

METAPONTUM AGROBIOS

# RELAZIONE CONCLUSIVA RILASCIO DELIBERATO

NOTIFICA B/IT/04/01

## 1. Scopo dell'emissione

L'emissione ha riguardato la linea sperimentale GM di melanzana DH-LVBt H # 7 , denominata in seguito Bt7 esprimente la tossina Cry3B di *Bacillus turingiensis* con azione anticoleottero, codificata dal gene CryH, posto sotto il promotore costitutivo 35S di CaMV. L'emissione ha avuto lo scopo principale di valutare le interazioni bi- e tritrofiche tra piante transgeniche di melanzana (*Solanum melongena* L.), e l'artropodofauna utile presente nell'agroecosistema. Particolare attenzione è stata rivolta ai predatori della dorifora presenti nella zona di emissione, ad altri coleotteri fitofagi della melanzana (es. altiche) ed agli insetti floricoli (flower-visiting insects). Dunque si intendevano valutare i possibili effetti derivanti dal rilascio in pieno campo di piante geneticamente modificate sulla biodiversità degli insetti non target ed i loro nemici naturali.

Un ulteriore obiettivo del rilascio deliberato, è stato quello di valutare alcuni potenziali effetti ambientali nella fase di post-raccolta. Questa parte di studio è stata svolta in collaborazione con l'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma, nell'ambito di un progetto finanziato dal Ministero dell'Ambiente, che ha ricevuto dallo stesso Istituto dettagliata relazione tecnica. Nello specifico le prove hanno avuto lo scopo di consentire uno studio comparativo di metodi di trattamento dei residui colturali, finalizzato ad individuare un possibile trattamento, tra quelli comunemente adottati, che comporti il minor impatto ambientale e che sia nel rispetto della normativa vigente.

## 2. Descrizione dell'emissione deliberata

Il campo dell'emissione deliberata è stato localizzato a Metaponto (MT), all'interno dell'Azienda Sperimentale Dimostrativa "Pantanello" di proprietà della Agenzia Lucana di Sviluppo ed Innovazione in Agricoltura della Regione Basilicata (S.S. Jonica al Km 448.2) all'interno della quale è presente anche il centro ricerche del notificante.

L'emissione delle PSGM è stata effettuata mediante trapianto su terreno provvisto di pacciamatura impiegando piantine alla quarta-quinta foglia. La semina è stata effettuata in contenitori alveolati in ambiente confinato circa due mesi prima del trapianto. La prova è stata eseguita secondo uno schema sperimentale che prevedeva sei parcelle di cui tre contenenti la linea transgenica DH-LVBt H # 7 , denominata in seguito Bt7, e tre il relativo controllo non trasformato (cv. Picentia). La densità d'impianto è stata di 2 piante/m<sup>2</sup>, con le piante disposte in file binate (120 cm tra le bine, 50 cm tra le file e 50 cm sulla fila). Le sei parcelle sono state divise da un vialetto di passaggio largo due metri. La zona di emissione è stata circondata da una fascia coltivata a mais larga due metri ed estesa per tutto il perimetro del campo (Fig. 1).



**Fig.1 :** Campo di melanzana transgenica (B/IT/04/01) con barriera anti polline di mais.

Le PGM sono state coltivate ad una distanza superiore ad 1 Km da altre piante di melanzana commerciale. In Allegato A si riporta lo schema del campo sperimentale. In totale in campo erano presenti: 180 piante transgeniche e altrettanto di linea isogenica. La parte coltivata del campo occupava una superficie totale di 720

m<sup>2</sup>.



