

L'impiego di impollinatori come bioindicatori di impatto ambientale

G. M. Di Leo^{1-2*}, S. Arpaia¹, D. Battaglia².

¹ENEA – Centro Ricerche Trisaia, Rotondella (MT)

²Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, via dell'Ateneo Lucano 10, Potenza.

*corresponding author: grazia_dileo@yahoo.it

Riassunto

Lo scopo dello studio è stato quello di sviluppare una approfondita conoscenza delle relazioni fra insetti impollinatori e piante con riferimento ai due aspetti seguenti:

- il potenziale impatto di piante geneticamente modificate (PGM);
- le possibilità di contaminazione dell'ambiente attraverso la dispersione di polline.

Tale lavoro è stato effettuato utilizzando come casi studio quello di PGM esprimenti tossine di tipo Cry per la resistenza ad insetti.

Sono state studiate tre diverse colture: colza, melanzana e pomodoro.

Introduzione

Alcuni imenotteri impollinatori, in particolare l'ape domestica (*Apis mellifera* L.), comunemente usati quali indicatori dell'impatto ambientale delle attività industriali o agricole, possono essere utili per valutare le eventuali conseguenze negative di alcune nuove tecnologie.

Le piante geneticamente modificate (PGM) resistenti agli insetti hanno come scopo fondamentale quello di controllare alcuni fitofagi dannosi, senza interferire con la biologia delle specie "non bersaglio". È ormai comune in diversi agro-ecosistemi ortofrutticoli l'introduzione di arnie destinate ad aumentare l'efficacia dell'impollinazione naturale. Anche per questi motivi gli impollinatori sono divenuti fra gli organismi "non bersaglio" comunemente monitorati per la valutazione dell'impatto ambientale delle PGM, valutazione prevista anche dalla legislazione comunitaria.

La gran parte degli studi relativi agli effetti di tali colture sugli impollinatori hanno riguardato essenzialmente le api (*Apis mellifera* L.) (Duan et al., 2008) o i bombi (*Bombus* spp.) su PGM esprimenti tossine derivate da *Bacillus thuringiensis* Berl. (Bt) (Malone e Pham-Delègue, 2001).

Durante la loro attività bottinatrice sulle piante, le api vanno alla ricerca di polline, nettare, gomma e resine, inoltre possono venire a contatto con la melata prodotta dai fitomizi in attività trofica sulle stesse piante. L'assunzione di questi prodotti costituisce una potenziale via di esposizione alla tossina espressa in pianta.

La letteratura scientifica corrente suggerisce che le tossine Cry derivate da Bt non esercitano tossicità diretta verso api e bombi (Duan et al., 2008; Malone e Pham-Delègue, 2001). Per valutare a pieno la compatibilità di queste varietà PGM con l'azione bottinatrice dei pronubi, è però importante esaminare anche possibili effetti non letali che pure potrebbero avere conseguenze ecologiche notevoli (Arpaia et al., 2006).

Materiali e metodi.

Sono state svolte osservazioni comparative del comportamento in serra degli impollinatori su PGM di colza, melanzana e pomodoro. Inoltre, allo scopo di valutare il ruolo degli impollinatori nella dispersione ambientale di geni, è stato studiato il flusso genico mediato

da impollinazione entomofila fra una PGM (pomodoro) e piante coltivate o spontanee filogeneticamente relate.

Colza: Sono state effettuate osservazioni in serra a contenimento, per due cicli colturali, sul comportamento alimentare di *Bombus terrestris* L. in prove con piante di colza geneticamente modificato esprimente la tossina Cry1Ac e piante controllo (Stewart *et al.*, 1996).

Le PGM esprimono nel DNA genomico il gene Bt *Cry1Ac* che esprime una δ -endotossina, attiva contro i lepidotteri, ed inoltre presenta nel costrutto il gene reporter (mGFP5-er) codificante per la proteina della fluorescenza verde (GFP estratta da *Aequorea victoria*) che espresso insieme alla δ -endotossina ne permette l'identificazione nel reticolo endoplasmatico mediante la fluorescenza emessa.

