



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
119° (2001), Vol. XXV, pp. 511-524

FRANCESCO PENNACCHIO¹ – ERMENEGILDO TREMBLAY²
ANTONIO TRANFAGLIA¹ – FERDINANDO BIN³
ROSA RAO⁴ – CARLA MALVA⁵

Biotecnologie per il controllo degli insetti fitofagi⁶

INTRODUZIONE

Una considerevole parte della produzione agricola mondiale viene distrutta o resa inutilizzabile da parassiti e patogeni. Fra questi agenti dannosi, gli artropodi sono responsabili di perdite, sia in campo che in magazzino, che oscillano fra il 25 e il 50% della produzione totale (Naylor e Ehrlich, 1997). Negli ultimi 50 anni, per far fronte a queste considerevoli perdite, si è ampiamente ricorso all'uso degli insetticidi di sintesi (Pimentel *et al.*, 1993). I ben noti problemi di inquinamento ambientale, di salute pubblica e di profonda alterazione degli equilibri ecologici derivanti dall'abuso di queste sostanze hanno fortemente stimolato lo sviluppo di tecniche alternative di controllo degli insetti dannosi. Riesaminando la storia della difesa delle piante dagli organismi animali dannosi, si passa da un iniziale approccio di tipo puramente chimico ad un crescente impiego del mezzo biologico o di strategie a ridotto impatto, basate su conoscenze ecologiche, comportamentali e fisiologiche degli artropodi (Tremblay, 1993).

¹ Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università della Basilicata, Macchia Romana, 85100 Potenza – e-mail: pennacchio@unibas.it

² Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria, Università di Napoli «Federico II», Via Università 100, 80055 Portici (NA).

³ Dipartimento di Arboricoltura e Protezione delle Piante, Università di Perugia, Borgo XX Giugno, 06121 Perugia.

⁴ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente, Università di Napoli «Federico II», Via Università 100, 80055 Portici (NA).

⁵ Istituto di Genetica e Biofisica, CNR, Via P. Castellino 111, 80131 Napoli.

⁶ Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

Il *controllo integrato*, ovvero l'uso di tutti i mezzi possibili, nel rispetto di principi ecologici, tossicologici ed economici (Viggiani, 1997), sempre più orientato verso l'uso del mezzo biologico, quando possibile, è senza dubbio la strategia più efficace e realistica di contenimento delle popolazioni degli insetti dannosi in agricoltura. Questa articolata e complessa visione della difesa fitosanitaria è maturata nella consapevolezza, generata dall'esperienza, che la «soluzione panacea» non esiste e che nessuna innovazione tecnologica, anche la più valida, può essere la soluzione unica e definitiva per il controllo degli insetti dannosi. L'eradicazione di questi organismi, basata sull'uso di un unico mezzo, è un'impresa in molti casi difficile, se non impossibile, e tentativi miopi in questa direzione risultano, nel complesso, dannosi, sia dal punto di vista ecologico che economico.

In questa logica generale, che si è andata sempre più consolidando negli ultimi decenni, vanno inquadrare tutte le innovazioni nel campo della difesa delle piante contro gli insetti, incluse le più moderne biotecnologie, nuovo e potente strumento il cui uso corretto può offrire dei notevoli vantaggi. Le biotecnologie, pertanto, semplicemente allargano il novero degli strumenti e delle strategie utilizzabili per lo sviluppo di piani di controllo integrato, che devono essere sempre definiti puntando ad un aumento della sostenibilità ed eco-compatibilità della difesa fitosanitaria.

Il campo delle biotecnologie applicate al controllo degli insetti fitofagi è talora definito in modo soggettivamente così ampio da poter includere, paradossalmente, anche lo stesso uso degli insetticidi di sintesi. Senza entrare in pur utili disquisizioni semantiche, *per biotecnologie finalizzate al controllo degli insetti fitofagi, così come trattate in questa sintesi, si intendono tutte quelle tecnologie che in fase di sviluppo e/o applicazione si basano su tecniche e conoscenze a livello molecolare di fisiologia, sviluppo, riproduzione e comportamento degli insetti e dei meccanismi che regolano le loro relazioni simbiotiche con altri organismi.*

Il presente lavoro è una breve introduzione alle innovazioni già esistenti nel campo delle biotecnologie per il controllo degli insetti fitofagi, e pone particolare attenzione alle strategie che la ricerca scientifica sta seguendo o dovrebbe seguire per una loro efficace integrazione in metodi razionali di difesa delle piante e per lo sviluppo di nuove biotecnologie aventi tale prerogativa.

