

# Biotecnologie applicate agli artropodi e relativo impatto ambientale

*Giovanni Burgio*

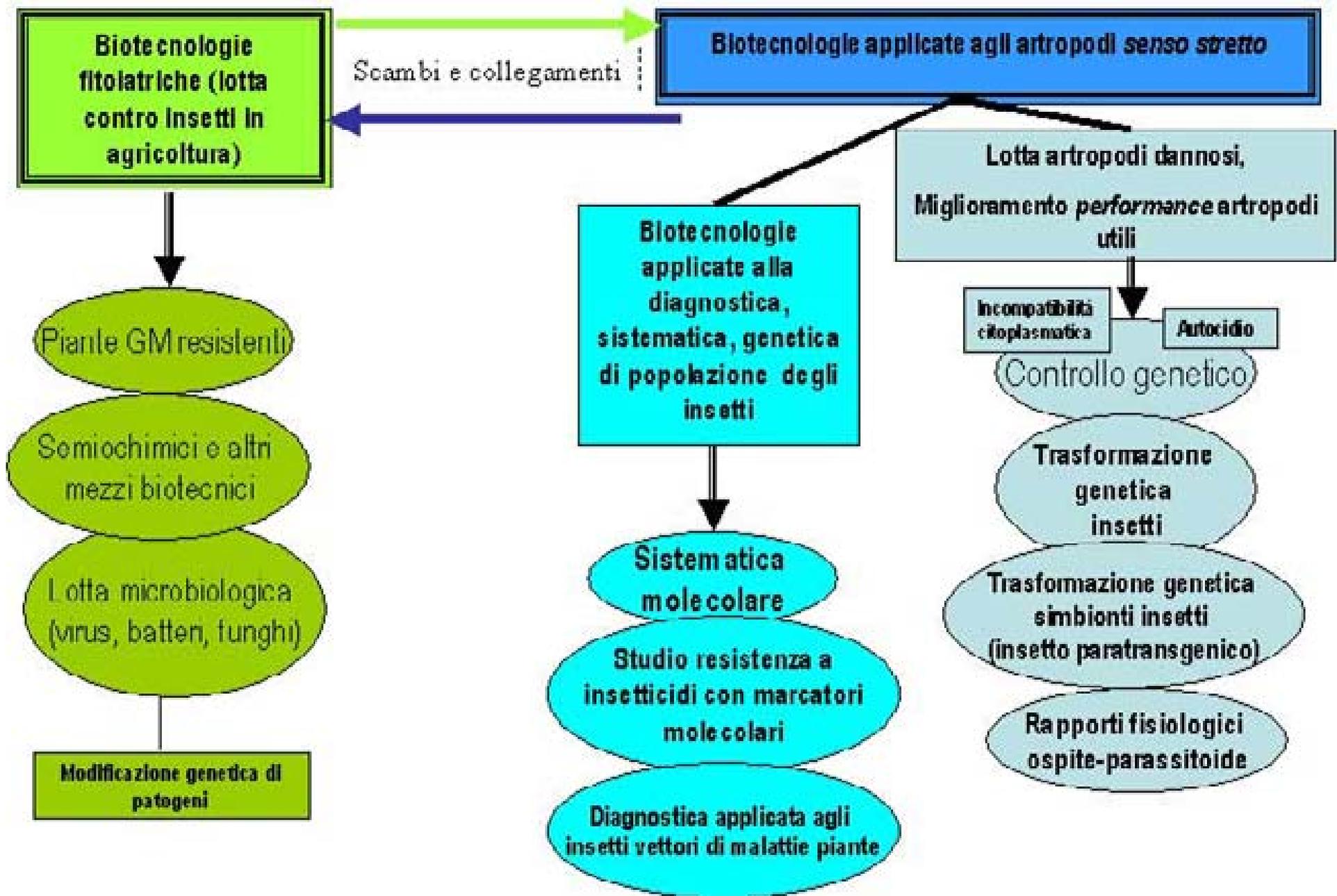
Dipartimento Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA)  
*area entomologia, Alma Mater Studiorum* Università di  
Bologna

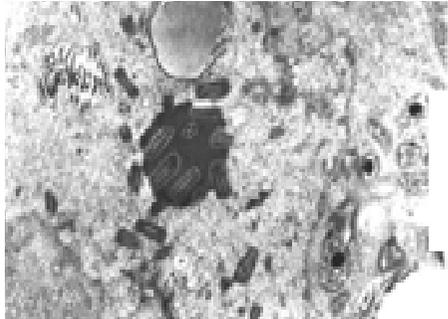


ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

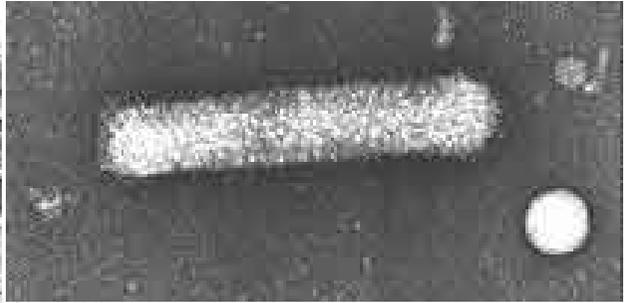
- Cosa sono le biotecnologie applicate agli artropodi?

# BIOTECNOLOGIE APPLICATE AGLI ARTROPODI

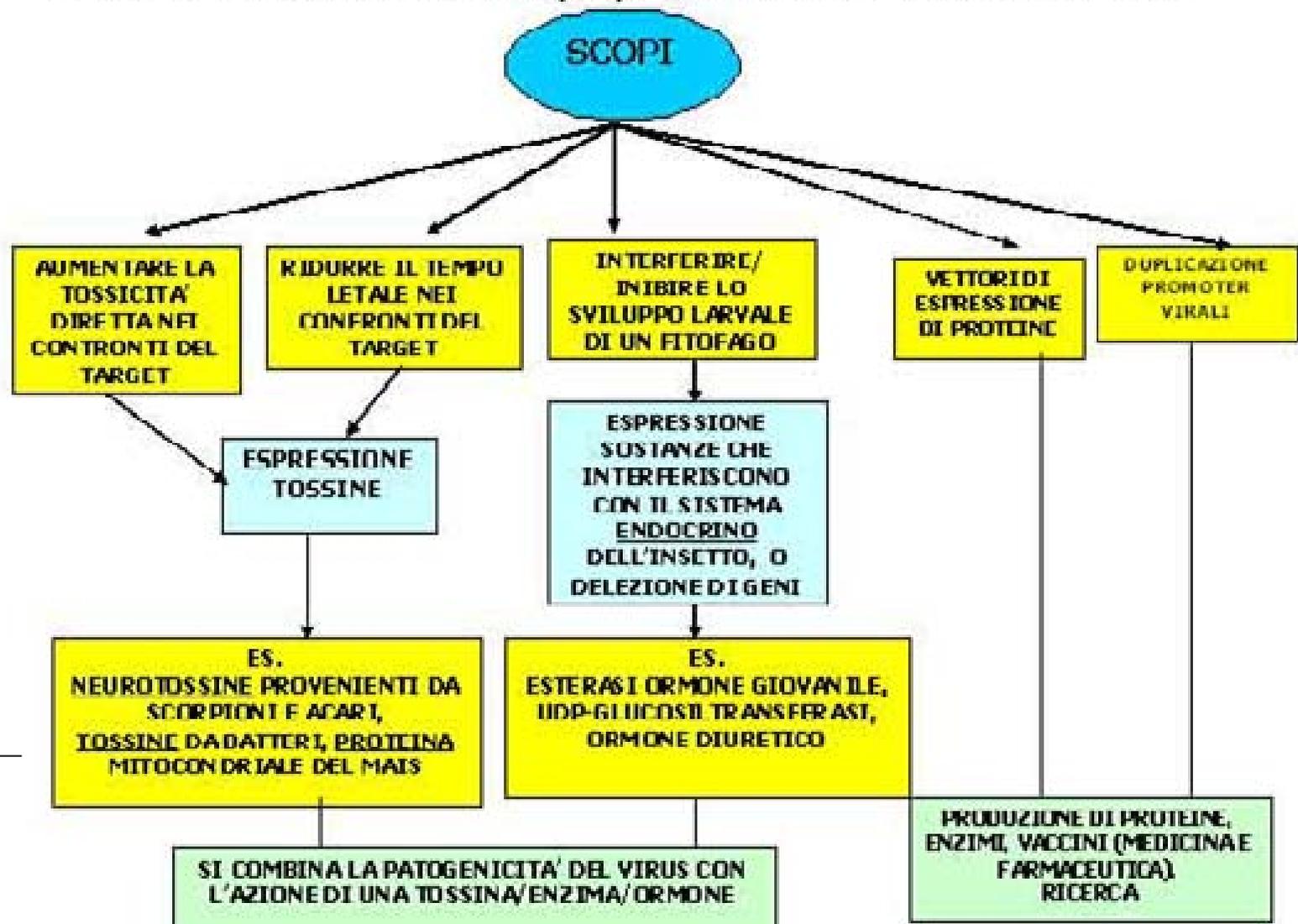




*Temi che possono creare interesse nell'impatto ambientale ambientale coinvolgente artropodi*



**BACULOVIRUS RICONBINANTI (BR) NELLA LOTTA CONTRO I FITOFAGI**



# BIOTECNOLOGIE APPLICATE AGLI ARTROPODI

Sistematica molecolare,  
diagnostica

elettroforesi, PCR,  
RAPD-PCR, FLP

Marcatore proteici (allozimi)

DNA genomico,

DNA mitocondriale

RNA ribosomiale

biosistematica, diagnostica,  
resistenza fitofarmaci

trasformazione

fitofagi,  
vettori malattie

*ridurre la capacità riproduttiva e la  
potenzialità di trasmettere  
malattie –  
indurre instabilità nelle  
popolazioni*

