



Scuola Superiore
Sant'Anna
di Studi Universitari e di Perfezionamento

Corso di BIOTECNOLOGIE VEGETALI

Biotecnologie applicate alla difesa degli insetti

A cura di

Pierdomenico Perata & Elena Loreti

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Insetti

- Non GM: Insetti resi sterili con radiazioni
- GM: insetti geneticamente sterili

Piante GM

- Produzione di lectine tossiche (GNA *Galanthus nivalis* agglutinin)
- Avidina
- Tecnologia Bt

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: Produzione di lectine tossiche

(GNA *Galanthus nivalis* agglutinin)



Piante transgeniche di patata esprimenti GNA sono resistenti a larve di *Lacanobia oleracea* (tomato moth).



Le piante transgeniche di patata esprimenti GNA sono però innoque per le larve di *Eulophus pennicornis*, vespa parassita delle larve di *Lacanobia oleracea* (tomato moth).

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM:Produzione di avidina



Gli insetti distruggono granaglie per milioni di \$



Il bianco d'uovo contiene avidina. L'avidina ha la proprietà di sequestrare la biotina, essenziale vitamina anche negli insetti.

L'avidina è efficace come biopesticida

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM:Produzione di avidina

Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests

Avidin is a glycoprotein found in chicken egg white, that sequesters the vitamin biotin. Here we show that when present in maize at levels of 100 p.p.m., avidin is toxic to and prevents development of insects that damage grains during storage. Insect toxicity is caused by a biotin deficiency, as shown by prevention of toxicity with biotin supplementation. The avidin maize is not, however, toxic to mice when administered as the sole component of their diet for 21 days. These dates suggest that avidin expression in food or feed grain crops can be used as a biopesticide against a spectrum of stored-produce insect pests. *Nature 2000*

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM:Produzione di avidina

Mais transgenico produttore avidina è resistente alla maggior parte degli insetti dannosi.

L'insetto *Prostephanus truncatus* è tra i pochi resistenti: batteri che vivono al suo interno producono biotina

L'avidina è innoqua per l'uomo, in quanto fa parte della sua dieta (uova).

L'avidina è anche impiegata in medicina come diagnostico: estratta dalle uova costa 3000\$ al grammo. Estratta da mais transgenico ha costi molto inferiori.

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: difesa dalla Piralide
(*Ostrinia nubilalis* European Corn Borer, ECB)



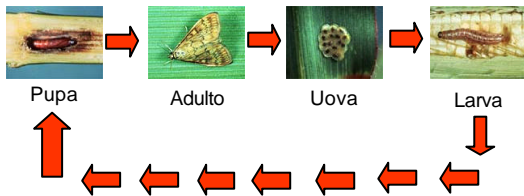
La piralide causa gravi danni alle coltivazioni di mais



La piralide si è rapidamente diffusa sul territorio americano

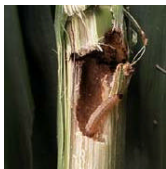
Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: difesa dalla Piralide
(European Corn Borer, ECB)



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: difesa dalla Piralide
(European Corn Borer, ECB)



La piralide causa gravi danni alle coltivazioni di mais



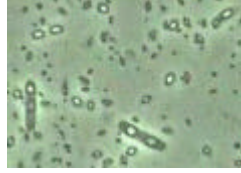
Il numero di generazioni/anno aumenta all'aumentare delle temperature

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia *Bt*



La piralide causa gravi danni alle coltivazioni di mais



Il *Bacillus thuringiensis* produce una proteina tossica per la piralide ad altre larve

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia *Bt*



Preparati a base di *Bacillus thuringiensis* sono impiegati in agricoltura biologica per la difesa delle colture: è un biopesticida.

