

DINAMICA DI COORTI DI *HELICOVERPA ARMIGERA* (HÜB.) ALIMENTATE CON POMODORO TRANSGENICO

Speranza S.⁽¹⁾, Dattilo A.M.⁽²⁾, Carlini L.⁽²⁾, Severini M.⁽²⁾, Pucci C.⁽¹⁾

Abstract

Dynamics of Helicoverpa armigera (Hüb.) cohorts fed with transgenic tomato

From the eggs laid on the same day by lepidopteron noctuid *Helicoverpa armigera* (Hüb.) females, three cohorts were formed. These were bred in a climatic chamber under the same temperature conditions ($T = 27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and photoperiod (18 hours of light and 6 hours of darkness) and in different feeding conditions. The first cohort was fed with transgenic tomato leaves (*Lycopersicon esculentum* L.) for the *KT13* genes (a soy gene that codifies for a Kunitz type tryptic inhibitor), the second with transgenic tomato leaves for the *AtCys* genes (a *Arabidopsis thaliana* gene, codifying for a cystatinic inhibitor) and the third with non transgenic tomato leaves (control). Three new second generation cohorts were formed with the newborn of first generation adults and bred, until the adult stage, under the same laboratory conditions. The experiment was repeated twice. A comparison between the times that the three first and second generation cohorts reached their different lifestyle stages did not show significant differences ($P < 0.25$); this leads us to exclude the possible sub-lethal effects for the *H. armigera* cohorts fed with both the transgenic diets. This innovative research of the valuation of the sub-lethal effects of the exogenous molecules in transgenic plants increases the knowledge of the new plant-phytophagan interactions that will occur in nature after the controlled release of the new phytophagan-resistant plants.

Introduzione

Recenti ricerche hanno stimato che il 13 % delle perdite mondiali della produzione agricola si verifica a causa degli insetti e, in modo predominante, è dovuta all'attività delle larve di lepidotteri e di coleotteri (GATHEOUSE, *et al.*, 1994).

Negli ultimi 30 anni l'agricoltura tradizionale ha utilizzato, per la lotta ai fitofagi, quasi esclusivamente molecole di sintesi. Tali molecole, se da un lato hanno permesso un effi-

(1) Dipartimento di Protezione delle Piante, Sezione di Entomologia, Università degli Studi della Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, 01100 Viterbo E-mail: speranza@unitus.it

(2) Istituto di Scienze dell'Atmosfera e del Clima, CNR (Sezione di Roma), Area di ricerca di Tor Vergata, Via del Fosso del Cavaliere, 100, 00133 Roma. E-mail: Maurizio.Severini@uniroma1.it

ciente controllo dei fitofagi, dall'altro hanno indotto notevoli alterazioni degli agroecosistemi sopprimendo l'entomofauna utile, favorendo l'insorgenza di fenomeni di resistenza nei confronti dei diversi p.a. utilizzati e, infine, interferendo con la salute degli operatori agricoli e dei consumatori. Da quanto sopra esposto risulta evidente come sia necessario adottare strategie alternative di controllo degli insetti che permettano di ridurre i rischi diretti e indiretti collegati all'uso dei p.a. di sintesi. Allo scopo sono state individuate nuove metodologie di controllo integrato nell'ambito delle diverse componenti dell'agroecosistema. Importante risulta il contributo dell'ingegneria genetica nell'ambito della corretta gestione degli agroecosistemi. Su questo argomento sono state effettuate ricerche basate sull'introduzione di geni derivati dal *Bacillus thuringiensis* (Mc PHERSON *et al.*, 1989; PERLAK *et al.*, 1990; VAECK *et al.*, 1987) e, più recentemente, sull'introduzione di geni che conferiscono resistenza ai fitofagi già presenti in molte piante come, ad esempio, gli inibitori di enzimi proteolitici, gli inibitori delle α -amilasi e delle lecitine (BOULTER *et al.*, 1990; DUCK & EVOLA, 1999; SHADE *et al.*, 1994).

In questo lavoro viene studiata l'interazione tra piante transgeniche di pomodoro esperimenti due tipi di inibitori di proteinasi relative a due generazioni consecutive del lepidottero notturno *Helicoverpa armigera* (Hüb.), analizzando gli effetti di tali interazioni attraverso l'osservazione di diversi parametri biologici.

