

FRANCESCA FARISEI², DANIELA PANICHI², ELIA POERIO², STEFANO SPERANZA¹, CLAUDIO PUCCI¹, VALENTINA FONZO², RICCARDO CACCIA², GIAN PIERO SORESSI²

¹ Dipartimento di Protezione delle Piante, Università della Tuscia di Viterbo

² Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Università della Tuscia di Viterbo

Livelli di attività antiproteinasiche in piante transgeniche di pomodoro esprimenti inibitori di proteinasi a serina e a cisteina

Antiproteinase activities in tomato transgenic plants expressing serine and cysteine proteinase inhibitors - Tomato plants transgenic for genes coding for protein inhibitors were tested in order to evaluate their capability to inhibit the commercial proteinase activities as well as those present in the midgut of the phytophagous insect *Helicoverpa armigera* (Hüb.). Leaf extracts of *Pi-IV* (gene from soybean coding for a Bowman-Birk-like trypsin inhibitor) transgenic T₃ plants (cv. UC-82) are able to inhibit bovine pancreatic trypsin and trypsin-like activity of the phytophagous insect 4 times more than control plant extracts; extracts of *KTI3* (gene from soybean coding for a Kunitz-like trypsin inhibitor) transgenic T₃ plants (cv. Riogrande) are able to inhibit bovine pancreatic trypsin and trypsin-like activity of the insect 200 times more than control plant extracts; leaf extracts of *AtCys* (gene from *Arabidopsis* coding for a cysteine protease inhibitor) transgenic T₂ plants (cv. Riogrande) are able to inhibit commercial papain and cysteine-like activity of the insect 4 times more than control plant extracts. On the basis of the data it would be interesting, for both speculative and applicative purposes, to use these transgenic plants in order to verify *in vivo* the action on the mortality and/or on the reproduction ability of the *H. armigera*, particularly dangerous to the tomato crop.

Key words: transgenic tomato, *Helicoverpa armigera*, Kunitz, Bowman-Birk, Cystatine.

L'abilità degli insetti nell'utilizzare differenti fonti di cibo ha reso alcuni di essi dannosi per l'uomo. Per questo è necessario conoscere il processo digestivo dei vari insetti come prerequisito per sviluppare metodi per bloccarlo. Recentemente sono state ottenute interessanti informazioni sulle proteinasi digestive di diversi *taxa* di insetti e sulle loro principali proprietà (TERRA & FERRIERA, 1994). Nel mesenteron dei Lepidotteri, che ha un pH alcalino (DOW, 1984; APPLEBAUM, 1985; DOW, 1992), sono comunemente presenti tutte le 4 famiglie note di proteinasi ed in particolare quella delle serin-proteinasi. Saggi *in vivo* con inibitori di proteinasi di origine vegetale hanno causato ritardo di crescita ed elevata mortalità nelle larve di diverse specie di insetti (ZHAO *et al.*, 1996). L'obiettivo del lavoro è stato il saggio *in vitro* delle attività antiproteinasiche presenti in tessuti (foglie e/o bacche) di piante di pomodoro trasformate con geni che codificano per inibitori proteici a serina e a cisteina, potenzialmente in grado di interferire con le attività proteinasiche presenti nel tratto digestivo di larve del fitofago *Helicoverpa armigera* (Hüb.). Questo lepidottero possiede una notevole varietà di enzimi digestivi (LENZ *et al.*, 1991) ed è responsabile di seri danni alle colture di cotone, mais, pomodoro, melanzana, patata, tabacco, lattuga (GRANDI, 1951; MANJUNATH *et al.*, 1989; TREMBLAY, 1990; MATTHEWS, 1991; BOWN *et al.*, 1997; POLLINI, 1998; PATANKAR *et al.*, 2001).

MATERIALI E METODI

Le piante di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) saggiate (tab. 1), transgeniche e di controllo, appartengono alle cultivar UC-82 e Riogrande (RIG). La trasformazione è

Tab. 1 - Elenco materiale vegetale utilizzato negli esperimenti.