La prova è stata allestita in una serra di 150 m², in parcelle di 35 m² (2 parcelle per ogni tesi: colza GM e controllo quasi isogenico non trasformato), secondo uno schema completamente randomizzato. Nella fase iniziale della fioritura al centro della serra è stata collocata una colonia di bombi (*Bombus terrestris* L. - Koppert Italia s.r.l., Bussolengo, VR), che erano pertanto gli unici impollinatori disponibili per la coltura.

L'attività degli impollinatori è stata monitorata con osservazioni dirette, su 1-2 fiori per parcella, per la durata di 30 minuti nel corso di due sessioni giornaliere, tra le ore 10,00 e le 14,00. Il comportamento degli impollinatori è stato registrato usando il programma "OBSERVER" (Noldus Information Technology bv, Wageningen, The Netherlands), con un computer portatile. In particolare, sono stati misurati il numero e la durata delle visite su ogni singolo fiore.

Melanzana: Sono state utilizzate piante transgeniche di melanzana (var. Picentia), esprimente la tossina *Cry3Bb* per la resistenza a coleotteri (Iannacone *et al.*, 1997), ed il rispettivo controllo quasi isogenico.

Le piante sono state trapiantate in una serra di 150m², in parcelle di 35m² (2 parcelle per ogni tesi), seguendo uno schema completamente randomizzato. Le modalità delle osservazioni sono state le stesse descritte per la prova con piante di colza.

Piante di melanzana provenienti dalla stessa partita di seme utilizzata per la prova in serra sono state allevate in vaso. Al momento della fioritura sono state effettuate estrazioni di sostanze volatili sotto vuoto e sono stati raccolti dati morfologici sui fiori.

Pomodoro: Le prove sperimentali sono state impostate con l'obiettivo di:

- a) valutare l'attrattività di PGM di pomodoro nei confronti degli impollinatori e la successiva accettazione delle stesse;
- b) quantificare l'ibridazione fra PGM di pomodoro e piante di pomodoro non trasformato;
- c) valutare la correlazione fra eventi di incrocio spontaneo e mobilità dei pronubi.

L'esperimento è stato condotto in serra (15x38 m.). Nella parte centrale della serra è stata predisposta un'area contenente 120 piante invase di pomodoro GM. Tra ogni pianta è stata lasciata una distanza di circa 30 cm. Sono state utilizzate piante di pomodoro GM ottenute da Metapontum Agrobios s.r.l. (Metaponto, MT); le piante di pomodoro (linea UC82) sono state trasformate via *Agrobacterium tumefaciens* per esprimere la tossina *Cry3Bb* di *Bacillus thuringiensis* come descritto da Iannacone *et al.* (2008). Il gene era una versione modificata del gene *Cry3Bb* di *Bacillus thuringiensis* (Iannacone *et al.*, 1997).

Il resto della serra é stato occupato con 639 piante dell'ecotipo Agrinocerino disposte intorno all'area coltivata con PGM. Una famiglia di bombi (*Bombus terrestris* L.) è stata posta al centro della serra per favorire l'impollinazione.

Sono state effettuate osservazioni sull'attività alimentare dei bombi misurando la durata di ogni visita ed il numero di fiori visitati su ogni infiorescenza. Inoltre sono state effettuate 150 analisi immunologiche dei semi da bacche di Agrinocerino prelevate in 10 aree da 20 piante ciascuna.

Risultati e discussione

Colza: Nel primo anno di prova, la frequenza delle visite sul primo fiore di una singola infiorescenza è stata maggiore sulle piante controllo, rispetto alle PGM (l'analisi della varianza indica valori altamente significativi per le visite sul primo, secondo fiore e successivi). La percentuale di bombi che ha continuato a bottinare su altri fiori della stessa infiorescenza non è risultata significativamente differente, tra i trattamenti. Allo stesso modo non sono state osservate differenze significative nella durata media delle visite sui singoli fiori (tabella 1).