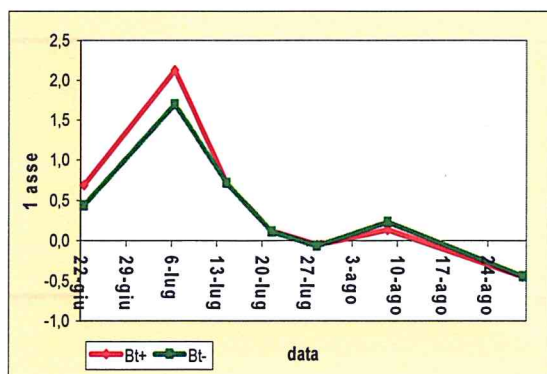
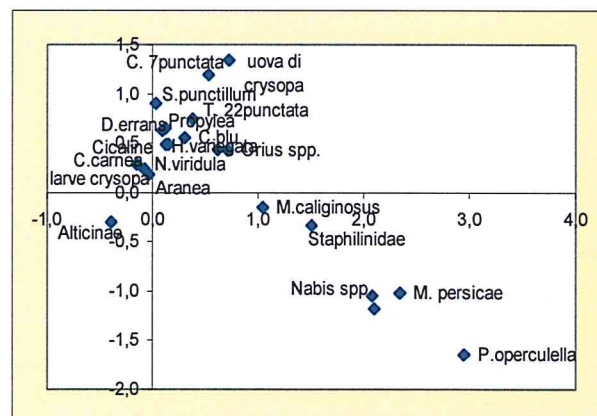
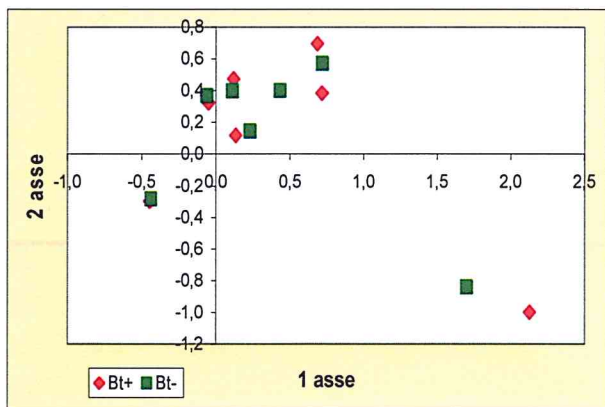
### 3. Studio dell'impatto sulla biodiversità dell'artropodofauna.

Lo studio delle catene alimentari degli artropodi in ambiente agricolo, considerando il potenziale effetto negativo che gli erbivori esplicano nelle colture assume una elevata importanza nello studio di agro-ecosistemi specifici. Rispetto ad ambienti naturali i sistemi agricoli sono molto più semplici anche interazioni multitrofiche anche temporanee, si stabiliscono tra diverse specie fino a formare una specifica rete alimentare (food web). L'analisi ecologica basata su poche specie dette "chiave", possono dare risposte esaurienti dal punto di vista economico e tecnico ma forniscono una informazione parziale per la comprensione delle complesse interazioni a diversi livelli trofici che possono verificarsi in seguito all'immissione di colture transgeniche in ambienti agricoli e non. Quindi, un cambiamento nella struttura di un assemblaggio di artropodi può portare a cambiamenti più o meno importanti per diverse funzioni ecologiche.

I rilievi sugli artropodi sono stati effettuati settimanalmente a partire dal 22 giugno 2005 e la raccolta delle bacche è stata effettuata scalarmene a partire dall'8 agosto 2005 fino al 21 settembre 2005.

L'osservazione visiva delle popolazioni di artropodi presenti (Fig.2) è stata effettuata su tutta la parte aerea della pianta (6 piante/parcella) collezionando la specie, ove possibile il riconoscimento, oppure il taxon di appartenenza. I dati delle osservazioni sono stati registrati su software "Observer" (Noldus) con l'ausilio di computer portatili

La comparazione della biodiversità degli insetti nelle due tesi messe a confronto è stata analizzata attraverso l'Analisi delle Corrispondenze (Benzecri, 1973) ovvero si è analizzata la struttura spaziale e temporale delle specie, mentre l'associazione tra i taxa collezionati e le tesi è stata definita attraverso la Indicator Species Analysis (ISS, Dufrene and Legendre, 1997) ovvero si è stimata la biodiversità in modo quantitativo e si è cercato di individuare delle specie indicatrici del sistema in studio.