Come noto la *H. armigera* svolge 2-4 generazioni annue, con dannosità crescente dalla prima all'ultima, e pertanto in questo studio il protocollo sperimentale ha previsto lo svolgimento di biosaggi plurigenerazionali e cioè valutando nel tempo la risposta che il fitofago ha nei confronti degli inibitori di proteinasi.

Il notturno è un fitofago cosmopolita tra i più dannosi nelle aree tropicali e subtropicali (WU *et al.*, 1997). Può attaccare più di 180 specie vegetali tra le quali numerose orticole (GRANDI, 1951; POLLINI, 1998; TREMBLAY, 1990; PATANKAR *et al.*, 2001; MANJUNATH *et al.*, 1989; BOWN *et al.*, 1997; MATTHEWS, 1991). Le larve attaccano i bocci fiorali, le foglie e le bacche, svolgendo la loro azione trofica preferenzialmente in modo endofitico (PARENZAN, 1994). I danni più gravi si verificano a carico delle parti riproduttive di cui le larve hanno più bisogno per alimentarsi. Nelle bacche di pomodoro si insediano le larve anche di giovane età che passano inosservate durante la raccolta. Più di frequente le bacche infestate sono visibilmente danneggiate per la presenza di un foro.

Materiali e metodi

Per l'esecuzione dei biosaggi sono state utilizzate delle piante di pomodoro transgeniche e non, fornite dal gruppo di ricerca del Prof. G. Soressi del Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo. Le piante utilizzate erano omogenee per età e condizione di allevamento. Sono stati presi in considerazione tre genotipi vegetali: il testimone (cv. RioGrande), i transgeni del controllo contenente gli inibitori di proteinasi delle cistatine (*AtCys*) e quello contenente gli inibitori di protei-

nasi KTI3 (Kunitz). Gli inibitori di proteinasi dovrebbero andare ad interagire negativamente con l'assunzione degli aminoacidi impedendo la scissione delle molecole proteiche complesse. Queste proteine, non scisse in aminoacidi, non possono così essere assorbite nel lume celomatico.

Diversi studi hanno già saggiato l'effetto di alcuni inibitori di proteasi (PIs) nei confronti dell'*H. armigera* ma tali ricerche hanno dato sempre risultati contrastanti (JONSTON *et al.*, 1993; BOWN *et al.*, 1997; GATEHOUSE *et al.*, 1997, WU *et al.*, 1997).

Le molecole utilizzate sono di seguito brevemente descritte.

Kunitz (KTI3)

Le molecole appartenenti alla famiglia Kunitz, hanno un peso molecolare di 21-22 kDa (181 aminoacidi) ed inibiscono la tripsina, la chimotripsina, la subtilisina, la kallikreina e l'amilasi. Sono molecole che hanno il pH ottimale di attività a valori alcalini. Tali inibitori di proteinasi possiedono quindi un'azione ottimale nel mesentero dei lepidotteri dove si riscontrano valori normali pari a pH tra 10 e 11 (DOW, 1984; DOW, 1992).

Cistein-proteinasi (AtCys)

Le cistein-proteinasi, non sono secrete come enzimi negli animali superiori ma si ritrovano in numero predominante nell'intestino di parecchie famiglie di Emittenti e Coleotteri dove appaiono giocare un ruolo fondamentale nella digestione dei cibi (MURDOCK *et al.*, 1987; WOLFSON & MURDOCK, 1990). Molti degli appartenenti a questi due ordini di insetti si nutrono di semi e foglie e hanno la caratteristica di avere il pH del loro intestino acido (circa 5) valore vicino a quello richiesto proprio dalle cistein-proteinasi (5-7) (BARRETT, 1986; MURDOCK *et al.*, 1987; WIEMAN & NIELSEN, 1988).

Biosaggio

Il biosaggio ha previsto lo svolgimento di due generazioni consecutive di *H. armigera* sul medesimo genotipo di pomodoro, valutando, in ambiente termocondizionato (27°C ±1°C; 18-6 h luce-buio; 50% U.R.) e distintamente per ciascuna delle due generazioni, la dinamica dei passaggi delle differenti età larvali.

