

ADVANCES IN MEDITERRANEAN AQUACULTURE

Porto Conte Ricerche

Tramariglio, Alghero, Sardegna

29-30 giugno 2009

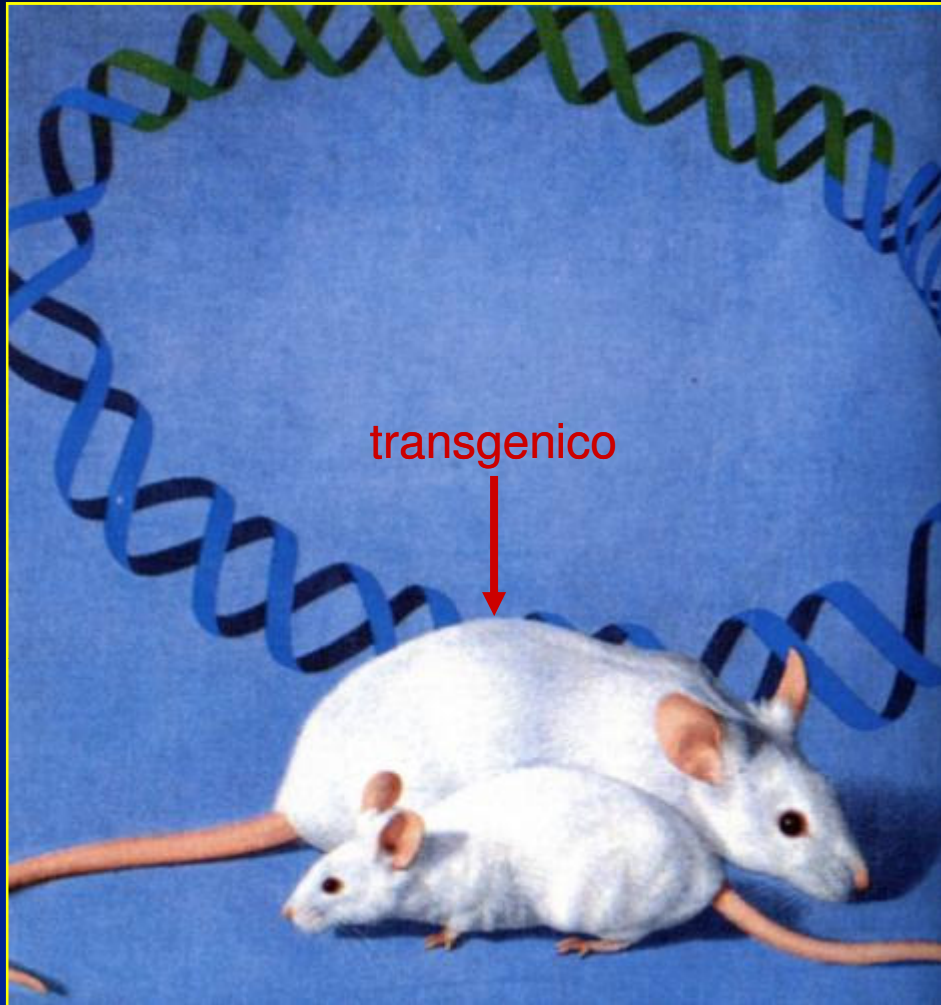
Problematiche relative al rischio
ecosistemico derivante dall'allevamento
di pesci transgenici

Lorenzo Colombo

Dipartimento di Biologia

Università di Padova

lorenzo.colombo@unipd.it



Topo transgenico a crescita rapida portatore di un costrutto codificante l'ormone della crescita di ratto rispetto al controllo

Palmiter *et al.* (1982). *Nature*, 300, 611.

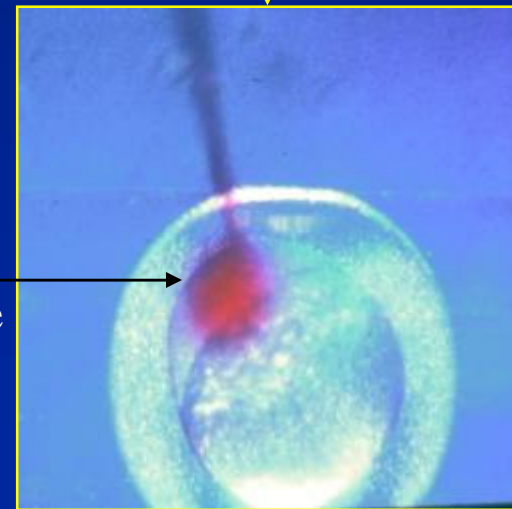
Microiniezione di DNA in blastomero di pesce zebrato



micromanipolatore



DNA
con colorante



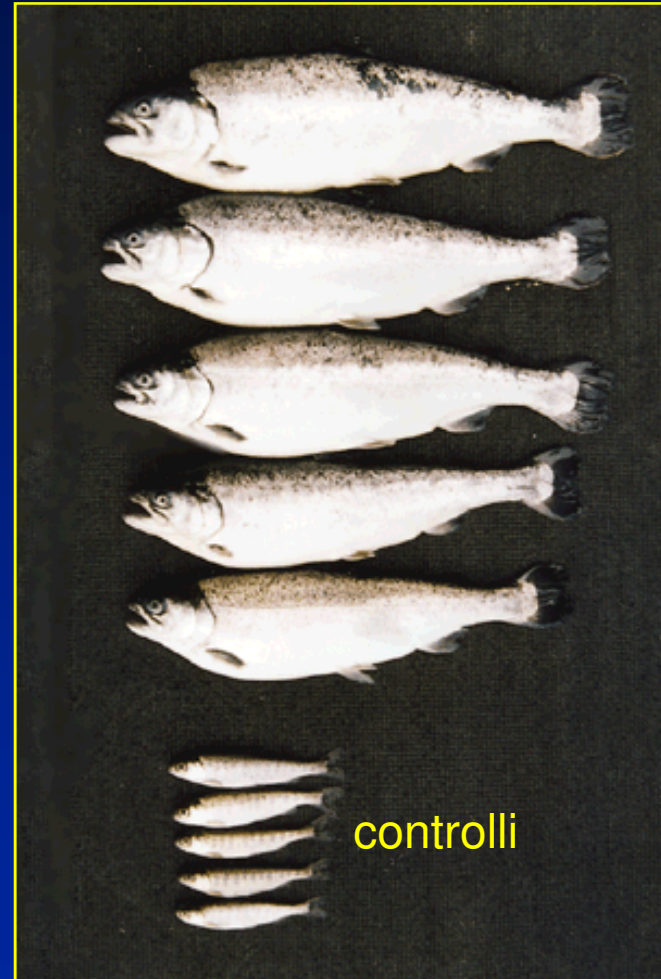
Salmoni transgenici per l'ormone della crescita (GH) di salmone

x 3



Oncorhynchus tshawytscha
Nuova Zelanda – Bartley, 1999

x 11



Oncorhynchus kisutch
Canada – Devlin *et al.*, 1994

Teleostei transgenici per il GH

coho salmon (*O. kisutch*)
Atlantic salmon (*Salmo salar*)
brown trout (*S. trutta*)
Arctic char (*Salvelinus alpinus*)
African catfish (*Clarias gariepinus*)
channel catfish (*Ictalurus punctatus*)
Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*)
Japanese medaka (*Oryzias latipes*)
zebrafish (*Danio rerio*)
common carp (*Cyprinus carpio*)
tilapia (*Oreochromis niloticus*)
northern pike (*Esox lucius*)
goldfish (*Carasius auratus*)
silver crucian carp (*C. auratus linda*)
red crucian carp (*C. auratus auratus*)
mud carp (*Cirrhinus chinensis*)
wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)
loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)
mud loach (*M. mizolepis*)
gilthead seabream (*Sparus auratus*)
blackhead bream (*Acanthopagrus schlegli*)
largemouth bass (*Micropterus salmoides*)
striped bass (*Morone americanus*)
killifish (*Fundulus sp.*)
walleye (*Stizostedion vitreum*)