LE PIANTE TRANSGENICHE RESISTENTI AD INSETTI

Le piante transgeniche resistenti ad insetti sono state una delle prime applicazioni biotecnologiche in agricoltura. Piante di cotone esprimenti un gene derivato dal batterio entomopatogeno *Bacillus thuringiensis* (Bt) sono state messe in campo nell'estate del 1996, negli Stati Uniti d'America (James, 2001). La diffusione a livello mondiale delle piante transgeniche, nella maggioranza dei casi resistenti ad insetti e erbicidi, ha interessato, nel 2000, 44 milioni di ettari in 13 paesi (James, 2001), evidenziando una crescente domanda di innovazione biotecnologica, soprattutto da parte dell'agricoltura del Nord America (Fernandez-Cornejo e Mc Bride, 2000).

Lo sviluppo di queste piante è stato realizzato puntando ad esaltare l'efficienza di espressione dei domini biologicamente attivi di una tossina batterica prodotta dal *Bacillus thuringiensis*, fino ad arrivare a livelli di attività insetticida notevoli, nei confronti soprattutto di Lepidotteri e Coleotteri, attraverso la costruzione di geni parzialmente o totalmente sintetici, in grado di aumentare l'efficienza di espressione in pianta (Mazier *et al.*, 1997). Attraverso questa strategia si è passati da un livello di espressione molto basso, inferiore allo 0.001% delle proteine fogliari solubili, al 3-5%, con l'espressione in cloroplasto (Mc Bride *et al.*, 1995). L'elevato livello di espressione di una sostanza insetticida in pianta genera una forte pressione selettiva nei confronti delle popolazioni naturali di insetti, aumentando la probabilità di selezione di ceppi resistenti (Gould, 1994; 1998). Una tale evenienza limita l'utilizzabilità non solo delle piante resistenti ma anche dei formulati commerciali di Bt. La consapevolezza di queste problematiche, facilmente prevedibili sulla base dell'esperienza pregressa sull'uso massiccio e continuato di insetticidi di sintesi, ha stimolato numerosi studi sulla prevenzione e gestione della resistenza (Gould, 1998). Le stesse ditte produttrici di piante transgeniche e le associazioni di produttori negli USA già da tempo suggeriscono metodi di coltivazione miranti a ridurre la pressione selettiva nei confronti dei fitofagi, attraverso l'impiego di aree rifugio o la semina di genotipi resistenti diversi, contemporaneamente o in sequenza, in una sorta di consociazione o rotazione genetica (Gould, 1998; Jouanin *et al.*, 1998). A queste strategie di campo si affiancano scelte oculate di geni diversi da introdurre nello stesso soggetto, cercando di diversificarne le sue capacità di resistenza, e di opportune strategie di espressione (alta o bassa), scegliendo promotori tessuto-specifici e/o inducibili da ferita (Jouanin *et al.*, 1998). L'attuale tendenza, non completamente suffragata da evidenze sperimentali, è quella di ricorrere all'utilizzo di piante caratterizzate da elevati livelli di espressione del transgene, unitamente all'impiego di aree rifugio, dove la presenza di piante suscettibili dovrebbe arginare la diffusione nella popolazione del fitofago degli alleli di resistenza (Gould, 1998; Jouanin *et al.*, 1998).

Sono necessari ulteriori sforzi di ricerca, sia pubblica che privata, per definire nuove ed efficaci strategie di sviluppo ed uso delle piante transgeniche, al fine di preservarle e potenziare il loro inserimento in piani di controllo integrato. A tale scopo, sono di essenziale importanza studi miranti a quantificare l'impatto delle piante transgeniche su organismi non-bersaglio, particolarmente su insetti utili, quali impollinatori (Malone e Pham-Delegue, 2001) e nemici naturali (Schuler *et al.*, 1999; Lozzia, 1999). Sono ancora troppo esigue le informazioni su questi argomenti, peraltro spesso generate da metodi di studio non ancora standardizzati a sufficienza, in grado di produrre dati comparabili.