**Contributi assoluti dei singoli taxa all'assemblaggio delle specie lungo il primo asse**

M.persicae	0,038929	Orius spp.	0,008081
M.caliginosus	0,043664	Nabis spp.	0,030732
D.errans	0,000051	Alticinae	0,213184
Lygus	0,054817	C.7punctata	0,001752
Cicaline	0,009672	Thea punctata	0,002045
S.punctillum	0,000024	P. punctata	0,000164
P.operculella	0,115683	H.variegata	0,000128
Stafilinidi	0,44507	uova crysopa	0,001383
Orius spp.	0,008081	adulti crysopa	0,000217
N.viridula	0,006707	larve crysopa	0,003163
coleottero blu	0,000968	Aranea	0,000034
Nabis spp.	0,030732		

**Fig. 2:** Modello di ordinamento dell'assemblaggio dei taxa nelle due tesi e i contributi assoluti dei taxa ottenuti mediante analisi delle corrispondenze

In figura 2 si riportano i cambiamenti nell'associazione tra le specie ottenuti con l'Analisi delle Corrispondenze e le diverse osservazioni vengono rappresentate in una dispersione spaziale tra i primi due assi. Molte osservazioni si distribuiscono lungo i due assi e non si evidenzia una chiara separazione tra i dati raccolti nelle tesi Bt+ e quelli raccolti nella tesi Bt. I punti localizzati alla destra in basso del primo grafico sono riferiti ai primi campionamenti effettuati dove erano state collezionate poche osservazioni, mentre tutti le altre osservazioni, più robuste da un punto di vista numerico, si raggruppano in un'unica nuvola attorno all'origine degli assi. La distribuzione delle specie nelle due tesi a confronto risulta pertanto molto simile. Molti taxa sono rappresentati in un'unica nuvola, soltanto alcuni di essi, come gli afidi e le mine di tignola (*Phthorimaea operculella*) si separano da essa. I taxa che hanno fornito i contributi assoluti più alti risultano essere: le mine di *P.operculella* (0,115683), gli stafilinidi (0,44507) le alticinae (0,213184). La dinamica dell'assemblaggio delle specie rappresentato dinamicamente nel tempo (Fig. 2 ultimo pannello), mostra chiaramente un andamento comparabile tra le due tesi a confronto tendendo a sovrapporsi completamente in alcuni periodi d'osservazione.