E' però costoso, instabile agli UV, e sono necessari trattamenti ripetuti

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia *Bt*



+



=

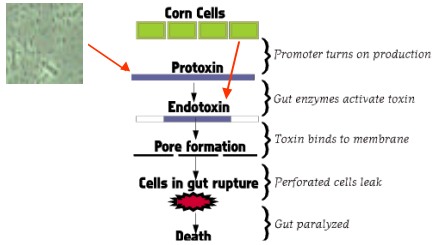
Mais transgenico *Bt*

Gene *Bt*

Il mais *Bt* produce la proteina *Bt* ed è quindi tossico per le larve che se ne dovessero cibare

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia Bt



Il mais Bt produce la tossina Bt ed è quindi tossico per le larve che se ne dovessero cibare

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia Bt

La protossina Bt è codificata in *Bacillus thuringiensis* da un largo numero di geni

Geni Cry (crystalline)

Geni Cyt (cytolytic)

cryI e *cryII* sono specifiche per i lepidotteri

Esempi di geni Cry:

Gene	Crystal shape	Protein size (kDa)	Insect activity
cry I [subgroup A, B, C, D, E, F, G]	Spiraxial	130-138	lepidoptera larvae
cry II [subgroup A, B, C]	rhomboid	69-71	lepidoptera and diptera
cry III [subgroup A, B, C]	hexagonal	73-74	coleoptera
cry IV [subgroup A, B, C, D]	Spiraxial	73-154	diptera
cry V-IX	various	85-125	various

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia Bt

Il gene Bt codificato in *Bacillus thuringiensis* si esprime a livelli bassissimi in piante transgeniche

Il gene privato di circa metà della sequenza al 3' è espresso maggiormente e conserva le sue proprietà insetticide; le piante transgeniche così ottenute non sono però in grado di controllare gli insetti (basso livello di espressione della proteina Bt)

Il gene "corto" ulteriormente ingegnerizzato per eliminare sequenze che interferivano con la sua espressione in piante ha consentito di ottenere le prime varietà resistenti agli insetti grazie alla produzione di proteina Bt (fino allo 0,005-1% delle proteine solubili)

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: mais Bt

Mais Bt come *NaturGard KnockOut* prodotto da Syngenta:

Esprime:

- promotore PEP carbossilasi - gene *Cry1ab* modificato
- promotore polline specifico - gene *Cry1ab* modificato
- promotore 35S - gene resistenza erbicida (metodo di selezione)
- promotore batterico-gene resistenza Amp (non espresso in pianta)

Metodo di trasformazione:

- biolistico

Destinato a:

- consumo umano (farina, olio)
- insilaggio per bestiame

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: mais Bt

Mais Bt come *YieldGard* prodotto da Monsanto:

Esprime:

- promotore 35S - gene *Cry1ab*
- promotore 35S – transit peptide cloroplasto-gene EPSPS (resistenza Glyphosate)
- promotore 35S – transit peptide cloroplasto-gene GOX (resistenza Glyphosate)
- promotore batterico-gene resistenza neomicina (non espresso in pianta)

Metodo di trasformazione:

- biolistico

Destinato a:

- consumo umano (farina, olio)
- insilaggio per bestiame

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: mais Bt

Mais Bt come *NaturGard KnockOut* prodotto da Syngenta:

Esprime:

- promotore PEP carbossilasi - gene *Cry1ab*

Consente l'espressione nei tessuti verdi, di cui si ciba la larva nella 1ª generazione

- promotore polline specifico - gene *Cry1ab*

Consente l'espressione nel polline, di cui si ciba la larva nella 2ª generazione

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: mais Bt

Mais Bt come *YieldGard* prodotto da Monsanto:

Esprime:

- 35S - gene Cry1ab

Consente l'espressione in tutti i tessuti per resistenza a piralide

- promotore 35S – transit peptide cloroplasto-gene EPSPS modificato

- promotore 35S – transit peptide cloroplasto-gene GOX

Conferisce resistenza al diserbante Glyphosate

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: mais Bt

Mais Bt come *YieldGard* prodotto da Monsanto:

Esprime:

- proteina Cry1ab

Tossica specificamente su larve di lepidottero

Non tossica su mammiferi o volatili fino a 10 mg/g peso

(uomo di 70 kg= 0.7 grammi di proteina Bt)