Riferimenti

Devlin et al. (1994a)
Fletcher et al. (1988)
Sin (1997)
Pitkanen et al. (1999)
Müller et al. (1992)
Dunham et al. (1987)
Sheela et al. (1999)
Inoue et al. (1990)
Stuart et al. (1988)
Chen et al. (1993)
Brem et al. (1988)
Gross et al. (1992)
Zhu et al. (1985)
MacLean et al. (1987)
Sin (1997)
MacLean et al. (1987)
MacLean et al. (1987)
Zhu et al. (1986)
Nam et al. (2000)
Knibb (1997)
Sin (1997)
Goldburg (1998)
Goldburg (1998)
Khoo (1995)
Khoo (1995)

“AGGIUNGI UN MOSTRO A TAVOLA”



Frankenstein fish ?

Requisiti essenziali per il consumo di OGM acquatici

Sicurezza per il consumatore

- Criterio della sostanziale equivalenza alimentare:
 - i componenti transgenici sono equiparabili a sostanze “generalmente considerate sicure” per l’alimentazione
 - ● i componenti transgenici sono identici a sostanze già presenti nell’alimento naturale
- I pesci transgenici per il GH omologo soddisfano tale criterio.

Aspetti positivi dei pesci transgenici per il GH

- Il trasferimento genico nella linea germinale dei teleostei è oramai una **tecnica consolidata**.
- Con la transgenesi per il GH si è riusciti ad aumentare mediamente di **2-11 volte** il tasso di crescita di almeno **30 specie di teleostei**, per lo più di interesse per l'acquacoltura.
- I pesci transgenici per il GH richiedono **meno acqua ed energia** per il raggiungimento della taglia commerciale e convertono **il cibo più in proteine e meno in grassi**.
- Alcune **imprese private hanno investito notevoli capitali** per la produzione di massa di pesci transgenici per il GH (per lo più salmoni).
- I **rischi per il consumo umano** di pesci transgenici per il GH sono concordemente ritenuti **trascurabili**.
- Secondo la **FAO**, i pesci a crescita rapida potrebbero servire a **far fronte** alla futura **domanda umana di proteine animali**.

Aspetti controversi dei pesci transgenici per il GH

- I pesci transgenici per il GH sarebbero il **primo prodotto animale** destinato al consumo umano ad essere **ingegnerizzato geneticamente**.
- Il miglioramento produttivo mediante trasferimento genico **sovverte lo schema classico del miglioramento per incrocio selettivo**:
 - 1) strategia da **genotipo→fenotipo** invece che da fenotipo→genotipo;
 - 2) i transgeni sono dei **costrutti genici *ad hoc*** e non dei veri geni;
 - 3) **stretto determinismo genetico**: il transgene è inteso modificare in modo automatico un singolo carattere di interesse, indipendentemente dalla contestualizzazione ontogenetica ed ambientale dell'espressione genica;
 - 4) la transgenesi è una **modificazione singola** (one-step) e non un miglioramento progressivo;
 - 5) gli animali transgenici sono **brevettabili**.
- L'opposizione all'allevamento di massa di pesci transgenici si basa sulla **compatibilità ecosistemica dei pesci sfuggiti dagli impianti** e sulla possibile **contaminazione transgenica dei conspecifici selvatici**.

European Food Safety Authority (EFSA)

Agency of the European Union founded by the European Parliament and Council Regulation (EC) No. 178/2002 of 28 January 2002.

EFSA GMO Unit

INVITATION TO TENDER - NP/EFSA/GMO/2008/01

“Defining environmental risk assessment criteria for genetically modified (GM) fish to be placed on the EU market”

Launch date **27/11/2008**

Deadline for submission of offers **23/01/2009**

Largo N. Palli 5/a, I - 43100 Parma

Identification of potential hazards

- **task 2.1** is to list **GM fish** (including aquarium fish) that are **far-advanced** in the development pipeline and that might reach the **EU market** within the forthcoming **decade** per (i) **species**, (ii) **transgenic trait**, and (iii) anticipated **region of release** within the EU.
- **tasks 2.2-3** is to list all potential **routes of environmental exposure**, the types of relevant receiving **aquatic environments** across the EU, and to identify all potential direct, indirect, immediate, delayed and long-term **adverse effects** to the biotic and abiotic environment ensuing from the commercial release into the environment of GM fish.
- **tasks 2.4-6** is to review experimental procedures, approaches and methodologies used to study the **likelihood of occurrence** and the **environmental consequences** of the adverse effects.
- **task 2.7** is to extract the relevant **criteria** to be considered when performing an **environmental risk assessment** of GM fish to be commercially released into the environment.

Identification of assessment endpoints and methodology

- **task 3.1** is to identify crucial **fish characteristics** at different **life-history stages**, **environmental variables** (e.g. density, food availability and type, interactions with pathogens) and **genotype-environment** interactions to evaluate the net **survival** and **reproductive fitness**, spread, migration, persistence and invasiveness of GM fish, as well as their **behavioural interactions** with other species, relative to their non-GM counterpart and/or wild types (conspecifics).
- **tasks 3.2-4** is to assess the strengths, weaknesses and utility of **experimental designs**, **model** approaches and methodologies used for generating empirical information on the survival and reproductive fitness of GM fish escapees
- **task 3.5** is to identify baseline **information about receiving environments** (such as the biology, ecology, demography and distribution of wild types in the EU) that are to be considered when conducting an environmental risk assessment of commercially released GM fish.

