Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 351-356

MARCO PAOLO NUTI* – SERGIO CASELLA**
MANUELA GIOVANNETTI***

Trasferimento orizzontale di geni nei microrganismi****

Riassunto – Il trasferimento dell'informazione genetica nei batteri e nei microfunghi avviene verticalmente oppure orizzontalmente mediante meccanismi di sessualità, para-sessualità ed anche in assenza di veri e propri fenomeni di sessualità. Il trasferimento orizzontale nei batteri può coinvolgere larghe porzioni del genoma, fino a 300 Kb, ed è unidirezionale. Nei microfunghi il trasferimento orizzontale non determinato da sessualità è mediato dalla formazione di ponti anastomotici ifali che consentono il movimento di interi nuclei da un'ifa ad un'altra, anche appartenenti ad individui ed isolati diversi. Nei batteri è stato dimostrato che fino al 16% del DNA codificante di una specie è mobilizzabile lateralmente e può essere acquisito orizzontalmente da un'altra specie.

Queste recenti acquisizioni sono ritenute importanti ai fini della valutazione del trasferimento d'informazione genetica tra popolazioni microbiche nel terreno sia autoctone sia introdotte come ceppi selvaggi o geneticamente modificati. È possibile sviluppare dei modelli predittivi, almeno per i batteri, della frequenza di fissazione di un transgene in una popolazione, sia esso neutrale o positivamente selezionabile, entro un determinato tempo e numero di generazioni.

I modelli disponibili possono costituire un valido contributo alla valutazione d'impatto ambientale e alla migliore comprensione di fenomeni evolutivi dei microrganismi procarioti ed eucarioti.

* Dipartimento di Chimica e Biotecnologie agrarie, Università di Pisa, via del Borghetto 80, 56124 Pisa.
** Centro di Studio per la Microbiologia del Suolo del CNR, via S. Michele degli Scalzi 2, 56124 Pisa.
*** Dipartimento di Biotecnologie agrarie, Università di Padova Agripolis, s.s. Romea Km 16, Legnaro (Padova).
**** Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

1. Trasferimento di informazioni genetiche

Il trasferimento di informazione genetica tra organismi avviene in natura sia verticalmente che orizzontalmente. L'acquisizione di geni alloctoni da parte di un organismo può essere seguita da eventi ricombinazionali del DNA ed è determinata da fenomeni di sessualità e parasessualità sia nei microrganismi a struttura procariotica che eucariotica, ma si verifica anche in assenza di esogenoti cellulari (ricombinazione attraverso trasformazione nei batteri).

L'adattamento alle condizioni ambientali e presumibilmente la stessa evoluzione sono determinati sia da eventi ricombinazionali che mutazionali; questi ultimi possono avvenire durante e dopo l'evento di ricombinazione.

