

LO STATO ATTUALE DELLE COLTIVAZIONI TRANSGENICHE NEL MONDO

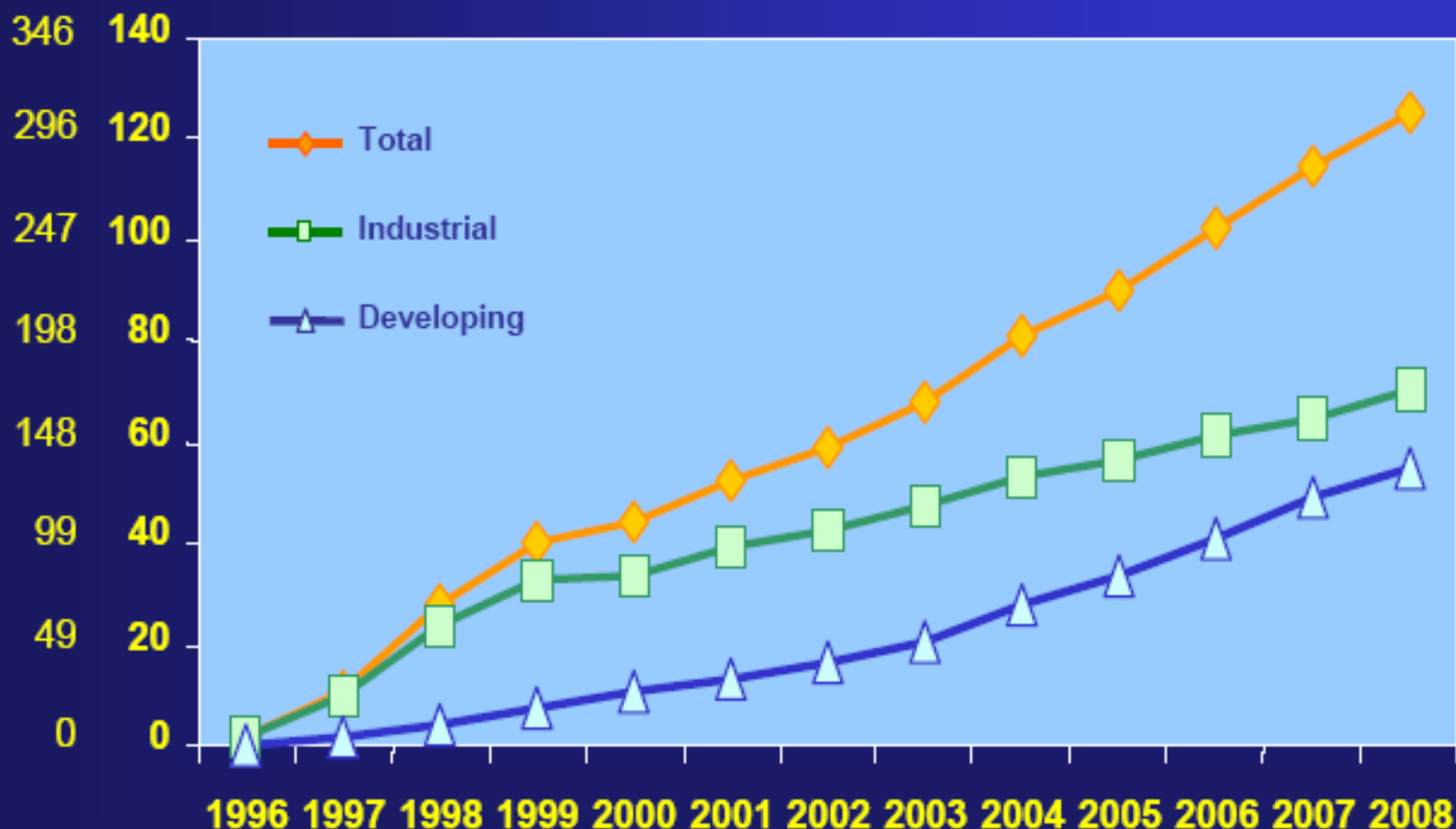
dati estratti da: Clive James, 2009: Global Review of Commercialized Transgenic crops. Published as ISAAA Briefs (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications)

www.ISAAA.org

Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2008: Industrial and Developing Countries (M Has, M Acres)