Le larve neonate prelevate dall'allevamento sono state alimentate singolarmente, per quattro giorni, in provette di plexiglas con la dieta artificiale con lo scopo di ridurre la normale mortalità neonatale riscontrata negli allevamenti massivi permettendo inoltre di standardizzare le condizioni morfo-fisiologiche degli insetti da testare nei diversi biosaggi. Successivamente, sono state prelevate a caso n. 64 larve distintamente per ciascuna delle tre tesi (Testimone, *AtCys* e *KTI3*) poste, singolarmente, nei "pozzetti" di allevamento (4,2cm x 3,7cm x 2,2cm) dei contenitori multicella. Sono state poste nei pozzetti, con cadenza giornaliera, porzioni di foglia di pomodoro, prelevate da piante omogenee per età. La tipologia di somministrazione dell'alimento ha permesso alle larve di potersi alimentare *ad libitum* eliminando perciò la variabile dovuta allo stress causato dalla

ricerca del cibo. Ogni due giorni si è provveduto all'eliminazione delle deiezioni, alla sterilizzazione con alcool etilico del pozzetto di allevamento. Sempre ogni due giorni è stata effettuata la registrazione dei sopraccitati parametri biologici. Le crisalidi sono state sessate, numerate e poste singolarmente in provette di plexiglas chiuse da uno zaffo di cotone. Successivamente è stata annotata la data di sfarfallamento delle immagini ed è stato avviato il biosaggio sugli adulti. Gli adulti, provenienti dai biosaggi di prima generazione, distintamente per ciascun genotipo, hanno costituito il materiale di partenza per i biosaggi condotti in seconda generazione.

Le larve provenienti dall'accoppiamento degli adulti ottenuti con la prima generazione, distintamente per genotipo, sono state tutte alimentate per quattro giorni su dieta artificiale per le medesime motivazioni riportate nella prima generazione. Dal gruppo delle larve di quattro giorni di età sono stati prelevati a caso 64 individui per tesi, ed è stato ripristinato il biosaggio adottando la stessa metodologia riportata per la prima generazione.

Analisi sulle differenze temporali nel raggiungimento degli stadi larvali, di crisalide e di adulto

Si è voluto indagare sugli effetti legati all'azione dell'alimentazione transgenica sulla dinamica di sviluppo delle coorti, quindi un'analisi volta a rivelare gli effetti sub-letali. Allo scopo, sono stati evidenziati i passaggi delle diverse età larvali mediante il rilevamento, dopo la muta, delle capsule cefaliche che hanno permesso la precisa identificazione della data di passaggio (Fig. 1).

Risultati

Le curve relative al raggiungimento dello stadio larvale, di crisalide e di adulto sono riportate in Fig. 2 e in Fig. 3 (I generazione Fig. 2; II generazione Fig. 3). Con linea continua sono rappresentate le curve relative al controllo mentre in tratteggio sono rappresentate le coorti trattate.

Sia in prima che in seconda generazione è stato calcolato il tempo medio $\langle t \rangle$ impiegato dalla coorte per raggiungere gli stadi larvali di sviluppo, lo stadio di crisalide e quello di adulto. Ad ognuno dei valori medi è stato associato il relativo valore della varianza (Tab. 1). È stato confrontato il valore $\langle t \rangle$ relativo al controllo con i rispettivi valori di $\langle t \rangle$ delle coorti alimentate con cibi transgenici; Il parametro di probabilità P (test t di Student) è stato riportato in Tab. 2.

I valori relativi ai tempi medi di raggiungimento dei vari stadi del ciclo vitale sono stati utilizzati per l'analisi statistica con il metodo di Student (t-test). Il metodo di analisi fornisce le probabilità di commettere errore nel rifiutare l'ipotesi di uguaglianza tra i valori di $\langle t \rangle$ nei quattro casi riportati in tabella 3 (Controllo-AtCys in I e II gen.; Controllo-KT13 in I e II gen.).

Dalla Tab. 2 si nota che all'aumentare dello stadio anche i valori di P aumentano; data

Tab. 1

Stadio	3	4	5	6	crisalide	adulto	
C I	4.3	8.3	10.5	12.9	19.8	30.6	<t>
	0.7	1.4	2.2	2.8	5.2	14.0	var
C II	4.0	7.6	9.8	12.4	19.3	29.6	<t>
	0.9	0.9	1.4	2.1	3.3	9.8	var
AtCys I	4.4	7.2	9.4	11.7	18.5	29.3	<t>
	0.6	1.1	1.7	2.4	4.7	14.2	var
AtCys II	4.0	7.7	10.2	12.4	19.0	30.0	<t>
	0.9	0.8	1.3	2.0	4.2	10.7	var
KTI3 I	4.0	8.4	10.7	13.2	20.4	31.6	<t>
	0.9	2.3	3.0	3.3	5.3	15.2	var
KTI3 II	4.0	7.4	9.4	11.6	18.3	28.6	<t>
	0.9	1.1	1.8	2.3	5.0	9.8	var

