

IMPATTO DELLE PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE SUI MICRORGANISMI DEL SUOLO

MANUELA GIOVANNETTI

Università di Pisa

Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie

Laboratorio di Microbiologia Ambientale

Via del Borghetto 80, 56124 Pisa

INDICE

1. Introduzione
2. Impatto delle piante GM sui microrganismi rizosferici
3. Impatto delle piante GM sui funghi simbiotici radicali benefici.
 - 3.1. Caso studio 1: linee di melanzana che esprimono la defensina Dm -AMP1
 - 3.2. Caso studio 2: linee 11 e 176 di mais Bt, che esprimono la proteina CryIAb (da *Bacillus thuringensis*).
4. Rischio di trasferimento genetico orizzontale nel suolo
5. Impatto a lungo termine delle piante GM: accumulo di tossine e persistenza dei residui nel suolo
6. Bibliografia

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi 10 anni l'Unione Europea ha finanziato ricerche in agricoltura che privilegiano la sostenibilità rispetto alla produzione. Gli obiettivi degli ultimi calls per la ricerca agraria sono stati quelli della riduzione degli inputs chimici, della conservazione della biodiversità, della valorizzazione delle risorse genetiche per l'agricoltura e della produzione di alimenti di alta qualità. Anche la Direttiva Water

Framework si propone di ridurre ulteriormente gli inputs agricoli come pesticidi e fertilizzanti di sintesi e di promuovere l'uso di mezzi alternativi per fornire nutrienti e ottenere colture sane.

Il dibattito sull'uso di colture geneticamente modificate (GM) si è incentrato in Europa soprattutto sul fatto che questo tipo di colture non rappresenta un vero cambiamento rispetto all'agricoltura intensiva della rivoluzione verde, pone i vecchi problemi relativi alla qualità del cibo e dell'ambiente e nuovi rischi inattesi, frutto dell'approccio riduzionista che sta alla base di alcune applicazioni di ingegneria genetica. Infatti, l'inserimento di qualsiasi gene estraneo in un organismo può provocare reazioni imprevedibili se va ad interferire con il funzionamento di vie metaboliche fondamentali e se non è opportunamente regolato nella sua espressione (1-3). Altrettanto imprevedibili sono le interazioni tra gli organismi GM e quelli vicini, come, nel caso delle piante transgeniche, le altre specie vegetali, gli animali ed i microrganismi che vivono nel suolo. Inoltre non si conoscono le interazioni dei residui della coltivazione delle piante transgeniche con i microrganismi del suolo che decompongono l'intera pianta e rimettono in circolo gli elementi nutritivi. Di certo sappiamo che in natura "tutto va dappertutto", e che i geni possono essere trasferiti da un organismo all'altro, esattamente come in laboratorio (4-6).

Numerosi studi e ricerche hanno dimostrato "eventi inaspettati", relativi alla coltivazione di piante transgeniche, come la diffusione di transgeni attraverso la ibridazione delle piante GM con specie selvatiche vicine, il rilascio nel suolo delle tossine transgeniche, sia insetticide che fungicide, da parte delle radici delle piante GM, il trasferimento di geni ingegnerizzati dalle piante transgeniche ai batteri del suolo. Una delle prime reazioni della comunità scientifica internazionale è stata la pubblicazione, da parte di molte riviste scientifiche di articoli di rassegna dei dati più importanti sui rischi ecologici del rilascio in campo aperto di piante GM (7-14).

Ai fini di valutare le possibilità di coesistenza tra colture GM, colture biologiche, convenzionali e di qualità in ambito regionale, saranno presi in considerazione

criticità, impatti e sostenibilità della coesistenza dal punto di vista ambientale, con particolare riguardo ai microrganismi benefici del suolo.

2. IMPATTO DELLE PIANTE GM SUI MICRORGANISMI RIZOSFERICI

I microrganismi del suolo sono indispensabili per il funzionamento dei cicli di materia ed energia, per la fertilità dei suoli e la nutrizione delle piante. Molti studi hanno dimostrato che con l'introduzione delle piante GM, eventi inattesi possono verificarsi a carico di organismi non-target benefici - batteri del suolo e funghi - che rivestono un ruolo fondamentale nei cicli biogeochimici (9). La maggior parte degli studi disponibili riguarda piante modificate per produrre proteine insetticide, come le tossine prodotte da un microrganismo del suolo, *Bacillus thuringensis*, denominate *Bt*, che sono attive contro Lepidotteri, Ditteri e Coleotteri. Uno dei lavori più citati riguarda un evento inatteso ed imprevedibile: il rilascio della tossina *Bt* dalle radici di mais transgenico (*Bt*) nella rizosfera, dove mantiene la sua attività per almeno 234 giorni, in quanto capace di legarsi alle particelle di argilla del suolo, dove è protetta dalla degradazione microbica (15-17). La possibilità che le proteine transgeniche passino dalle radici al suolo attraverso gli essudati radicali è stata recentemente dimostrata in piante di melanzana GM capaci di produrre una tossina antimicrobica (defensina) (18), che manteneva costante la sua attività anche dopo la raccolta degli essudati.

