

STUDI DI VALUTAZIONE DI IMPATTO AMBIENTALE DI PIANTE GM ATTRAVERSO L'UTILIZZO DI MICRORGANISMI NON-TARGET

Prof. Manuela Giovannetti, *Dipartimento di Chimica e Biotecnologie
Agrarie, Università di Pisa, Via del Borghetto 80*

1. Introduzione

Il rilascio in campo aperto di piante geneticamente modificate impone lo studio del loro impatto sugli organismi benefici non-target, in particolare sulle popolazioni di microrganismi nel terreno, fondamentali per la fertilità dei suoli e la nutrizione delle piante (Giovannetti, 2003). Un importante gruppo di microrganismi benefici è rappresentato dai funghi micorrizici arbuscolari (MA), che stabiliscono simbiosi mutualistiche con circa l'80% delle piante terrestri (Smith e Read, 1997).

I funghi MA sono organismi minacciati dall'uso massiccio e sistematico di fertilizzanti e pesticidi, e possono essere considerati dei validi bioindicatori di qualità del suolo. Essi rappresentano pertanto i principali microrganismi non-target chiave, da monitorare negli studi di impatto ambientale di piante geneticamente modificate (GM) da introdurre in agricoltura (Giovannetti e Avio, 2002). Essi hanno avuto origine più di 400 milioni di anni fa e sono considerati dei veri e propri fossili viventi. Sono biotrofi obbligati e il loro ciclo vitale non può essere completato in assenza della pianta ospite. Le spore presenti nel terreno germinando danno origine ad un micelio pre-simbiotico, capace di riconoscere l'ospite e differenziare strutture infettive, gli appressori, che si formano sulla superficie delle cellule radicali. Gli appressori producono ife capaci di penetrare e crescere all'interno della radice sia intercellularmente lungo l'asse longitudinale, sia intracellularmente formando gli arbuscoli, dove avvengono gli scambi di nutrienti tra il fungo e la pianta ospite. Dopo l'instaurarsi della simbiosi il fungo riceve dalla pianta i composti del carbonio essenziali per la crescita ed inizia a produrre un'estesa rete miceliare extraradicale funzionale all'esplorazione dell'ambiente circostante e all'assorbimento dei nutrienti minerali. Il ciclo si completa con la produzione di

nuove spore, che restano quiescenti nel terreno in attesa di germinare ed incontrare una nuova pianta ospite.

Le piante modificate per la produzione di tossine antifungine o insetticide potrebbero influenzare la formazione della simbiosi micorrizica, e di conseguenza interferire sulla capacità dei funghi simbionti di funzionare da rete di trasferimento dei nutrienti dal terreno alle piante agrarie.

Le fasi del ciclo vitale dei funghi MA utili per monitorare l'impatto delle piante GM sono rappresentate da:

- a) *Fase di crescita pre-simbiotica*. Le radici delle piante ospiti rilasciano, tramite gli essudati radicali sostanze che promuovono la crescita ifale ed inducono le ife ad aumentare le loro ramificazioni in prossimità delle radici. Questo processo è stato definito "morfogenesi differenziale" (Giovannetti et al., 1993a). Sia la crescita ifale, sia la morfogenesi differenziale possono essere influenzate dalla presenza di piante GM.
- b) *Riconoscimento dell'ospite e formazione delle strutture infettive*. Questa fase di interazione tra il fungo e la pianta ospite è caratterizzata dal differenziamento degli appressori, strutture infettive multinucleate che si formano sulla superficie delle radici in seguito al riconoscimento dell'ospite (Giovannetti et al., 1993b). Le piante GM possono influenzare la formazione e la funzionalità degli appressori e di conseguenza la capacità del fungo di colonizzare la radice.
- c) *Colonizzazione intraradicale*. La capacità dei funghi MA di svilupparsi all'interno delle radici è fondamentale ai fini della funzionalità della simbiosi. Le piante GM possono influenzare questa fase del ciclo vitale dei funghi MA.

Nella presente Unità Formativa saranno presi in esame due tipi di piante GM: linee di mais trasformate per esprimere la tossina Bt, ad attività insetticida e linee di melanzana trasformate per esprimere la proteina antifungina Dm-AMP1, una defensina.

2. Descrizione delle piante GM prese in esame.

2.1. Linee di mais Bt. Le linee di mais considerate sono la linea Bt 176 e la linea Bt 11. Nel mais Bt 176 (NK4640Bt) la tossina di *B. thuringensis* espressa è la CryIAb, sotto il controllo del promotore della fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPC). La proteina Bt (CryIAb) si esprime nei tessuti verdi della pianta, nel polline e nelle cariossidi. Nel mais Bt 11 (NK4640Bt) la tossina espressa è la CryIAb, sotto il controllo del promotore CaMV35S. La pianta esprime la tossina CryIAb in tutti i tessuti. Studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che la tossina *Bt* viene rilasciata nella rizosfera dalle radici di piante di mais transgenico e può rappresentare un rischio potenziale a lungo termine per gli organismi benefici del suolo (Saxena et al. 1999).