Tab. 2

I generazione	Controllo-AtCys	II generazione	Controllo-AtCys
Stadio	P	Stadio	P
3	0.03	3	0.00
4	0.19	4	0.03
5	0.17	5	0.05
6	0.17	6	0.01
Crisalide	0.18	Crisalide	0.05
Adulto	0.25	Adulto	0.09
I generazione	Controllo-KTI3	II generazione	Controllo-KTI3
3	0.06	3	0.00
4	0.01	4	0.04
5	0.02	5	0.07
6	0.04	6	0.12
Crisalide	0.08	Crisalide	0.14
Adulto	0.21	Adulto	0.18

la struttura analitica del test t di Student, considerando che anche la varianza associata ad ogni <t> aumenta con l'aumentare dello stadio (Tab. 1), si potrebbe pensare che con l'avanzare dello stadio vi siano tra le curve differenze sempre più significative. In realtà questa tendenza non può essere considerata come un risultato; le entità dei valori di P ($0 < P < 0.25$) risultano, infatti, troppo piccole per poter affermare che le coorti trattate si

sviluppano con tempi differenti rispetto le coorti di controllo. Statisticamente non esiste nessuna differenza significativa tra le coorti, e quindi nessun effetto sub-letale è emerso dall'analisi dello sviluppo delle coorti alimentate con pomodoro transgenico.

Conclusioni

I biosaggi plurigenerazionali effettuati con i due genotipi transgenici (*AtCys e KTI3*) a confronto con il testimone, hanno permesso di studiare taluni effetti sulle popolazioni di *Helicoverpa armigera* (Hüb).

L'analisi dei tempi medi di raggiungimento dei diversi stadi del ciclo di sviluppo ha reso possibile l'indagine sugli effetti sub-letali, indotti dal diverso tipo di alimentazione, sulle coorti. Dal confronto tra coorti di controllo e coorti trattate è emerso che le differenze nei tempi medi non sono statisticamente rilevanti ($P < 0.25$).

Si può concludere quindi che non si sono rivelati effetti letali e sub-letali dei due tipi di alimentazione transgenica sulle coorti in I e II generazione.

Per concludere si può affermare come attualmente sia ancora prematuro comprendere tutte le possibili interazioni a breve e a lungo termine che si instaurano nel livello tritrofico con l'introduzione delle nuove piante transgeniche fitofago-resistenti (SCHULER *et al.*, 1999). È perciò di fondamentale importanza valutare su basi scientifiche e socio-economiche i pregi e i difetti di questa innovativa strategia di controllo. Va però sottolineato che le piante transgeniche fitofago-resistenti concorrono sicuramente alla riduzione dell'enorme impatto ambientale determinato dall'utilizzo delle molecole di sintesi soprattutto ad ampio spettro d'azione.

Bibliografia

- BARRETT A.J., 1986 - The classes of proteolytic enzymes. In Plant Proteolytic Enzymes. 1: 1-16.
- BOULTER D., EDWARDS G.A., GATEHOUSE A.M.R., GATEHOUSE J.A., HILDER V.A., 1990 - Additive protective effects of incorporating two different higher plant derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. Crop Prot.. 9: 351-354.
- BOWN D.P., WILKINSON H.S., GATEHOUSE J.A., 1997 - Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. Insect Biochem. Mol. Biol.. 27: 625-638.
- DOW J.A.T., 1984 - Extremely high pH in biological system: a mode for carbonate transport. American Journal of Fisiology. 246: 633-636.
- DOW J.A.T., 1992 - pH gradients in the Lepidopteran midgut. J. Exp. Biol.. 172: 355-375.
- DUCK N. E EVOLA S., 1999 - Use of Transgenes to Increase Host Plant Resistance to Insects: Opportunities and Challenges. Advances Insect Control. 1-20.

GATEHOUSE A.M.R., DAVISON G.M., NEWELL C.A., MERRYWEATHER A., HAMILTON W.D.O., BURGESS E.P.J., GILBERT R.J.C., GATEHOUSE J.A., 1997 - Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. Mol. Breeding. 3: 49-63.