- proteina EPSPS modificato

- proteina GOX

Nessun effetto tossico noto

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: mais Bt

Mais Bt come *YieldGard* prodotto da Monsanto:

Esprime:

- proteina Cry1ab

Tossica specificamente su larve di lepidottero

Non tossica su mammiferi o volatili fino a 10 mg/g peso

(uomo di 70 kg tollera senza effetti oltre 700 mg di proteina Bt)

Contenuto proteina Cry1ab in *YieldGard*:

Foglie: 9.55 µg/g

Pianta intera 1.35 µg/g

Pannocchia 3.2 µg/g

(1 etto di farina = 0.32 mg proteina Bt)



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: mais Bt

Mais Bt come *NaturGard KnockOut* prodotto da Syngenta:

Esprime i seguenti livelli di proteina Bt:

Foglie: 0.596 - 1.159 µg/g (plantule)
 0.530 - 3.029 µg/g (stadio fioritura)
 0.442 - 0.471 µg/g (maturità fisiologica)
 0.066 - 0.225 µg/g (senescenza)
 Polline: 1.137 - 2.348 µg/g
 Radici: 0.008 µg/g
 Cariossidi: <limite deteazione

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Mais Bt come *NaturGard KnockOut* prodotto da Syngenta:

Performance in campo:

- Nessuna differenza quando comparato alla varietà di origine tranne che per la resistenza a larve di lepidottero e a erbicida

Gene flow:

- la produzione e vitalità del polline Bt è comparabile a quella del polline di altri ibridi e quindi la cross-ibridazione è un evento possibile con altre varietà coltivate.
- l'impollinazione con specie del genere Teosinte è possibile. Il Teosinte è normalmente confinato in Messico, Guatemala e Nicaragua, ma popolazioni sono state identificate in Florida. Gli eventuali ibridi hanno ridotta capacità riproduttiva.
- Il genere Zea è anche compatibile con il genere *Tripsacum* (Messico, America Centrale e del Sud). Ibridi difficili però da ottenere e spesso sterili.
- La dispersione nell'ambiente selvatico di mais è improbabile in quanto specie coltivata.

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Varietà di mais Bt:

Nome	Costrutto primario	Altro costrutto
YieldGard (90% del mercato mais-Bt)	35S- <i>CryIAb</i>	35S- <i>ESPS</i> 35S- <i>GOX</i>
NaturGard	PEPC- <i>CryIAb</i> polline-spec- <i>CryIAb</i>	35S-res-erbicida
BT11	35S- <i>CryIAb</i>	35S-res-erbicida
Starlink (solo per alimentazione bestiame)	35S- <i>Cry9c</i> <i>proteina molto stabile alla degradazione</i>	35S-res-erbicida
Bt Xtra	35S- <i>CryIAc</i>	35S-res-erbicida

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Mais Bt :

Gene flow:



Mais transgenico



Mais selvatici (teosinte)



Tripsacum

Gene-flow

Diffusione dei pollini GM



Mais

Teosinte

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: problematiche connesse alla tecnologia Bt

Trasferimento di geni in popolazioni di mais selvatico

Nature 2001

Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico

David B. Clark & Pamela H. Shelton

Department of Environmental, Policy and Management, University of California, Berkeley, California 94720, USA

Nature 2002

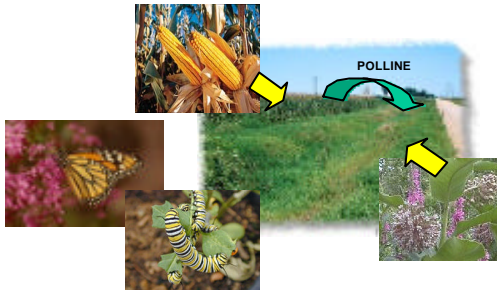
Maize transgene results in Mexico are artefacts

Quist and Chapela's conclusion¹ that the transgenes they claim to have detected in native maize in Oaxaca, Mexico, are predominantly reassorted and inserted into a "diversity of genomic contexts" seems to be based on an artefact arising from the inverse-polymerase chain reaction (i-PCR) they used to amplify sequences flanking 35S transgenes from cauliflower mosaic virus (CaMV).