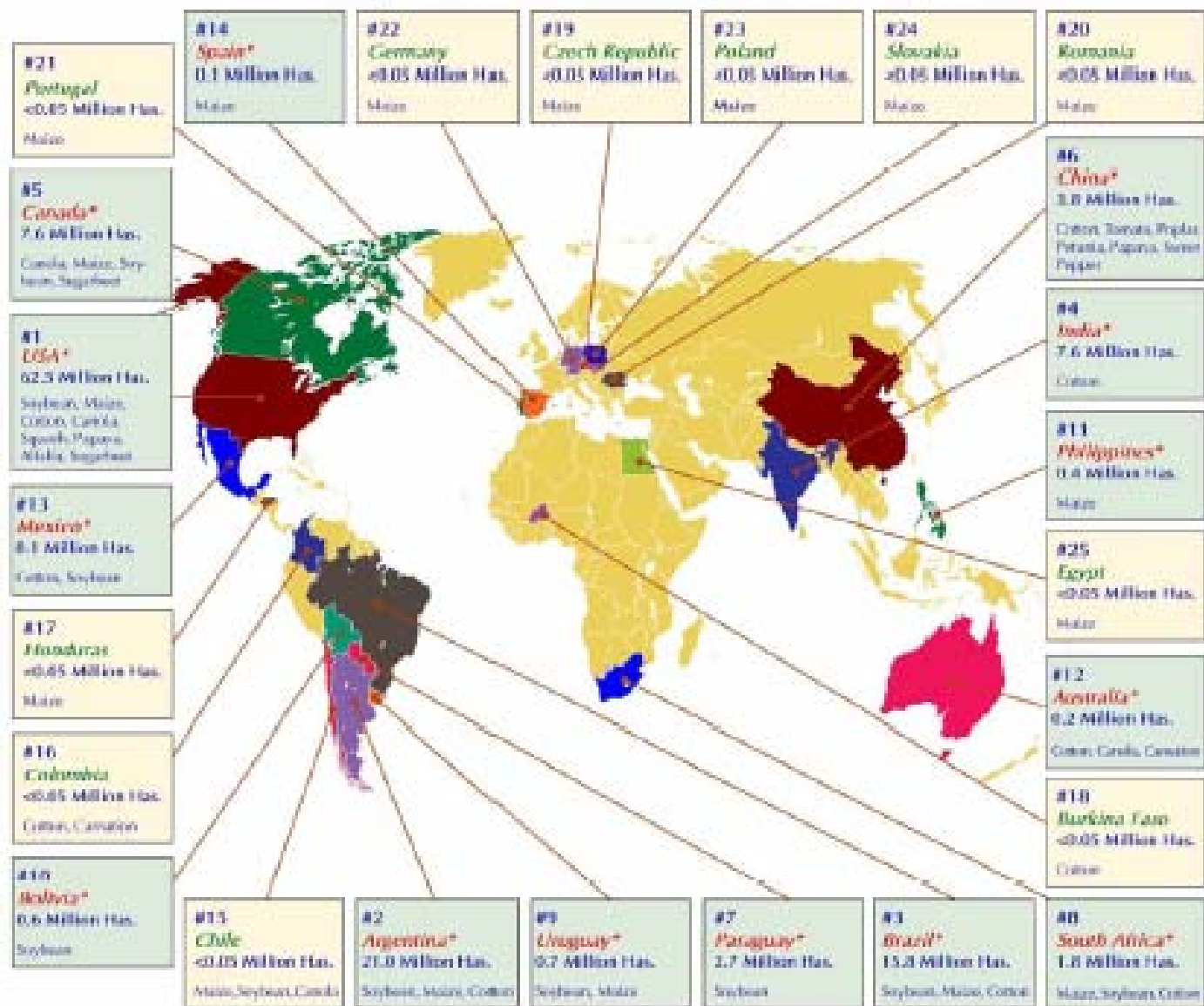


M Acres



Source: Clive James, 2009

Biotech Crop Countries and Mega-Countries*, 2008



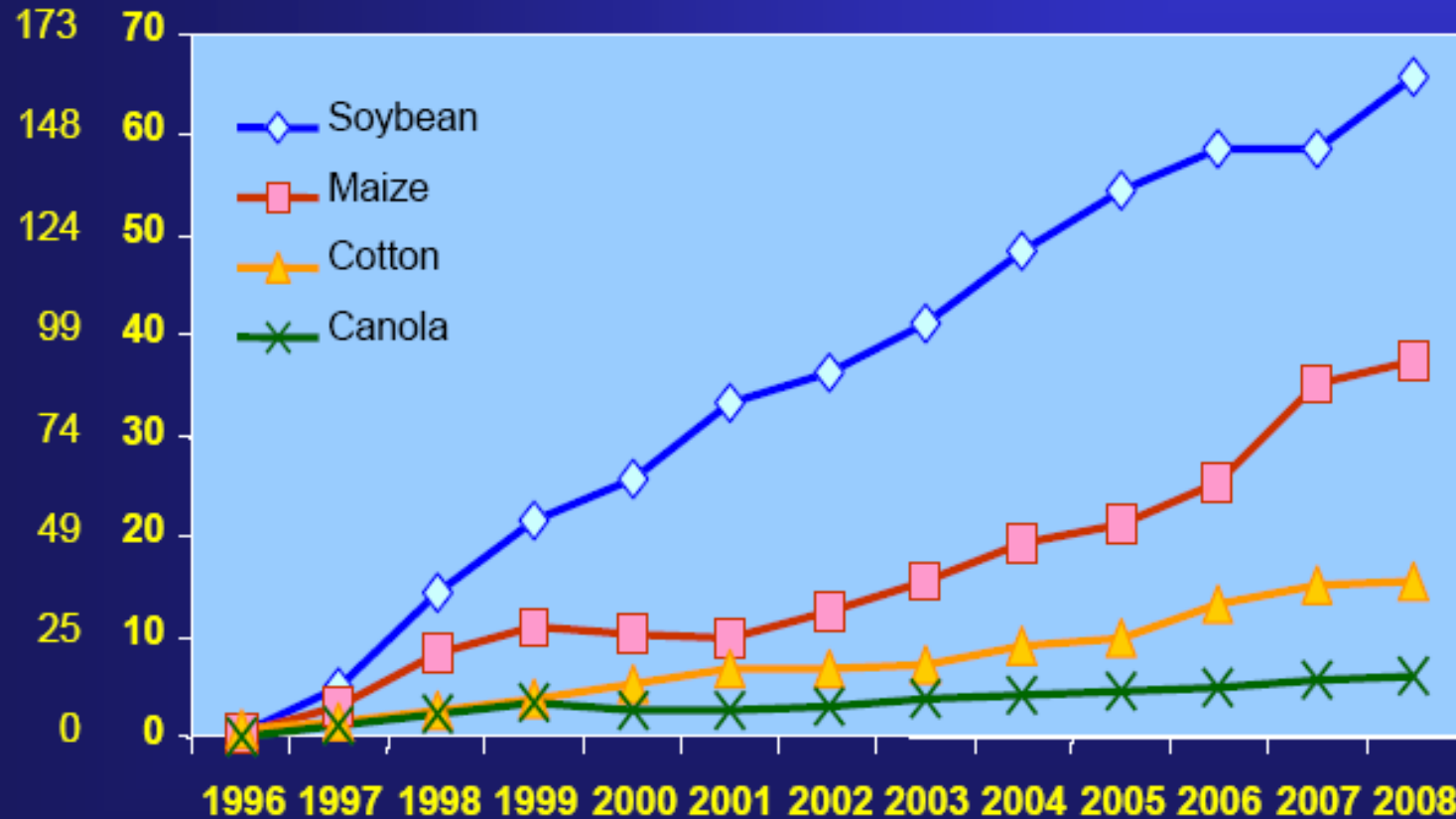
* 14 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops.

Source: Clive James, 2008.

Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2008: By Crop (Million Hectares, Million Acres)



M Acres

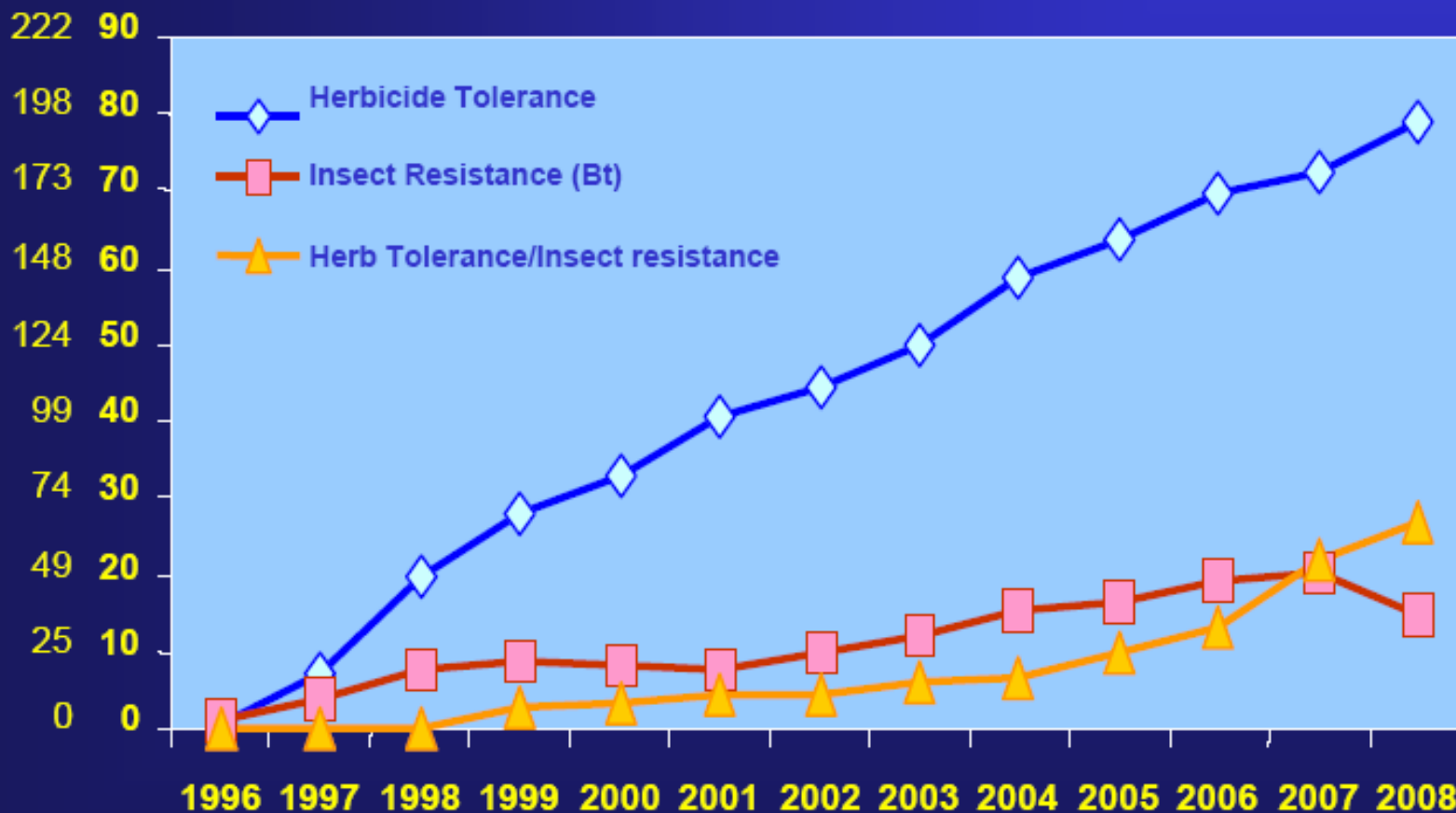


Source: Clive James, 2009

Global Area of Biotech Crops, 1996 to 2008: By Trait (Million Hectares, Million Acres)