Requisiti per la commercializzazione dei pesci transgenici

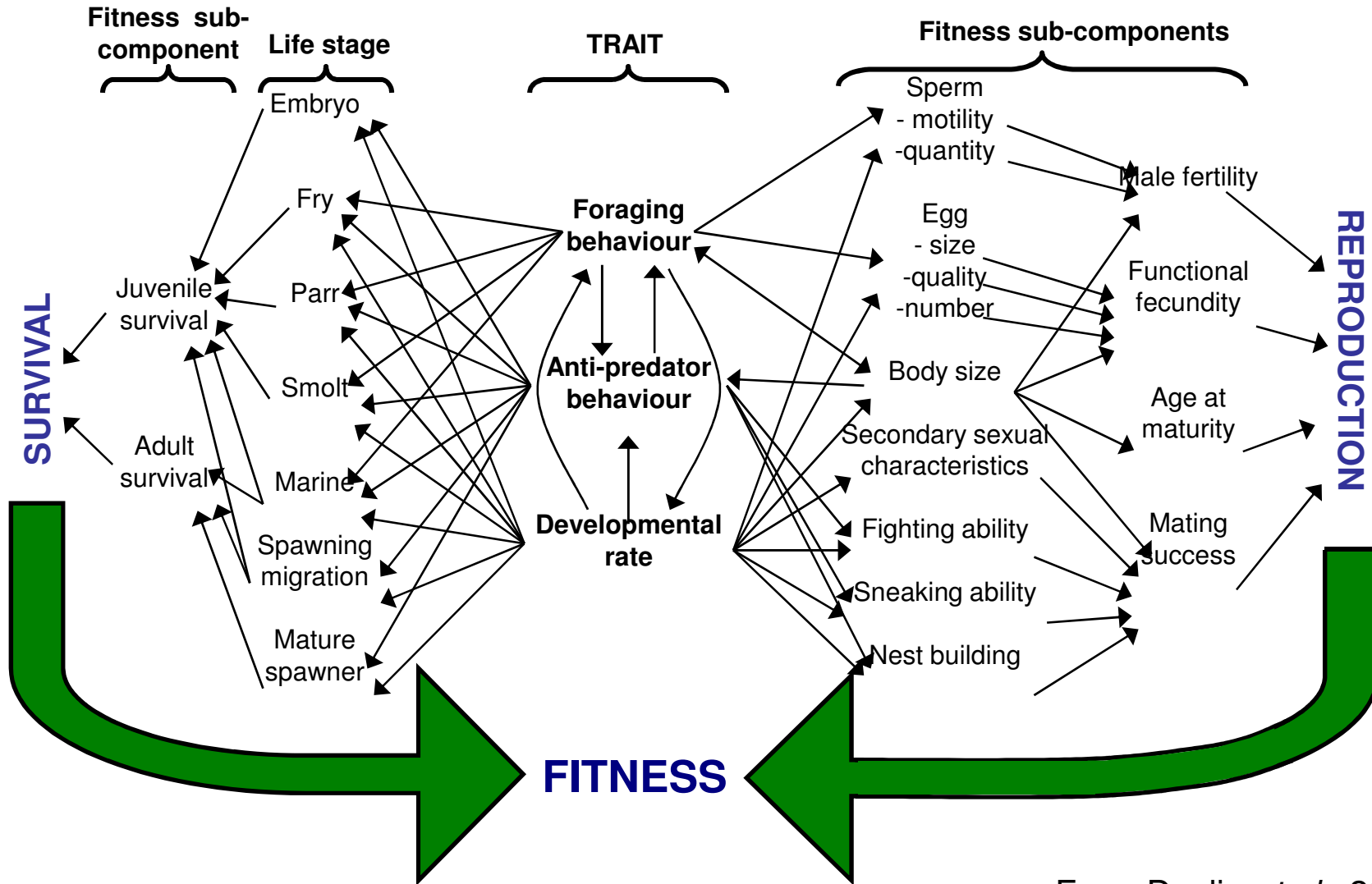
- Nel 2001, l'Ufficio Europeo dei Brevetti ha rilasciato alla ditta canadese Seabright il primo brevetto per pesci transgenici per il GH a crescita rapida (**brevetto EP 0578 653 B1**).
- La **valutazione del rischio ecosistemico** è una **tappa obbligatoria** per la concessione di permessi per l'allevamento commerciale di pesci transgenici brevettati.
- Nella valutazione del rischio si deve calcolare la **probabilità** che pesci transgenici fertili evasi dagli impianti possano costituire **una popolazione permanente** in natura (**stima della fitness**), stabilire la **gravità del danno** eventualmente causato alle biocomunità residenti (**stima dell'impatto biodinamico**) e, in presenza di conspecifici, il grado e le conseguenze di una loro **contaminazione transgenica** (**stima dell'impatto genetico**).

Mission impossible

- Innumerevoli interazioni ecosistemiche possono condizionare la **sopravvivenza e la riproduzione** di pesci transgenici fertili in natura, rendendo **difficile la quantificazione dei dati**.
- Eterogeneità ambientale e fluttuazioni nella composizione delle biocomunità richiedono che la **valutazione del rischio venga ripetuta** in un'ampia gamma di condizioni sperimentali e di siti.
- I **test in campo** richiesti per la stima della fitness nella valutazione del rischio ecosistemico dei pesci transgenici fertili sono di dubbia applicazione e validità:
 - 1) i test in **ambiente naturale** sono pericolosi perchè i pesci transgenici potrebbero disperdersi e non essere più recuperabili alla fine;
 - 2) in **ambienti confinati**, come microcosmi di laboratorio o mesocosmi semi-naturali, i test hanno una validità limitata proprio per l'arbitrarietà del contesto adottato.
- I **dati ottenibili** con i test in campo consentono quindi solo una valutazione del rischio con **limitata capacità predittiva**.

STIMA DELLA FITNESS

Effetti pleiotropici per tre caratteri modificati dalla transgenesi per il GH nei salmoni



From Devlin *et al.*, 2006

Transgenic fish: is a new policy framework necessary for a new technology?

Nathaniel Logar*, Leslie K. Pollock

- Nell'articolo, gli autori indicano chiaramente che cosa intendano per **accettabile valutazione del rischio ecosistemico** associato a pesci transgenici fertili:

“Una completa valutazione dovrebbe comprendere l'esame di tutti i prevedibili rischi ragionevoli posti dai pesci transgenici per l'intero ecosistema – e per tutti i suoi componenti - in cui venissero introdotti, sia deliberatamente che accidentalmente.

I pesci transgenici per il GH fertili *non* sono un'invenzione utile

- Qualsiasi richiesta di allevamento di pesci transgenici fertili può essere bloccata nella fase di valutazione del rischio data **l'impossibilità tecnica di dimostrare** l'equivalenza ecosistemica di pesci transgenici e non-transgenici (**compatibilità ecosistemica**).
- In presenza di conspecifici selvatici, nessuna autorizzazione verrebbe concessa per **timore di contaminazione transgenica**.
- Di conseguenza non resta che il ricorso al **principio di precauzione massima** con il risultato di imporre **moratorie** senza un termine definito.
- Poichè i pesci transgenici sono brevettabili, le **ditte produttrici** potrebbero essere ritenute **responsabili per qualsiasi tipo di danno a lungo termine**, anche non previsto, recato all'ecosistema, come del resto avviene per i farmaci nei confronti dei pazienti.

Pesci con copyright

- Il rischio ecosistemico dei pesci transgenici per il GH non è dovuto soltanto al fatto che esemplari fuggiti dagli allevamenti possono essere **molto mobili, invasivi e altamente prolifici** in un **ambiente** per noi **poco accessibile**, ma è collegato soprattutto ad una loro caratteristica non biologica.
- Mentre il loro **impatto biodinamico** (predazione, competizione, occupazione) potrebbe anche essere equivalente a quello di ceppi selezionati per un accrescimento rapido, l'**impatto genetico** dovuto al trasferimento di un transgene per incrocio con riproduttori selvatici non è equivalente al flusso genico tra varietà o specie ibridabili, in quanto il transgene è **patentabile** e quindi coperto da **diritti di proprietà**.
- Pertanto la diffusione di un transgene tra conspecifici selvatici è equivalente alla loro marcatura con un **contrassegno commerciale** gravido di implicazioni e responsabilità legali.