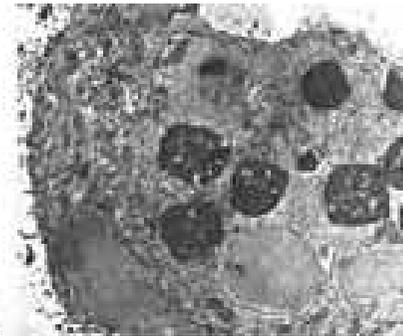
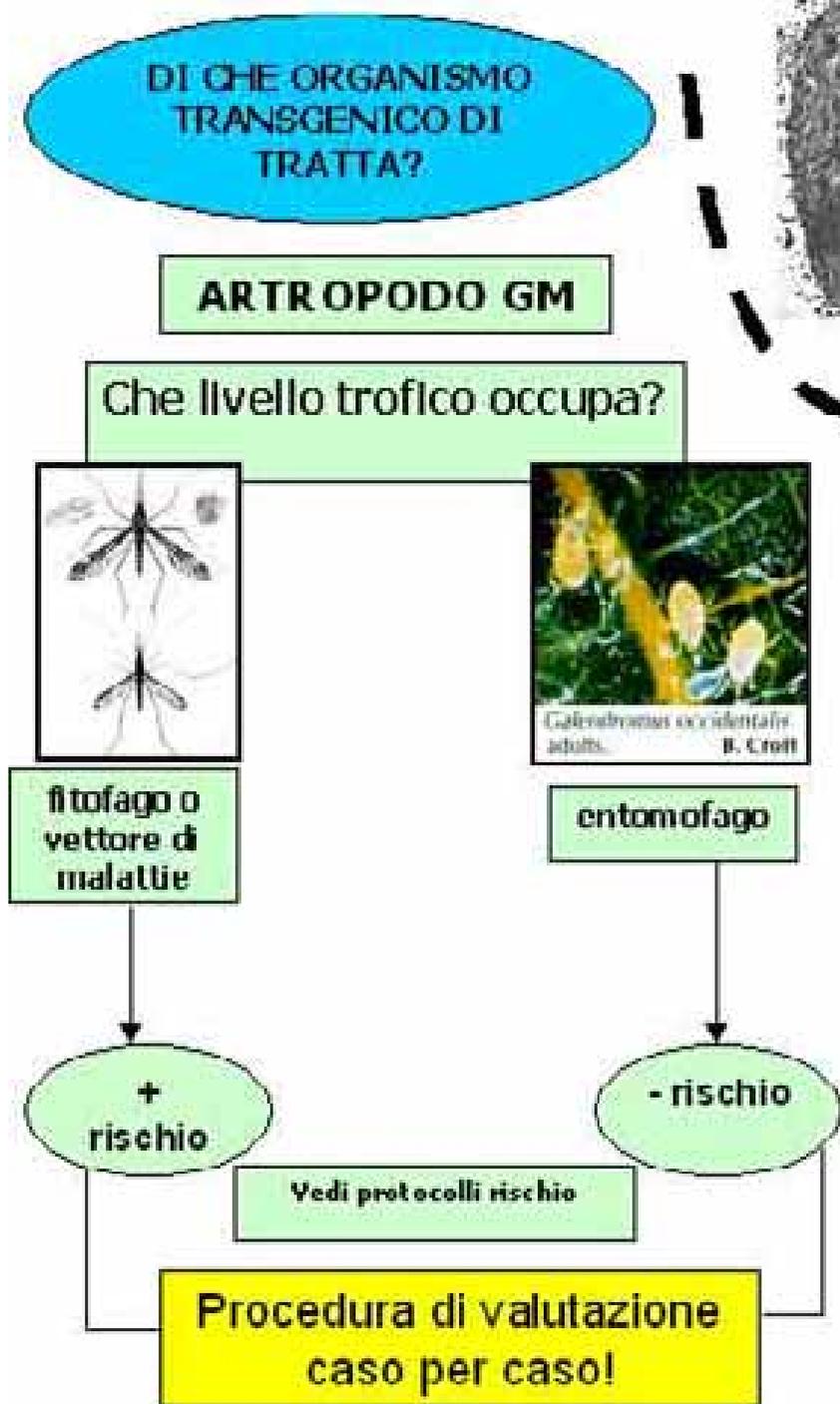
- Ceppi artropodi resi sterili da "geni letali"
- Sterilità maschi
- Incompatibilità citoplasmatica (*Wolbachia*)
- Diffusione trasposoni o meccanismi alterazione meiosi
- Prevenire lo sviluppo o la propagazione del patogeno all'interno dell'insetto vettore (teoria receptor-ligand) per impedire la trasmissione di malattie

insetti utili

potenziamento  
*performance*

-resistenza fitofarmaci  
-parassitoidi endofagi

trasformazione  
simbionti di insetti  
(insetto  
*paratransgenico*)



**VIRUS ENTOMOPATOGENI GM**

Rischi intrinseci:  
flusso genico,  
mutazioni, ecc.

Effetti non target  
indiretti su predatori-  
parassitoidi

Utilizzo/ingestione  
di fitofagi infetti

Permanenza  
virus nei  
predatori e  
loro  
escrementi

Effetti su  
parassitoidi  
per  
alterazione  
del ciclo  
degli ospiti

maggior  
esposizione  
nell'ambiente,  
dispersione in  
ambienti non  
target

# Insetti transgenici: scienza o fantascienza?



- ***“There is no reason why a wide variety of useful characters cannot be similarly moved from one species to another and combined to form strains of insect parasites or plant pollinator that are superiorly adapted to the environments where they are needed.”***
- (da: Sailer, 1961. Possibilities for genetic improvement of beneficial insect. In: *Germ plams resources.American. Assoc. Adv. Sci. Washington, DC.*)
- **Più di 30 anni fa alcuni studiosi proposero l'ibridazione interspecifica come tecnica di miglioramento genetico di insetti utili!**

- **Allo stato attuale la manipolazione genetica di artropodi (sia dannosi che utili) ha superato la fase “embrionale” ma necessita di molti progressi: grazie agli studi su *Drosophila*, notevoli progressi sono stati indubbiamente compiuti**
- **Alcuni metodi di manipolazione genetica sono stati studiati con successo anche su altri insetti o artropodi e tali traguardi fanno intuire importanti progressi nei prossimi anni**

# Stato dell'arte

- mancanza di un efficiente metodo di trasformazione “universale”: se per ogni insetto *target* devono essere sviluppati vettori di clonaggio specifici e/o tecniche specifiche, la trasformazione genetica rischia di essere limitata a poche specie di grande importanza economica, a causa degli alti costi e dei lunghi tempi richiesti per perfezionare tali sistemi
- esigenza di approfondire le conoscenze di base, soprattutto per quanto riguarda le tecniche per ottenere trasformazioni stabili e i *promoter* da utilizzare
- Il numero di geni clonati negli artropodi è ancora basso: le ricerche riguardano principalmente la resistenza a pesticidi, lo sviluppo di marker per l'identificazione di trasformanti oppure approfondimenti della ricerca di base (regolazione genica negli insetti)
- *Argomento molto delicato e caratterizzato da certi rischi:*
  - Il lancio di insetti transgenici richiederà lo studio e l'applicazione di approfonditi e complessi protocolli di rischio, che porrà problemi metodologici, studi a lungo termine e in definitiva aumento dei costi

Selected Genes Cloned from Insects Other than *Drosophila*

Gene coding for:	Function(s)	Insect	References
Actin	Muscle contraction	<i>Ceratitis capitata</i>	Maymer et al. 1990
Attacin	Immune response	<i>Hyalophora cecropia</i>	Sun et al. 1991
Cecropins	Antibacterial responses	<i>Bombyx mori</i>	Kato et al. 1993
		<i>Manduca sexta</i>	Dickenson et al. 1988
		<i>Ceratitis capitata</i>	Rosetto et al. 1993
Chitinases	Digest chitin in exoskeleton	<i>Manduca sexta</i>	Kramer et al. 1993
Cuticle proteins	Component of cuticle	<i>Manduca sexta</i>	Rebers et al. 1987
Cytochrome P-450 mono-oxygenase, CYP6B1	Detoxify xanthotoxin	<i>Papilio polyzenes</i>	Cohen et al. 1992
Cytochrome P450, family 4	Energy substrate mobilization	<i>Blattella discoidalis</i>	Bradfield et al. 1991
Eclosion hormone	Triggers ecdysis	<i>Manduca sexta</i>	Horodyski et al. 1989
		<i>Bombyx mori</i>	Kamito et al. 1992
Histones	Chromosome structure	<i>Chironomus thummi</i>	Hankein and Schmidt 1991
Insulin superfamily	Unresolved—growth and differentiation(?)	<i>Locusta migratoria</i>	Lagueux et al. 1990, Ebberink et al. 1989
Luciferase	Firefly enzyme	<i>Luciola mingrelica</i>	Devine et al. 1993
Lysosomal aspartic protease	Terminate oogenesis?	<i>Aedes aegypti</i>	Cho and Raikhel 1992
Pesticide resistance	Amplified esterases	<i>Culex mosquitoes</i>	Mouches et al. 1990
	Knockdown resistance ( <i>kdr</i> )	<i>Myzus persicae</i>	Field et al. 1988
		<i>Musca domestica</i>	Williamson et al. 1993
Protease	Vitellin degradation	<i>Bombyx mori</i>	Ikeda et al. 1991
Pupal cuticle protein	Pupal structural protein	<i>Bombyx mori</i>	Nakato et al. 1992
Sapecin	Immune response	<i>Sarcophaga peregrina</i>	Matsuyama and Natori 1988
Sarcotoxin	Immune response	<i>Sarcophaga peregrina</i>	Kanai and Natori 1989

(continues)

Table 5.1 (continued)

Gene coding for:	Function(s)	Insect	References
Serine proteases	Digestive proteases	<i>Haematobia irritans</i>	Elvin et al. 1993
Serpins	Inhibitors of serine proteases	<i>Manduca sexta</i>	Jiang et al. 1994
Silk genes, <i>Ser1</i> , <i>Ser2</i>	Silk	<i>Bombyx mori</i>	Michaille et al. 1986, 1990
		<i>Galleria mellonella</i>	Zurovec et al. 1992
Steroid receptor superfamily, <i>E75</i> and <i>MHR3</i>	Regulation of ecdysone response	<i>Manduca sexta</i>	Segraves and Woldin 1993
			Palli et al. 1992
Triosephosphate isomerase	Glycolysis	<i>Culex tarsalis</i>	Tittiger et al. 1993
Vitellogenin	Yolk proteins	<i>Anthonomus grandis</i>	Trewitt et al. 1992
		<i>Ceratitis capitata</i>	Rina and Savakis 1991
		<i>Bombyx mori</i>	Sato and Yamashita 1991
Vitelline membrane proteins	Membrane ?	<i>Aedes aegypti</i>	Lin et al. 1993

Table 15.2

Some Cloned Resistance Genes Possibly Useful for Genetic Manipulation of Pest and Beneficial Arthropods