Linea	Cultivar di origine	Tipologia	Situazione allelica
V710040	UC-82	controllo	-
V1893	UC-82	transgenica <i>Pi-IV</i>	omozigote T ₃
RIG	RIG	controllo	-
MS498	RIG	transgenica <i>KT13</i>	omozigote T ₃
RIG	RIG	controllo	-
BG	RIG	transgenica <i>AtCys</i>	miscuglio emizigoti-omozigoti T ₁
BG24-3 - BG24-7	RIG	transgenica	<i>AtCys</i> omozigoti T ₂

avvenuta mediante *Agrobacterium tumefaciens* ceppo EHA105; in UC-82 è stato incorporato il gene *Pi-IV*, proveniente da soia che codifica per un inibitore triptico tipo Bowman-Birk; in RIG sono stati introdotti separatamente il gene *KT13*, proveniente da soia, che codifica per un inibitore triptico tipo Kunitz e il gene *AtCys*, proveniente da *Arabidopsis*, che codifica per un inibitore cistatinico (SCHETTINO *et al.*, 1998). Le piante trasformate (T₀) sono state riprodotte in serra e tra le plantule T₁ sono state selezionate *in vitro* quelle resistenti alla canamicina (miscuglio emizigoti-omozigoti); la loro progenie è stata selezionata per l'ottenimento di linee T₂ e T₃, omozigoti per l'uno o l'altro dei transgeni. Le larve di *H. armigera* sono state allevate con dieta artificiale in cella climatica alla temperatura di 27°C con 16 ore di luce e 8 di buio. La concentrazione proteica dei vari campioni è stata determinata secondo la metodica di BRADFORD (1976). Le foglie per la preparazione degli estratti (da 3 piante per genotipo), sono state immediatamente congelate in azoto e macinate finemente in mortaio. Gli estratti per la valutazione dell'attività inibente le proteinasi a cisteina sono stati preparati con un tampone NaH₂PO₄ 0,05 M, EDTA 3 mM, pH 6,6; quelli per la valutazione dell'attività inibente le proteinasi a serina con un tampone Tris-HCl 0,46 M, CaCl₂ 11,5 mM, pH 7,0. Le larve utilizzate per la preparazione degli estratti sono state congelate in azoto e omogeneizzate con gli stessi tamponi utilizzati per le piante. La valutazione dell'attività tripsino-simile da *H. armigera* ed i relativi saggi di inibizione sono stati effettuati secondo la metodica di HUMMEL (1959), impiegando il substrato sintetico TAME (N α-p-toluensulfonil-L-arginina metil estere). La valutazione dell'attività papainica e antipapainica è stata effettuata sfruttando la capacità dell'enzima di idrolizzare il substrato sintetico BApNA (N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilide). Miscela di reazione (3,5 ml): tampone fosfato (NaH₂PO₄) 0,05 M, EDTA 3 mM pH 6,6, 50 µl di cisteina 0,5 M in H₂O, x µl di papaina, 125 µl di BApNA 0,2 M in DMSO puro. La reazione è stata bloccata con TCA 30%. Dopo centrifugazione, l'attività papainica è stata quantificata mediante lettura spettrofotometrica a 410 nm.

RISULTATI

Gli estratti proteici fogliari delle piante T₃, per ognuno dei due genotipi UC-82 in esame, sono stati saggiati per la loro capacità di interferire con tripsina pancreatica bovina e l'attività similtriplica di larve (III-IV età) di *H. armigera*. Gli estratti del genotipo transgenico per *Pi-IV* (V1893) sono in grado di inibire l'attività triptica commerciale e similtriplica di *H. armigera* con un'efficacia circa 4 volte superiore a quella degli estratti del

Tab. 2 - Livelli di attività antitriptica in estratti fogliari di piante di pomodoro, cv. UC-82.

Genotipo	U.I.T./mg	U.I.sT./mg
V710040 (controllo)	7,4	6,8
V1893 (<i>Pi-IV</i> transgenica)	32	31,6

U.I.T./mg= attività inibente la tripsina pancreatica bovina per mg di proteine

U.I.sT./mg= attività inibente l'attività similtriptica da larve di *H. armigera* per mg di proteine

Tab. 3 - Livelli di attività antitriptica in estratti fogliari e di bacche di piante di pomodoro, cv. RIG.

Genotipo	U.I.T./mg		U.I.sT./mg	
	foglie	bacche	foglie	bacche
RIG (controllo)	0,3	0,4	0,3	0,4
MS498 (<i>KT13</i> transgenica)	59	40	57	38

U.I.T./mg= attività inibente la tripsina pancreatica bovina per mg di proteine

U.I.sT./mg= attività inibente l'attività similtriptica da larve di *H. armigera* per mg di proteine

Tab. 4 - Livelli di attività antipapainica presenti in estratti proteici di foglie di piante di pomodoro *AtCys* transgeniche e di controllo (RIG); tutte le famiglie saggiate erano costituite da un miscuglio di 10 individui T₁, omozigoti ed emizigoti.