M Acres

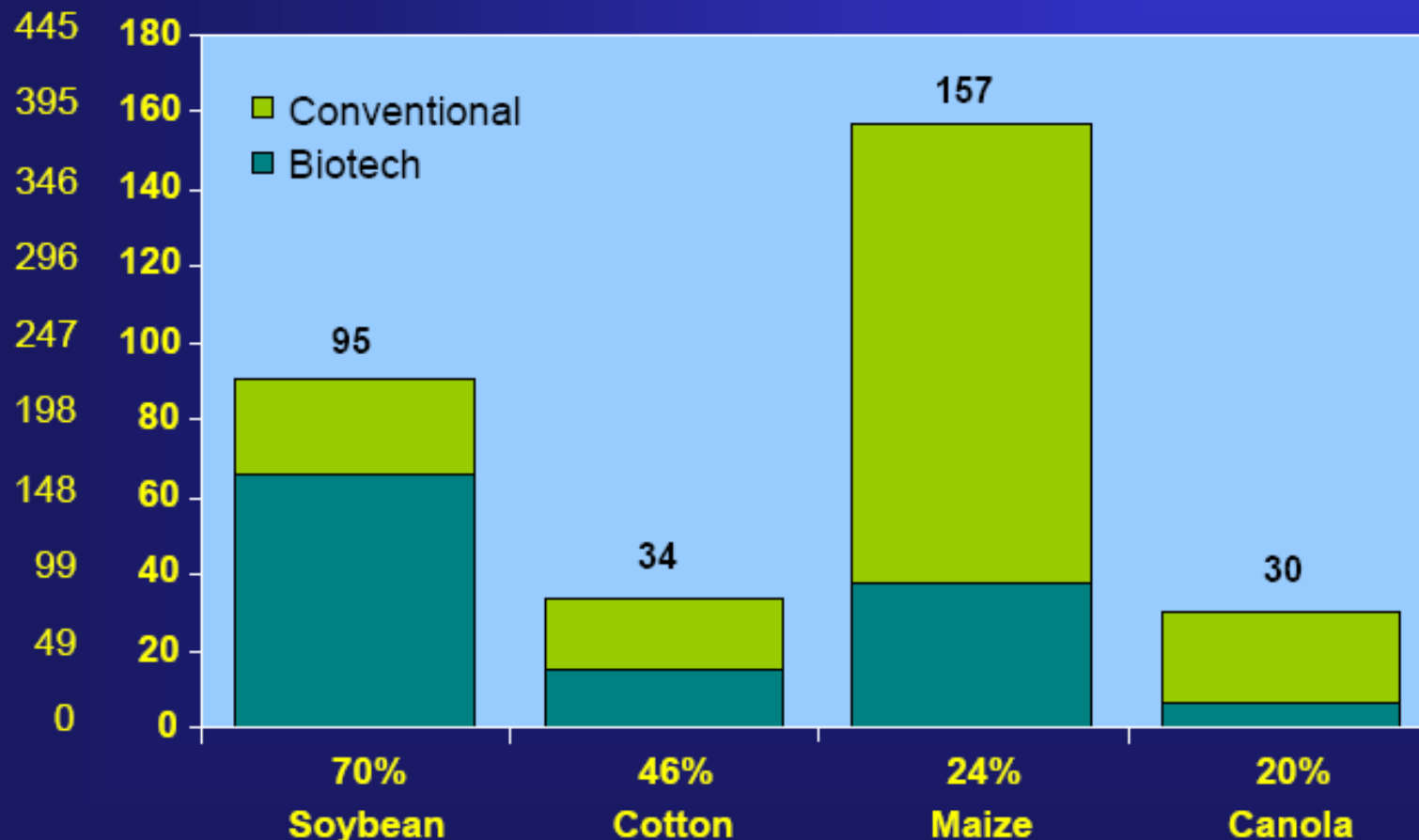


Source: Clive James, 2009

Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares, Million Acres), 2008



M Acres



Source: Clive James, 2009

I caratteri più diffusi nelle attuali varietà GM sono:

1. Tolleranza ad erbicidi
2. Resistenza ad insetti

TOLLERANZA AGLI ERBICIDI

Gli erbicidi agiscono interferendo con alcuni processi essenziali delle cellule vegetali:

- **Interferenza con vari pathways della biosintesi degli amminoacidi**
- **Inibizione della fotosintesi**
- **Interferenza con la biosintesi dei lipidi**
- **Blocco della biosintesi dei carotenoidi**
- **Inibizione della divisione cellulare**
- **Interazione con altri pathways metabolici**

Una sostanza chimica per poter essere definita erbicida deve avere le seguenti proprietà:

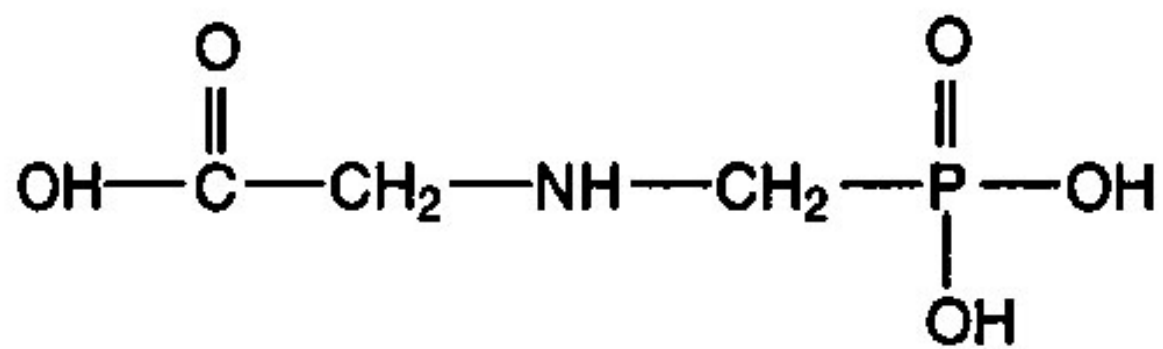
- Avere un'attività inibitoria o letale per le piante
- Essere facilmente utilizzata dalla pianta
- Essere a basso costo
- Non essere nociva per gli organismi non-target

Classificazione degli erbicidi:

Per pre-emergenza Sono gli erbicidi che bloccano processi essenziali per la germinazione o per le prime fasi di sviluppo.

Per post-emergenza Sono gli erbicidi che colpiscono processi metabolici essenziali per la crescita della pianta quando spruzzati sulle erbe in crescita.

GLYPHOSATE (Roundup®)



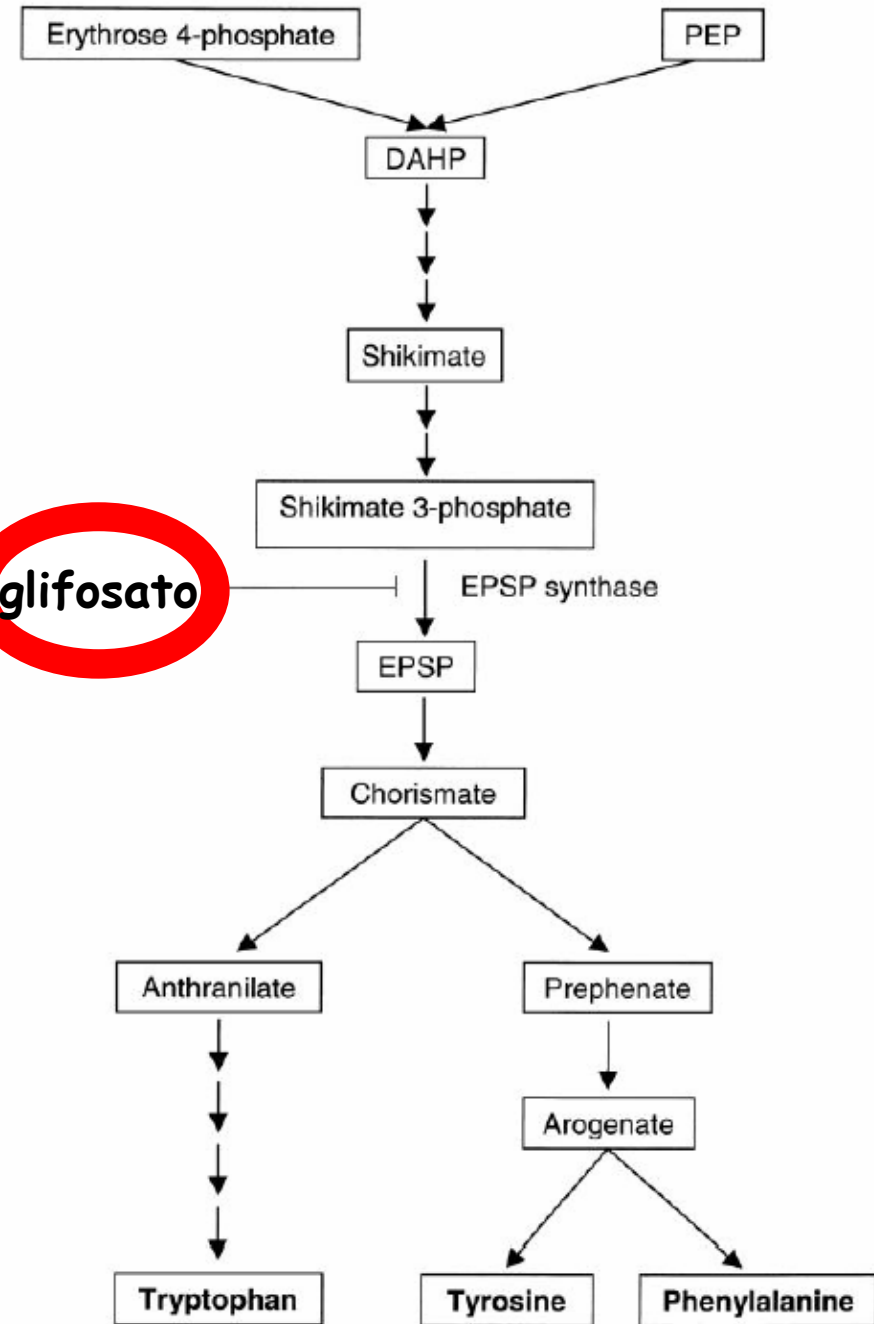
N-(phosphonomethyl)glycine

- Il **glifosato** è un erbicida sistemico ad ampio spettro, non selettivo
- E' letale per tutti i tipi di piante, incluse annuali, perenni e alberi
- L'erbicida è assorbito attraverso le foglie e i tessuti giovani del fusto e trasportato in tutta la pianta
- Non è assorbito dalle radici e viene degradato nel terreno
- Le piante trattate muoiono in giorni o settimane
- Può essere usato in pre-emergenza o come essiccante se applicato poco prima del raccolto