Gene, abbreviation, and resistance conferred	Sources	References
Acetylcholinesterase ( <i>Ace</i> ); pesticide resistance	<i>D. melanogaster</i> <i>Anopheles stephensi</i>	Hall and Spierer 1986, Hall and Malcolm 1991, Hoffmann et al. 1992, Fournier et al. 1989, 1992a
$\beta$ -Tubulin; benomyl resistance	<i>Neurospora crassa</i> <i>Septoria nodorum</i>	Orbach et al. 1986, Cooley et al. 1991
Catalase; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> resistance	<i>D. melanogaster</i>	Orr and Sohal 1992
$\gamma$ -Aminobutyric acid A <sub>A</sub> receptor gene; cyclodiene resistance ( <i>Rdl</i> )	<i>D. melanogaster</i> <i>Aedes aegypti</i>	French-Constant et al. 1991, 1993a,b, French-Constant and Rocheleau 1993, Thompson et al. 1993
Cytochrome P450-B1; DDT resistance	<i>D. melanogaster</i>	Waters et al. 1992
Cytochrome P450	<i>Musca domestica</i>	Feyereisen et al. 1989
Esterase B1 amplification core; organophosphate resistance	<i>Culex</i> species	Mouches et al. 1986, 1990
Esterases E4 and PE4	<i>Myzus persicae</i>	Field et al. 1993
Glutathione S-transferase; DmGST 1-1, DmGST-2, DDT resistance	<i>D. melanogaster</i>	Toung et al. 1990, 1993 Beall et al. 1992
Glutathione S-transferase; MmGST1; organophosphate resistance	<i>Musca domestica</i>	Wang et al. 1991, Fournier et al. 1992b
Knockdown resistance; <i>kdr</i> ; DDT and pyrethroids	<i>Musca domestica</i>	Williamson et al. 1993
Metallothionein gene; <i>Mt</i> ; copper resistance	<i>D. melanogaster</i>	Theodore et al. 1991
Multidrug resistance; <i>Mdr19</i> , <i>Mdr50</i> , and <i>Mdr65</i> ; colchicine resistance	<i>D. melanogaster</i>	Wu et al. 1991, Gerard et al. 1993

(continues)

# Trasformazione degli artropodi: sintesi dei principali metodi per trasferire DNA ad artropodi

**Table 14.3.** Gene Transfer Methods for Developing Transgenic Arthropods

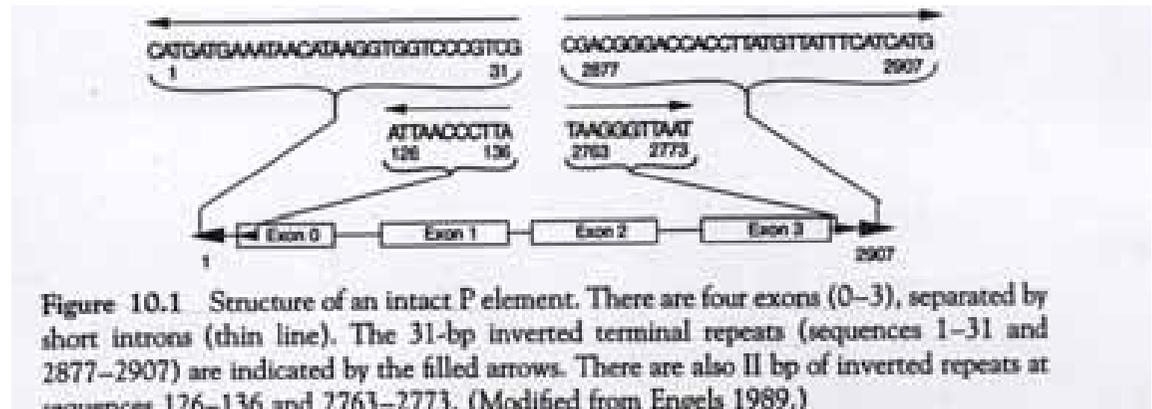
Method of inserting DNA	Stable or transient transformation	Host range species, order(s)
<b>Gene targeting</b>		
Homologous recombination	Stable	<i>D. melanogaster</i> , Diptera; not yet used with other insects
Targeted gene replacement	Stable	<i>D. melanogaster</i> , Diptera; not yet used with other insects
<b>Modify microbial symbionts (paratransgenesis) of insects</b>		
Gut symbionts	Stable	Symbionts chosen have narrow host range
<b>Transposable element vectors</b>		
<i>Hermes</i>	Stable	From <i>Musca domestica</i> , Diptera; transformed <i>D. melanogaster</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Ceratitis capitata</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> , Diptera and Coleoptera
<i>hobo</i>	Stable	From <i>D. melanogaster</i> , Diptera; transformed <i>D. melanogaster</i> and <i>D. virilis</i> , Diptera
<i>mariner</i>	Stable	Widespread; transformed <i>D. mauritiana</i> , <i>M. domestica</i> , <i>Bombyx mori</i> cells, Diptera and Lepidoptera
<i>Minos</i>	Stable	From <i>Drosophila hydei</i> , Diptera; Transformed <i>C. capitata</i> and <i>Anopheles stephensi</i> , Diptera
<i>piggyBac</i>	Stable	From <i>Tricoplusia ni</i> , Lepidoptera; Transformed several Diptera, Lepidoptera and Coleoptera
<b>Viral vectors</b>		
Baculoviral vectors	Transient	Used to express proteins in insects or insect cell cultures; primarily Lepidoptera, but can integrate into mammal chromosomes; efforts to produce stable transformation are underway
Pantropic retroviral vectors	Stable (goal)	Evaluate genes and regulatory elements; very broad host range due to modification, including humans
Engineered with broad host range	Transient now	
Parvoviridae vectors	Transient	Host range is limited to mosquitoes (?)
	Stable in future	
Polydnavirus vectors	Stable	Transforms lepidopteran and coleopteran cells in culture
Retroviruses and retrotransposons	Potentially stable	Modify <i>gypsy</i> to be a vector?
Sindbis virus vectors	Transient	Evaluate genes and regulatory elements; virus host range primarily <i>Culex</i> and <i>Aedes</i> mosquitoes and birds; horizontal transmission via water and cannibalism; vertical transmission via venereal transmission (?)

# Trasformazione degli artropodi: sintesi dei principali metodi per trasferire DNA

- Uso di trasposoni (*transposable elements vectors*)
  - P-elements
  - Hermes
  - Hobo
  - Mariner
  - Minos
  - piggyBac

# Fra i trasposoni troviamo anche i *P elements*: causano la *Hybrid Dysgenesis* in *Drosophila*

- Caratteristiche dei P-element:
  - dimensioni: 2907 bp
  - 4 esoni (separati da corti introni) affiancati da ripetizioni invertite di 31 bp
  - codificano un polipeptide con attività di trasposizione
  - La presenza delle ripetizioni invertite “intatte” è condizione indispensabile affinché i P element possano muoversi
  - Copie multiple di P element sono sparse nel genoma dei “ceppi P” di *Drosophila*
  - Il movimento dei P element causa mutazioni inattivando geni, alterando il tasso di trascrizione e alterando l’espressione genica
  - I P element sono stati geneticamente manipolati per l’utilizzo come vettori di DNA esogeno da inserire nel genoma di *Drosophila*
  - Testati anche su altri insetti (mosca della frutta, zanzare, ecc): la trasformazione è avvenuto ma l’efficienza è bassissima (<0.1%)



## A) Structure of P-element derivative: Carnegie 20

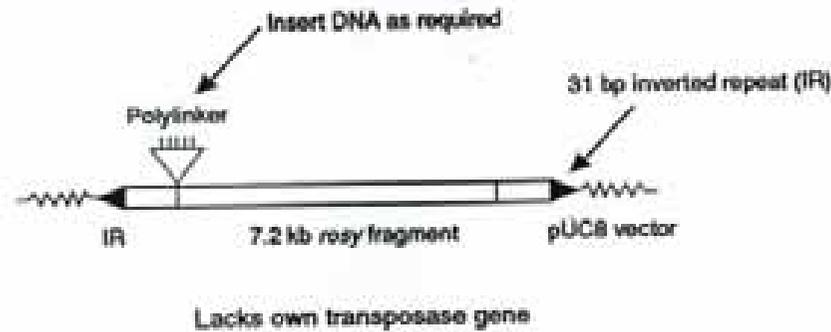
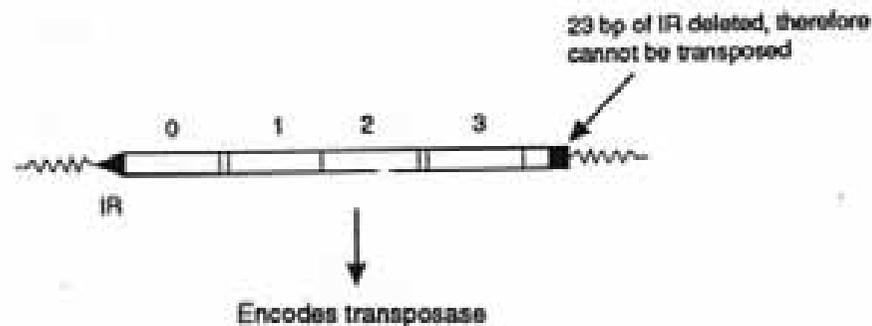
B) Structure of helper P-element derivative:  $\pi$ 25.7 wings clipped

Figure 10.3 Examples of modified P-element vectors. (A) The Carnegie 20 vector contains a 7.2-kb segment of DNA coding for the *rosy* gene. It contains a polylinker for inserting exogenous DNA and retains the 31-bp inverted repeats (IR, dark arrows). This vector cannot transpose without a helper element because it cannot make transposase. (B) The helper element,  $\pi$ 25.7, wings clipped, produces transposase, but 23 bp of inverted repeat have been deleted at one end so this vector cannot insert into the chromosome.