Mentre il trasferimento di informazione genetica di tipo verticale attraverso divisione clonale nei batteri implica che l'adattamento di questi organismi alle diverse condizioni ambientali avvenga attraverso mutazioni, appare sempre più chiaro che l'altro meccanismo di trasferimento di materiale genetico, denominato trasferimento orizzontale dei geni (HGT) avviene all'interno di una popolazione con meccanismi indipendenti dai processi di moltiplicazione. Questo trasferimento di DNA può avvenire tra individui della stessa specie ma anche tra individui appartenenti a specie diverse e a generi diversi. In natura può avvenire tra procarioti e eucarioti (pensiamo al caso del T-DNA di *Agrobacterium tumefaciens* che viene integrato nel genoma della pianta ospite), o tra piante e batteri come specificheremo più avanti, oppure infine tra virus e procarioti o piante. I batteri possono trasferire lateralmente porzioni minori di genoma, meno di 300 Kb, in un singolo evento ma la quantità complessiva di informazione genetica che può venire trasferita lateralmente in più eventi è notevole. Ad esempio Ochman *et al.* (2000) hanno analizzato il profilo d'uso dei codoni e il contenuto in GC% di 19 genomi batterici sequenziati arrivando a stimare che oltre il 16% del DNA codificante era stato acquisito orizzontalmente. Perna *et al.* (2001) hanno comparato il genoma del ceppo O157:H7 di *Escherichia coli* a quello del ceppo commensale K-12 e sono giunti anch'essi alla conclusione che la maggior parte dei tratti di patogenicità erano stati acquisiti orizzontalmente. Ulteriori studi sulle variazioni nucleotidiche in *E. coli, Neisseria meningitis* e *Streptococcus pneumoniae* hanno indicato che tali variazioni avvengono più per ricombinazione che per mutazione, con un rapporto di 5-50:1 tra i due meccanismi (Guttman e Dykhuizen, 1994; Feil *et al.*, 2001). Viene spontaneo a questo punto porsi la domanda se l'HGT sia compatibile o meno con il concetto di specie nei batteri, o viceversa, se è ancora lecito parlare di specie nei batteri dato il flusso continuo d'informazione che rende il genoma batterico estremamente dinamico; in altri termini, batteri che vivono in prossimità l'uno dell'altro possono scambiare lateralmente informazione genetica ma rimanere specie genetiche distinte? La risposta è positiva in considerazione del fatto che se i caratteri trasferiti orizzontalmente, come per le mutazioni, non conferiscono un vantaggio selettivo al nuovo ospite, avranno la tendenza ad essere perduti dopo un

certo numero di generazioni. Per la fissazione di un nuovo carattere in una popolazione batterica, entro un lasso di tempo ecologicamente significativo, è necessaria cioè una selezione di tipo positivo. Poiché è possibile che l'HGT si verifichi anche tra DNA nudo e cellule riceventi vive, in questo caso se si tratta di specie distanti tra di loro, il carattere ha scarsa probabilità di essere trattenuto nella popolazione ricevente per diversità di sequenza, per diversa capacità di espressione genica, per il diverso uso di codoni, a causa di modificazioni post-translazionali, per la mancanza di riconoscimento di promotori o per la perdita potenziale di funzionalità dovuta a condizioni citoplasmatiche diverse da quelle originarie.

2. Fattori critici dell'HGT in suolo e rizosfera

Cercando di quantificare il trasferimento laterale d'informazione genetica, è importante conoscere i fattori critici che possono influenzarne l'entità e la velocità. Trevors e Van Elsas (2001) propongono i fattori riportati in tab. 1.

Tab. 1 – *Fattori critici che influenzano la quantità e velocità del trasferimento orizzontale di geni.*

- suolo: densità, tipo, disturbato o non, pH, umidità, aerazione, presenza di sostanze tossiche e di piante
- livello di studio: laboratorio. micro/meso-cosmo, pieno campo
- cellule: donatore/ricevente, densità, VC/VNC (*), presenza e tipologia di sistemi di restrizione-modificazione e di fattori di competenza
- DNA: replicone, spettro d'ospite, dimensioni, sequenza, tipologia funzioni, marcatori
- tempo: durata in relazione a fattori abiotici
- monitoraggio: molecolare, cellulare, valutazione d'impatto target/non target

(*) VC/NC = rapporto tra cellule vitali coltivabili (VC) e vitali non coltivabili (VNC).

È possibile quantificare l'HGT nel suolo mediante l'uso di metodi combinati di tipo cellulare e molecolare, basati sia sull'estrazione di DNA dal terreno sia su metodi di coltivazione della frazione coltivabile della biomassa microbica terricola, sia infine su metodi di studio *in situ.* Recenti rassegne dei metodi molecolari, che tra l'altro consentono di valutare anche la biodiversità di microrganismi del suolo, sono disponibili (Nuti *et al.*, 2002) insieme a rassegne sui metodi di quantificazione dell'HGT in suolo e nella rizosfera (Trevors eVan Elsas, 2001).

