

STEFANO SPERANZA<sup>1</sup>, VALENTINA FONZO<sup>2</sup>, GIAN PIERO SORESSI<sup>2</sup>,  
CLAUDIO PUCCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Protezione delle Piante, Sezione di Entomologia, Università della Tuscia di Viterbo

<sup>2</sup> Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Sezione di Genetica,  
Università degli Studi della Tuscia di Viterbo

## **Biosaggi plurigenerazionali sull'*Helicoverpa armigera* (Hüb.) (Lepidoptera Noctuidae) alimentata con foglie di pomodoro transgenico per il gene *KTI3* (Kunitz)**

*Bioassays on consecutive generations of Helicoverpa armigera* (Hüb.) (Lepidoptera Noctuidae) fed with *KTI3* (Kunitz) transgenic tomato leaves - *H. armigera* is, together with aphids, one of the industrial tomato key insects in central Italy. Its trophic action causes a decrease in the marketable production with high social costs for the agricultural operators. The aim of the present work was to perform a bioassay on the cotton bollworm, feeding the larva with Kunitz proteinase inhibitor coded by the *KTI3* gene transgenic plant leaves. The molecules belonging to the Kunitz family have a molecular weight of 21-24 kDa and inhibit the serine proteinase, resulting active in the pH interval 9-11, that is the distinctive interval of Lepidoptera larva midgut. Riogrande cultivar tomato plants were transformed with the *KTI3* gene through *Agrobacterium tumefaciens*. The analysis of the data obtained and their elaboration show a direct effect (negative) on the Lepidoptera biology, particularly in the second generation; this result could have, in the future, a direct containment action of the phytophagous populations in nature, causing a relevant decrease of the marketable production cull percentage.

*Key words:* bioassay, transgenic plants, tomato, proteinase inhibitor, Kunitz.

Gli effetti negativi sugli agroecosistemi indotti dalle varie molecole di sintesi, utilizzate nel controllo delle popolazioni di insetti infestanti, hanno spinto la ricerca a individuare metodologie innovative per il controllo di questi fitofagi. Una promettente metodologia sono lo sviluppo e l'utilizzo di piante autonomamente resistenti o tolleranti agli attacchi dei fitofagi. L'ingegneria genetica di concerto con biologi, botanici, biochimici, entomologi e patologi, seppur con discrete incertezze scientifiche, è riuscita a sviluppare piante transgeniche di rilevante interesse agronomico. In questo ambito, oltre all'introduzione di geni derivati dal *Bacillus thuringiensis* (FISCHOFF *et al.*, 1987; MCPHERSON *et al.*, 1989; PERLAK *et al.*, 1990; VAECK *et al.*, 1987), più recentemente, sono state effettuate ricerche connesse con l'introduzione di geni che codificano per sostanze, già presenti in molte piante, quali inibitori di enzimi proteolitici, inibitori delle amilasi e lecitine (BOULTER *et al.*, 1990; DUCK & EVOLA, 1999; SHADE *et al.*, 1994) in grado di conferire resistenza ai fitofagi. Tali piante transgeniche, però, oltre a saggi biomolecolari, devono essere sottoposte a biosaggi con l'organismo bersaglio per valutarne l'efficacia. Questo lavoro ha lo scopo di valutare l'effetto di biosaggi plurigenerazionali sul lepidottero nottuido *Helicoverpa armigera* (Hüb.) alimentato con piante di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) transgeniche per l'inibitore di proteasi tipo Kunitz.