**Table 14.4.** Current and Potential Methods to Deliver Foreign DNA into Arthropod Tissues

Method of delivering DNA	Example(s) (selected references)
<b>Artificial chromosomes</b> Insert genes into artificial chromosome, insert chromosome into genome	Not yet achieved with insects but feasible with yeast and mice (Peterson et al. 1997)
<b>Biolistic Methods</b> "Gene gun"	<i>D. melanogaster</i> (Baldarelli and Lengyel 1990) <i>Anopheles gambiae</i> eggs (Mialhe and Miller 1994) <i>Bombyx mori</i> salivary glands (Horard et al. 1994)
<b>Electroporation</b> Electric current punches holes in membranes, letting DNA in	<i>Bombyx mori</i> eggs (Shamila and Mathavan 1998) <i>D. melanogaster</i> , transient expression (Kamdar et al. 1992) <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Musca domestica</i> (Leopold et al. 1996)
<b>Microinject eggs after dechoriation</b> Method originating with <i>D. melanogaster</i> (Santamaria 1986), modified for each egg type	<i>Bombyx mori</i> (Nikolaev et al. 1993, Nagaraju et al. 1996) <i>Musca domestica</i> (Yoshiyama et al. 2000b) <i>Pectinophora gossypiella</i> (Peloquin et al. 1997)
<b>Microinject abdomens of females</b> Maternal microinjection	<i>Metaseiulus occidentalis</i> (Presnail and Hoy 1992) <i>Cardiochiles diaphaniae</i> (Presnail and Hoy 1996)
<b>Microinject testes</b>	<i>Bombyx mori</i> (Shamila and Mathavan 1998)
<b>Nuclear transplantation</b>	<i>D. melanogaster</i> (Zalokar 1981) Chimeric larvae of honey bee produced (Omholt et al. 1995)
<b>Sperm-mediated transformation</b> Insert DNA into genome via artificial Insemination	<i>In vitro</i> association of DNA with sperm (Atkinson et al. 1991) <i>Apis mellifera</i> (Robinson et al. 2000)

- Uso di vettori virali: molti virus sono stati modificati per l'utilizzo come vettori per ottenere trasformazione stabile, o per trasformazione nel breve periodo di tessuti infetti (vettori d'espressione)
- \*certi Baculovirus sono stati trovati in cellule epatiche umane, ipotizzando un utilizzo nella terapia genica
- \*\*alcuni Baculovirus ricombinanti sono stati ipotizzati come vettori di geni per la trasformazione di mammiferi

# Microiniezione materna

- Le uova dei Fitoseidi sono estremamente difficili da decorionare e deidratare!
- Presnail e Hoy (1992) hanno sviluppato una tecnica di trasformazione del fitoseide *Metaseiulus occidentalis*:
  - giovani uova nello stadio pre-blastoderma in femmine gravide sono microiniettate con un ago, attraverso la cuticola
  - con questa tecnica si sono ottenute trasformazioni stabili con discreti livelli di efficienza senza utilizzo di trasposoni



# IDENTIFICAZIONE DEGLI ARTROPODI TRASFORMATI: ALCUNI MARCATORI POSSONO COMPORTARE RISCHI???

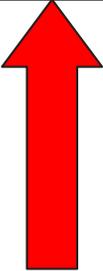
marker visibili  
(colore occhi)

Per *Drosophila*

ma molti insetti e  
acari mancano di tali  
sistemi

gene per la  
resistenza a  
pesticidi  
(*opd* gene)

**il lancio di  
fitofagi con  
tale gene può  
essere di  
rischio per la  
diffusione dei  
tratti della  
resistenza  
alla  
popolazione!**



gene per la  
resistenza ad  
antibiotici, es.  
neomicina  
(*neo*)

proteina  
fluorescente  
proveniente da una  
medusa  
bioluminescente

*dihydrofolate  
reductasi  
gene (dhfr)*

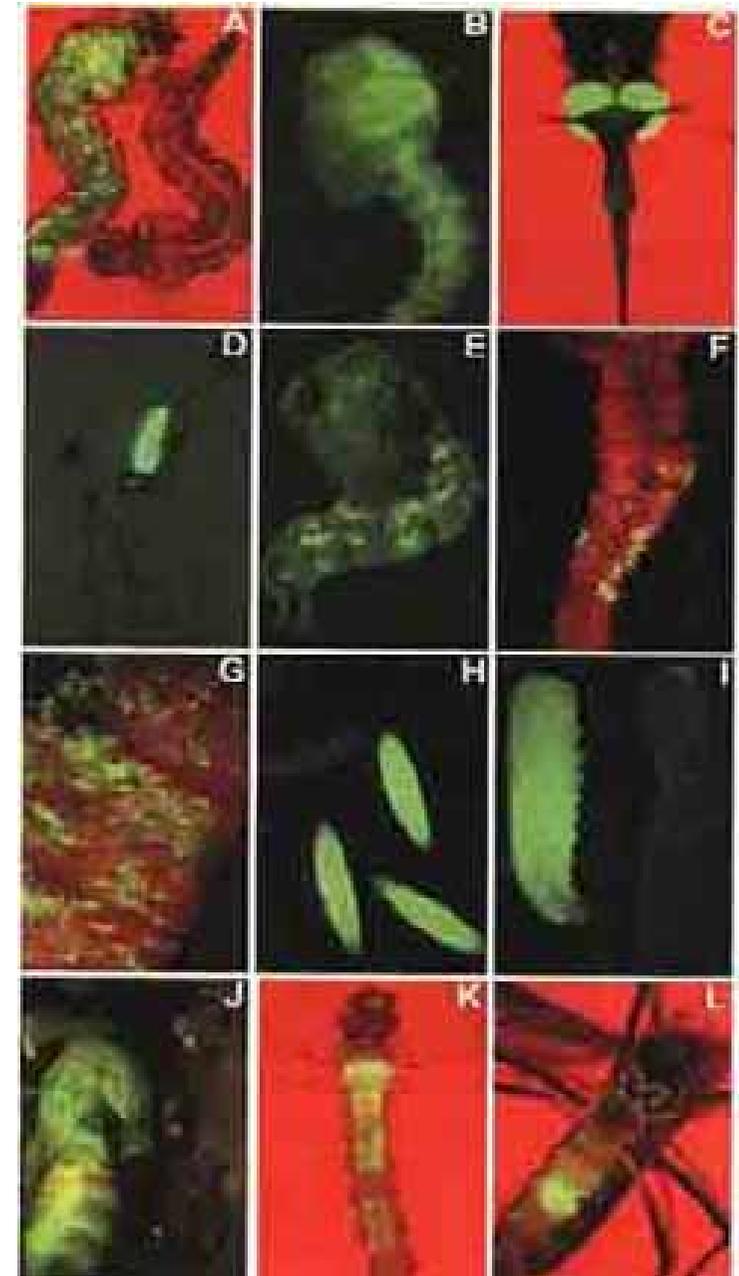
gene  $\beta$ -  
galattosidasi  
(*lacZ*) clonato  
da *Escherichia  
coli* e regolato  
dall'hsp70 di  
*Drosophila*

usato nel  
famoso  
esperimento  
di  
trasformazione  
e di  
*Metaseiulus  
occidentalis*)  
questo gene può  
essere scoperto  
mediante un  
saggio che  
produce una  
colorazione blu  
negli individui  
trasformati

# **Proteine fluorescenti (Green fluorescent protein, GFP)**

- **Estrate dalla medusa *Aequorea aequorea* (= *A. victoria*).**
- **In seguito il gene (gfp 10) codificante GFP è stato clonato (Prashar et al., 1992) ed espresso in *Escherichia coli* senza l'intervento di cofattori specifici provenienti dalla medusa, aprendo la strada per il suo utilizzo in campo entomologico.**
- **Il gene codificante GFP è stato in seguito sottoposto a tecniche di mutagenesi chimica per produrre geni GFP ingegnerizzati con caratteristiche ottimali**

**COLOR FIGURE 2** GFP expressed in different insects. (A) Larva of *Ae. aegypti* infected with TE/3'2J/GFP virus (uninfected control on right); (B) Pupa of *Anopheles gambiae* infected with TE/3'2J/recombinant GFP; (C) adult *Ae. aegypti* with TE/3'2J/GFP; (D) larva of *Ae. aegypti* infected with recombinant densovirus (AeDNV); (E) pupa of *Ae. aegypti* infected with recombinant densovirus (AeDNV); (F) section of embryo of *Tribolium castaneum* infected with TE/3'2J/GFP; (G) wing of adult *Papilio glaucus* infected with TE/3'2J/GFP; (H) eggs of *Anastrepha suspensa* transformed with *piggyBac* vector pB[PUB nls EGFP] (nontransformed control in upper left); (I) larva of *A. suspensa* transformed with *piggyBac* vector (control on right); (J) adult of *A. suspensa* transformed with *piggyBac* vector (control on right); (K) larva of *Ae. aegypti* transformed with *Hermes*; (L) adult *Ae. aegypti* transformed with *Hermes*. Photo credits: A and C (Higgs, S. et al., *Biotechniques* 21, 660–664, 1996. With permission). B (courtesy of S. Higgs). D and E (courtesy of T. Ward). F and G (courtesy of D. Lewis). H–J (courtesy of A. Handler). K and L (courtesy of A. Pinkerton and P. Atkinson).



# Specie di insetti (o cellule) nei quali sono stati espressi varianti GFP

**TABLE 5.2**  
**Species of Insects and Insect Cell Lines in Which GFP Variants Have Been Expressed**

GFP Variant	Insect Species	Delivery/Expression		Ref.
		System		
GFP, S65T GFP	<i>Aedes aegypti</i>	dsSIN		Higgs et al., 1996
S65T GFP	<i>Ae. aegypti</i>	AcDNV		Afanasyev et al., 1999
EGFP	<i>Ae. aegypti</i>	Hermes		Pinkerton et al., 1999
GFP, S65T GFP	<i>Ae. triseriatus</i>	dsSIN		S. Higgs (unpublished)
EGFP	<i>Anastrepha suspensa</i>	piggyBac		A. Handler (personal communication)
GFP	<i>Anopheles gambiae</i>	dsSIN		Higgs et al., 1996; Olson et al., 1998
S65T GFP	<i>An. stephensi</i>	dsSIN		S. Higgs and C. Barillas-Mury (unpublished)
EGFP	<i>Bombus terrestris</i>	piggyBac		A. Handler (personal communication)
EGFP	<i>Bombyx mori</i>	AcNPV		Yamao et al., 1999
EGFP	<i>Ceratitis capitata</i>	piggyBac		A. Handler (personal communication)
EGFP	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Hermes		M. Allen, C. Levesque, D. O'Brochta, P. Atkinson (personal communication)
S65T GFP	<i>Cx. pipiens</i>	dsSIN		Higgs et al., 1996
EGFP	<i>Drosophila melanogaster</i>	dsSIN		A. Rayne-Keller (personal communication)
GFP	<i>D. melanogaster</i>	Pseudotyped retrovirus		J. Burns (personal communication)
EGFP	<i>D. melanogaster</i>	piggyBac		A. Handler (personal communication)
EGFP	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	dsSIN		D. Lewis et al., 1999
EGFP	<i>Pectis coeniza</i>	dsSIN and SinRep5		D. Lewis et al., 1999
EGFP	<i>Papilio glaucus</i>	dsSIN		D. Lewis et al., 1999
EGFP	<i>Tribolium castaneum</i>	dsSIN and SinRep5		D. Lewis et al., 1999
GFP, S65T GFP	C6/36 ( <i>Ae. albopictus</i> )	dsSIN		Higgs et al., 1996
S65T GFP	C6/36 ( <i>Ae. albopictus</i> )	AcDNV		Afanasyev et al., 1999
S65T GFP	ATC-15 ( <i>Ae. aegypti</i> )	dsSIN (MRE-16 version)		S. Higgs (unpublished)
S65T GFP	AP-61 ( <i>Ae. pseudoscutellaris</i> )	dsSIN (MRE-16 version)		S. Higgs (unpublished)