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: problematiche connesse alla tecnologia *Bt*

Effetti dannosi su altri insetti: il caso della farfalla monarca



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: problematiche connesse alla tecnologia *Bt*

Effetti dannosi su altri insetti: il caso della farfalla monarca

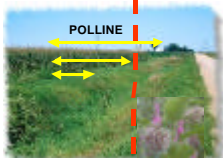


Proposta all'ente americano di protezione ambientale (EPA): coltivare una "cornice" di mais non-Bt intorno all'appezzamento per minimizzare la diffusione del polline Bt su piante spontanee.

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: problematiche connesse alla tecnologia *Bt*

Effetti dannosi su altri insetti: il caso della farfalla monarca



Università del Maryland: il 90% del polline *Bt* cade entro 3 metri dai bordi dell'appezzamento.

Livello di polline su foglie

in campo	: 229 pollini/cm ²
a bordo campo:	78
a 1 metro	: 28
a 5 metri	: 1,4

Tossicità (ridotta crescita larve) richiede almeno 600 pollini/cm²

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: problematiche connesse alla tecnologia *Bt*
Effetti dannosi su altri insetti: il caso della farfalla monarca



Altre evidenze:

- Pioggia e rugiada lavano le foglie dal polline
- Polline esposto per 8 giorni a luce solare perde tossicità
- Proteina Bt perde il 50% e il 90% della sua attività in 1,6 e 15 gg rispettivamente (mais YieldGard)

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: problematiche connesse alla tecnologia *Bt*
Effetti dannosi su altri insetti: il caso della farfalla monarca



Università di Guelph (Canada): le larve di farfalla monarca preferiscono cibarsi di foglie NON cosparse da polline

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

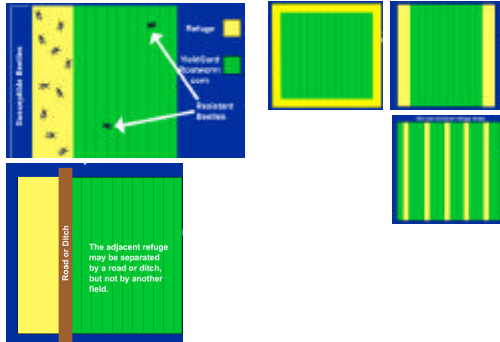
Piante Bt: sviluppo di insetti resistenti alla tossina Bt



L'alternanza di file di mais non-Bt negli appezzamenti Bt consente di ridurre lo sviluppo di ceppi di insetti resistenti alla tossina

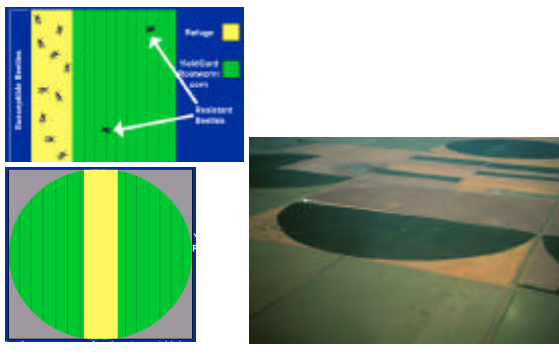
Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante Bt: sviluppo di insetti resistenti alla tossina Bt



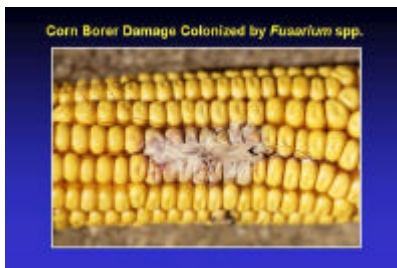
Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante Bt: sviluppo di insetti resistenti alla tossina Bt



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: micotossine in non transgenico



Pannocchie danneggiate da piralide sviluppano colonie fungine con produzione di micotossine