Il nottuido presenta le ali anteriori di 3,5- 4 cm di apertura, di colore giallastro tendente, nella femmina, all'arancione e nel maschio al grigio verdastro. Sul margine delle ali anteriori sono presenti 6-8 piccole macchie scure che formano una banda trasversale. Le ali posteriori sono di colore grigio chiaro con un'ampia fascia marginale scura ed una macchietta bruna quasi alla base. Le antenne sono ricoperte da una leggera peluria (DOMINGUEZ

GARCIA-TEJERO, 1957; HARDWICK, 1965; CAYROL, 1972; DELATTE, 1973; TREMBLAY, 1990; KING, 1994). L'uovo, di forma sferoidale di diametro di 0,4-0,6 mm circa, appena deposto appare bianco giallastro brillante per poi virare in parte al rossiccio e quindi diventare, alla schiusa, di colore scuro. Le larve di prima e seconda età sono bianco-giallastre con il capo, la placca pronotale, lo scudo anale, le zampe e le verruche pilifere di colore nero. Le larve mature, di circa 30-40 mm di lunghezza, presentano il capo e lo scudo pronotale castani con sottili bande dorsali scure affiancate da bande chiare. Sono caratteristiche le due bande laterali chiare in cui spiccano gli stigmi scuri. La colorazione è molto variabile, dal verdastro, giallo-paglia al roseo, rossastro e marrone. La crisalide ha una lunghezza di 2 cm circa, è di colore dapprima verdastro poi, a completo disseccamento del tegumento, di colore castano-mogano. Nella crisalide l'esame della zona delle aperture genitali consente l'immediata discriminazione dei sessi.

*H. armigera* è un insetto cosmopolita tra i più dannosi nelle aree tropicali e subtropicali (WU *et al.*, 1997). Può attaccare più di 180 specie vegetali (GRANDI, 1951; MANJANUTH *et al.*, 1989; TREMBLAY, 1990; MATTHEWS, 1991; BOWN *et al.*, 1997; POLLINI, 1998; PATANKAR *et al.*, 2001). In Italia sverna da crisalide, gli adulti compaiono in aprile maggio e sono presenti fino ad ottobre anche per l'effetto di lunghe migrazioni. Gli adulti volano anche durante il giorno nutrendosi di nettare e succo di frutti (PARENZAN, 1994). Le femmine depongono da 300 a 2700 uova (max 4394 per femmina), in modo isolato o in gruppetti di pochi elementi, su ogni parte della pianta inclusi fiori e frutti. Le larve attaccano i boccioli fiorali, le foglie e le bacche, svolgendo la loro azione trofica preferenzialmente in modo endofitico. Le larve, anche neonate, dimostrano tendenze aggressive, spesso sono dedite al cannibalismo, da cui il nome di armigera. I danni più gravi si verificano a carico delle parti riproduttive di cui le larve preferenzialmente si alimentano. Compie l'intero ciclo biologico in poco più di un mese con incrisalidamento sempre nel terreno ad una profondità che varia a seconda della natura del suolo (da 2,5 a 17,5 cm). In Italia compie 2-4 generazioni annue (TREMBLAY, 1990) con dannosità crescente dalla prima all'ultima e pertanto in questo studio il protocollo sperimentale ha previsto lo svolgimento di biosaggi plurigenerazionali valutando nel tempo la risposta del fitofago nei confronti dell'inibitore di proteinasi.

## MATERIALI E METODI

È stata effettuata la trasformazione genetica della cultivar di pomodoro Riogrande (RIG) applicando le procedure e i protocolli di rigenerazione da cotiledone e cocoltivazione *in vitro* con *Agrobacterium tumefaciens*. Le piante transgeniche rigenerate sono state micro-propagate e mantenute *in vitro* ed è stata eseguita la caratterizzazione a livello molecolare, a livello proteico, per evidenziare la presenza del transgene e la sua espressione. Le piante transgeniche, allevate e riprodotte in ambiente confinato nel rispetto delle norme vigenti, sono state caratterizzate anche dal punto di vista citologico, morfologico e fenologico, per la selezione di solo individui diploidi e fertili. Tra le linee transgeniche, omozigoti per il gene di interesse KT13, è stata scelta la MS498 caratterizzata da un elevato livello di espressione della proteina eterologa. Le piante della linea selezionata sono state allevate in serra unitamente a quelle di controllo (cv Riogrande) utilizzandone le foglie per i previsti biosaggi *in vivo* con le larve del fitofago.

Il biosaggio ha previsto lo svolgimento di due generazioni consecutive di *H. armigera* sempre alimentate con foglie dei medesimi genotipi di pomodoro (transgenico e di testimone) in ambiente termocondizionato (27°C ±1°C).