# Altri metodi

- Paratransgenesi: a essere modificato geneticamente è un simbionte dell'insetto
- Insetto *paratransgenico*
- **Es. Trasformazione di batteri simbiotici per la lotta alla malattia di Chagas**

# Trasformazione di batteri simbiotici per la lotta alla malattia di Chagas

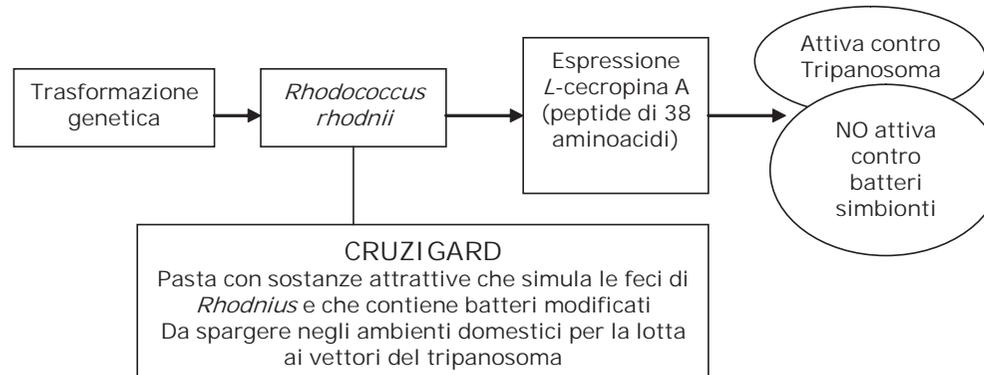
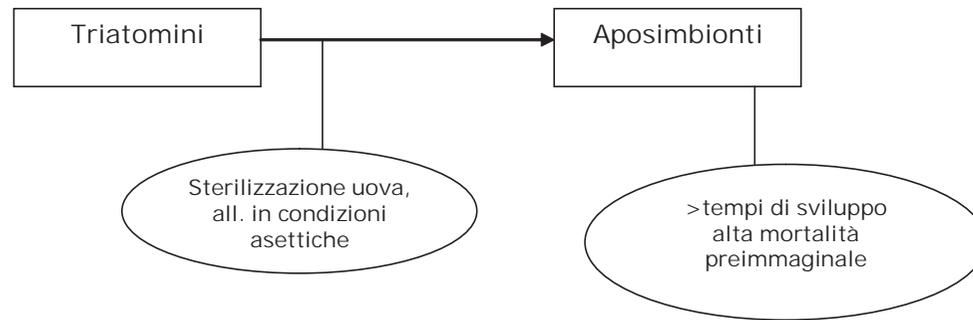
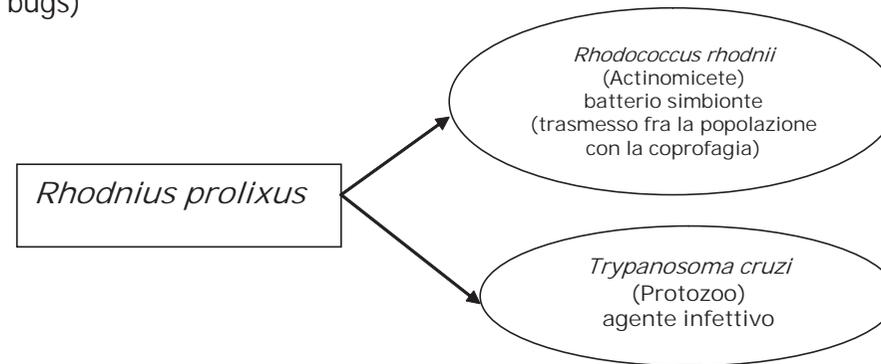
## Morbo di Chagas

Colpisce circa 16-18 milioni di persone in Centro-Sud America

Non esiste vaccino e cura efficace per le infezioni croniche

Parassita cellule del sistema reticolo endoteliale, con frequenti lesioni al muscolo cardiaco; può colpire il sistema neurovegetativo afferente al tubo digerente.

Trasmesso da insetti Reduviidae (Triatomini) (Kissing bugs, Assassin bugs)



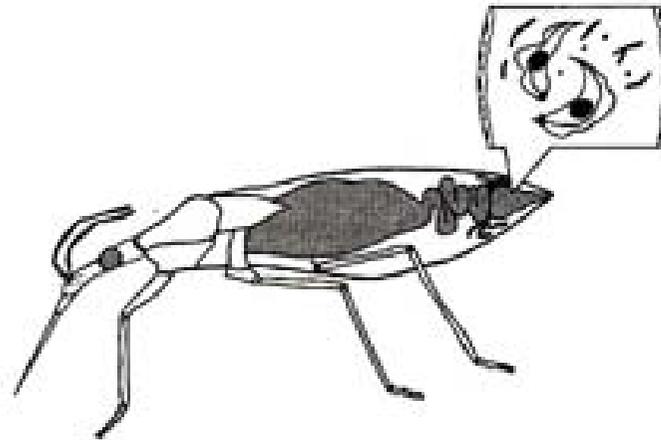


FIGURE 16.1 The actinomyceete symbiont *Rh. rhodni* lives in the gut of *R. prolixus*, in direct proximity to the Chagas disease agent *Trypanosoma cruzi*.

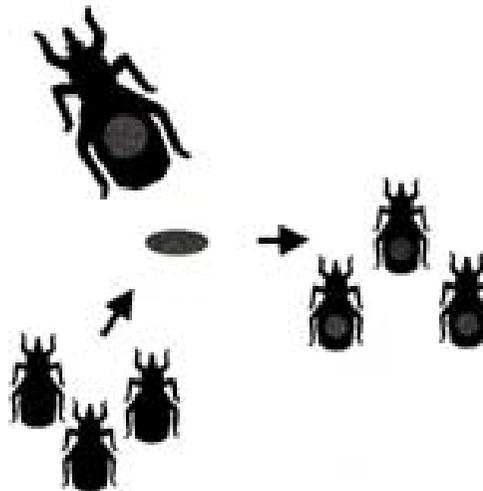
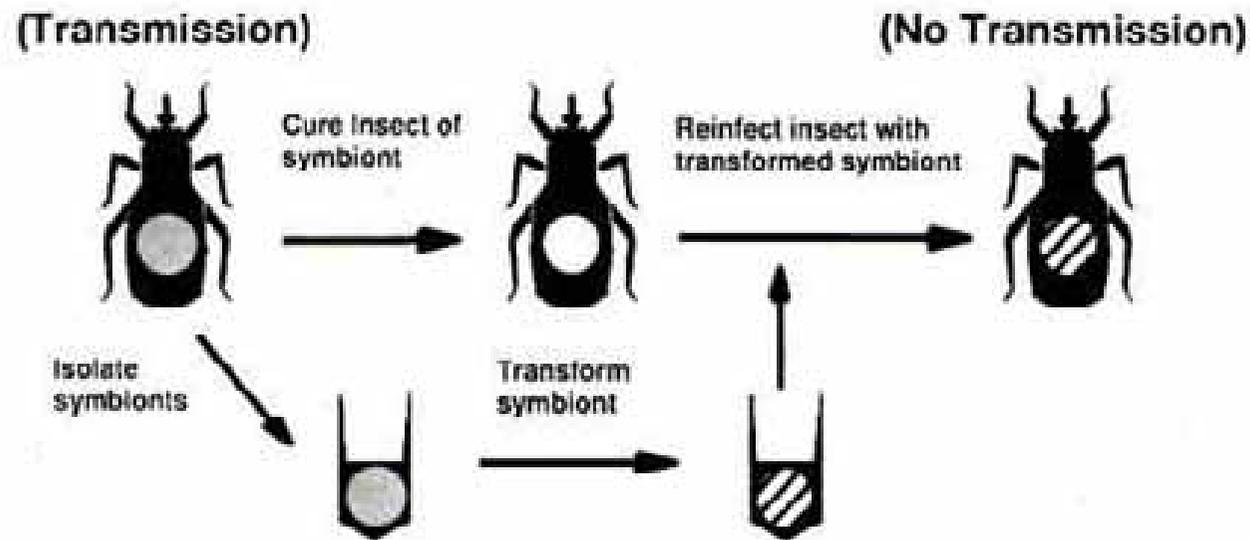


FIGURE 16.2 Essential symbionts are transmitted from adult to progeny through coprophagy — the ingestion of feces. Insects that do not acquire the symbiont die.



**FIGURE 16.4** The symbiont *Rh. rhodnii* can be isolated from *R. prolixus*, genetically modified to express an anti-*T. cruzi* gene product, and placed back into *R. prolixus*, rendering the insect incapable of transmitting the Chagas disease agent *T. cruzi*. (From Beard, C. B., et al., *Emerg. Infect. Dis.*, 4, 581-591, 1998.)

# Controllo genetico di insetti dannosi, o Autocidio

- Comprende un insieme di tecniche finalizzate alla gestione di problematiche causate da insetti, basate su un approccio di tipo genetico (= studio di geni e cromosomi degli insetti e loro ruolo nell'interazione insetto-ambiente)
- Il termine "controllo" è molto generico in quanto comprende anche bio-tecniche che hanno lo scopo di "eradicare" popolazioni di insetti
- Queste bio-tecniche sono applicate molto spesso per insetti di importanza medico-veterinaria, che causano danni al bestiame o che trasmettono malattie ad animali e all'uomo (insetti a "soglia molto bassa")
- Alcune tecniche sono comunque anche applicate per insetti di importanza agraria (es mosca della frutta).