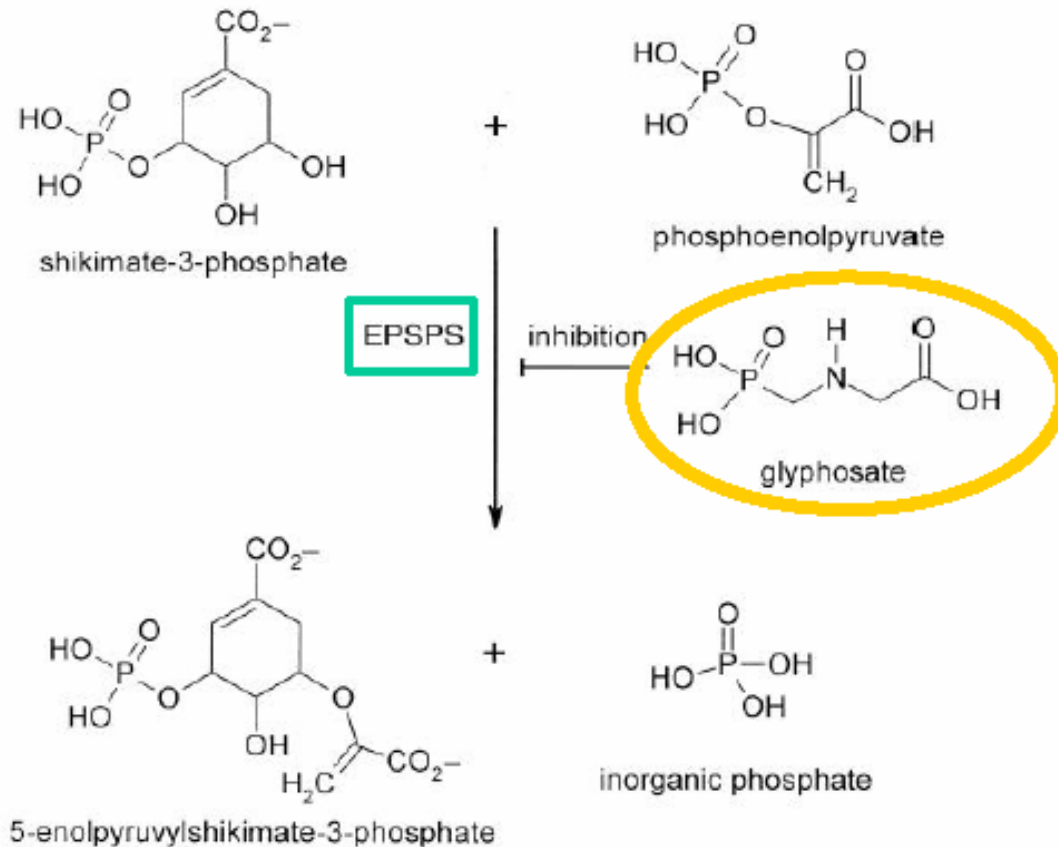
Il glifosato inibisce la sintesi degli amminoacidi aromatici

Inattiva l'enzima EPSP sintasi 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasi

glifosato

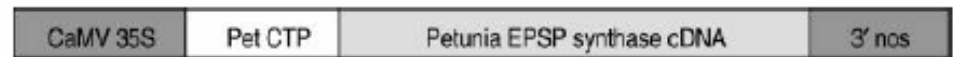


Il glifosato interferisce con il legame del PEP al sito attivo dell'enzima

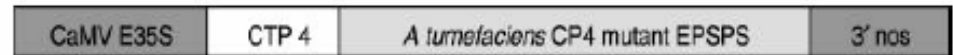


STRATEGIE PER OTTENERE RESISTENZA AL GLIFOSATO

1) Sovraespressione dell'enzima EPSPS



2) Introduzione di un gene EPSPS mutato (funziona anche in presenza di glifosato)



3) Introduzione di un gene che detossifica il glifosato
es. glifosato ossidasi (*gox*)

L'erbicida non si accumula nella pianta perché viene degradato

GTS 40-3-2

Host Organism / Variety

Glycine max L. (Soybean)

Trait

Glyphosate herbicide tolerance.

Trait Introduction Method

Microparticle bombardment of plant cells or tissue

Proposed Use

Production of soybeans for animal feed
(mostly defatted toasted meal and flakes)
and human consumption (mostly oil, protein fractions,
and dietary fibre).

Company Information

Monsanto Company



Roundup Ready®

Summary of Introduced Genetic Elements

Code Name	Type	Promoter, Terminator other	Copies	Form
EPSPS 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (<i>Agrobacterium sp. strain CP4</i>)	HT	enhanced CaMV 35S chloroplast transit peptide from Petunia hybrida	<i>A. tumefaciens</i> nopaline synthase (<i>nos</i>) 3'-polyadenylation signal	1* Native; Also 2 partial gene sequences (250 bp; 72 bp)



35S-p: promotore CaMV 35S

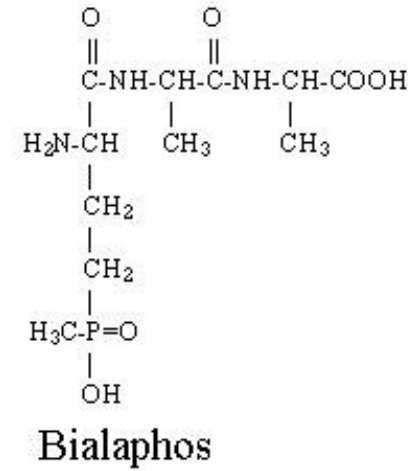
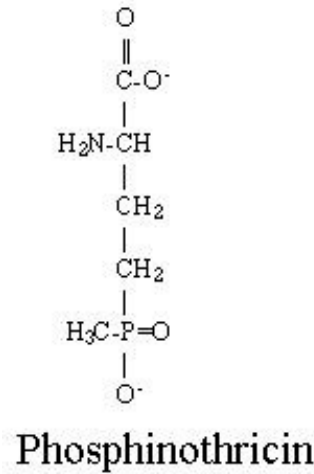
CTP: sequenza per peptide di transito nei cloroplasti

CP4-EPSPS: cDNA per la EPSPS di *A. tumefaciens* ceppo CP4

nos-t: terminatore

GLUFOSINATO

- Erbicida ad ampio spettro attivo in post-emergenza
- Molto efficace ed utilizzato
- Attività solo nelle foglie
- Non dà dispersione nel terreno (veloce degradazione)
- Prodotto da alcune specie di *Streptomyces*
- Inibisce l'attività della Glutamina Sintetasi (GS)



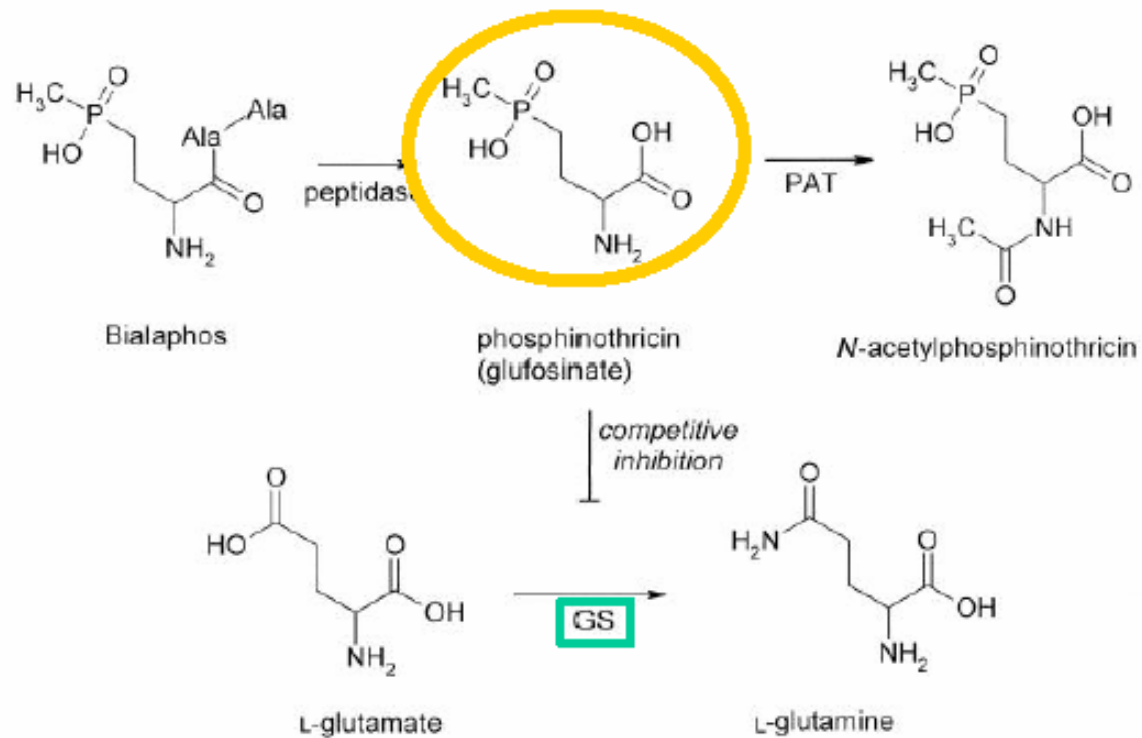
diminuzione dei livelli di glutamina con conseguente accumulo di ioni ammonio