3. Casi di studio

Nell'ampia casistica disponibile (reperibile in una letteratura di ca. 300 voci bibliografiche) vengono presentati alcuni rilevanti casi esemplificativi, il primo dei quali è quello di *Acinetobacter sp*. BD4, che viene geneticamente trasformato dal DNA di *Ralstonia solanacearum* in tessuto necrotico in *planta* (Kay e Simonet, 2001). *Ralstonia solanacearum* infetta alcune solanacee (patata, pomodoro, tabacco ad esempio) attraverso colonizzazione del tessuto vascolare che provoca la successiva necrosi della pianta. In queste condizioni ecologiche *R. solanacearum* è capace di HGT con batteri della stessa specie anche se questi sono opportunisti non associati a quella particolare pianta, come *Acinetobacter sp.* Ciò è dovuto alla formazione di fattori di competenza che, *in planta*, portano allo scambio di informazione genetica.

I funghi micorrizici arbuscolari (AM) mostrano un'alta diversità genetica che può dipendere da eventi ricombinazionali (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001). I funghi AM esercitano un ruolo di estrema importanza per la formazione ed il mantenimento di ecosistemi vegetali terrestri. Le spore di questi zigomiceti contengono un numero elevato di nuclei, anche diversi tra loro; probabilmente le variazioni intrasporali sono dovute ad anstomosi ifali (Giovannetti *et al.*, 1999) che permettono lo scambio d'interi nuclei. Genomi multipli sono stati recentemente dimostrati in *Scutellospora castanea* (Kuhn *et al.*, 2001), fungo micorrizico arbusculare.

Il monitoraggio post-rilascio di barbabietola da zucchero geneticamente modificata ha consentito a Gebhard e Smalla (1999) di verificare la persistenza di DNA transgenico nel terreno ed anche l'HGT. De Vries *et al.* (2001) sono riusciti a trasformare dei batteri con transgeni vegetali. La trasformazione naturale di batteri opportunisti con lisati cellulari di *Acinetobacter, Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia* è stata descritta da Nielsen (2000 a, b).

4. Esposizione ambientale, HGT e fissazione di transgeni

In un recente studio, Nielsen e Townsend (2001) valutano i fattori limitanti dell'HGT di transgeni cromosomali tra agenti di controllo biologico di fitopatogeni e batteri opportunisti. La fissazione di un transgene è una funzione della frequenza di ricombinazione, ma ben diverso sarà il caso di trasformanti dove si ha selezione negativa del carattere trasferito (con tendenza quindi alla perdita del carattere stesso nella popolazione in poche generazioni) dal caso in cui la selezione sarà neutra o positiva. Nel secondo caso la probabilità di fissazione del transgene sarà più o meno equivalente alla velocità ed entità di comparsa di mutazioni spontanee, nel terzo invece la selezione positiva di un trasformante raro costituirà lo scenario che presumibilmente genera un impatto ecologico. In altri termini l'effetto della selezione naturale è il fattore decisivo per la fissazione di un transgene in una popolazione batterica ricevente. Per il secondo e terzo caso questa probabilità si esprime matematicamente con

$$\mathbf{n_o r / N\lambda} \quad \text{e} \quad \mathbf{2n_o rs/\lambda}$$

dove **r** è la frequenza dell'HGT, $\mathbf{n_o}$ è la dimensione della popolazione batterica esposta al tempo zero, che è parte di **N** (popolazione effettiva), **λ** è la velocità esponenziale della diminuzione all'esposizione ed **s** esprime il coefficiente di selezione, cioè la differenza tra l'adattamento («fitness») relativo dei trasformati nei confronti degli individui non trasformati.