# Meccanismi e tecniche usati nel controllo genetico:

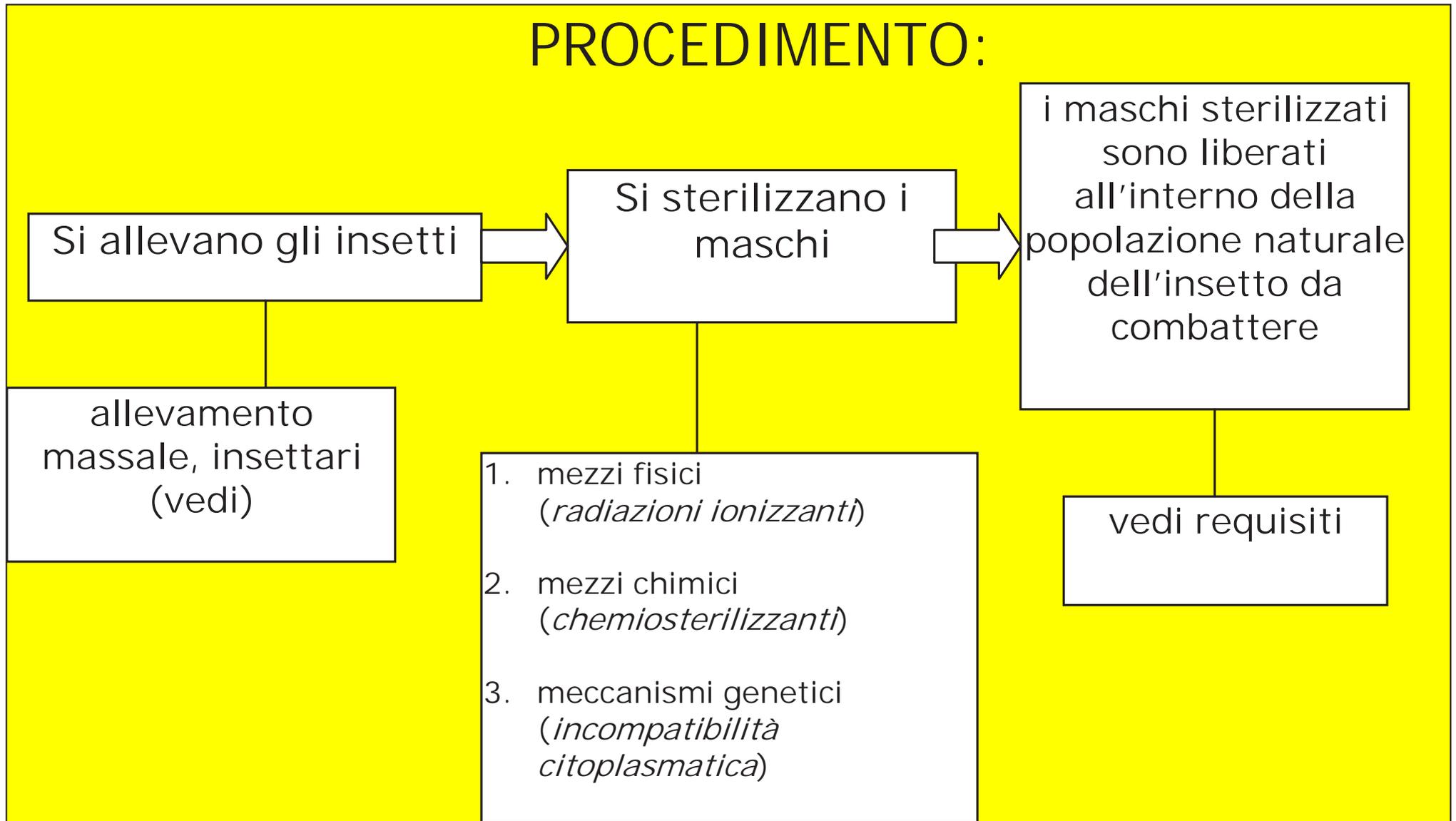
- Letalità dominante, *dominant lethality*, che è la base della Tecnica dell'insetto sterile (Insect Sterile Technique, SIT, spesso denominata Tecnica del Maschio Sterile, MST)
- Semi-sterilità o Sterilità parziale, nei Lepidotteri
- Traslocazioni cromosomiche (autosomi) e cromosomi composti
- Sterilità causata da ibridi, che comprende l'*Incompatibilità Citoplasmatica* determinata da batteri del genere *Wolbachia*

# Principi generali

- Il principio del Controllo genetico si basa sul fatto che un insetto portatore di un carattere genetico "letale" possa essere lanciato in campo, accoppiarsi con la popolazione naturale e causare un effetto negativo "a catena" su di essa (es. crollo della popolazione o eradicazione)
- Le tecniche di Controllo Genetico si basano quindi sulla trasmissione, per almeno una generazione, di materiale ereditario "alterato" e richiedono che avvenga l'accoppiamento fra l'insetto lanciato (portatore del carattere letale) e gli insetti "naturali"
- Questo implica un'importante conseguenza: *queste tecniche sono specie-specifiche (tranne qualche eccezione per la sterilità degli ibridi, vedi dopo)*

# Tecnica del maschio sterile

## PROCEDIMENTO:



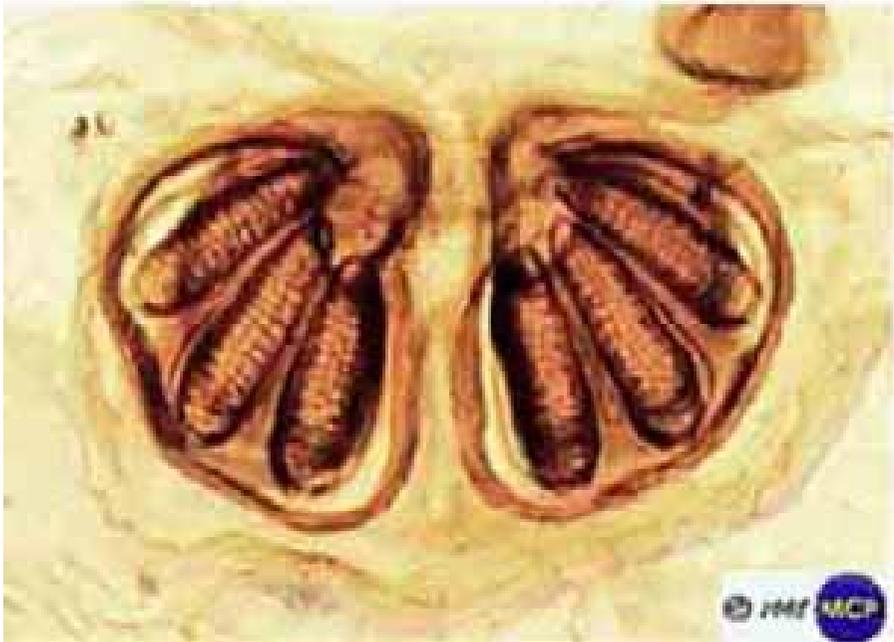
# Considerazione generali

- E' UNA BIOTECNOLOGIA ALTAMENTE SELETTIVA (DA ALCUNI CONSIDERATA UNA TECNICA DI *LOTTA BIOLOGICA "MODERNA"*)
- "*CONTRASTA*" IN PARTE COI PRINCIPI DELLA LOTTA BIOLOGICA
- MOLTO EFFICACE IN AMBIENTI CONFINATI (ES. ISOLE)

# LA TIS PUO' CAUSARE PROBLEMI?

- PROBLEMI ECOLOGICI:
- RIDURRE LA POPOLAZIONE DI UN INSETTO AL DI SOTTO DI UNA POPOLAZIONE MINIMA PUO' ESSERE CONTROPRODUCENTE
- IL POSTO VUOTO (NICCHIA) POTREBBE ESSERE OCCUPATO DA UN ALTRO INSETTO DANNOSO
  
- *QUESTO FENOMENO E' STATO RISCONTRATO IN :*
- *CERATITIS CAPITATA (SUBENTRATA) –DACUS DORSALIS (ELIMINATA) (ISOLE PACIFICO)*
- *TORTRIX VIRIDANA (SUBENTRATA)-LYMANTRIA DISPAR (ELIMINATA) (PENISOLA IBERICA)*
  
- SPECIE VEGETALI INFESTANTI (SUBENTRATE) –*MELOLONTHA VULGARIS (COMBATTUTA)*
- (PASCOLI)
  
- PROBLEMI ECONOMICI:
- ALTI COSTI INIZIALI (ALLEVAMENTI, ATTREZZATURE, PERSONALE SPECIALIZZATO, EFFICACE ORGANIZZAZIONE OPERATIVA)...
- ... COMPENSATI PERO' DALLA SPECIFICITA' E PERSISTENZA DEL METODO e SALVAGUARDIA AMBIENTE





# Incompatibilità citoplasmatica e *Wolbachia*

- = interruzione della discendenza a seguito dell'unione di maschi e femmine della stessa specie ma di diversa provenienza geografica.
- Dovuta a fattori extra-cromosomici
- Recenti scoperte hanno evidenziato come l'incompatibilità citoplasmatica sia determinata da microrganismi del gen. *Wolbachia*
- *APPLICAZIONI PRATICHE DELLA I.C.:* "Con questo metodo in tre mesi si è ottenuta la soppressione di una zanzara (*Culex pipiens quinquefasciatus*) in un villaggio asiatico della Birmania distribuendovi maschi di provenienza europea"

Osservato per la prima volta negli ovari e nei testicoli della zanzara *Culex pipiens* nel 1924, con un microscopio ottico

Simbionte intracellulare obbligato

-  
Presente, all'interno degli Artropodi, negli Aracnidi, Crostacei, Insetti (trovato in almeno 32 famiglie!); trovato anche nei Nematodi

di forma rotondeggiante o bacilliforme, circondato da 2 membrane cellulari, più una terza che sembra originaria dell'ospite

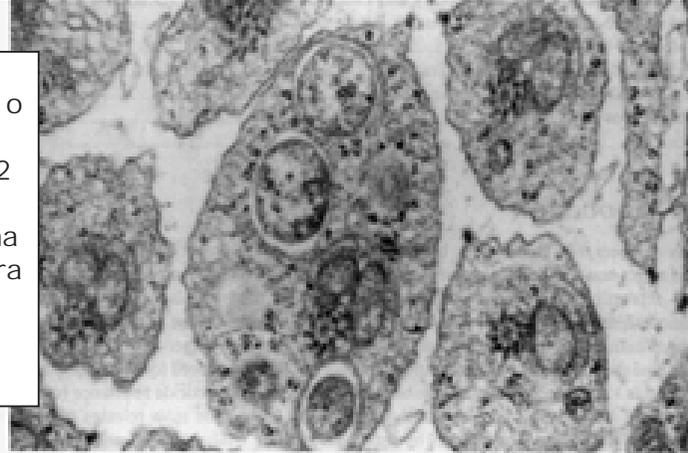


FIGURE 15.1 Transmission electron micrograph of *Biddulphia* within a developing spermatid of the mite *Ephraia castella*. (From O'Neill, S. L. et al., *Infectious Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*, Oxford University Press, Oxford, 1997. By permission of Oxford University Press.)