Le larve neonate provenivano dall'allevamento del Dipartimento di Protezione delle Piante dell'Università della Tuscia. Dalla coorte iniziale, sono state prelevate a caso 64 larve distintamente per ciascuna delle due tesi (testimone e MS498) poste, singolarmente, nei "pozzetti" di allevamento di contenitori multicella ed alimentati *ad libitum* con porzioni di foglie, prelevate da piante omogenee per età, appartenenti ad individui transgenici per la coorte di seguito definita MS498 e non transgenici per la coorte di seguito definita RIG. Ogni due giorni si è provveduto all'eliminazione delle deiezioni, alla sterilizzazione con alcool etilico del pozzetto di allevamento, alla registrazione del peso e dell'eventuale morte di ogni singola larva. All'incrisalidamento si è proceduto al rilevamento dei parametri morfometrici ed al sessaggio. Delle crisalidi, mantenute sempre distinte le une dalle altre, è stata annotata la data di sfarfallamento. Gli adulti sono stati prelevati e posti a coppie (maschio e femmina) in cellette di accoppiamento appositamente predisposte. Alle singole coppie è stata somministrata *ad libitum* una soluzione idrozuccherina liquida. Da ogni coppia sono state conteggiate le uova deposte e schiuse. All'inizio della schiusa si è provveduto giornalmente al prelievo delle larve neonate, poste singolarmente in provetta contenente la dieta artificiale, etichettata con data di schiusa, distintamente per i genotipi transgenici e testimone.

Dal gruppo delle larve provenienti dagli accoppiamenti degli adulti ottenuti nella prima generazione sono stati prelevati a caso, sempre distintamente per genotipo, 64 individui per tesi, realizzando il biosaggio con la stessa metodologia adottata per la prima generazione.

## RISULTATI

Nella figura 1 si evidenzia la mortalità media cumulata, delle due coorti di fitofagi a confronto, fino allo sfarfallamento, durante la prima generazione. I dati ottenuti non mostrano significative differenze nelle mortalità delle coorti.

La figura 2 mostra l'andamento della mortalità media cumulata fino allo sfarfallamento, durante i biosaggi di seconda generazione. In questo caso, si nota una netta differenza tra le coorti. In particolare durante la fase di incrisalidamento la coorte MS498 al 16° giorno di vita presenta già una mortalità di oltre il 71%, contro quella riscontrata per la coorte RIG che raggiunge solo il 31%. La mortalità media cumulata finale, per tutti gli stadi preimmaginali, sale ad oltre l'81% nella coorte MS498 mentre nella popolazione RIG si ferma al 46%.

La figura 3 mette in evidenza, per coorte e per generazione, la mortalità complessiva considerando tutti gli stadi preimmaginali, il numero di adulti sfarfallati, il numero di uova schiuse e non schiuse. Data l'elevata differenza dei valori numerici tra gli istogrammi si è preferito utilizzare una scala logaritmica. Per il testimone, non si notano differenze significative nel numero di individui morti tra le due generazioni. Per la coorte MS498 il numero di individui morti durante la seconda generazione è significativamente superiore rispetto alla sua prima generazione e alle due generazioni della coorte RIG. Differenze numericamente evidenti si riscontrano nella vitalità delle uova deposte (uova schiuse); in particolare si fa rilevare la completa assenza di schiusa delle uova della coorte MS498 nella seconda generazione.

## CONCLUSIONI

I dati ottenuti, elaborati statisticamente per la valutazione del rischio relativo di mortalità, evidenziano una netta influenza negativa dell'inibitore di proteinasi sulla vitalità degli