Strategia usata per ottenere resistenza alla fosfinotricina

Se un microrganismo produce una sostanza tossica dovrà possedere un modo per detossificarla

In *Streptomyces* sono stati isolati due geni codificanti la fosfinotricina acetiltransferasi (**PAT**)

- gene *bar* da *S. hygroscopicus*
- gene *pat* da *S. viridochromogenes*



PAT: fosfinotricina acetiltransferasi
acetila il glufosinato rendendolo inattivo

ACS-ZMØØ2-1 / ACS-ZM003-2 (T14, T25)

**Host Organism /
Variety**

Zea mays L. (Maize)
Liberty-Link™

Trait

Phosphinothricin (PPT) herbicide
tolerance, specifically glufosinate
ammonium.

**Trait Introduction
Method**

Chemically mediated introduction
into protoplasts and regeneration.

Proposed Use

Production of corn of the yellow
dent type for grain and silage.
These materials will not be grown
outside the normal production
area for corn.

**Company
Information**

Aventis CropScience (formerly
AgrEvo)



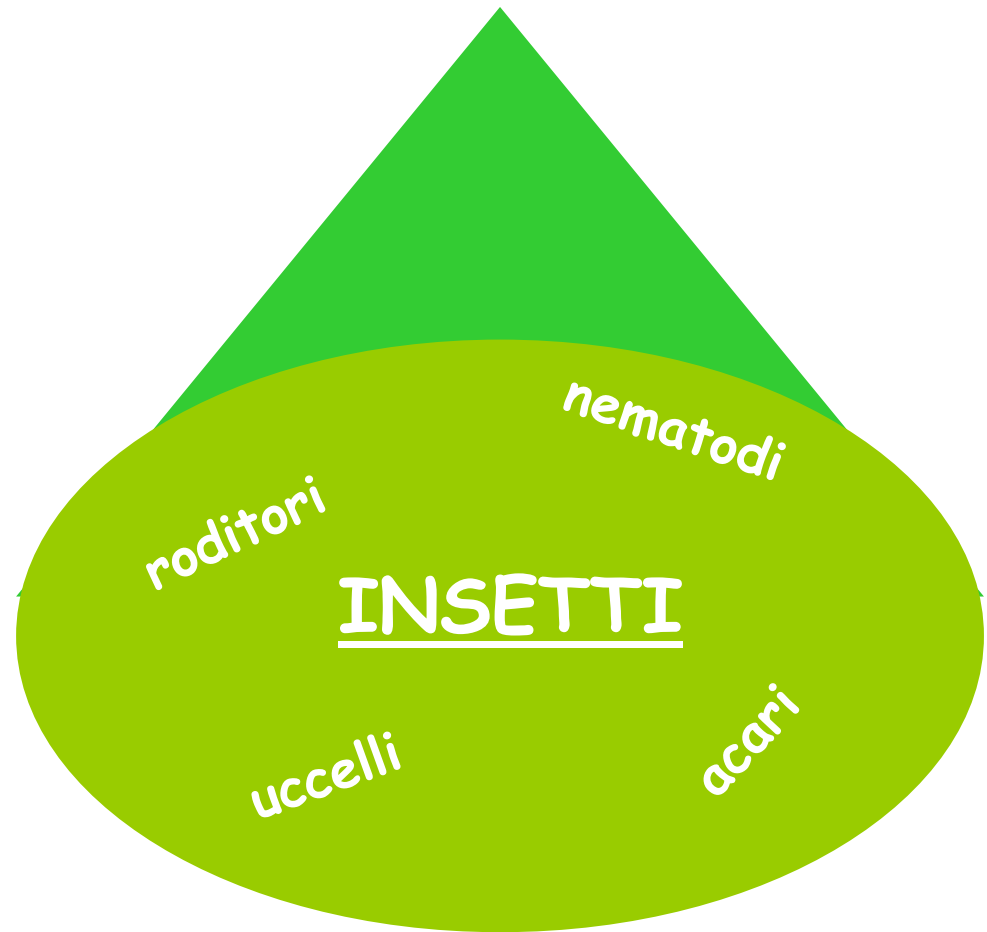
Summary of Introduced Genetic Elements

Code Name		Type	Promoter, Terminator	Copies	Form
			other		
<i>pat</i>	phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) (<i>S. viridochromogenes</i>)	HT	CaMV 35S	CaMV 35S poly(A) signal	3 or 1* Modified for enhanced expression; PEG mediated uptake into plant protoplasts; 3 copies in T14, 1 copy in T25
<i>bla</i>	beta lactamase	SM	bacterial promoter		Truncated beta-lactamase gene missing about 25 % of the gene from the 5' end; not expressed

RESISTENZA AGLI INSETTI

Gli insetti sono una
delle maggiori cause di
perdita del raccolto

larve di:
lepidotteri
coleotteri
ortotteri
omotteri



esempi: **piralide del mais** (*Ostrinia nubilans*, Lepidottero)
dorifora della patata (*Leptinotarsa decemlineata*,
Coleottero)

DANNI PRODOTTI DAGLI INSETTI

- Durante la crescita delle piante
- Dopo la raccolta
- Per la maggior parte controllati con l'uso di insetticidi
- Molte preoccupazioni
 - Per mancanza di specificità
 - Per l'inquinamento ambientale
 - Per i costi



Il *Bacillus thuringiensis*

- Il pesticida "biologico" più ampiamente utilizzato da circa 50 anni
- 2% del mercato globale degli insetticidi nel 1995
- "nemico naturale" di molti insetti
- Usato ampiamente contro zanzare e mosche

specie utilizzate

Bt subsp. *kurstaki*

Bt subsp. *israelensis*

Bt subsp. *Berliner*



Courtesy USDA

Vantaggi nell'uso del *Bacillus thuringiensis*

- 1) Pericoli trascurabili per l'uomo
- 2) Il batterio può essere usato fino al momento del raccolto
- 3) Non ci sono periodi di attesa dal momento della applicazione al momento di rientro sul campo
- 4) I differenti ceppi sono classe-specifici, questo significa che gli insetti "utili" e insetti non-target non sono colpiti
- 5) Gli insetti che hanno ingerito il batterio, e quindi destinati a morire o già morti, non sono considerati pericolosi per gli uccelli o altri animali
- 6) Non sono conosciuti effetti tossici del batterio sulle piante su cui è applicato; il batterio non è considerato pericoloso per l'ambiente

Le tossine del *Bacillus thuringiensis* come insetticidi microbici

- *B. thuringiensis* è un batterio che forma spore
- Le spore contengono cristalli proteici
- La solubilizzazione del cristallo rilascia una protossina (non attiva come insetticida)
- Il taglio della protossina da parte di specifiche proteasi produce la tossina attiva

Queste endotossine (70–130 kDa) sono codificate dai geni *cry*

Sono stati identificati 40 geni *cry*
hanno specificità diversa

Le proteine Cry sono raggruppate in 4 classi

Table 15.1 Some properties of the insecticidal toxins from various strains of *B. thuringiensis*

<i>B. thuringiensis</i> strain or subspecies	Toxin class	Protoxin size (kDa)	Target insects
<i>berliner</i>	CryI	130–140	Lepidoptera
<i>kurstaki</i> KTO, HD-1	CryI	130–140	Lepidoptera
<i>entomocidus</i> 6.01	CryI	130–140	Lepidoptera
<i>aizawai</i> 7.29	CryI	130–140	Lepidoptera
<i>aizawai</i> IC 1	CryI	135	Lepidoptera, Diptera
<i>kurstaki</i> HD-1	CryII	71	Lepidoptera, Diptera
<i>tenebrionis</i> (<i>san diego</i>)	CryIII	66–73	Coleoptera
<i>morrisoni</i> PG14	CryIV	125–145	Diptera
<i>israelensis</i>	CryIV	68	Diptera

Adapted from Lereclus et al., p. 37–69, in Entwistle et al., (ed.), *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, 1993.