5. HGT e valutazione del rischio nell'uso di OGM

Nella valutazione del rischio ambientale nell'uso di OGM, la Direttiva 2001/18/EC del 12.03.2001 introduce la definizione dei termini «effetti diretti, indiretti, immediati e ritardati» degli OGM, dove per effetti diretti s'intendono gli effetti primari sulla salute umana o sull'ambiente che siano un risultato dell'OGM stesso e non quello di una catena di eventi; «effetti indiretti» sono quelli che risultano da una catena di eventi attraverso meccanismi quali le interazioni con altri organismi, trasferimento di materiale genetico o cambiamenti dell'uso di prodotti o della gestione; «effetti immediati» ed «effetti ritardati» si riferiscono al periodo del rilascio. Dunque l'HGT rientra tra i possibili effetti indiretti e, come tale, deve essere valutato sia in termini di probabilità dell'evento sia come previsione consequenziale degli effetti (Traxler *et al.*, 2001). È interessante notare che, come riportato nel paragrafo precedente, siano già disponibili dei modelli matematici per l'HGT tra microrganismi e che, al momento, l'evento di HGT tra piante e batteri venga considerato un evento molto remoto, per quanto biologicamente possibile. In tal senso giocherà un ruolo importante sia la quantità che la stabilità del DNA biodisponibile nell'ambiente (Tappeser *et al.*, 2001).

6. Considerazioni conclusive

L'HGT tra microrganismi è un fenomeno possibile anche indipendentemente dai fenomeni riproduttivi. Ciò è stato verificato a livello di laboratorio, mesocosmo e in sistemi complessi quale il suolo o *in planta* sebbene per questi ultimi le evidenze sperimentali siano più scarse. L'HGT si verifica in natura anche tra virus e piante o tra batteri e piante con frequenze che sono sperimentalmente calcolabili. Ben più remoto sembra, per quanto biologicamente possibile, il trasferimento orizzontale di geni da piante a batteri. Sono stati infine sviluppati di recente modelli matematici, basati sulla genetica di popolazione, per calcolare la probabilità di fissazione di un transgene in popolazioni batteriche che sviluppano fattori di competenza entro tempi, e numero di generazioni, definiti.

BIBLIOGRAFIA

De Vries J. *et al.* (2001). The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp by transgenic plant DNA depends strictly on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiology Letters*, *195*, 211-215.

Feil E.J. *et al.* (2001). Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *PNAS*, *98*, 182-187.

Gebhard F. & Smalla K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistance of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, *28*, 261-272.

Giovannetti M., Azzolini D. & Citernesi A.S. (1999). Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in Arbuscular Mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 5571-5575.

Guttman D.S. & Dykhuizen D.E. (1994). Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science*, *266*, 1380-1383.

Kay E. & Simonet P. (2001). Bacterial plant colonization and gene gransfer. In *Interactions in the microbial world*, 9th Int. Symp. on Microbial Ecology, Amsterdam 26-31 August (Abstr. vol.) p. 276.

Kuhn G., Hijri M. & Sanders I.R. (2001). Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, *414*, 745-748.

Nielsen K.M. & Townsend J.P. (2002). Environmental exposure, horizontal transfer and selection of transgenes in bacterial populations (in press).

Nielsen K.M. *et al.* (2000). Natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 206-212.

Nielsen K.M. *et al.* (2000). Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413(pFG4Δ*npt*II) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1237-42.

Nuti M., Agnolucci M., Russo A., Giovannetti M., Toffanin A. & Casella S. (2002). Soil microbial biodiversity: concepts and functions. In *Soil emergency: microbial biodiversity conservation*, Workshop COST Action 831/838 Erice 18 May 2001, (in press).

Ochman H. *et al.* (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, *405*, 299-304.

Perna N.T. *et al.* (2001). Genome sequence of the enterohaemorragic *Escherichia coli* 0157:H7. *Nature*, *409*, 529-533.

Tappeser B., Eckelkamp C. & Weber B. (2001). Analysis of observed adverse effects from the release of genetically modified organisms. Umweltbundesamt (Federal Environmental Agency, Austria). *Monographien*, *148*, 1-71.

Traxler A., Heissenberger A., Frank G., Lethmayer C. & Gaugitsch H. (2001). Ecological monitoring of genetically modified organisms. Umweltbundesamt (Federal Environmental Agency, Austria). *Monographien*, *147*, 1-87.

Trevors J.T. & Van Elsas J.D. (2000). Quantification of gene transfer in soil and the rhizosphere. In *Soil, rhizosphere and phyllosphere*, Chapter 56, pp. 500-508.

Vandenkoornhuyse P., Leyval C. & Bonnin I. (2001). High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity*, *87*, 243-253.