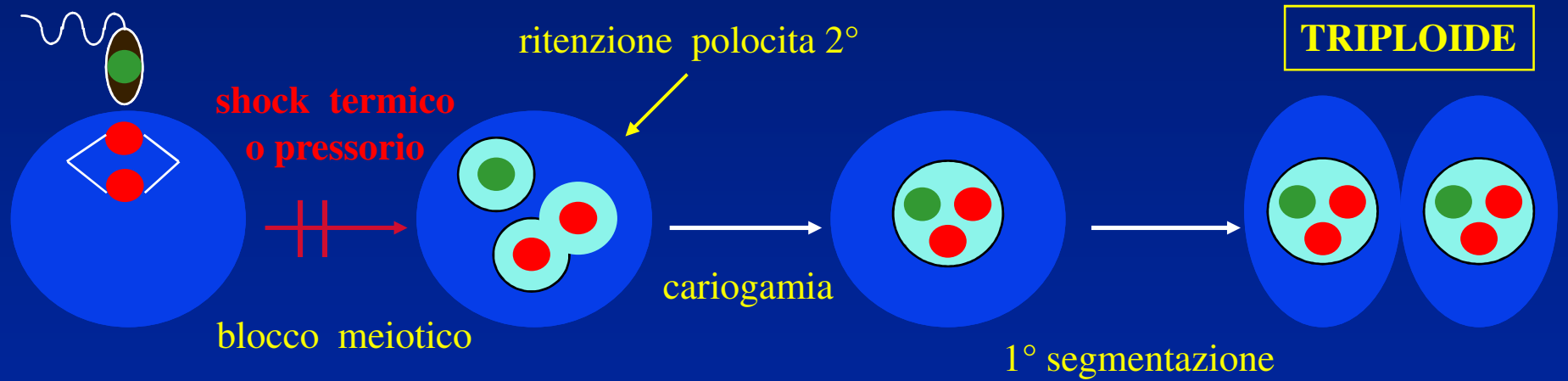
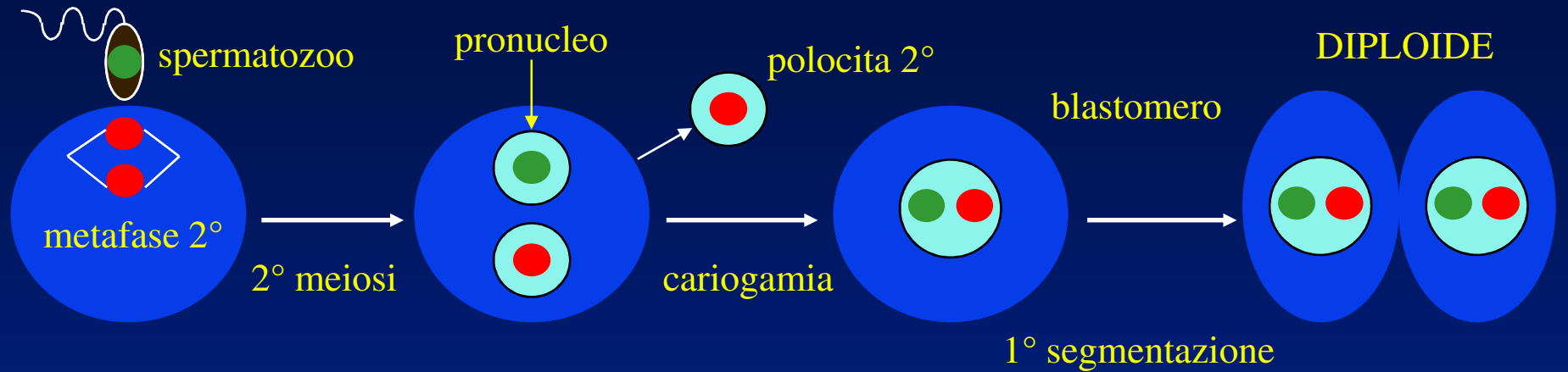
A way out

- Le **ditte impegnate** nello sviluppo commerciale di pesci transgenici hanno tutto l'interesse a **prevenire la loro dispersione in natura** sia per tutelare i propri diritti di proprietà, che per evitare incriminazioni a causa di contaminazioni genetiche.
- I **gruppi di opinione** per la salvaguardia ambientale e la conservazione della biodiversità acquatica si **oppongono alla propagazione di pesci transgenici** in quanto portatori di un artificiale chimerismo genetico suscettibile di brevetto ed estraneo al contesto naturale.
- Questo **elemento convergente** nei rispettivi interessi consentirebbe di risolvere l'apparente antagonismo delle due parti qualora i **pesci transgenici destinati all'ingrasso fossero privi di fitness**, cioè incapaci di riprodursi, mentre i riproduttori fossero sicuramente segregati in impianti a circuito chiuso.

Niente più sesso

- Con pesci transgenici per il GH privi di fitness è **eliminato il rischio** di **contaminazione transgenica**, mentre **l'impatto biodinamico** esercitato lungo la catena trofica da parte di esemplari fuggitivi durante un singolo ciclo vitale **non può verosimilmente eccedere quello di pesci selezionati** per un più rapido accrescimento e capaci di riprodursi.
- La perdita di fitness può essere ottenuta con tecniche di sterilizzazione, come **l'induzione della triploidia** mediante shock termico o pressorio che induce **disgenesia ovarica** nelle femmine e **spermatogenesi abortiva** nei maschi.
- La **sterilità** è un parametro che può essere facilmente e continuamente monitorato anche a livello di impianto e **certificato da ispettori**.

