative e influenzate da una propaganda scorretta. La tendenza attuale pertanto è rifiutare a priori gli alimenti ingegnerizzati a causa di pregiudizi non sempre fondati.

In un settore particolare come l'enologia inoltre si incontra un'opposizione ancora più forte. I produttori temono le reazioni negative del consumatore e il possibile impatto sulle DOP, DOC e DOCG. Per questa ragione, non si conoscono ancora bene gli effetti che può avere un lievito OGM sul vino e sull'ambiente.

Pertanto si può affermare che la ricerca nel campo dell'ingegneria genetica dovrebbe essere favorita, così da riuscire ad avere una conoscenza tale da poter giudicare la convenienza e la pericolosità o meno di questo tipo di organismo. Fintanto che l'uso dell'ingegneria genetica resterà proibito, l'ibridazione è la tecnica che può fornire i risultati migliori, sia nella microbiologia enologica che in viticoltura.

Bibliografia/sitografia

- Microbiologia e biologia dei vini* : C. Zambonelli
- Trattato di enologia I* : P. Ribéreau-Gayon, D. Dubordieu, B. Donèche, A. Lonvaud
- Ibridi di lievito* : Van Rensburg, Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch University
- I lieviti impiegati in enologia: l'esempio del ceppo industriale S6U nella produzione di amarone della valpolicella*: dipartimento scientifico e tecnologico, Università degli studi di Verona
- Genetica, analisi di geni e genomi*: Daniel L. Hartl, Elizabeth W. Jones
- Vigne e vini*: numero 6-7, anno 2012
- Selection and improvement of wine yeasts*: Pretorius, Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch University
- GM yeast in wine industry. Threat or opportunity?* : F. Bauer, Institute for Wine Biotechnology, Stellenbosch University
- Genetically modified wine yeasts: actual situation and risk assessment*: M. Grossmann, F. Kießling, J. Singer, H. Schoeman, M.-B. Schröder, C. von Wallbrunn
- Metabolic analysis of S. cerevisiae strains engineered for malolactic fermentation* : Lallemand inc.; laboratorie de microbiologie et technologie des fermentations, Montpellier

- www.microbiologia.unige.it
- www.lallemandwine.com
- www.anchor.co
- www.laffort.com
- www.environmentcanada.gc.ca
- ec.europa.eu/Eurobarometer
- www.lescienze.it
- www.espresso.repubblica.it/food
- www.di.unisa.it/BIOINFORMATICA/BiologiaMolecolare