Lavori recenti, effettuati in microcosmo, hanno mostrato differenze nelle comunità batteriche rizosferiche tra piante di mais *Bt* 11 e *Bt* 176 e piante di controllo, quando veniva utilizzata una tecnica di fingerprinting molecolare DGGE, analizzando i geni 16S rRNA. Queste differenze sono state confermate dai successivi esperimenti fatti in serra (19).

Alcuni autori hanno dimostrato che linee di patata GM che producono un'agglutinina di *Galanthus nivalis* e piante di *Brassica napus* resistenti all'erbicida glifosato modificano la composizione e la diversità delle comunità microbiche del

suolo e della rizosfera (20-21). Tali dati sono stati confermati da altri lavori che riportano cambiamenti, sia nella struttura, sia nell'attività della comunità microbica del suolo, causati dalla presenza di piante GM (22-24).

3. IMPATTO DELLE PIANTE GM SUI FUNGHI SIMBIONTI RADICALI BENEFICI

Un importante gruppo di microrganismi del suolo fondamentali per la fertilità del terreno e la nutrizione delle piante, è rappresentato dai funghi micorrizici arbuscolari (MA), che stabiliscono simbiosi mutualistiche con la maggior parte delle piante (25). I funghi MA sono sensibili alle variazioni dei sistemi colturali ed alle applicazioni di fertilizzanti e pesticidi, rappresentando così importanti microrganismi non-target da monitorare negli studi di impatto ambientale di colture GM da introdurre in agricoltura (26). I risultati ottenuti in due casi studio indicano che i funghi MA possono rappresentare dei validi indicatori ai fini della valutazione di impatto ambientale delle piante GM.

3.1. Caso studio 1: linee di melanzana che esprimono la defensina Dm-AMP1

Le defensine sono proteine ad attività antifungina capaci di inibire, a concentrazioni micromolari, la crescita di specie di funghi fitopatogeni. Data la loro capacità di aumentare la resistenza delle piante verso le malattie fungine, i geni che codificano per queste proteine sono stati usati per produrre piante transgeniche (27-28). Il gene per la defensina Dm-AMP1 proveniente dalla pianta *Dahlia merckii* è stato usato per trasformare piante di melanzana. In queste piante la proteina Dm-AMP1 si esprime ad elevati livelli in tutti i tessuti e si localizza preferenzialmente nelle pareti cellulari sia delle foglie sia delle radici. E' stato dimostrato, attraverso l'uso di anticorpi contro la defensina, che tale proteina viene rilasciata negli essudati radicali dove è presente già dopo quattro giorni di coltura idroponica (18). La defensina manteneva la sua attività verso i funghi fitopatogeni, mentre non interferiva con l'instaurarsi della simbiosi micorrizica.

3.2. Caso studio 2: linee 11 e 176 di mais Bt, che esprimono la proteina CryIAb (da *Bacillus thuringensis*).

Utilizzando lo stesso approccio sperimentale sopra descritto due linee di mais transgenico - *Bt* 11 e *Bt* 176 - sono state valutate per il possibile impatto sul fungo micorrizico *Glomus mosseae*. La morfogenesi differenziale, il primo segno di riconoscimento dell'ospite da parte del fungo, veniva elicitata in modo paragonabile dagli essudati delle piante transgeniche e da quelli delle piante di controllo. La lunghezza delle ife cresciute in presenza delle radici di mais *Bt* 11 e *Bt* 176 era invece ridotta del 14% e del 28%, rispetto ai controlli. Le strutture infettive che si formavano sia sulle radici delle piante *Bt*, sia su quelle dei controlli mostravano una ridotta funzionalità sulle radici della linea *Bt* 176. La colonizzazione radicale raggiungeva il 25% nelle radici delle piante controllo, ed era invece circa la metà (14%) nelle radici delle due linee di mais *Bt* (18; 28)

Il sistema sperimentale usato per saggiare gli effetti delle piante GM sul fungo benefico del suolo *Glomus mosseae* permette di evidenziare comportamenti differenziali del fungo in presenza di piante transgeniche che esprimono geni diversi. Dati presenti in letteratura riguardo all'impatto di piante GM nei confronti di funghi micorrizici arbuscolari confermano che i funghi MA rappresentano dei validi bioindicatori per la valutazione dei potenziali rischi associati al rilascio nell'ambiente di piante GM.