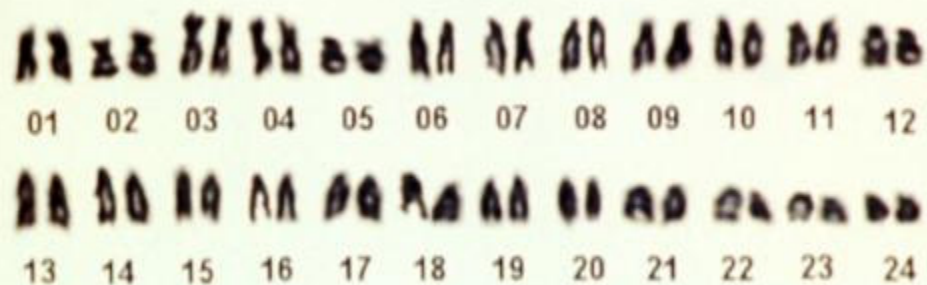
TRIPLOIDIZZAZIONE



- patrimonio cromosomico paterno
- patrimonio cromosomico materno

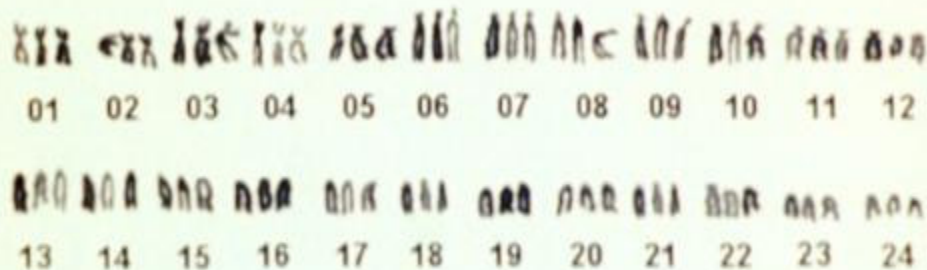


Orata (*Sparus aurata*) triploide



Cariogrammi di *S. aurata*

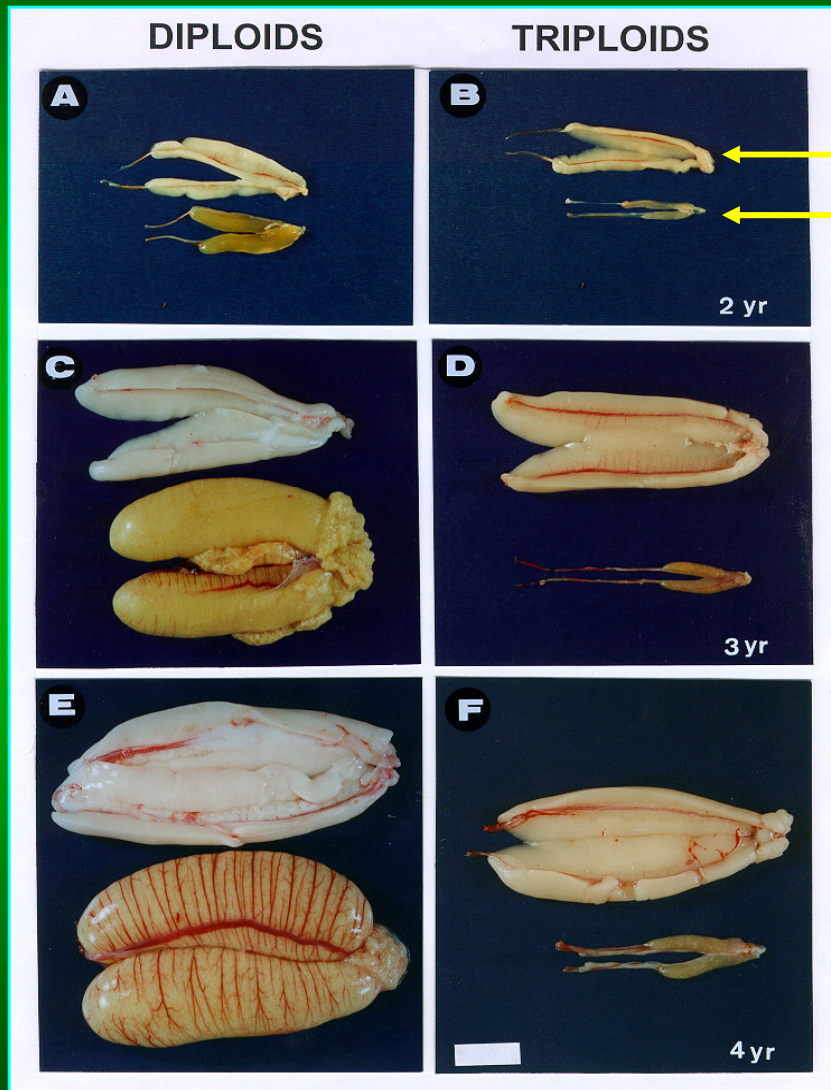
Diploide (2n)



Triploide (3n)

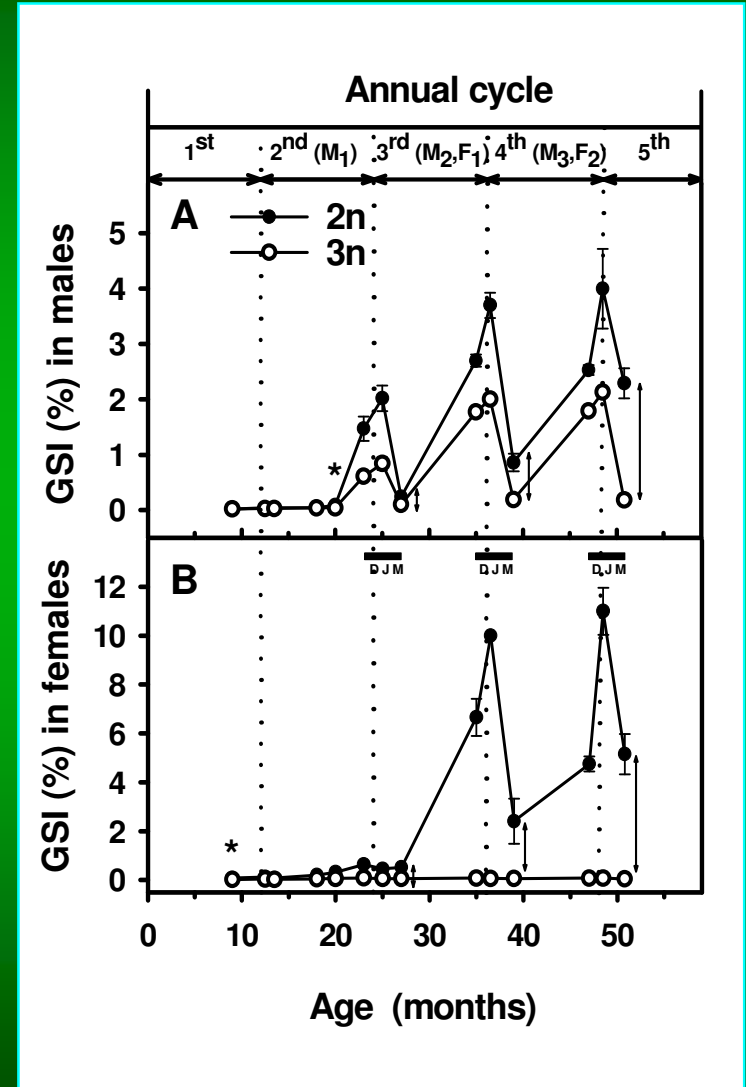
Effetti della triploidia sullo sviluppo gonadico del branzino

Sviluppo gonadico



testicoli
ovari

Indice gonadosomatico



Poliploidizzazione in agricoltura

- Come l'ibridazione interspecifica, la poliploidizzazione non è considerata una modificazione genetica (GM) da legislazioni nazionali ed internazionali.