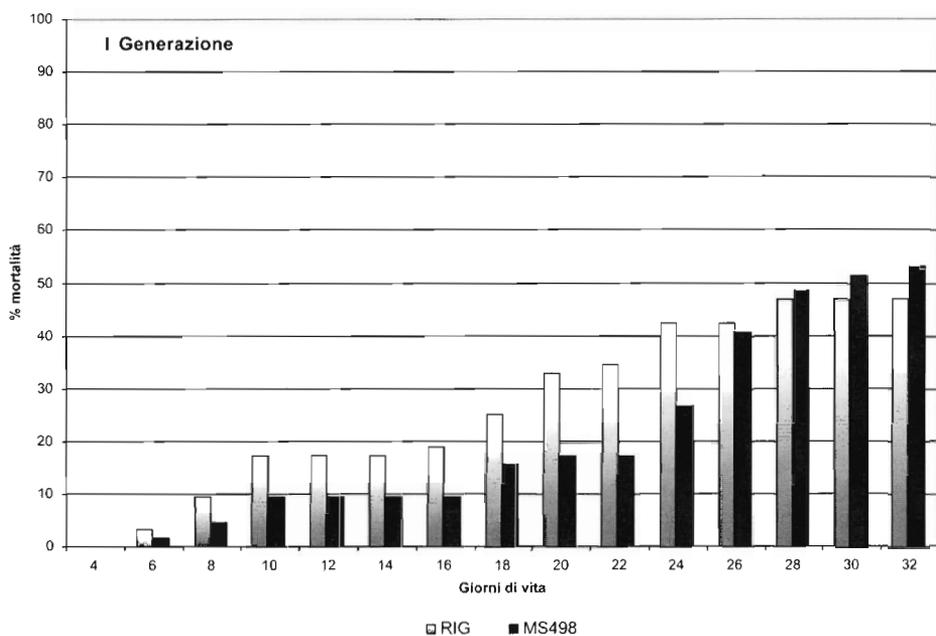


Fig. 1 - Andamento della mortalità delle coorti di *H. armigera*, a confronto durante i biosaggi di prima generazione.

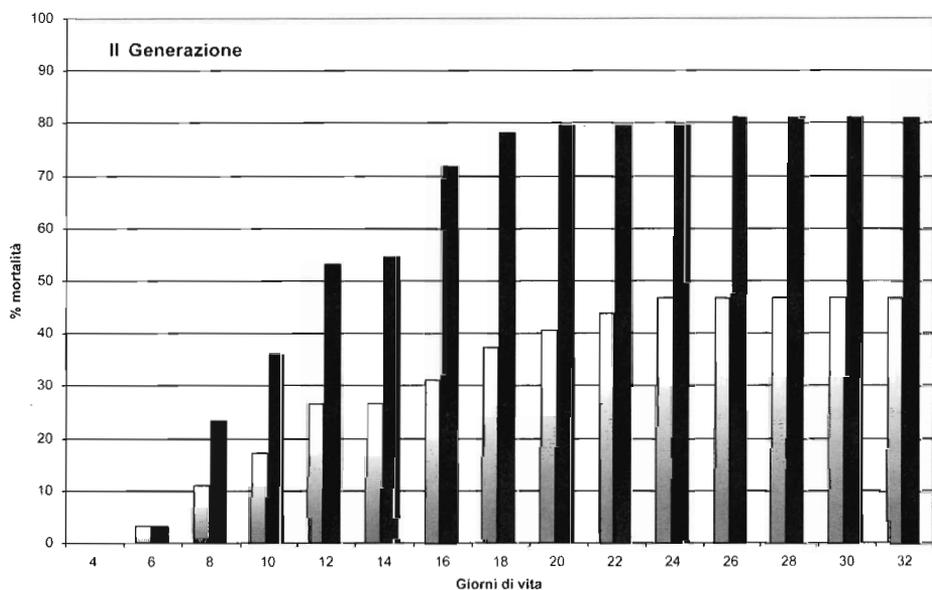


Fig. 2 - Andamento della mortalità delle coorti di *H. armigera*, a confronto durante i biosaggi di seconda generazione.