4. RISCHIO DI TRASFERIMENTO GENETICO ORIZZONTALE NEL SUOLO.

Per trasferimento genetico orizzontale si intende il trasferimento indesiderato di transgeni dalle piante GM ad organismi filogeneticamente lontani, attraverso trasformazione, coniugazione e trasduzione.

Alcuni studi hanno dimostrato che geni ingegnerizzati possono essere trasferiti dalle piante GM ai batteri del suolo (29). Gli autori della ricerca hanno utilizzato l'ingegneria genetica introducendo, insieme al gene oggetto di studio, un gene che conferiva resistenza ad un antibiotico e che permette la individuazione di eventuali cellule microbiche trasformate contenenti i transgeni. Poiché i geni per la resistenza agli antibiotici sono geni batterici, le grandi quantità di essi rilasciate nell'ambiente con le coltivazioni transgeniche destano preoccupazioni legate alla possibilità che siano trasferiti ai batteri indigeni del suolo. Sebbene l'industria e l'ente statunitense Food and Drug Administration (FDA) abbiano affermato che i geni introdotti nelle piante non possono essere incorporati dai batteri, le ricerche condotte da microbiologi del suolo hanno dimostrato trasferimento genetico orizzontale tra piante GM ed una specie batterica appartenente al genere *Acinetobacter* (29). Negli esperimenti di trasformazione genetica, eseguiti in condizioni di laboratorio, 2 µg di DNA proveniente da barbabietola transgenica erano capaci di ottenere trasformanti batterici alla frequenza di 5.4×10^{-9} , evidenziando la possibilità di trasferimento di geni dalle cellule vegetali ai batteri del suolo. Anche l'omogeneizzato di foglie di barbabietola possedeva capacità trasformanti nei confronti di batteri del suolo, con frequenze di 1.5×10^{-10} . I risultati di laboratorio hanno evidenziato la possibilità di trasferimento di geni dai cromosomi delle cellule vegetali ai batteri del suolo competenti e forniti di sequenze omologhe. Questi dati sottolineano i rischi della disseminazione di transgeni nell'ambiente per mezzo di microrganismi del suolo, in particolare se si considera il largo uso di geni di resistenza agli antibiotici come geni marcatori nella produzione di piante e microbi GM. Sebbene la probabilità di trasferimento genetico orizzontale sia bassa, l'uso di una tecnologia che faccia a meno dei geni per la resistenza agli antibiotici è stato consigliato da una commissione di esperti della FAO e dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

Il rischio di trasferimento orizzontale di geni dalle piante GM ai batteri del suolo e da questi ad un numero indefinito di altri batteri era considerato altamente improbabile, ma le recenti evidenze sperimentali suggeriscono di rivedere tali

affermazioni. Infatti, quando si tratta di batteri, il significato della parola "evento improbabile" deve tener conto del fatto che i batteri, in presenza di sufficiente cibo e spazio, si riproducono molto velocemente e, per esempio, potrebbero raggiungere la cifra di un miliardo di miliardi in circa 30 ore. Inoltre, considerando che in un grammo di terreno fertile vive circa un miliardo di batteri, si può facilmente calcolare che un miliardo di miliardi di batteri si può trovare in circa 3000 metri quadrati di suolo (9). Così, il problema fondamentale riguardo alla "fuga di geni" è che se i geni coinvolti presentano dei pericoli, la bassa probabilità del verificarsi degli eventi rischiosi non rappresenta un argomento rilevante.

5. IMPATTO A LUNGO TERMINE DELLE PIANTE GM: ACCUMULO DI TOSSINE E PERSISTENZA DEI RESIDUI NEL SUOLO

Poiché è noto che la tossina prodotta dal mais *Bt* si accumula nel terreno legandosi alle argille ed agli acidi umici, mantenendo la sua attività fino a 234 giorni (15-17), lo studio dell'impatto dei residui colturali di mais *Bt*, una volta interrati al termine del ciclo produttivo, sulla sopravvivenza e infettività dei propaguli fungini micorrizici sembra essere importante in una valutazione generale degli effetti della coltivazione del mais *Bt*. Studi recenti indicano un effetto negativo del terreno contenente i residui di mais *Bt* 11 sulla infettività dei funghi MA ed una riduzione della respirazione del suolo (19).

I risultati ottenuti confermano che i funghi MA sono organismi non-target chiave ai fini della valutazione di impatto ambientale per i mais transgenici e presumibilmente per tutte le specie vegetali che formano simbiosi con questo gruppo di funghi del suolo.