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: micotossine in non transgenico



Biologico

Transgenico

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: micotossine in non transgenico

Effetti delle micotossine	
Aspergillus spp.	
Aflatoxins	Hepatotoxic, carcinogenic
Stenigmatocystin	Carcinogenic
Ochratoxin A	Nephrotoxic, carcinogenic
Penicillium spp.	
Cerinin	Nephrotoxic
Falutin	Toxic, carcinogenic
Rubrotossin	Hepatotoxic
Penicilium	Teratogenic
Penicillic acid	Carcinogenic
Fusarium spp.	
T-2	Dermal necrosis, hemorrhagic
Deoxynivalenol	Irritant
Clascrotryprenol	Dermal necrosis, hemorrhagic
Zearalenone	Estrogenic
Fumonisin	Carcinogenic

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: micotossine in non transgenico

Il mais Bt ha livelli 9-10 volte inferiori di fumosina rispetto a mais non-Bt

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Tecnologia Bt: altre applicazioni in mais

Mais Herculex

Esprime: Cry1F

Resiste a:



- European Corn Borer ECB (piralide) →
- ← Southwestern Corn Borer SWCB
- Fall Armyworm FAW →
- Black cutworm BCW →
- Corn Earworm CEW



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

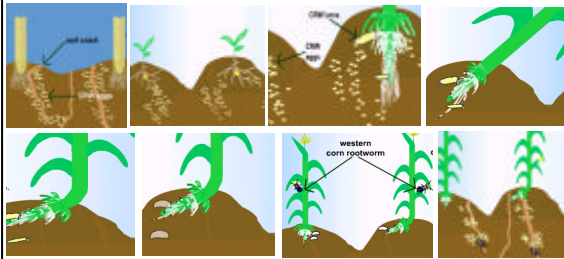
Tecnologia Bt: altre applicazioni in mais

Mais Herculex

Esprime: Cry3Bb1

Resiste a:

Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera*)



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

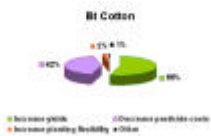
Piante GM: tecnologia Bt

La tecnologia Bt è stata applicata ad altre colture:

Cotone



Main reason to adopt as stated by farmers



Impieghi alimentari:

Limitati alla produzione di olio di semi

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia Bt

- Cotone Bt: varietà Bollgard® e Bollgard II®
- Sul mercato dal 1996
- Rappresenta il 33% del cotone coltivato
- Gli agricoltori all'acquisto accettano di partecipare al programma di campi rifugio
- Il Bollgard ha costi di produzione inferiori
- Qualità delle fibre inalterate rispetto al non-GM



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: tecnologia Bt

Sviluppo della varietà transgenica BOLLGARD

- Prime evidenze di fattibilità: 1990
- Sviluppo di diverse combinazioni promotore-Bt
- Trasformazione con Agrobacterium possibile su varietà Coker
- Ottenute centinaia di trasformati in background Coker
- Programma di back-crossing per ottenere varietà commercialmente valide
- Selezione delle linee che esprimevano un buon livello di proteina Bt
- Prove in campo
- Commercializzazione nel 1996



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: cotone Bt

Cotone Bollgard esprime 35S-Cry1Ac



Pink Bollworm
(*Pectinophora gossypiella*)



Bollworm
(*Helicoverpa zea*)



Tobacco Budworm
(*Heliothis virescens*)

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Cotone Bollgard esprime 35S-Cry1Ac



Pink Bollworm
(*Pectinophora gossypiella*)
Bollgard garantisce buona protezione



Bollworm
(*Helicoverpa zea*)
Bollgard garantisce parziale protezione e richiede uso di insetticidi



Tobacco Budworm
(*Heliothis virescens*)
Bollgard garantisce buona protezione

L'espressione Bt nel polline è bassa e il polline è il cibo per il Bollworm

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Cotone Bollgard esprime 35S-Cry1Ac



Pink Bollworm
(*Pectinophora gossypiella*)
Bollgard garantisce buona protezione



Bollworm
(*Helicoverpa zea*)
Bollgard garantisce parziale protezione e richiede uso di insetticidi