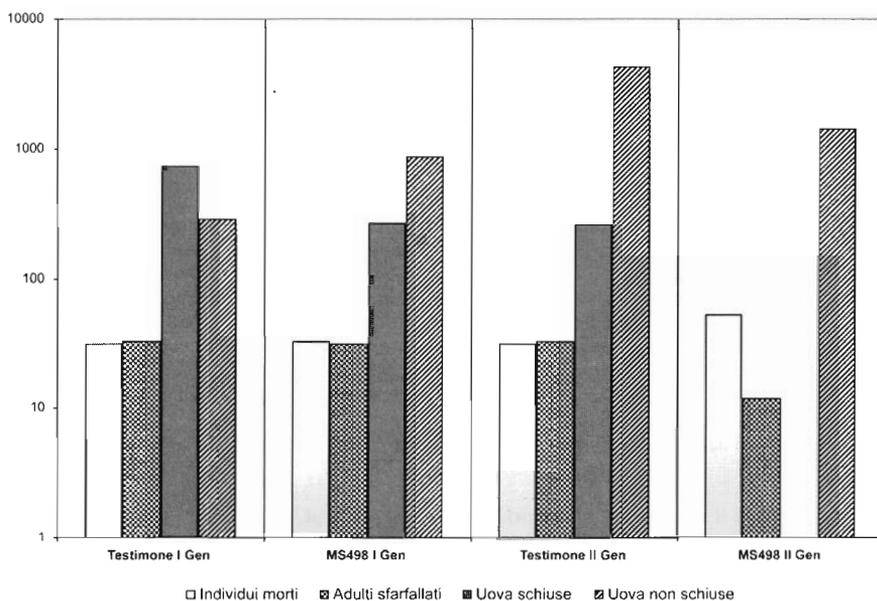


Fig. 3 - Mortalità complessiva degli stadi preimmaginali, numero di adulti sfarfallati, numero di uova schiuse e non schiuse, per coorte e per generazione.

stadi preimmaginali e sulla fertilità degli adulti, in seconda generazione. In particolare risulta altamente significativo il confronto tra il numero complessivo di individui morti della coorte MS498 di seconda generazione e quello della coorte RIG sempre in seconda generazione ( $P=0,0002$ ) con un rischio relativo di mortalità 2,35 volte superiore; confrontando per il medesimo carattere il valore della coorte MS498 durante la prima generazione, il rischio relativo di mortalità è ancora 2,19 di volte superiore ( $P=0,0007$ ). Differenze altamente significative si evidenziano analizzando i dati sulla vitalità delle uova, dove è determinante la completa non schiusa delle uova della coorte MS498 in seconda generazione. Questa assenza di vitalità delle uova di MS498 in seconda generazione comporta, nei confronti con le uova non schiuse delle altre coorti in prima e seconda generazione, un valore di  $P < 0,0001$  con un rischio relativo di mortalità delle uova definibile con il valore 8.

## DISCUSSIONE

L'attività descritta e i dati ottenuti mostrano innanzi tutto la fondamentale importanza della conoscenza della bioetologia dei fitofagi quando si realizzano biosaggi con piante transgeniche. L'utilizzo del biosaggio plurigenerazionale ha permesso di evidenziare risultanze biologiche non facilmente riscontrabili in biosaggi a generazione singola. L'utilizzo del genotipo di pomodoro KTI3 transgenico (MS498) con *H. armigera* ha dimostrato, più che un effetto diretto sulla mortalità degli individui durante le due generazioni, un'influenza negativa sulla possibilità per il nottuido di proseguire con eguale efficienza riproduttiva nelle successive generazioni. L'assenza di vitalità di tutte le uova della coorte MS498 di seconda generazione deve essere oggetto di ulteriori studi per evidenziare se l'azione del suddetto inibitore di proteinasi agisce sulla spermatogenesi e/o oogenesi oppure durante l'embrio-

genesi. È noto, tra l'altro, che le proteinasi dell'uovo giocano un ruolo essenziale nell'embrionogenesi, permettendo la degradazione delle proteine del tuorlo in aminoacidi necessari per lo sviluppo dell'embrione (XIAO-FAN *et al.*, 1998).