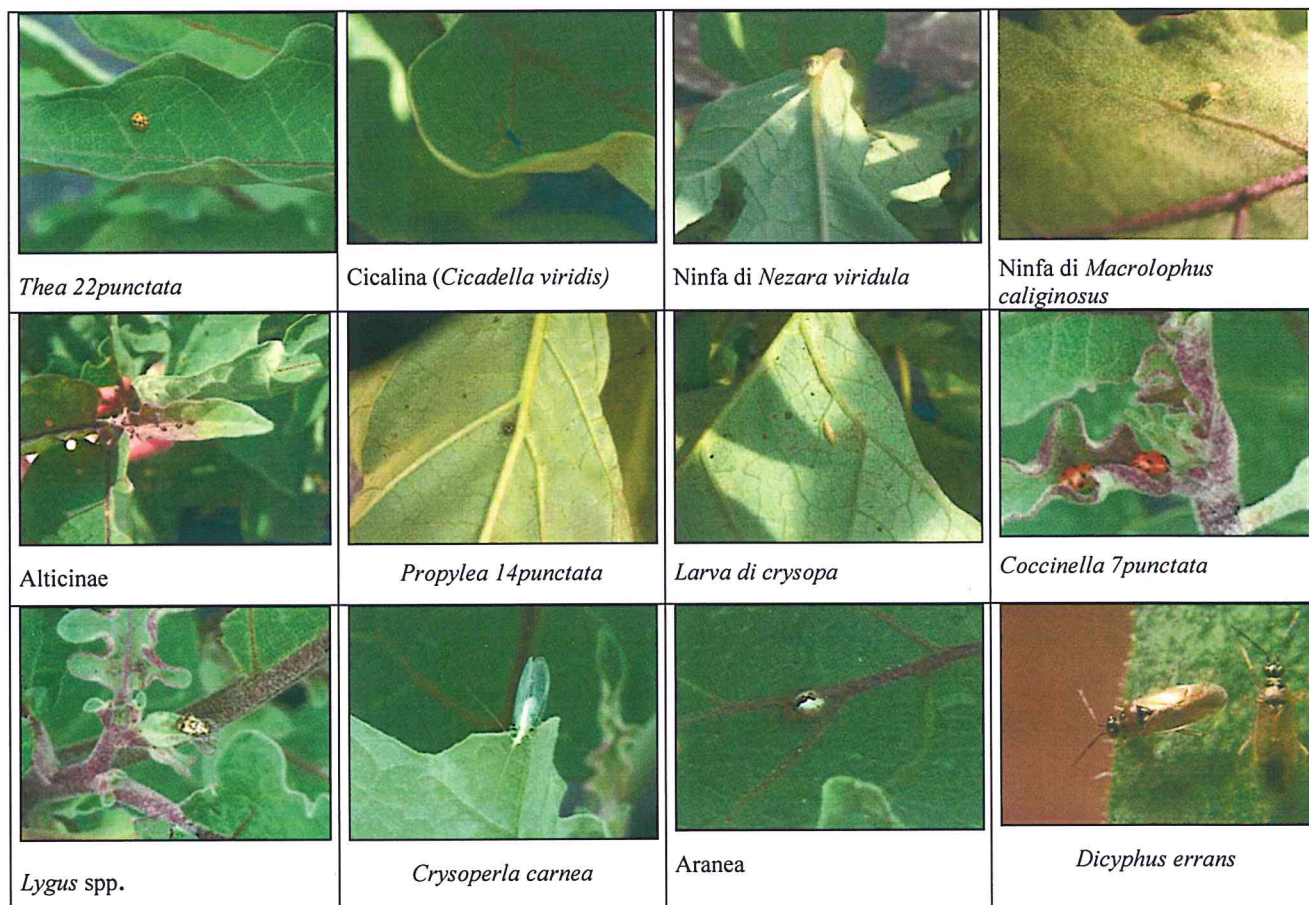
Taxon	22 Giugno	6 luglio	14 luglio	21 luglio	28 luglio	8 Agosto	29 Agosto
<i>M. persicae</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
Cicadellidi	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>M. caliginosus</i>	0,034 Bt+	0,028 Bt+	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,018 Bt-
<i>D. errans</i>				n.s.	n.s.	n.s.	
<i>Lygus</i>	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	
<i>C. septempunctata</i>			n.s.	n.s.	n.s.		
<i>Propylea</i>					n.s.	n.s.	n.s.
<i>Hippodamia variegata</i>					n.s.	n.s.	
<i>Thea 22-punctata</i>			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
<i>Stethotus punctillum</i>				0,008 Bt+	n.s.		n.s.
Uova di <i>crisopa</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Larve di <i>crisopa</i>			n.s.	n.s.			n.s.
Adulti di <i>crisopa</i>			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Orius</i> spp.	n.s.	n.s.	0,022 Bt-	n.s.	n.s.		n.s.
<i>P. operculella</i> (mine)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
Staphilinidae	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Nabis</i> spp.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	
<i>Nezara viridula</i>		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Alticinae	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Coleottero blu</i>				n.s.	n.s.	n.s.	
<i>T. uticae</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	
Aranea	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

**Tab. 1:** Risultati ottenuti con L'Indicator species analysis effettuata sui dati collezionati in campo.

L'Indicator Species Analysis è un indice particolarmente importante quando l'analisi viene effettuata in maniera contemporanea su una serie di taxa a cui non viene attribuito a priori alcun valore ecologico differente. Il numero di taxa (Fig.3) presenti nei campionamenti è stato di 22. L'Indicator Species Analysis (Tab.1) non ha evidenziato un taxon



significativamente associato con un trattamento (Bt o non Bt) per tutte le date d'osservazione. Solo alcuni come il miride *Macrolophus caliginosus* si presenta significativamente associato con la tesi transgenica nelle prime due date d'osservazione ( $p=0,034$  e  $p=0,028$ ), ma perde tale significatività nella parte centrale del ciclo colturale andando alla fine ad associarsi significativamente con la tesi non transgenica ( $p=0,018$ ). Alcuni casi sporadici di associazione significativa si osservano per lo *Stethorus punctillum* ( $p=0,008$  Bt+) e per l'*Orius* spp. ( $p=0,022$  Bt-) con la tesi non transgenica. Questi tre taxa rappresentano insetti predatori.