Modo di azione

solubilizzazione della tossina
nell'intestino dell'insetto



attivazione della tossina ad
opera di enzimi digestivi



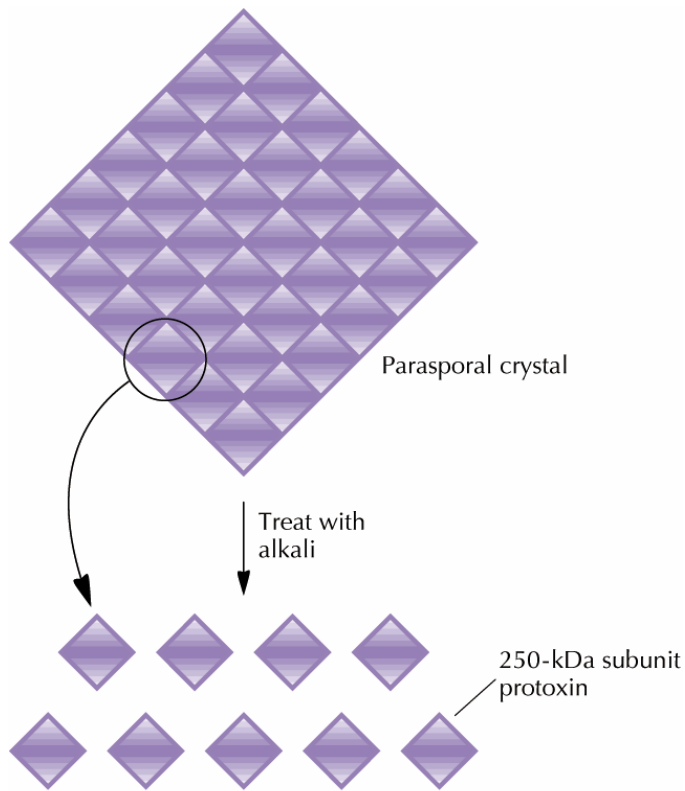
legame della tossina a recettori
presenti nell'intestino



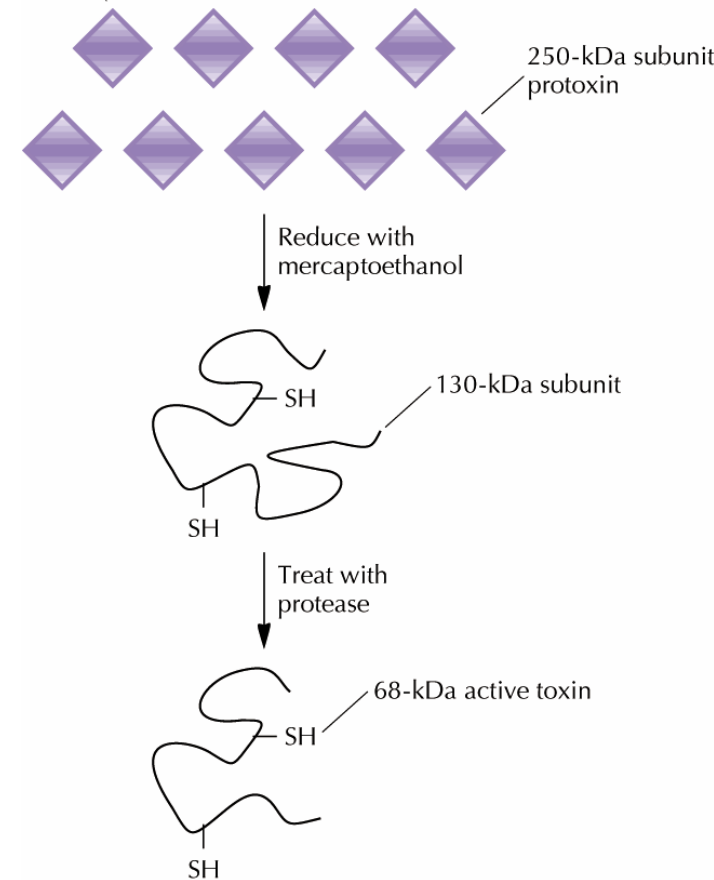
lisi delle cellule epiteliali dell'intestino

Modo di azione delle tossine di *Bacillus thuringiensis*

- Gli insetti ingeriscono i cristalli parasporali
- L'ambiente alcalino dell'intestino (pH 7.5-8.0) solubilizza il cristallo e si forma la protossina

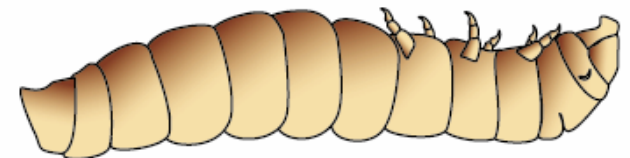
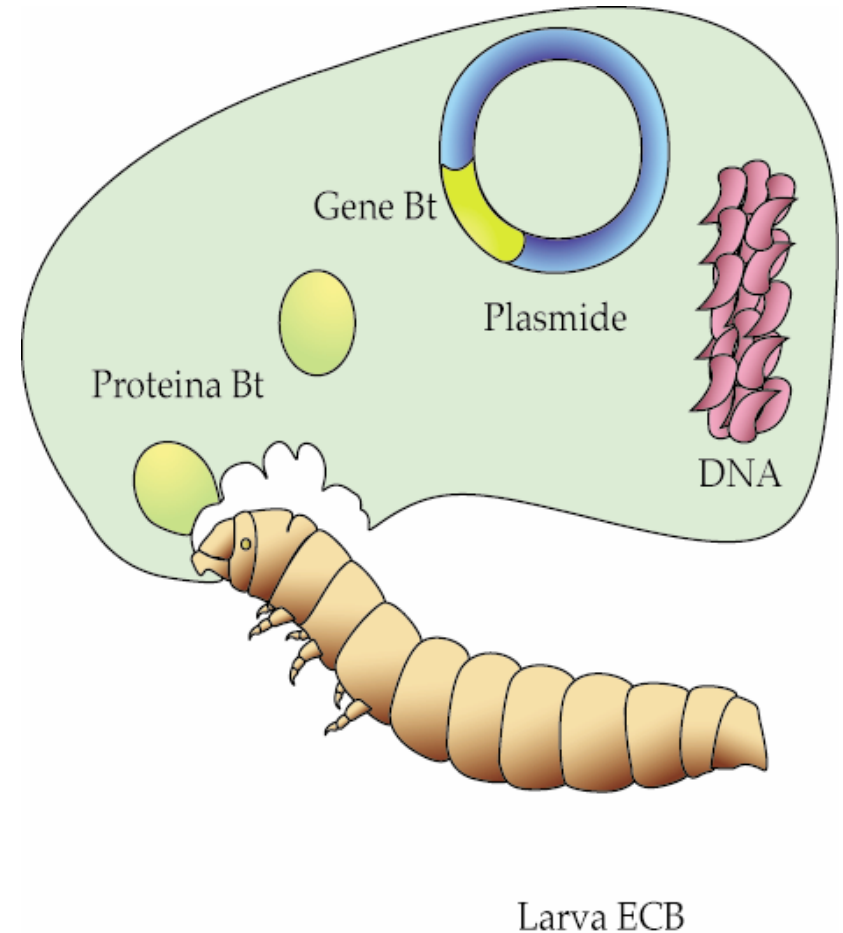


- Specifiche proteasi digestive presenti nell'intestino dell'insetto tagliano la protossina generando la tossina attiva
- Nell'uomo e negli animali non sono presenti le proteasi specifiche