Tobacco Budworm
(*Heliothis virescens*)
Bollgard garantisce buona protezione



Beet Armyworm
(*Spodoptera exigua*)
Bollgard garantisce parziale protezione

L'espressione del gene Cry1Ab potrebbe migliorare la resistenza ad altri lepidotteri

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Cotone Bollgard esprime 35S-Cry1Ac

Cotone Bollgard II esprime 35S-Cry2Ab & Cry1Ac



Beet Armyworm
(*Spodoptera exigua*)
Bollgard II garantisce BUONA protezione

Bollgard II è stato ottenuto per trasformazione biolistica di Bollgard

Ulteriori sviluppi: produzione di Bollgard II esprimente proteina chimerica cry1Ac/Cry1Fa: totale protezione contro tutte le larve di lepidotteri

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Problematiche di sicurezza (Bollgard)

La proteina Cry1Ac viene digerita rapidamente (emivita=15 secondi)
 Proteina Cry1Ac prodotta a livelli bassi (0.0005- 0.0020% su peso fresco)
 Proteina Cry1Ac non ha alcuna omologia di sequenza con allergeni noti
 La proteina Cry1Ac prodotta da Bollgard si degrada rapidamente nel suolo



Gene Flow
 Specie spontanee negli USA:



Gossypium thurbei che cresce in Arizona: non compatibile con *G. hirsutum*
Gossypium tomentosum che cresce nelle Hawaii ed è compatibile, ma *G. hirsutum* non è coltivato alle Hawaii

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Vantaggi (Bollgard)

Riduzione del numero di trattamenti chimici (in media 2,2 trattamenti in meno)
 Riduzione dell'esposizione dei lavoratori e delle popolazioni a pesticidi
 900.000 Kg di pesticidi NON impiegati nel 1998
 1200000 Kg di pesticidi NON impiegati nel 2000

Aspetti Economici (Bollgard)

Gli agricoltori pagano da 20 a 32\$ ad acro (0,4ha) per la licenza d'uso, oltre al costo delle sementi
 Il risparmio è di circa 50\$ ad acro, con un aumento di produzione di circa il 10% rispetto al cotone convenzionale

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

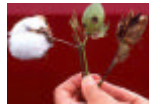
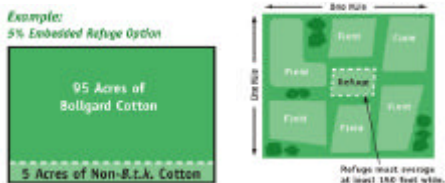
Piante GM: cotone Bt

Gestione Insorgenza Resistenza

Cotone Bollgard II esprime Cry2Ab & Cry1Ac
 Minor probabilità di doppia resistenza

Campi Rifugio:
 5% non-Bt non trattato con insetticidi
 oppure

20% non Bt trattato con insetticidi NON a base di tossina Bt



Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: patata Bt Resistenza alla Dorifora
Leptinotarsa decemlineata



Alla schiusa delle uova le larve si cibano delle foglie



L'adulto depone 300-500 in gruppi di 20 sulla pagina inferiore delle foglie



L'adulto sverna nel suolo

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: patata Bt Resistenza alla Dorifora
Leptinotarsa decemlineata



Uso: Alimentazione umana
Alimentazione bestiame

Metodo trasformazione: Agrobacterium

Transgene: 35S-Cry3A (specifico coleotteri)

Nomi commerciali: Atlantic
Superior
NewLeaf

Campi Rifugio: obbligatori

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: patata Bt Resistenza alla Dorifora
Leptinotarsa decemlineata



Valori nutritivi e composizione: equivalente a patate non-Bt

Digeribilità proteina Cry3A: alta

Livello di glicoalcaloidi (solanina): nella norma

Approcci Biotecnologici alla difesa delle colture dagli insetti

Piante GM: patata *Bt*

Resistenza alla Dorifora
Leptinotarsa decemlineata