**Fig.3:** Alcuni taxa osservati in campo

Nel complesso dunque non si sono osservate differenze significative tra piante GM e isogenica WT sulla biodiversità dell'artopodofauna.

#### 4. Studio comparativo di metodi di trattamento dei residui colturali.

Si è proceduto con due differenti metodi di trattamento delle PGM a fine coltura, conformemente a quanto notificato.

Al termine della prova, i frutti sviluppati sono stati raccolti e sterilizzati mediante autoclavazione. Al termine della coltura il terreno, con i residui vegetali della piante, si è trovato suddiviso nelle 6 parcelle costituenti le repliche sperimentali (3 OGM, 3 WT), ciascuna delle quali è costituita da quattro bine.

Sono stati adottati due diversi metodi di trattamento dei residui colturali delle piante:

- a) Estirpazione delle piante ed allontanamento dei residui e loro smaltimento mediante autoclavazione;

**b) Trinciatura delle piante ed interrimento.**

Le parcelle sono state divise a metà, eseguendo lo stesso trattamento su due bine vicine e alternando il trattamento secondo lo schema di campo descritto nell'Allegato A.

Lo studio è stato effettuato impiegando un calendario di campionamento di terreno che avrà una durata massima di dodici mesi dopo la fase di raccolta.

Il piano ha previsto un campionamento ad avvio della sperimentazione, uno nella settimana successiva al trattamento ed in seguito Marzo, Maggio, Luglio ed Ottobre 2006.

Sui campioni è stato seguito il riciclaggio del carbonio e dell'azoto attraverso i seguenti parametri:

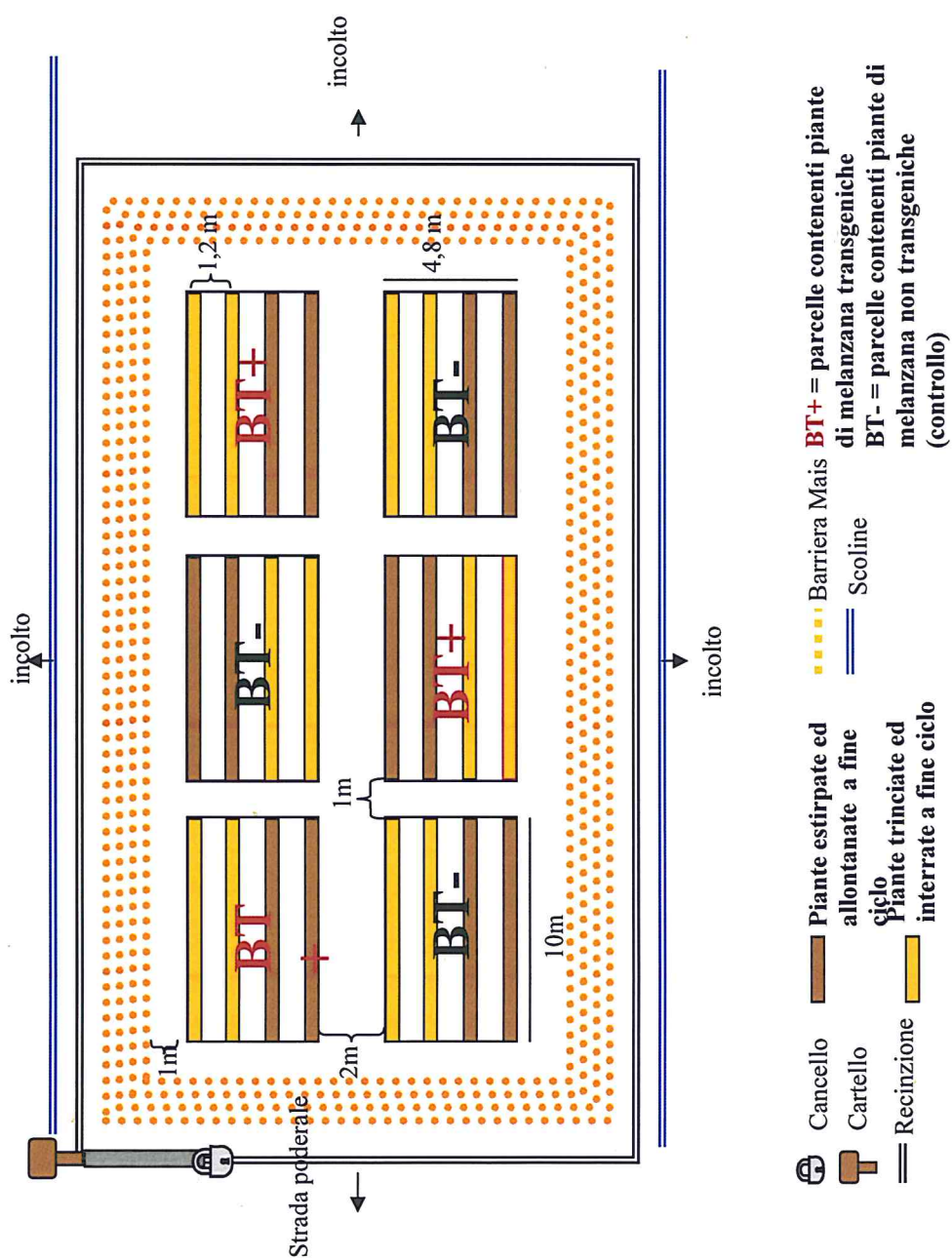
- misure respirometriche;
- dosaggio della biomassa microbica;
- determinazione del carbonio organico totale (TOC), del carbonio totale estratto (TEC) e frazionato in acidi umici e fulvici (HA+FA);
- determinazione dell'azoto totale, del rapporto C/N e del pool dell'azoto assimilabile.