In conclusione, il rischio di impatto delle piante GM e dei loro residui colturali sui microrganismi benefici del suolo, fondamentali per il mantenimento delle catene trofiche, è documentato. Ai fini della coesistenza dovrebbero essere

stabiliti i tempi minimi necessari per il riutilizzo ad agricoltura convenzionale e biologica dei suoli coltivati con piante GM.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Finn R. D., Jones C. G. (1999). Secondary metabolism and the risks of GMOs. *Nature*, 400, 14-15.
- 2) Makarevitch I., Svitashv S. K., Somers D. A. (2003). Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Molecular Biology*, 52, 421-432.
- 3) Hernandez M., Pla M., Esteve T., Prat S., Puigdomenech P., Ferrando D. (2003). A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard® based on the 3' -transgene integration sequence. *Transgenic Research*, 12, 179-189.
- 4) Doolittle R. F., Feng D. F., Anderson K. L., Alberro M. R. (1990). A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. *J. Mol. Evol.*, 31, 383-388.
- 5) Ellstrand N. C. (2001). When transgenes wander, should we worry? *Plant Physiol.*, 125, 1543-1545.
- 6) Intriari M., Buiatti M. (2001). The horizontal gene transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylogen. Evol.*, 20, 100-110.
- 7) Rissler J., Mellon M. (1996). *The ecological risk of engineered crops*. Cambridge, MIT Press, USA.
- 8) Butler D., Reichardt T. (1999). Long-term effects of GM crops serves up food for thought. *Nature*, 398, 651-656.
- 9) Giovannetti M. (2003). The ecological risks of transgenic plants. *Biology Forum*, 96, 207-224.
- 10) Giovannetti M., Sbrana C., Turrini A. (2005). The impact of genetically modified crops on soil microbial communities. *Biology Forum*, 98, 393-418.

- 11) Wolfenbarger L. L., Phifer P. R. (2000). The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 290, 2088-2093.
- 12) Halfhill M. D., Millwood R. J., Raymer P. L., Stewart C. N. (2002). Bt-transgenic oilseed rape hybridisation with its weedy relative, *Brassica rapa*. *Environm. Biosafety Res.*, 1, 19-28.
- 13) Rieger M. A. , Lamond M., Preston C., Powles S. B., Roush R. T. (2002). Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science*, 296, 2386-2388.
- 14) Gray, A. J., Raybould, A. F. (1998). Reducing transgene escape routes. *Nature*, 392, 653.
- 15) Saxena D., Flores S., Stotzky G. (1999). Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 402, 480.
- 16) Tapp H., Stotzky G. (1998). Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 30, 471-476.
- 17) Saxena D., Flores S., Stotzky G. (2002). Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biol. Biochem.* 34, 133-137.
- 18) Turrini A., Sbrana C., Pitto L., Ruffini Castiglione M., Giorgetti L., Briganti R., Bracci T., Evangelista M., Nuti M. P., Giovannetti M. (2004). The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 163, 393-403.
- 19) Castaldini M., Turrini A., Sbrana C., Benedetti A., Marchionni M., Fabiani A., Landi S., Santomassimo F., Pietrangeli B., Nuti M.P., Miclaus N., Giovannetti M. (2005). Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms, *Appl. Environ. Microbiol* 71, 6719-6729.

- 20) Siciliano S. D., Germida J. J. (1999). Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Excel and *Brassica rapa* cv. Parkland. FEMS Microbiol. Ecol. 29, 263-272.
- 21) Griffiths BS, Geoghegan IE, and Robertson WM. (2000). Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes. Journal of Applied Ecology 37, 159-170.
- 22) Mansouri H., Petit A, Oger P, Dessaux Y. (2002). Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species. Applied and Environmental Microbiology. 68, 2562-2566.
- 23) Schmalenberger A., Tebbe C. C. (2002). Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. FEMS Microbiology Ecology 40, 29-37.
- 24) Schmalenberger A., Tebbe C. C. (2003). Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. Molecular Ecology 12, 251-262.
- 25) Smith S. E., Read D. J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London.
- 26) Giovannetti M., Avio L. (2002). Biotechnology of Arbuscular mycorrhizas. In: Applied Mycology and Biotechnology. Vol. 2. Agriculture and Food Production. Arora DK e Ka chaturians GG Eds. Elsevier Science B.V. Amsterdam. pp. 275-310.
- 27) Gao A. G., Haikimi S.M , Mittanck C. A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M., Shah D.M., Liang J., Rommens, C.M.T. (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. Nature Biotechnology 18: 1307-1310.

- 28) Turrini A., Sbrana C., Nuti M. P., Giovannetti M. (2004). Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 266, 69-75.
- 29) Gebhard F., Smalla K. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1550-1554.