GATEHOUSE A.M.R., HILDER V.A., 1994 - Genetic manipulation of crops for insect resistance. In Marshall G., Walters D. (eds) Molecular Biology in Crop Protection. Chapman and Hall, London. 176-201.

GRANDI G., 1951 - Introduzione allo studio dell'entomologia. Edizioni Agricole Bologna, Vol. 2 Endopterigoti.

JOHNSTON K.A., GATEHOUSE J.A., ANSTEE J.H., 1993 - Effect of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. J. Insect Physiol.. 36: 657-664. 21: 389-397.

MANJANUTH T.M., BHATNAGAR V.S., PAWAR C.S., SITANATHAM S., 1989 - Economic importance of *Heliothis* spp. in India and an assessment of their natural enemies and host plants. In: King EG, Jackson RD (eds) Proceedings of the Workshop on Biological Control of *Heliothis*: Increasing the Effectiveness of Natural Enemies November 1985, New Delhi. New Delhi, India: Far Eastern Regional Research Office, US Department of Agriculture. 196-228.

MATTHEWS M., 1991 - Classification of the *Heliothinae*. NRI Bulletin No. 44. Chatham, Kent: Natural Resources Institute.

McPHERSON S., PERLAK F.J., FUCHS R.L., MACINTOSH S.C., DEAN D.A., FISCHOFF D.A., 1989 - Expression and analysis of the insect control protein from *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. In: Abstract of the First International Symposium on the Molecular Biology of the Potato, Bar Harbor, ME. P 51.

MURDOCK L.L., BROOKHART G., DUNN P.E., FOARD D.E., KELLEY S., KITCH L., SHADE R.E., SHUKLE R.H., WOLFSON J.L., 1987 - Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. Comp. Biochem. Physiol.. 87(b): 783-787.

PARENZAN P., 1994 - Nottue. In La difesa integrata dell'agroecosistema pomodoro. Schede INEA. 135-144.

PATANKAR A.G., GIRI A.P., HARSULKAR A.M., SAINANI M.N., DESHPANDE V.V., TENJEKAR P.K., GUPTA V. S., 2001 - Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinase explains polyphagous nature of the insect pest. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 31: 453-464.

PERLAK F.J., DEATON R.W., ARMSTRONG T.A., FUCHS R.L., SIMS S.R., GREENPLATE J.T., FISCHOFF D.A., 1990 - Insect resistant cotton plants. Bio/technology. 8: 3324-3328.

POLLINI A., 1998 - Manuale di Entomologia Applicata. Edagricole. 1462 pp.

SCHULER T.H., POPPY G.M., KERRY B.R., DENHOLM I., 1999 - Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. Tib.Tech.. 17: 210-216.

SHADE R.E., SCHROEDER H.E., PUEYO J.J., TABE L.M., MURDOCK L.L., HIGGINGS T.J.V., CHRISPEEL M.J., 1994 - Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Bio/tecnology. 12: 793-796.

TREMBLAY E., 1990 - Entomologia Applicata. Liguori Editore. 2.2. 381 pp.

VAECK M., REYNAERTS A., HOFTE H., JANSENS S., DE BEUCKELEER M., DEAN C., ZABEAU M., VAN MONTAGU M., LEEMANS J., 1987 - Transgenic plants protected from the insect attack. *Nature*. 327: 33-37.

WIEMAN K.F., NIELSEN S.S. (1988). Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoscelides obtectus* Say. (Coleoptera, Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 89: 419-426.

WOLFSON J.L., MURDOCK L.L., 1990 - Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 16: 1089-1102.

WU Y., LLEWELLYN D., MATHEWS A., DENNIS E.S., 1997 - Adaptation of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to a proteinase inhibitor expressed in transgenic tobacco. *Molecular Breeding*. 3: 371-380.

NOTIZIARIO

SULLA PROTEZIONE DELLE PIANTE

*Organo dell'Associazione Italiana per la Protezione delle Pianta
A.I.P.P.*

N. 15 (Nuova Serie)

Il Giornate di Studio

**METODI NUMERICI,
STATISTICI E INFORMATICI
NELLA DIFESA DELLE COLTURE AGRARIE
E DELLE FORESTE:
RICERCA E APPLICAZIONI**

con il patrocinio dell'A.I.P.P.

Scuola Superiore Sant'Anna
Pisa - 20-23 maggio 2002

2002