Famiglia	Inibizione (%)
BG24	32,5
BG27	28,5
BG30	24
RIG	8

controllo V710040 (tab. 2). Allo stesso modo sono stati saggiati anche gli estratti fogliari di piante T₃ di ciascuno dei due genotipi Riogrande. Gli estratti del genotipo transgenico per *KT13* (MS498) sono risultati in grado di inibire l'attività triptica bovina e similtriptica di *H. armigera* con un'efficacia circa 200 volte superiore a quella degli estratti del genotipo RIG di controllo; gli estratti di bacche di piante del genotipo MS498 hanno invece mostrato livelli di attività inibente la tripsina commerciale e quella similtriptica da larve di *H. armigera*, circa 100 volte superiori a quelle presenti in estratti di bacche di piante di controllo (tab. 3). Alcune famiglie T₁ di piante BG, miscuglio di individui emizigoti ed omozigoti per il gene *AtCys*, in aggiunta al controllo non trasformato RIG, sono state analizzate per il livello di attività di inibizione delle cistein proteinasi. Gli estratti fogliari delle famiglie BG24, BG27 e BG30 hanno presentato livelli medi di attività inibente da 3 a 4 volte superiori a quello del controllo RIG (tab. 4). Piante T₂ (BG24-3 e BG24-7), riconosciute omozigoti per il gene *AtCys*, hanno evidenziato identici livelli di inibizione della papaina, solo leggermente inferiori a quelli ritrovati nel miscuglio iniziale di piante T₁ (tab. 5). Sui campioni proteici estratti da foglie di BG24 e RIG, è stata saggiata *in vitro* anche la capacità di inibizione di campioni di estratti grezzi da *H. armigera* al IV-V stadio larvale. I dati ottenuti evidenziano che l'estratto derivante da BG24 è in grado di inibire l'attività cistein proteinasica di *H. armigera* con maggiore efficacia rispetto all'estratto di controllo della linea RIG (fig. 1).

Tab. 5 - Livelli di attività antipapainica presenti in estratti proteici di foglie di piante di pomodoro transgeniche e di controllo.

Campione	Inibizione (%)
BG24-3	28
BG24-7	29
BG24 pool	32,5
RIG	8

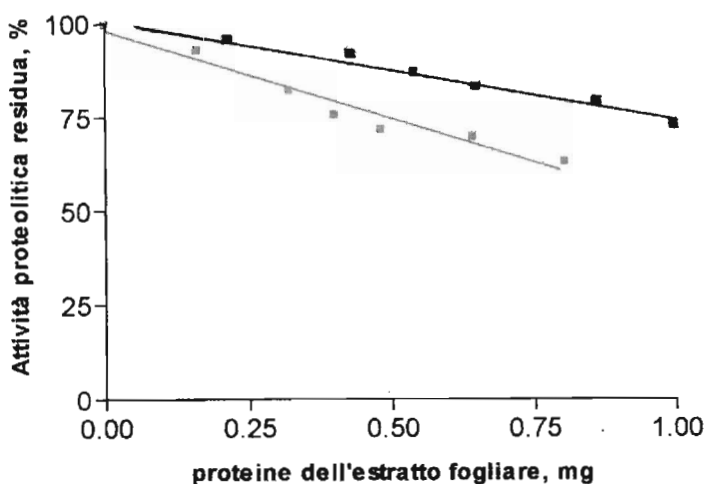


Fig. 1 - Inibizione dell'attività proteinasica a cisteina presente nell'estratto larvale grezzo di *H. armigera*, in funzione di quantità crescenti di proteine estratte dai campioni fogliari BG24 (—) e RIG (---).

CONCLUSIONI

Gli estratti proteici da foglie di piante di pomodoro transgeniche per geni codificanti per inibitori di proteinasi, hanno manifestato rispetto a quelli provenienti da piante non trasformate, una significativa, superiore capacità di inibire sia gli enzimi proteinasici commerciali che quelli presenti nel tratto digestivo del fitofago notturne *H. armigera*. I livelli di inibizione riscontrati nelle piante transgeniche rispetto ai corrispondenti controlli sono stati differenti per i tre geni esogeni studiati: da 4 volte superiori per *Pi-IV* e *AtCys* a 200 volte per *KTI3*. I dati ottenuti evidenziano un notevole interesse, sia sul piano speculativo che su quello delle possibili applicazioni, per l'utilizzo di tali piante transgeniche al fine di verificare *in vivo* l'effettiva azione sulla mortalità e/o sull'attività riproduttiva del notturne *H. armigera*, particolarmente dannoso per la coltura del pomodoro.