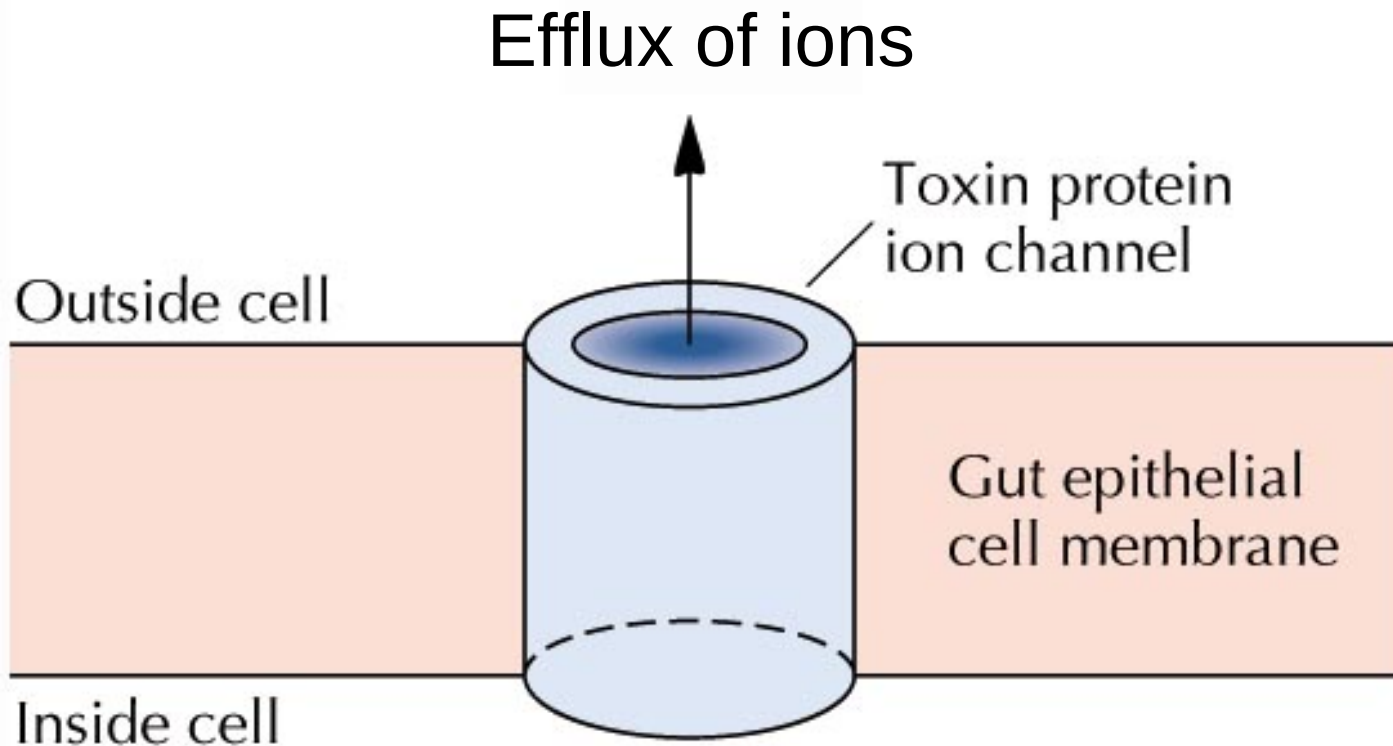


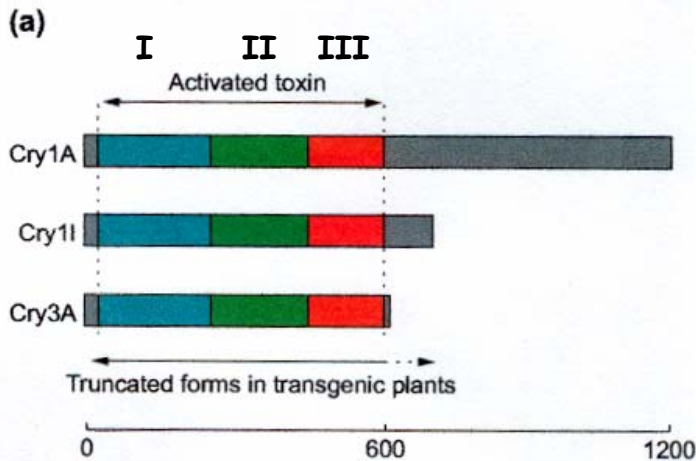
Modo di azione delle tossine di *Bacillus thuringiensis*

- La tossina si inserisce nella membrana delle cellule epiteliali dell'intestino creando un canale ionico
- Ciò determina un'alterazione dei flussi ionici e quindi la lisi delle cellule epiteliali
- L'insetto smette di mangiare, si disidrata e muore



Meccanismo di azione della tossina Bt





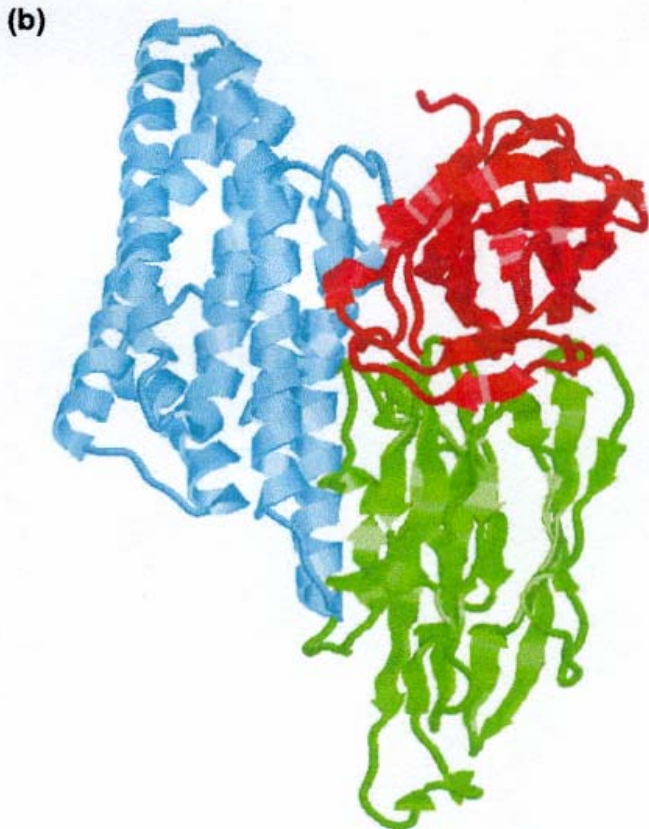
La tossina è attivata dal taglio proteolitico della regione N-terminale

I tre domini della tossina attiva sono conservati nelle diverse classi

dominio I: consente il passaggio attraverso la membrana dell'epitelio intestinale

dominio II: riconoscimento del recettore

dominio III: legame con il recettore



STRATEGIA

Inserire il gene per la proteina Bt in piante di mais in modo che la pianta sia costantemente protetta dall'attacco degli insetti

Ciò permette di ridurre drasticamente
l'impiego di pesticidi chimici

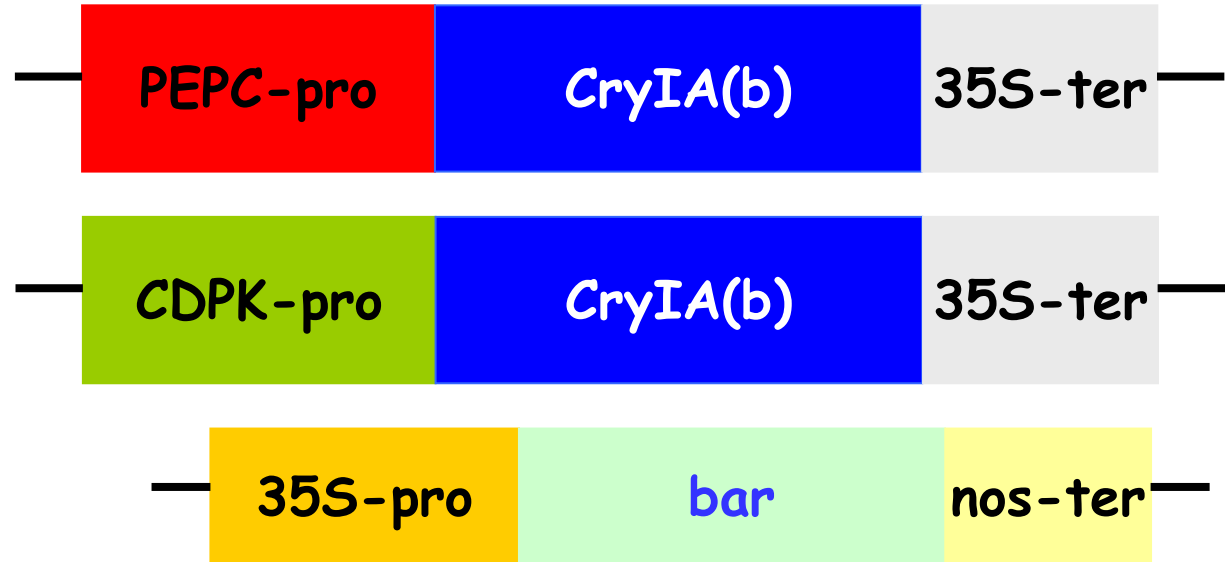
mais Bt176

Syngenta Seeds, Inc.

Host Organism / Variety	<i>Zea mays</i> L. (Maize) NaturGard™ KnockOut™
Trait	Resistance to European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>); phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance, specifically glufosinate ammonium.
Trait Introduction Method	Microparticle bombardment of plant cells or tissue
Proposed Use	Production of <i>Z. mays</i> for human consumption (wet mill or dry mill or seed oil), and meal and silage for livestock feed. These materials will not be grown outside the normal production area for corn.
Company Information	Syngenta Seeds, Inc.

mais Bt176

Syngenta Seeds, Inc.