Nella prova del secondo anno il numero delle osservazioni disponibili è stato quasi raddoppiato rispetto all'anno precedente, anche se i risultati di questo anno hanno dato risposte contrastanti. Il numero medio di visite per infiorescenza in piante di colza transgeniche e controllo è molto simile (tabella 2).

Le analisi statistiche indicano differenze non significative tra le tesi per ognuno dei parametri analizzati.

I risultati della prova del secondo anno indicano ancora un maggior numero di visite sui fiori delle parcelle controllo, anche se questo dato non è risultato statisticamente significativo.

Tesi	N° di visite sul primo fiore	Durata della visita	N° di visite sul secondo fiore	% di bombi sul secondo fiore	Durata della visita	N° di visite sul terzo fiore	% di bombi sul terzo fiore
Bt-	5.80 A	2.16 A	4.37 A	74.65 A	2.31 A	2.50 A	40.55 A
Bt+	4.63 B	2.12 A	3.28 B	71.63 A	2.24 A	1.85 B	42.80 A

Tabella 1: Prova in serra colza primo anno, comportamento alimentare di *Bombus terrestris* su linee di colza Bt e controllo

Tesi	N° di visite sul primo fiore	Durata della visita	N° di visite sul secondo fiore	% di bombi sul secondo fiore	Durata della visita	N° di visite sul terzo fiore	% di bombi sul terzo fiore
Bt-	3.52A	3.764A	2.169A	66.58A	2.101A	1.217B	42.099°
Bt+	3.68A	3.177B	2.493A	64.25A	2.209A	1.533A	42.80°

Tabella 2: Prova in serra colza secondo anno, comportamento alimentare di *Bombus terrestris* su linee di colza Bt e controllo

I bombi hanno mostrato in generale la tendenza ad orientarsi diversamente fra le aree con PGM e le aree con piante controllo. Tuttavia le piante geneticamente modificate sono risultate sempre ugualmente accettabili dai bombi per la loro attività di bottinamento dopo il primo assaggio, come risulta dalla misura della durata media di ogni singolo evento che è comparabile a quella rilevata sulle rispettive piante controllo. Un altro parametro che ha confermato l'uguale accettazione delle piante di colza dopo l'assaggio, è quello della percentuale di bombi che hanno continuato a bottinare sui fiori di una stessa infiorescenza Melanzana: Analizzando i dati relativi a questa prova è risultato che il numero delle visite è stato significativamente più alto sui fiori delle piante transgeniche. L'analisi della varianza indica un effetto significativo del trattamento, mentre il numero dei fiori, valutato come covariata, non esercita alcun effetto significativo. La durata media delle visite non è risultata significativamente differente (Tabella 3). I risultati cromatografici sulle PGM di melanzana e sulle piante controllo indicano una simile composizione qualitativa in sostanze volatili, ma una sensibile variazione quantitativa delle emissioni.

I dati morfologici relativi ai diametri delle corolle dei fiori di melanzana hanno evidenziato un diametro maggiore per le piante controllo rispetto alle PGM, anche se non statisticamente significativo.

Tesi	N° di visite sul primo fiore	Durata della visita
Bt -	6.28 A	18.48 A
Bt +	8.82 B	23.19 A

Tabella 3: Prova in serra melanzana; comportamento alimentare di *Bombus terrestris* su linee di colza Bt e controllo

I bombi hanno mostrato la tendenza ad orientarsi diversamente fra le varietà geneticamente modificate e le piante controllo, Tuttavia le piante geneticamente modificate sono risultate sempre ugualmente accettabili dai bombi per la loro attività di

bottinamento dopo il primo assaggio, come risulta dalla misura della durata media di ogni singolo evento che è addirittura superiore a quella rilevata sulle rispettive piante controllo. Pomodoro: La percentuale di campioni in cui è stata rilevato il gene *Cry3Bb* è stata dell'1,9% superiore all'esoincrocio che si registra in normali condizioni di campo (Tei, 2002).