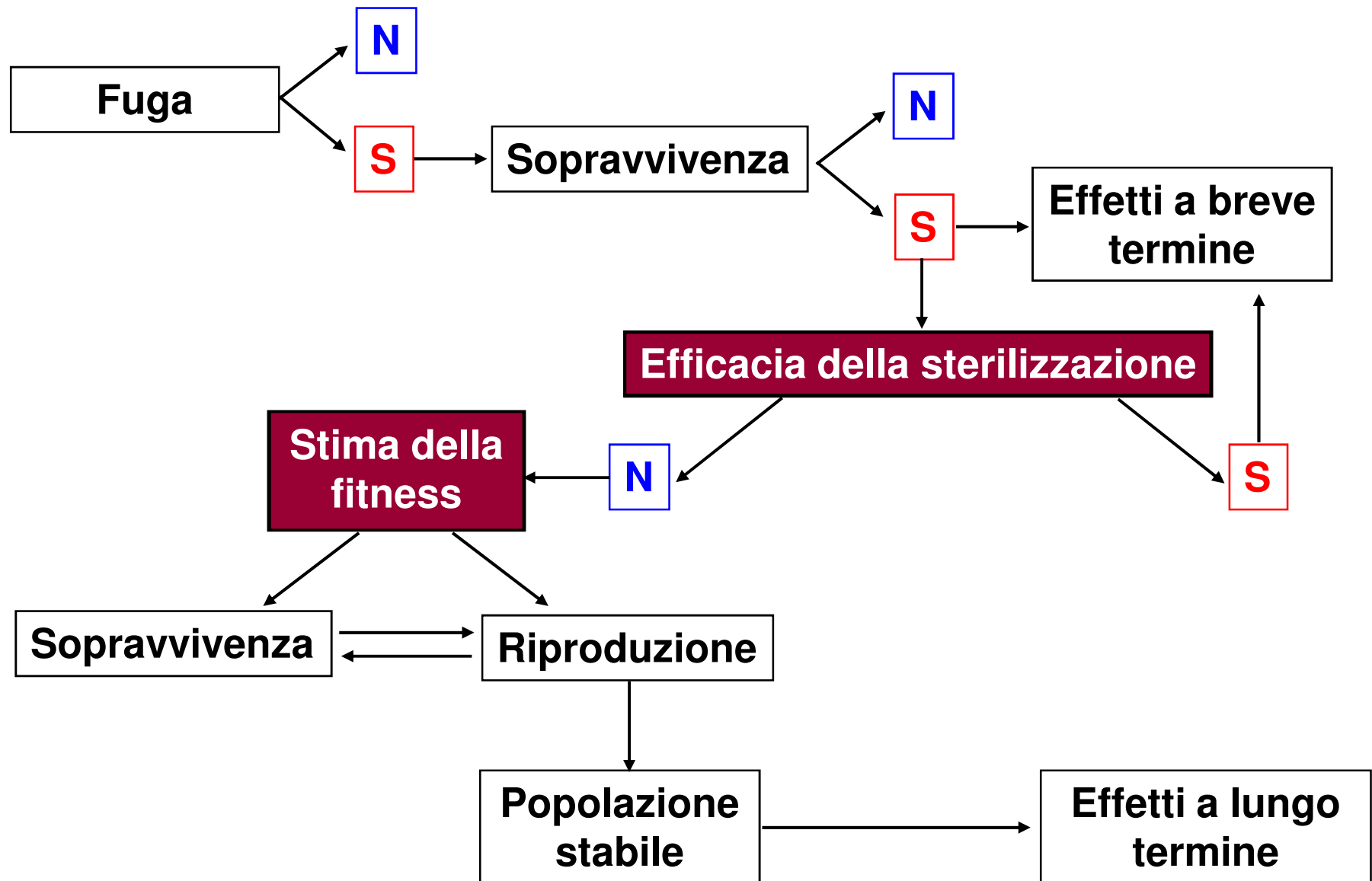
Piante coltivate poliploidi

Ploidia

barbabietole, banane, mele, arance, limoni, lime	3n
grano duro, orzo, cotone, patate, arachidi, caffè arabica, tabacco	4n
grano tenero, aglio, kiwi, prugne	6n
fragole	8n

- In acquacoltura biologica **non** è consentito l'uso di organismi poliploidi.

Schema di valutazione del rischio associato a pesci transgenici



Quando non basta

- Anche se talvolta l'efficacia nell'induzione della triploidia può essere del 100%, su scala commerciale essa è in media leggermente inferiore [es. pari al **97,8%** nella produzione di 10.000 ton/anno di trote triploidi in Francia per filetti affumicati di alta qualità (“Label Rouge”)].
- Tale tecnica è quindi adeguata per ridurre il dispendio energetico riproduttivo in pesci di normale allevamento, ma non per il confinamento genetico di pesci transgenici, per i quali sarebbe richiesta una consistente efficacia del **100%**, un traguardo ritenuto **impossibile**.

Ciò spiega il persistente rinvio da parte della FDA dell'approvazione della richiesta presentata nel 1996 da AquaBounty Farms in Waltham, Massachusetts, USA, per la produzione commerciale del suo **AquAdvantage salmon**, un salmone atlantico a rapida crescita (x 2) in quanto transgenico per il GH di salmone, nonostante la sua sterilizzazione mediante induzione della triploidia per shock pressorio.

Triploidi plus

- Incrocio tetraploide x diploide per produrre transgenici **triploidi sterili al 100%** (*Misgurnus* sp. $4n$ con gameti $2n$).
- Allotriploidizzazione di ibridi interspecifici transgenici sterili come diploidi (**doppia sterilità**).
- Aggiunta di un transgene codificante per l'enzima tiaminasi sotto controllo del promotore estrogeno-inducibile della vitellogenina in modo da sopprimere, per carenza di vitamina B_1 , le femmine diploidi residue in lotti di tutte-femmine triploidizzate in seguito a secrezione estrogenica in seguito a maturazione ovarica (**terminator transgene**).

Production of Trout Offspring from Triploid Salmon Parents

Tomoyuki Okutsu,¹ Shinya Shikina,¹ Megumi Kanno,¹ Yutaka Takeuchi,¹ Goro Yoshizaki^{1,2*}