## RIASSUNTO

La *H. armigera* è insieme agli afidi uno degli insetti chiave del pomodoro da industria nel centro Italia. La sua azione trofica determina una riduzione della produzione vendibile con alti costi sociali per gli operatori agricoli. Scopo del presente lavoro è stato quello di effettuare un biosaggio sulla nottua gialla del pomodoro, alimentando le larve con foglie di piante transgeniche per l'inibitore di proteinasi Kunitz codificato dal gene *KTI3*. Le molecole appartenenti alla famiglia Kunitz hanno un peso molecolare di 21-24 kDa ed inibiscono le serin proteinasi, risultando attive nell'intervallo di pH 9-11, corrispondente a quello caratteristico del mesenteron delle larve di lepidotteri. Piante di pomodoro della cv. Riogrande sono state trasformate con il gene *KTI3* mediante l'*Agrobacterium tumefaciens*. Dall'analisi dei dati ottenuti e dalla loro elaborazione statistica si evince un diretto effetto negativo sul ciclo biologico del lepidottero specialmente in seconda generazione. La possibile applicazione di questi risultati potrebbe portare, in futuro, ad una diretta azione di contenimento delle popolazioni del fitofago con un relativo decremento della percentuale di scarto del prodotto vendibile.

Lavoro svolto con il contributo finanziario R.S.A. 2003 del Prof. C. Pucci.

## BIBLIOGRAFIA

- 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.
- CAYROL R.A., 1972 - *Famille des Noctuidae. Sous-famille des Melicleptriinae*. *Helicoverpa armigera* Hb. In: Entomologie appliquée à l'agriculture, Balachowsky A.S. Ed., Masson et Cie, Paris, France, 2: 1431-1444.
- DELATTE R., 1973 - *Parasites et maladies en culture cotonnière*. - Manuel Phytosanitaire, Division de Documentation, IRCT: 73-78.
- DOMINGUEZ GARCIA-TEJERO F., 1957 - *Bollworm of tomato, Heliothis armigera* Hb. (= *absoluta* F.). In: Plagas y Enfermedades de las Plantas Cultivadas, Dossat S.A. Ed., Madrid, Spain: 403-407.
- DUCK N., EVOLA S., 1999 - *Use of Transgenes to Increase Host Plant Resistance to Insects: Opportunities and Challenges*. - Advances Insect Control: 1-20.
- FISCHOFF D.A., BOWDISH K.S., PERLAK F.J., MARRONE P.G., MCCORMICK S.M., NIEDERMEYER J.G., DEAN D.A., KUSANO-KRETZMER K., MAYER E.J., ROCHESTER D.E., ROGERS S.G., FRALEY R.T., 1987 - *Insect tolerant transgenic tomato plants*. - Bio/Technology, 5: 807-813.
- GRANDI G., 1951 - *Introduzione allo studio dell'entomologia*. Edizioni Agricole Bologna, Vol. 2, Endopterigoti.
- HARDWICK D.F., 1965 - *The corn earworm complex*. - Memoirs of the Entomological Society of Canada, 40: 1-247.
- KING A.B.S., 1994 - *Heliothis/Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). In: Insect Pests of Cotton, Matthews G.A. & Tunstall J.P. (Eds), Wallingford, UK. CAB International, Wallingford: 39-106.
- MANJANATH 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: Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis: Increasing the Effectiveness of Natural Enemies, King E.G. & Jackson R.D. Eds, November 1985, 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: 51.

- PARENZAN P., 1994 - *Noctue*. 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 Biochem. Mol. Biol.*, 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, Bologna: pp. 1462.
- 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  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles*. - *Bio/tecnology*, 12: 793-796.
- TREMBLAY E., 1990 - *Entomologia applicata*. Liguori Editore, Vol. 2.2: pp. 381.
- VAECK M., REYNAERTS A., HOFTE H., JANSSENS 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.
- 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.
- XIAO-FAN ZHAO, JIN-XING WANG, YIN-CHANG WANG, 1998 - *Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, Helicoverpa armigera*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 259-264.

**Autore referente:** Stefano Speranza, Dipartimento di Protezione delle Piante, Università della Tuscia, Viterbo, Via S. Camillo de Lellis s.n.c., 01100 Viterbo; e-mail: speranza@unitus.it.