PEPC-pro: promotore PEP carbossilasi → espressione solo nei tessuti verdi

CDPK-pro: promotore Protein Chinasi Ca^{2+} -Dipendente → espressione nel polline

bar: resistenza all'erbicida fosfinotricina



1999 "caso della farfalla monarca"

Polline di mais Bt176 posto su foglie di una specie di cui si nutre la farfalla
Risultato: la larva muore

Il mais Bt176 già nel 2000
rappresentava < 2 % del mais
GM e < 1% nel 2001

Non verrà più venduto

Mais StarLink

Aventis

Cry9C

similarità con allergeni

1998 autorizzazione solo per alimentazione animali

Nel 2000 viene rinvenuto DNA
StarLink in tacos

Si analizzano 51 casi di reazioni
allergiche dopo l'assunzione di mais,
conclusione: non imputabili allo
StarLink



MON-ØØ81Ø-6 (MON810)

Host Organism / Variety	<i>Zea mays</i> L. (Maize) Yieldgard®
Trait	Resistance to European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>).
Trait Introduction Method	Microparticle bombardment of plant cells or tissue
Proposed Use	Production of <i>Z. mays</i> for human consumption (wet mill or dry mill or seed oil), and meal and silage for livestock feed. These materials will not be grown outside the normal production area for corn.
Company Information	Monsanto Company



mais MON810
Monsanto



Metodo biolistico

2 plasmidi:

- PVZMBK07 gene *cry1Ab*
- PVZMGT10 geni CP4 EPSPS e *gox*

Nella linea MON810 non sono presenti i geni per la tolleranza al glifosato.

↳ Integrazione in loci diversi - perdita per segregazione

Cotton Bollgard®

Monsanto



MON-ØØ531-6, MON-ØØ757-7
(MON531/757/1076)

Host Organism / Variety

Gossypium hirsutum L. (Cotton) Bollgard®

Trait

Resistance to lepidopteran pests including, but not limited to, cotton bollworm, pink bollworm, tobacco budworm.

Trait Introduction Method

Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation.

Proposed Use

Production of cotton for fibre, cottonseed and cottonseed meal for livestock feed, and cottonseed oil for human consumption.

Company Information

Monsanto Company

Cotton Bollgard®

Monsanto

Code	Name	Type	Promoter, other	Terminator	Copies	Form
<i>cry1Ac</i>	Cry1Ac delta-endotoxin (<i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i> (Btk))	IR	double enhanced CaMV 35S	3' poly(A) signal from soybean alpha subunit of the beta-conglycinin gene	>=1	Truncated; Line 757: 1 complete T-DNA and 1 partial T-DNA insertion event
<i>aad</i>	3''(9)-O-aminoglycoside adenyltransferase	SM	bacterial promoter			Not expressed in plant tissues
<i>neo</i>	neomycin phosphotransferase II (<i>Escherichia coli</i>)	SM	nopaline synthase (<i>nos</i>) from <i>A. tumefaciens</i>		>=1	Native

PIANTE TRANSGENICHE CON LA TOSSINA BT

- Pomodoro
- Tabacco
- Patata
- Riso
- Mais
- Mela
- Melanzana
- Colza
- Alfalfa
- Noce
- Pioppo
- Abete rosso
- Mirtillo nero
- Cotone

Altre strategie per ottenere resistenza ad insetti

<i>gene</i>	<i>pianta di origine</i>	<i>insetti target</i>	<i>piante trasformate</i>
INIBITORI DI PROTEASI			
CpTI (tripsina)	Vigna	coleotteri, lepidotteri	tabacco, pomodoro, lattuga, colza, girasole, melo, grano
C-II (serina proteasi)	soia	coleotteri, lepidotteri	colza, pioppo, patata, tabacco
INIBITORI DI ALFA AMILASI			
a-AI-Pv	fagiolo	coleotteri	tabacco, pisello, fagiolo azuki
LECTINE			
GNA	bucaneve	omotteri, lepidotteri	tabacco, patata, vite, colza, riso, girasole

Impatto di queste strategie

- Riduzione della applicazione di pesticidi chimici
- Pesticidi potenzialmente pericolosi possono essere eliminati
- L'efficacia del trattamento è indipendente dalle condizioni climatiche. La proteina transgenica non può essere lavata via dalla pioggia
- Questo sistema di controllo è attivo per tutta la vita della pianta. Inoltre, se la tossina è espressa in tutte le parti della pianta sarà ingerita dall'insetto ogni volta che mangerà la pianta

Impatto di queste strategie

- I soli insetti che vengono colpiti sono quelli che attaccano la pianta, perché la pianta è l'unica fonte di insetticida. Altri insetti presenti sul campo "benefici e non" non mangiando la pianta coltivata non sono colpiti dalla tossina.
- L'agente attivo è una proteina biodegradabile: il potenziale di inquinamento delle falde e l'insorgenza di altri problemi ambientali sono molto remoti

Bt Cotton benefits in China

Bt Cotton in China:

- *Increased crop yield 6% (200kg/ha)*
- *Reduced operating cost 28% (\$1.40/kg)*
- *Reduced pesticide:*
 - *Application 67%*
 - *Quantity 81% (50kg/ha)*
 - *Costs 82% (\$626/ha)*
- *Increased health (79% fewer poisonings)*

Cotton Yield

+6%

Benefits

Production Cost
(Total)

-28%

Number of
Pesticide Applications

-67%

Pesticide Quantity

-81%

Pesticide
Cost

-82%

Bt Cotton acreage grew 40%
planted on 2 M+ ha in 2002
= 51% of total cotton planted

PRINCIPALI CRITICHE MOSSE A PIANTE GM TOLLERANTI AGLI ERBICIDI E RESISTENTI AGLI INSETTI

TOLLERANZA AGLI ERBICIDI

eccessivo uso dell'erbicida sulla pianta
coltivata resistente

RESISTENZA AGLI INSETTI

possibilità che si sviluppino insetti
resistenti

resistenza agli insetti

Meccanismi di resistenza



cambiamento del pH intestinale

modificazione degli enzimi
idrolitici

riduzione dell'affinità per il
recettore

solubilizzazione



attivazione



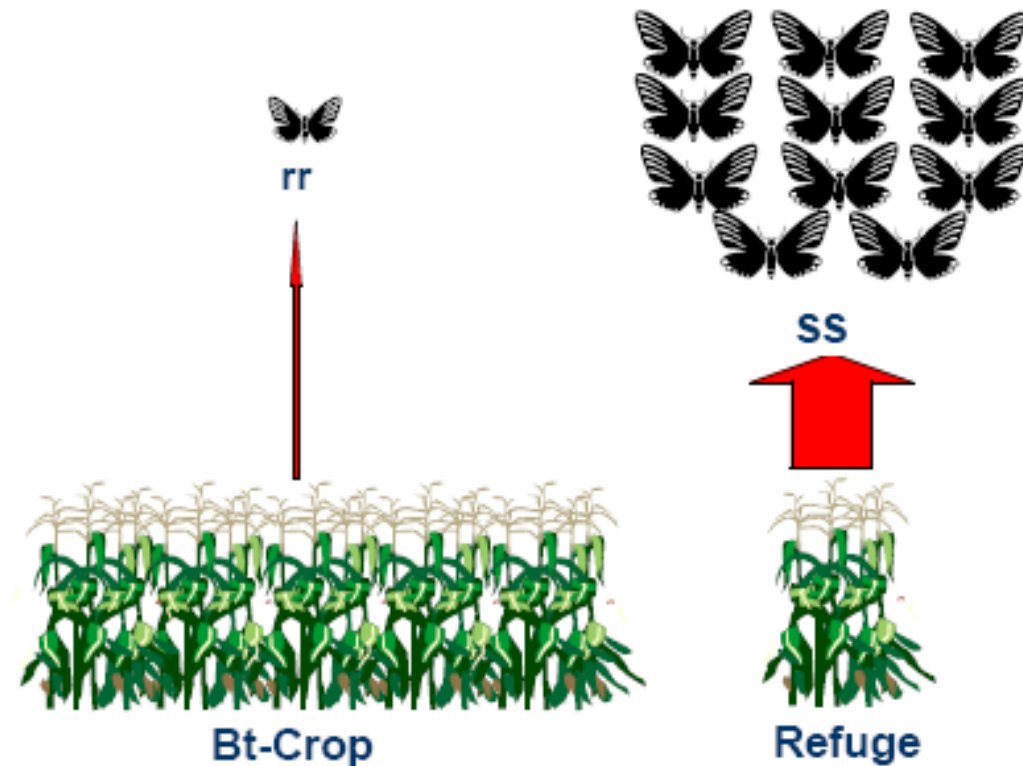
legame al recettore

Strategia HIGH-DOSE REFUGE

Accanto all'area coltivata con la varietà transgenica che produce un'alta dose di proteina Bt, vengono create "aree rifugio" coltivate con varietà non transgeniche.

Solo insetti rr resistenti omozigoti (molto rari) possono tollerare elevati livelli di Bt.

Nelle zone rifugio si sviluppano insetti suscettibili



Gli insetti resistenti (rr) incrociandosi con insetti suscettibili nelle zone rifugio daranno una progenie rS suscettibile che non può sopravvivere nelle aree coltivate a mais Bt