RIASSUNTO

Piante di pomodoro trasformate con geni che codificano per inibitori di proteinasi sono state saggate *in vitro* allo scopo di valutarne la capacità di interferire con le attività proteinasiche commerciali e con quelle presenti nel tratto digestivo dell'insetto fitofago *Helicoverpa armigera* (Hüb.). Gli estratti fogliari di piante T₃ (cv. UC-82) trasformate con il gene *Pi-IV* (gene proveniente da soia che codifica un inibitore triptico tipo Bowman-Birk) sono in grado di inibire la tripsina pancreatica bovina e l'attività tripsino-simile dell'in-

setto fitofago con un'efficacia 4 volte superiore a quella degli estratti di controllo; estratti di piante T₃ (cv. Riogrande) trasformate con il gene *KTI3* (gene proveniente da soia che codifica un inibitore triptico tipo Kunitz) sono in grado di inibire la tripsina bovina e l'attività tripsino-simile dell'insetto con un'efficacia 200 volte superiore a quella degli estratti di controllo; estratti fogliari di piante T₂ (cv. Riogrande) transgeniche per il gene *AtCys* (gene proveniente da *Arabidopsis*, codificante un inibitore cistatinico) sono in grado di inibire la papaina commerciale e l'attività cistein-proteinasi dell'insetto con un'efficacia 4 volte superiore a quella degli estratti di controllo. Sulla base dei dati ottenuti si ritiene interessante, sia sul piano speculativo che su quello delle possibili applicazioni, l'utilizzo di tali piante transgeniche per verificare *in vivo* l'effettiva azione sulla mortalità e/o sull'attività riproduttiva del notturno *H. armigera*, particolarmente dannoso per la coltura del pomodoro.

Questa ricerca è stata realizzata, in parte, grazie ad un finanziamento MURST (Cofin 2002) al prof. E. POERIO.

BIBLIOGRAFIA

- APPLEBAUM S.W., 1985 - *Biochemistry of digestion*. In: *Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Kerkut G.A., Gilbert L.I. (eds), Pergamon, New York, 4: 279-311.
- BOWN D.P., WILKINSON H.S., GATEHOUSE J.A., 1997 - *Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytopagous insect pest, Helicoverpa armigera, are members of complex multigene families*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 625-638.
- BRADFORD M., 1976 - *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. - *Anal. Biochem.*, 72: 248.
- DOW J.A.T., 1984 - *Extremely high pH in biological system: a mode for carbonate transport*. - *American Journal of Physiology*. 246: 633-636.
- DOW J.A.T., 1992 - *pH gradients in the Lepidopteran midgut*. - *J. Exp. Biol.*, 172: 355-375.
- GRANDI G., 1951 - *Introduzione allo studio dell'entomologia*. Ed. Agricole, Bologna, Vol. 2 (Endopteri-goti).
- HUMMEL B.C.W., 1959 - *A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin*. - *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 1393.
- LENZ C.J., KANG J., RICE W.C., MCINTOSH A.H., CHIPPENDALE G.M., SCHUBERT K.R., 1991 - *Digestive proteinases of larvae of the corn earworm, Heliothis zea: characterization, distribution and dietary relationships*. - *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 16: 201-212.
- MANJUNATH T.M., BHATNAGAR V.S., PAWAR C.S., SITANATHAM S., 1989 - In: *Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis: Increasing the Effectiveness of Natural Enemies*; King EG, Jackson RD (eds), New Delhi: 196-228.
- MATTHEWS M., 1991 - *Classification of the Heliothinae*. NRI Bulletin No. 44, Chatham, Kent: Natural Resources Institute.
- 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 proteinases explains polyphagous nature of the insect pest*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 453-464.
- POLLINI A., 1998 - *Manuale di Entomologia Applicata*. Ed agricole, Bologna: pp. 1462.
- SCHETTINO M., CACCIA R., TESTA G., SORESSI G.P., 1998 - *Piante di pomodoro transgeniche per l'inibitore di proteasi kunitz, finalizzate al controllo dell'Helicoverpa armigera*. - *Atti IV Giornate Scientifiche S.O.I.*, Sanremo 1-3 Aprile 1998: 505-506.
- TERRA W.R., FERRIERA C., 1994 - *Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function*. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B: 1-62.
- TREMBLAY E., 1990 - *Entomologia Applicata*. Liguori Editore, vol. 2: pp. 381.
- ZHAO Y., BOTELLA M.A., SUBRAMANIAN L., NIU X., NIELSEN S.S., BRESSAN R.A., HASEGAWA P.M., 1996 - *Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog*. - *Plant Physiol.*, 111: 1299-1306.

Autore referente: Elia Poerio Dip. ABAC, Università della Tuscia di Viterbo, Via S. Camillo de Lellis s.n.c., 01100 Viterbo; e-mail: poerio@unitus.it.