- Trasmesso solitamente dalle femmine, ma in certi casi sia da maschi che femmine  
- ereditato attraverso il citoplasma  
- non è stata finora osservata trasmissione orizzontale fra individui

si trova principalmente nei tessuti riproduttivi, ma è stato anche trovato nei tubi malpighiani

ceppi incompatibili possono essere trasformati in ceppi compatibili, con un trattamento di antibiotici (es. tetracicline)

responsabili di importanti fenomeni legati alla riproduzione negli insetti:

- incompatibilità citoplasmatica
- partenogenesi telitoca in alcuni insetti (imenotteri)
- spostamento della sex-ratio in favore delle femmine (*male killing bacteria!*)
- processi di "femminizzazione" negli isopodi

# *Wolbachia*: utilizzo pratico

La CI rappresenta un "sistema naturale" di produzione di sterilità

metodo alternativo per indurre sterilità in una popolazione di insetto, per potenziare le tecniche di autocidio (*tecnica del maschio sterile di tipo genetico*)-

es importante:  
CI usata per combattere una zanzara in Birmania, mediante il lancio di ceppi europei e il successivo incrocio

modificare la struttura di età di una popolazione di un insetto vettore di malattie per ridurre la capacità infettante

scoperto un ceppo virulento di *Wolbachia* che si replica nei tessuti nervosi di *D. melanogaster* portando a una morte precoce (*popcorn strain*)

Questa prospettiva si basa sull'assunzione che le malattie veicolate da insetti, sono solitamente trasmesse da una piccola frazione di individui "vecchi" (vedi ciclo)

trasformazione di *Wolbachia* per esprimere geni esogeni in popolazioni di artropodi (scoperto recentemente un promotore endogeno che potrebbe essere utile per guidare l'espressione di geni)

# STUDIO DI UN SISTEMA LETALE FEMMINA-SPECIFICO ATTIVO SU CEPPI TRANSGENICI DI INSETTI DANNOSI

- ESPERIMENTO ESEGUITO SU *DROSOPHILA MELANOGASTER*
- OBIETTIVI:
- LANCIARE MASCHI TRANSGENICI CHE ACCOPPIANDOSI, INDUCONO L'ESPRESSIONE DI GENI LETALI SULLE FEMMINE
- ESTENDERE TALE SISTEMA AD ALTRI INSETTI (ES. MOSCA DELLA FRUTTA) SUSCETTIBILI DI AUTOCIDIO.

# Componenti:

- COMPONENTI DEL SISTEMA LETALE:
- t TA = TRANSATTIVATORE CONTROLLATO DALLA TETRACICLINA(NON FUNZIONA IN PRESENZA DI TETRACICLINA!)
- Gene terminatore *hid* = CAUSA LA MORTE DELLE FEMMINE (DANNEGGIA LE CELLULE DEI CORPI GRASSI)
- *Yp1* = ENHANCER

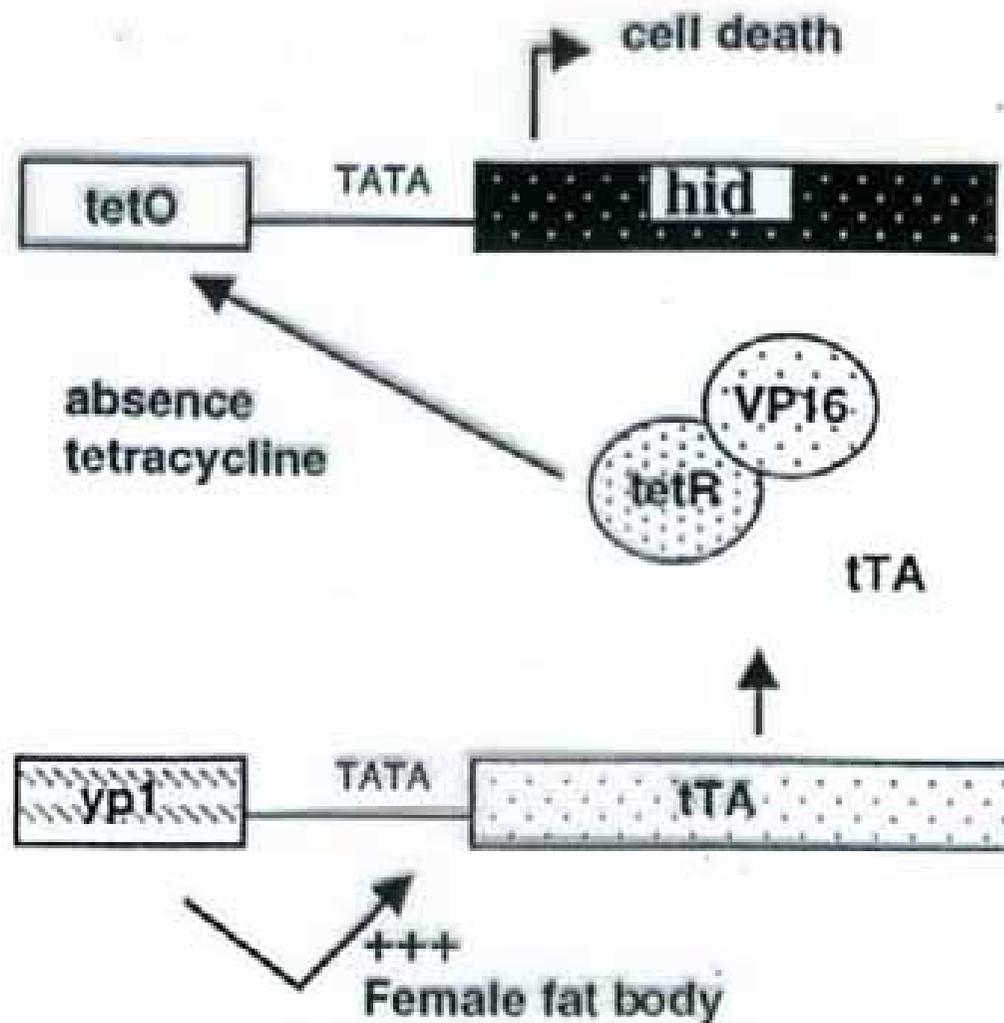
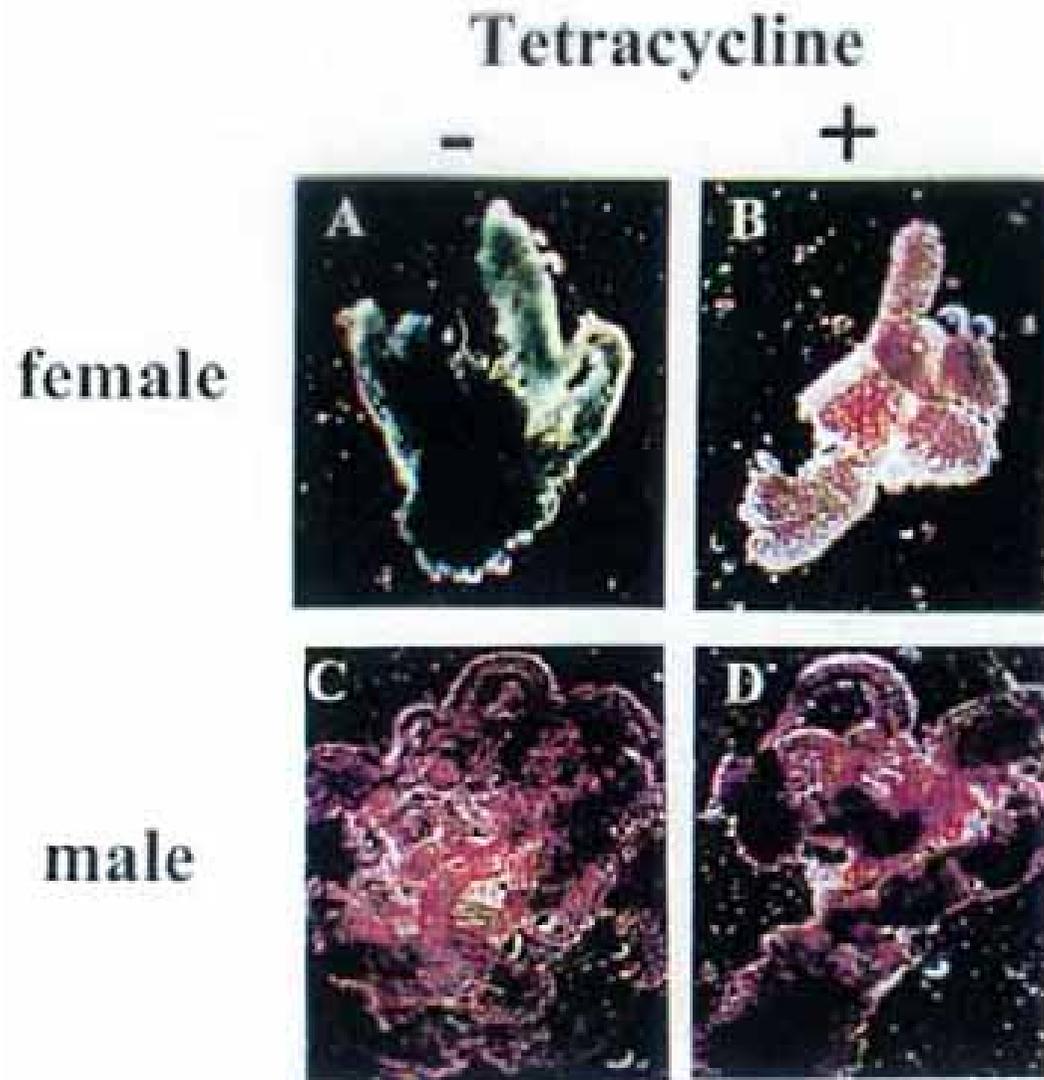


Fig. 1. The tetracycline-regulated female-killing system. Expression of *t* controlled with the female- and fat-body-specific transcription enhancer *I* the *ypl* gene (18). In the absence of tetracycline, tTA binds to *tetO* and induces expression of the proapoptotic gene *hid*. The loss of fat body results in female-specific lethality. In the presence of tetracycline, females are viable, because the binding of tTA to *tetO* is inhibited, switching off expression.