Su campioni di terreno ad inizio prova e fine prova si è proceduto inoltre alla determinazione dell'azoto potenzialmente mineralizzabile quale indicatore della cinetica di mineralizzazione della sostanza organica. Su alcuni campioni di terreno sono state inoltre condotti analisi di ecofisiologia microbica, PCR, DGGE e HGT.

I dati di tale sperimentazione sono stati inviati separatamente dall'Istituto di Nutrizione delle piante del CRA al Ministero dell'Ambiente, nell'ambito del Progetto "Individuazione di parametri idonei alla valutazione del rischio potenziale di inquinamento genico del suolo a seguito di colture geneticamente modificate" finanziato dallo stesso Ministero dell'Ambiente. I dati sono stati oggetto della seguente pubblicazione del gruppo di ricerca dell'istituto: Mocali S., Dentice A., Marcucci A., Benedetti A. (2009). The impact of post-harvest treatments of transgenic eggplant residues on soil quality and microbial diversity. *Agrochimica* LIII (5): 296-307. ISSN-IT0002-1857.



## Schema campo B/IT/04/01





**METAPONTUM AGROBIOS**

**INTEGRAZIONI**

**RELAZIONE CONCLUSIVA RILASCIO DELIBERATO**

**NOTIFICA B/IT/04/01**



Con riferimento a quanto disposto nell'Art. 2 del Decreto DPN/1249 del 30 giugno 2004, che autorizzava il rilascio deliberato previsto nella notifica B/IT/04/01, si precisa quanto segue:

- 1) La stabilità dell'inserito è stata valutata prima del trapianto, analisi da noi impiegata di routine prima dei rilasci deliberati, verificando l'integrità dei geni Bt ed nptii mediante analisi PCR su un campione di 40 piante delle 180 della linea di melanzana GM DH-LVBt H # 7. Tutte le piante hanno dimostrato la presenza integra e senza riarrangiamenti dei due geni presenti nel costrutto responsabili dei nuovi caratteri inseriti nelle PSGM.
- 2) Non si è proceduto alla messa a punto di sistemi alternativi di selezione che eliminassero il gene marker nptii, che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina, poiché il progetto di ulteriore sviluppo della tecnologia Bt è stato bloccato dalla società, a seguito del dilatarsi dei tempi e dei costi di sviluppo, legati alla necessità di verifica della sicurezza d'uso, ed all'incertezza sui ritorni dal mercato, connessi all'acuirsi del dibattito sull'impiego degli OGM. La prova di rilascio B/IT/04/01 è stato l'ultimo studio condotto dal notificante.