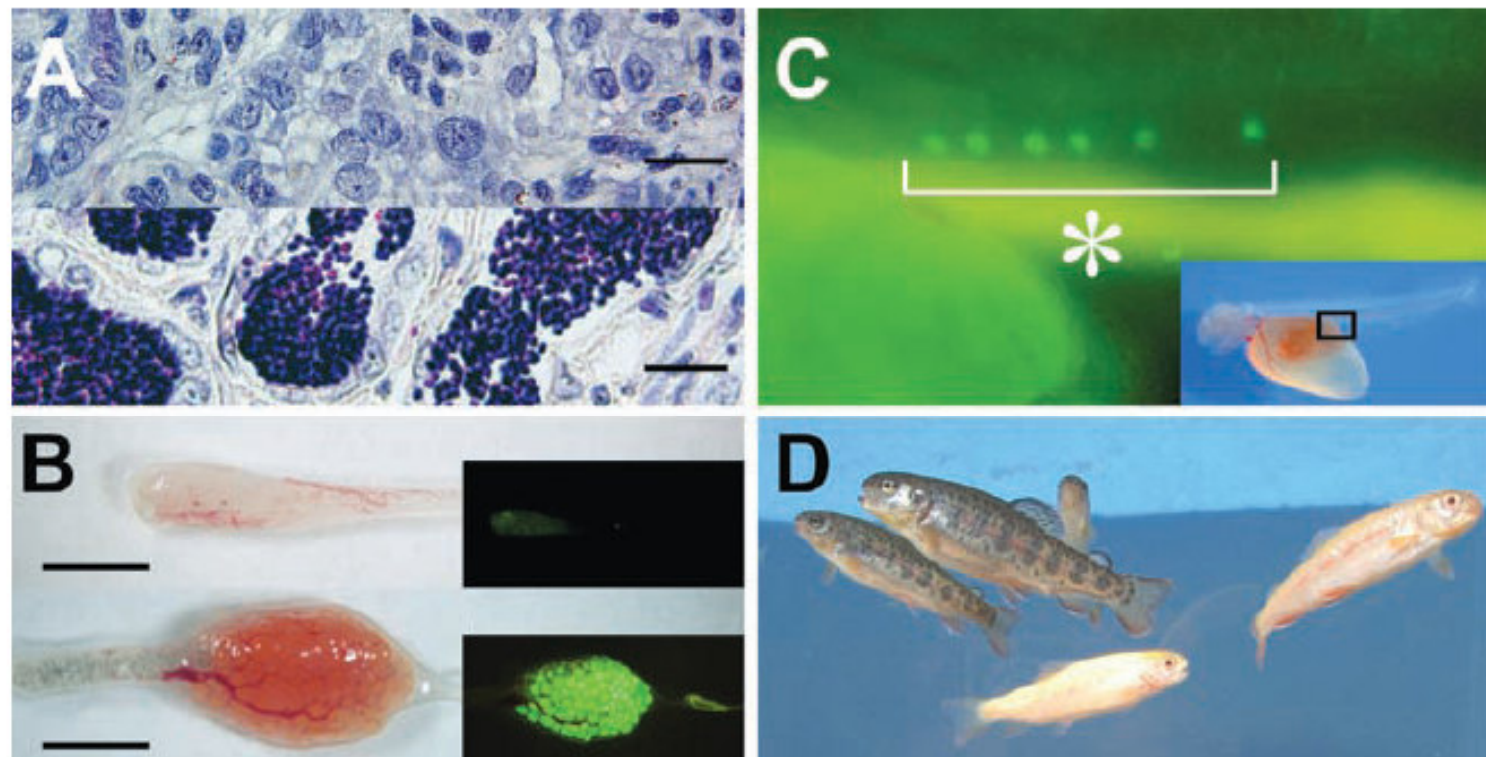


Fig. 1. Development of donor-derived germ cells and F1 offspring generated from surrogate parents. (A) Hematoxylin and eosin (H&E)-stained section of testes from an intact triploid salmon (top) and a triploid salmon recipient that received spermatogonial transplantation (bottom). Scale bars indicate 20 μm . (B) Oocyte colony derived from donor trout spermatogonia in the ovary of triploid salmon recipient at 17 months after transplantation (bottom) and ovaries of intact triploid salmon (top) at the same age as the recipient. (Insets) Fluorescent views. Scale bars, 5 mm. (C) Lateral view of orange-colored offspring (inset), with a highly magnified image of a frame. *Gfp* was expressed in PGCs (asterisk). (D) Trout juveniles at 6 months old generated from surrogate triploid salmon parents. *Science*, 317, 1517 (2007)

Genitori sterili in affitto

- **Spermatogoni** di **trote iridee adulte**, mutanti di colore **arancio** o con un transgene per la **GFP**, sono stati microiniettati intraperitonealmente in **prelarve di salmone masou triploidi sterili**.
- A 2 anni di età, 10 di 29 salmoni triploidi maschili (**XXY**) hanno prodotto **spermi** di trota in grado di fecondare normalmente uova di trota e produrre una F_1 con individui aventi il gene mutante o il transgene.
- A 3 anni di età, 5 di 50 salmoni triploidi femmine (**XXX**) hanno prodotto **uova** di trota con i geni marcatori che furono fecondate con gli spermi di cui sopra con un tasso di schiusa alla F_1 di 89,5%.
- Le trote della F_1 sono state incrociate tra loro ottenendo una normale F_2 .
- Mediante il trapianto di spermatogoni, anche criopreservati, in riceventi sterili triploidi xenogenici si potrebbe **generare individui di specie minacciate o in procinto di estinzione**.



Bluefin tuna – Tonno rosso (*Thunnus thynnus*)



Countdown per il tonno rosso

- Dal 1981 l'organizzazione responsabile della gestione della pesca del tonno rosso nell'Atlantico e nel Mediterraneo è l'International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (**ICCAT**) (anche detta International Commission for Catching All Tunas).
- L'ICCAT ha acconsentito di ridurre le catture da **28.500** ton nel **2008** (in realtà circa 60.000 ton con la pesca illegale) a **22.000** ton nel **2009** e a **19.950** ton nel **2010**, ancora troppo al di sopra della quota di **15.000** ton ritenuta oramai necessaria da esperti e conservazionisti.
- L'allevamento per l'ingrasso in gabbie galleggianti di **giovanili di cattura** di tonno rosso per rifornire il mercato giapponese ha **aggravato la situazione**, in quanto ha intensificato il prelievo di individui non ancora in età riproduttiva.