Non si sono avute differenze significative nella percentuale di positività al test immunologico rispetto alla posizione delle parcelle nella serra ($F=0,85, P=0,60$).

L'analisi del comportamento alimentare ha fornito risultati simili per le piante transgeniche e per quelle controllo in merito ai parametri comportamentali misurati.

La durata media della visita sul primo fiore è stata di 9 secondi su piante Bt e di 8,13 secondi su piante controllo ma tale differenza non è stata statisticamente significativa ($P=0,34$).

La durata della visita è stata normalmente più breve per il secondo fiore di un'infiorescenza, ma non significativamente diversa fra le due tesi.

La percentuale di bombi che ha visitato un secondo fiore della stessa infiorescenza è stata inferiore nel caso delle piante Bt rispetto al controllo anche se non in maniera significativa ($P=0,11$).

Il bottinamento su un terzo fiore della medesima infiorescenza è risultato un evento sporadico.

Tesi	Durata della visita sul primo fiore (sec.)	% di bombi sul secondo fiore
Bt -	8.13 A	10.18 A
Bt +	9.00 A	6.26 A

Tabella 4: Prova in serra pomodoro; comportamento alimentare di *Bombus terrestris* su linee di colza Bt e controllo

L'omogeneità del trasferimento del polline all'interno della serra è stata confermata in tre diverse date di raccolta delle bacche.

I nostri risultati nella prova con il pomodoro hanno mostrato che il gene flow, mediato da insetti fra diverse linee di pomodoro coltivate in serra, avviene in maniera abbastanza limitata (<2% dei semi presentavano la presenza del transgene), ma viene sensibilmente favorita dalla presenza dei pronubi. L'attività di foraggiamento di *B. terrestris* L. si è svolta in maniera simile su piante di pomodoro geneticamente modificato e su linee commerciali non trasformate. La loro distribuzione in serra non è stata influenzata dal diverso genomasplasma presente.

Ringraziamenti: Parte di questa ricerca è stata svolta nell'ambito del Progetto di Ricerca e Formazione MIUR DM 9/10/2002 Rif. Progetto n. 32.

Riferimenti bibliografici

- Arpaia, S., V.L. Fonseca, C.S. Pires, Silveira, F.A. **2006**. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. Ch. 7 in: Hilbeck, A., Andow, D.A., Duan, J.J., Marvier, M., Huesing, J., Dively, G., Huang, Z. 2008. A Meta-Analysis of Effects of Bt Crops on Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE* 3(1): e1415. doi:10.1371/journal.pone.0001415
- Fontes, E. (Eds.) Environmental Risk Assessment of Transgenic Organisms: A Case Study of Bt cotton in Brazil. CABI International, Wallingsford. U.K.: 155-174
- Iannaccone, R., Grieco, P. D., Cellini, F. **1997**. Specific sequence modifications of a cry3B endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance. *Plant Molecular Biology* 34: 485–496.
- Iannaccone, R., Mittempergher, F., Morelli, G., Panio, G., Perito, A., Ruberti, I., Sessa, G. and Cellini, F. **2008**. Influence of an *Arabidopsis* dominant negative *athb2* mutant on tomato plant development. *Acta Hort. (ISHS)* 789:263-276.
- Malone, L.A., Pham-Delègue, M. **2001**. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32, 287–304.
- Stewart, C. N Jr., Adang, M. J., All, J. N, Raymer, P. L., Ramachandran, S., Parrott, W. A. **1996**. Insect Control and Dosage Effects in Transgenic Canola Containing a Synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc Gene. *Plant Physiol.* 112: 115-120. doi:10.1104/pp.112.1.115
- Tei, F. **2002**. Tecnica colturale. in: Manuale di corretta prassi per la produzione integrata del pomodoro da industria. 30 pp. Regione Umbria.