2.2 Linee di melanzana esprimenti la defensina Dm-AMP1. Piante di melanzana trasformate con il gene codificante per la defensina Dm-AMP1 sono capaci di esprimere costitutivamente le defensine isolate da *Dahlia merckii*. La proteina antifungina è espressa ad elevati livelli in tutti i tessuti, si localizza preferenzialmente nelle pareti cellulari delle foglie e delle radici e viene rilasciata negli essudati radicali dove è presente già dopo quattro giorni di coltura idroponica (Turrini et al., 2004a).

3. Descrizione del metodo per la valutazione dell'impatto di piante GM sul fungo micorrizico *Glomus mosseae*.

Per analizzare l'impatto sul fungo micorrizico *G. mosseae* delle linee transgeniche di melanzana e mais, le tre fasi fondamentali del ciclo del fungo sopra descritte sono state saggiate in un sistema modello (Turrini et al., 2004b). Esso si basa su un "sistema a doppio sandwich", che permette di studiare separatamente la crescita miceliare pre-simbiotica, le risposte di riconoscimento della pianta ospite e la capacità del fungo di colonizzare le radici. In breve, tre membrane di esteri di cellulosa, contenenti le spore di *G. mosseae* vengono sovrapposte e dopo la germinazione il sistema radicale di una pianta viene inserito tra due membrane contenenti le spore germinate. La terza membrana, contenente altre spore germinate, viene lasciata intatta in modo da completare il doppio sandwich. L'uso di una

barriera fisica, posta tra il micelio cresciuto sulla membrana esterna e le radici della pianta ospite, che si trovano invece nella membrana più interna, impedisce la formazione della simbiosi micorrizica e permette di studiare la crescita e la differenziazione ifale in presenza degli essudati di piante GM e non. Le fasi successive della formazione della simbiosi possono invece essere studiate nella parte del sandwich in cui fungo e pianta sono entrati in contatto. Dopo un mese dall'inizio dell'esperimento, sia le membrane sia le radici vengono colorate in Trypan blue e la lunghezza di radice infetta viene misurata con il metodo "grid line intersect" (Giovannetti e Mosse, 1980). Le radici, montate su vetrino, possono essere osservate al microscopio ottico per analizzare la formazione degli appressori e degli arbuscoli.

4. Valutazione dell'impatto delle piante GM sul fungo micorrizico *Glomus mosseae*.

4.1. Caso studio 1: impatto delle linee di mais Bt 176 e Bt 11. La lunghezza del micelio originato da spore germinate in presenza delle radici di mais Bt 176 differiva significativamente da quella osservata in presenza di mais non trasformato, riducendosi del 28%, mentre non vi erano differenze significative tra Bt 11 e controllo. La morfogenesi differenziale delle ife fungine veniva elicitata allo stesso livello dalle radici delle tre linee di mais Bt 176, Bt 11 e controllo. L'analisi quantitativa delle strutture infettive (formazione di appressori e di punti di infezione), ha mostrato un numero significativamente più alto di appressori che non davano luogo ad infezione nelle radici di mais Bt176 (36% del totale di strutture infettive) rispetto al controllo (11%) e al mais Bt11 (9%). L'analisi microscopica delle radici mostrava la presenza, in Bt 176, di tentativi di colonizzazione abortivi, caratterizzati da retrazione del citoplasma e formazione di setti nelle ife di penetrazione che si sviluppano dagli appressori.

4.2. Caso studio 2: impatto delle linee di melanzana Dm-AMP1. La crescita pre-simbiotica del fungo micorrizico non mostrava differenze significative in presenza di essudati rilasciati dalle piante trasformate o da quelle di controllo, variando tra 908.6 e 1419.2 mm. L'aumento della ramificazione

delle ife di *G. mosseae* e le risposte di riconoscimento del fungo, elicitato dalla presenza dei segnali derivati dalla pianta ospite, non mostravano segni di cambiamento in presenza di essudati contenenti defensine. Infatti, le radici sia delle piante controllo, sia di quelle trasformate, cresciute al di sotto delle membrane, elicitarono la morfogenesi differenziale del micelio di *G. mosseae*, con una percentuale di sporocarpi che mostravano differenziazione variabile tra il 67% e il 100%. Questo dimostrava che la proteina antifungina Dm-AMP1 rilasciata negli essudati radicali non interferiva con il sistema di riconoscimento tra pianta ospite e fungo simbionte. Lo stabilirsi della simbiosi micorrizica nelle piante trasformate non differiva dai controlli. Infatti, né la percentuale di lunghezza radicale colonizzata dal fungo, che variava tra il 30 e il 60% nelle diverse piante e linee, né il numero di unità di infezione micorrizica (6,4 – 7,4 per cm di radice micorrizata) mostrava differenze statisticamente significative.

5. Considerazioni conclusive

I risultati ottenuti suggeriscono che i funghi micorrizici arbuscolari possono rappresentare dei validi indicatori ai fini della valutazione di impatto ambientale delle piante geneticamente modificate. Infatti questi organismi mostrano risposte diversificate in presenza di piante geneticamente modificate che esprimono transgeni di diversa provenienza e con diverse funzioni. Nel caso delle piante di melanzana trasformate con la proteina antimicrobica Dm-AMP1, rilasciata negli essudati radicali, il fungo micorrizico *G. mosseae* non era influenzato in alcuna fase del suo ciclo vitale, a differenza di quanto osservato per il mais Bt 176, in cui era parzialmente inibita la formazione della simbiosi micorrizica.