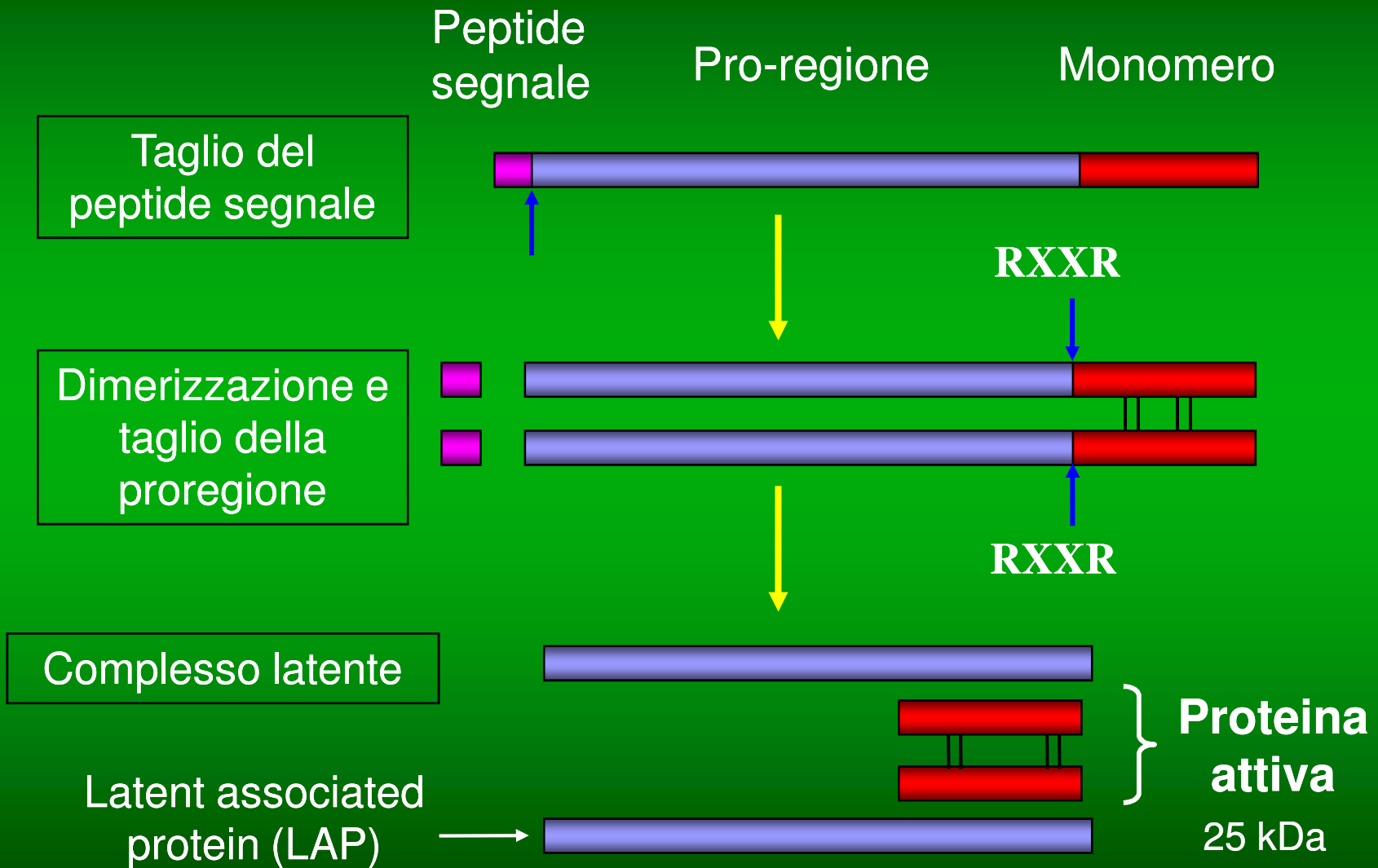


Allevamento di tonni rossi in gabbie galleggianti a Vibo Marina in Calabria

Miostatina

- La miostatina è un membro della superfamiglia dei **TGF- β /BMP** che comprende oltre quaranta proteine-segnale implicate nella regolazione della crescita e differenziamento cellulare.
- Nei **Mammiferi**, la miostatina ha un'azione ristretta a 2 siti di espressione: è un **inibitore della crescita della massa muscolare scheletrica** sia a livello embrionale (anti-miogenico) che nell'adulto (anti-miorigenerativo), mentre è uno **stimolatore della adipogenesi** con effetto iperplastico ed ipertrofico nell'adulto.
- Nei **Teleostei**, sono presenti 2 miostatine:
 - ✓ **miostatina-a**: espressa, oltre che nella muscolatura e adipociti, anche in altri tessuti/organi, sia durante la vita embrionale che nell'adulto.
 - ✓ **miostatina-b**: espressa solo nel sistema nervoso centrale a partire da stadi larvali premetamorfici sino all'adulto.

Processamento della prepromiostatina



Bovini a doppia muscolatura deficienti in miostatina



Razza Belgian blue



Razza piemontese

Mutazione missense G→A nell'esone 3
con sostituzione di Cys invariante con Tyr

Tori: 1150-1400 kg

Vacche: 700-800 kg

Vitelli: 42-46 kg (nascita)



Carcassa utile: 70-80% del peso vivo
Carne di prima qualità molto tenera e
povera di grassi

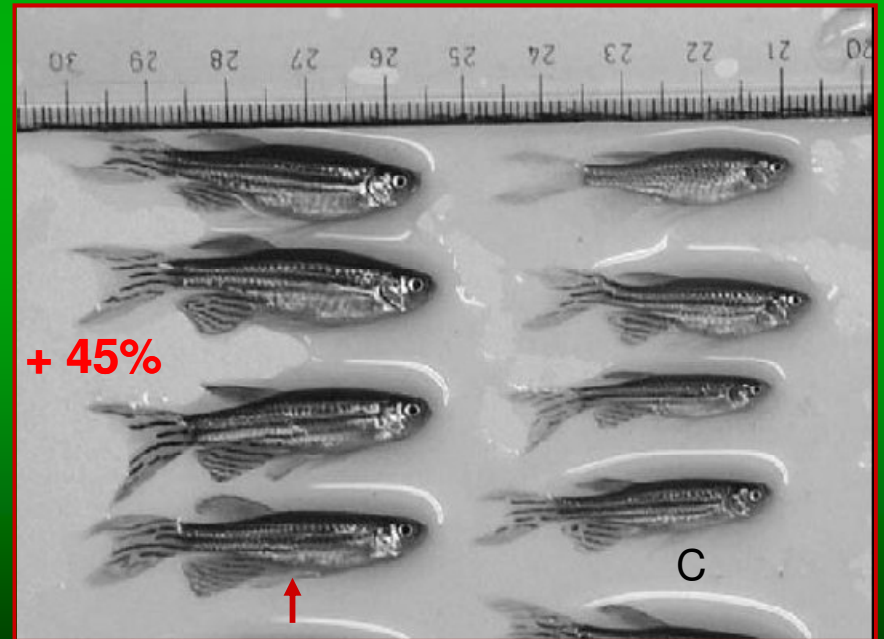
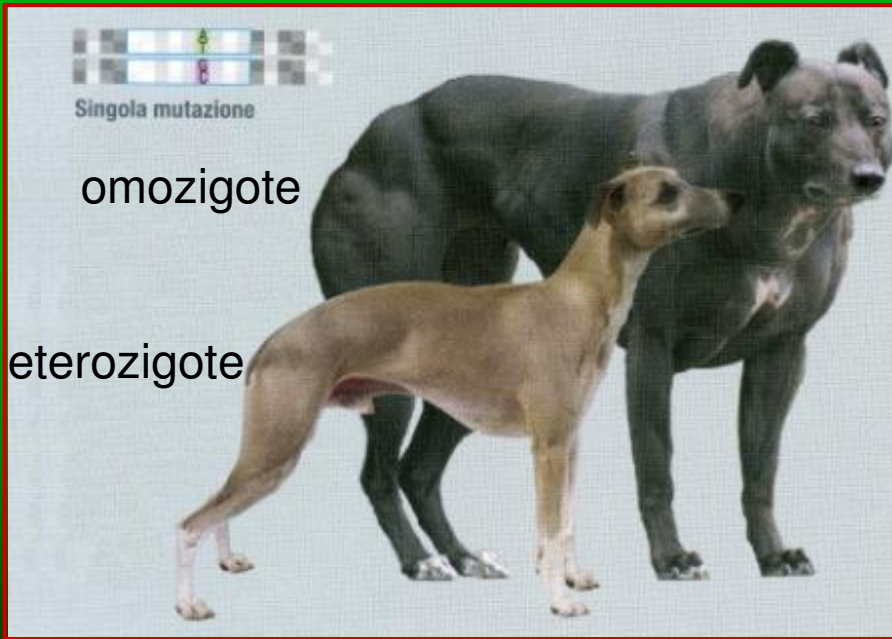


Delezione di 11 nucleotidi nell'esone 3 con
stop prematuro e miostatina tronca inattiva



+ 200-300%

Topi knockout per la miostatina



Levieri con mutazione puntiforme modificante il segnale di stop della miostatina

Knockdown di RNA della miostatina mediante RNA interference in zebrafish

Quale futuro per i pesci transgenici?

- Pesci sterili a crescita rapida prodotti per transgenesi additiva o sottrattiva potrebbero costituire un'**invenzione utile**.
- Tuttavia, la scienza da sola non può **trasformare un'invenzione in una reale innovazione**, cioè in un prodotto accettato dai consumatori e per il quale vi è una significativa domanda di mercato.
- Per questa transizione, si devono affrontare problematiche di carattere **commerciale, finanziario, politico, etico e ideologico**.
- Al momento non è sicuro che i pesci transgenici possano migliorare le produzioni di pesci carnivori nei Paesi sviluppati, mentre invece potrebbero rappresentare una **conveniente risorsa di proteine animali a basso costo** a partire da specie ittiche non-carnivore in Paesi sottoposti ad una forte pressione demografica.