**Fig. 2.** Expression of tTA is confined to the female fat body and is inhibited by tetracycline. Climbing third instar larvae were sexed, dissected, and stained for  $\beta$ -galactosidase expression (25). Strong staining was seen in fat body of female larvae raised on normal medium (A) but not medium that contained tetracycline (10  $\mu$ g/ml; B). Little staining above background level was seen in fat body from male larvae raised on either normal medium (C) or medium supplemented with tetracycline (D).

# Problema:

- Un metodo siffatto comporta un rischio?
- Vedi analisi dei rischi

# RISCHI ASSOCIATI AL LANCIO DI ARTROPODI TRANSGENICI

- 1) Il protocollo di rischio deve tener conto del livello trofico dell'insetto o artropodo target:
- *è fitofago (o vettore di malattie) o entomofago?*
- VEDI PROTOCOLLI DI RISCHIO DELLA MARJORIE HOY:
- Hoy A.M., 1994. Insect molecular genetics. Academic Press
- Hoy A.M., 1992. Criteria for release of genetically-improved phytodeiids: an examination of the risk associated with release of biological control agents. *Experimental & Applied Acarology*, 14: 393-416.

- 2) C'è possibilità di trasmissione orizzontale?

### IL CASO DEI *P-ELEMENT* IN *DROSOPHILA*

- I *P-element* sembrano aver invaso *Drosophila melanogaster*, probabilmente da una specie del gruppo di *Drosophila willistoni*
- I *P-element* possano essere stati trasferiti da una specie all'altra di *Drosophila* da altri organismi?
  - L'esempio riguarda il ruolo di un acaro semiparassita (*Proctolaelaps regalis*)

- Il trasferimento dei *P-element* da *D. willinstoni* a *D. melanogaster* è un evento raro ma possibile e dovrebbe prevedere le seguenti condizioni:

- due *Drosophila* di specie diversa devono deporre le uova vicino;
- l'acaro deve attaccare e mangiare prima il “donatore” e poi “il ricevente” nell'esatto ordine
- l'uovo “ricevente” deve essere in uno stadio particolare di suscettibilità (sviluppo embrionale precoce)
- l'uovo ricevente deve incorporare una copia completa di *P-element* all'interno di un cromosoma prima che esso sia degradato da enzimi del citoplasma
- l'embrione dell'uovo ricevente deve sopravvivere all'attacco dell'acaro
- l'adulto che si sviluppa dall'embrione deve trasmettere i *P-element* alla progenie

# IL CASO DI ALTRI TRASPOSONI (*MARINER*)

- Gli elementi *mariner* sono stati trovati in specie di due gruppi abbastanza separati (lontani): *Drosophila* e *Zaprionus* (Diptera Drosophilidae)
- L'esame del DNA ha mostrato che i *mariner* presenti nei due diversi insetti ha una somiglianza del 97%
- I *mariner* sono stati rinvenuti anche in altre specie di artropodi molto lontani filogeneticamente: (Lepidotteri) e Acari

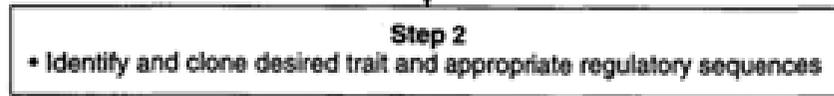
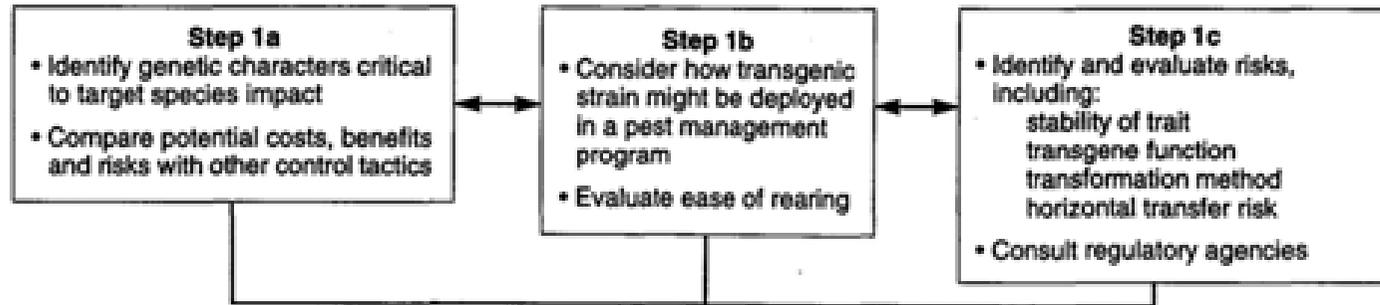
# In conclusione...

- questi trasposoni (*mariner*) sembrano presenti negli artropodi da molto tempo
- sembra possibile il trasferimento orizzontale

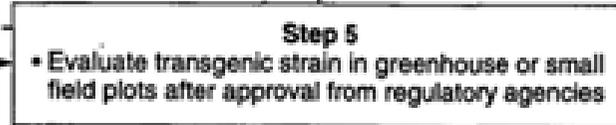
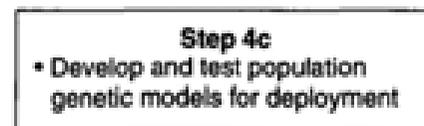
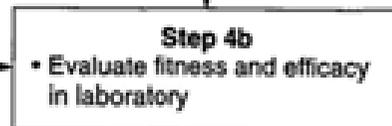
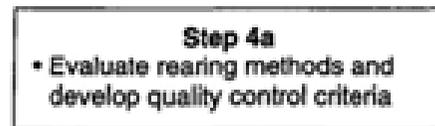
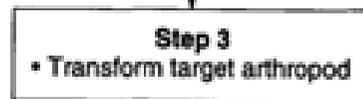
# ENDOSIMBIONTI (ES. BATTERI) POSSONO TRASFERIRE ORIZZONTALMENTE GENI?

- Certi batteri endosimbionti di zanzare, Coleotteri, mosche, possono essere trasmessi orizzontalmente
- Esami dell'RNA ribosomiale ai simbionti di insetti anche distanti filogeneticamente, mostrano una certa "somiglianza" fra tali microrganismi
- Il passaggio orizzontale di simbionti batterici è forse più frequente di quanto se ne sappia poiché molti microrganismi sono coinvolti nei fenomeni di incompatibilità citoplasmatica

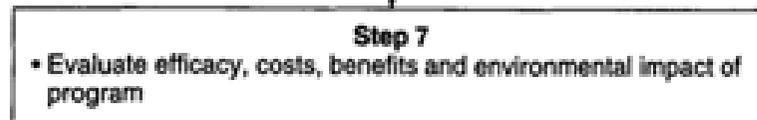
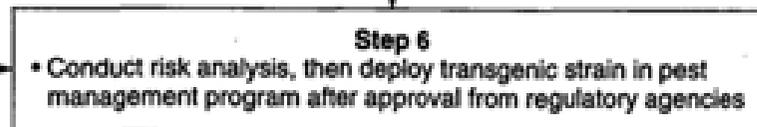
### Phase one



### Phase two



### Phase three



Analisi generale delle fasi che si susseguono in un progetto di trasformazione di artropodi:  
Hoy, 1993

Fig. 1. Risk assessment issues influence the steps employed in developing transgenic pest or beneficial arthropods for pest management programs. Risk assessment issues should be considered early in the project, as well as prior to evaluations in the field.

TABLE 3

Factors for risk assessment of a hypothetical transgenic strain of the phytoseiid *M. occidentalis*. No vector was used to insert an OP-resistance gene cloned from a prokaryote, the strain was selected for lack of diapause, and is susceptible to other pesticides. Different transgenic phytoseiids should be evaluated separately<sup>a</sup>

Hazard component <sup>b</sup>	Less	Degree of scrutiny required	More
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● indicates estimated degree of scrutiny for phytoseiid engineered with a pesticide resistance gene derived from a prokaryote and introduced without a virus or transposable element vector</li> </ul>		
<i>A. Attributes of genetic material</i>			
Characterized	● Fully		Poorly
Stability	● High (chromosomal)		Low (extra-chromosomal)
Nature of alteration	Gene deletions	● Add single gene	Add multiple genes
Source of DNA	Same	Closely related	● Unrelated species
Vector	● None	Non-self-transmissible	Self-transmissible
<i>B. Attributes of wild type organism</i>			
Level of domestication	Unable to reproduce	Semi-domesticated wild/feral populations	● Self-propagating wild
Ease of subsequent control	● Control agents known		None known
Origin		● Indigenous	Exotic
Habit	● Free living		Pathogenic, parasitic, symbiotic
Pest status	● Relatives not pests	Relatives pests	Pest itself
Survival under adverse conditions	Short term	●	Long term
Geographic range	Narrow	●	Broad/unknown
Prevalence of gene exchange in natural populations	None		● Frequent

# Esempio di *risk assessment*: Hoy, 1992

Hazard component <sup>a</sup>	Less	Degree of scrutiny required	More
	● indicates estimated degree of scrutiny for phytoseiid engineered with a pesticide resistance gene derived from a prokaryote and introduced without a virus or transposable element vector		
<i>C. Phenotypic attributes of engineered organism in comparison with parent organism</i>			
Fitness	Reduced irreversibly	● Reduced reversibly	Increased
Prey range	● Unchanged		Broadened/shifted
Environmental limits to growth or reproduction	● Narrowed, not shifted		Broadened/shifted
Susceptibility to control by biocides	Increased	● Unchanged	Decreased
Expression of trait	Independent of environmental context	Similar	● Dependent on context
Similarity to phenotypes previously used safely	Identical	● Similar	Dissimilar
<i>D. Attributes of the environment</i>			
Selection pressure for engineered trait	Absent		● Present
Wild relatives within dispersal capability	● Absent		● Present
Range of environments for testing/use; potential geographic range	Very restricted	●	Broad
Simulation of test conditions	Not difficult		● Difficult to simulate realistically
Public access to test site	● Tightly controlled	Limited	Uncontrolled
Effectiveness of monitoring and mitigation plans	Proven effective		● Untested/unlikely to be effective

<sup>a</sup>Adapted from Australia (1987) and Tiedje et al. (1989).

<sup>b</sup>Position on scale is qualitative or semi-quantitative. The importance of position on one scale may be contingent on another scale. The importance of particular scales will vary with different cases.