Queste prime applicazioni biotecnologiche diffuse sul mercato consentono di apprezzare sia le potenzialità offerte dalle piante transgeniche resistenti ad insetti sia l'esigenza di integrare razionalmente questa biotecnologia in strategie articolate, a basso impatto ambientale e tossicologico. Uno dei principi ispiratori del controllo integrato, ovvero la massima selettività dell'intervento, al fine di ridurre al minimo

gli effetti su organismi non-bersaglio e i conseguenti squilibri ecologici che ne possono derivare, deve essere tenuto in massima considerazione anche nel caso delle biotecnologie per il controllo degli insetti fitofagi. Pertanto, aspetti particolarmente importanti, sia per la gestione di eventuali fenomeni di resistenza che per lo sviluppo di nuove biotecnologie sostenibili di controllo degli insetti, sono la possibilità di disporre di un maggior numero di molecole ad attività insetticida, caratterizzate da elevata selettività primaria (i.e. fisiologica), e di strategie di espressione o immissione nell'ambiente in grado di assicurare un elevato livello di selettività secondaria (i.e. sincronizzazione spazio-temporale della molecola con il suo bersaglio).

GENI E MOLECOLE AD ATTIVITÀ INSETTICIDA DI INTERESSE BIOTECNOLOGICO

Lo sviluppo di nuove applicazioni biotecnologiche è fortemente condizionato dalla disponibilità di nuovi geni e molecole ad attività insetticida. Gli approcci perseguibili per il loro isolamento sono riconducibili a due principali alternative: (a) *lo studio delle basi molecolari delle interazioni antagonistiche insetti-altri organismi e microrganismi, finalizzato all'isolamento delle molecole e dei geni che regolano meccanismi di alterazione fisiologica negli insetti fitofagi*; (b) *lo studio dei meccanismi fisiologici e molecolari delle numerose funzioni vitali controllate da peptidi ad azione ormonale, al fine di cercare di alterare in modo mirato il loro titolo e/o metabolismo*. Entrambe queste strategie, in linea di principio, dovrebbero assicurare l'identificazione di molecole caratterizzate da un elevato livello di selettività primaria, data la notevole specificità dei fenomeni considerati.

Lo studio delle interazioni insetti-altri organismi è senza dubbio l'approccio più diffuso, e un rapido sguardo alla letteratura scientifica mostra l'esistenza di numerose attività di ricerca in questo ambito (Binnington e Baule, 1993). Una pur superficiale trattazione di quanto fatto finora andrebbe ben oltre lo scopo di questa breve nota. Ci si limiterà, pertanto, a discutere brevemente alcuni casi molto noti o promettenti.

L'esempio più classico è quello del batterio entomopatogeno *B. thuringiensis*, isolato all'inizio del 1900 in Giappone, su cui è stata sviluppata una mole imponente di informazioni molecolari, base conoscitiva che ha consentito le prime applicazioni biotecnologiche per il controllo degli insetti. Altri microrganismi e funghi, entomopatogeni e non, hanno fornito numerose molecole ad attività insetticida (Binnington e Baule, 1993). Studi recenti su tossine di un batterio simbiote di un nematode entomopatogeno sembrano essere particolarmente promettenti e potrebbero offrire una valida alternativa alle tossine Bt (Ffrench-Constant e Bowen, 1999; 2000).

Lo studio delle interazioni insetto-pianta ha consentito di definire complessi meccanismi coevolutivi che hanno portato all'isolamento di una cospicua serie di molecole e geni di piante, in grado di interferire con i processi digestivi e di assorbimento dei nutrienti degli insetti fitofagi (Felton e Gatehouse, 1996; Jouanin *et al.*, 1998). La pianta attaccata dal fitofago attiva, infatti, geni di difesa il cui ruolo è di

rallentare o impedire lo sviluppo dell'erbivoro secondo differenti vie di trasduzione del segnale, dipendenti dalle modalità di alimentazione del fitofago e dal tipo di danno da esso indotto (Walling, 2000). I geni di risposta al danneggiamento possono essere espressi sia localmente che sistemicamente. È stato dimostrato che la trasmissione sistemica del segnale è, in alcuni casi, opera di un piccolo peptide denominato sistemina, che si muove nella pianta attraverso il floema ed è biologicamente attivo a concentrazioni femtomolari (Ryan e Pierce, 2001). Infatti, piante transgeniche di pomodoro e di tabacco, che sovraesprimono la sistemina, esprimono costitutivamente i geni degli inibitori di proteasi ed inibiscono l'accrescimento di alcuni fitofagi (McGurl *et al.*, 1994; Rao, dati non pubblicati).

Lo sviluppo di queste conoscenze ha consentito la produzione di nuove piante transgeniche resistenti ad insetti, esprimenti inibitori di proteasi, di α -amilasi e lectine, mentre resta ancora non immediata la possibilità di manipolare il livello di metaboliti secondari ad attività insetticida (Carozzi e Koziel, 1997). L'adozione di queste molecole in nuove piante transgeniche deve affrontare problemi analoghi a quelli posti dalle tossine Bt, quali la resistenza o tolleranza derivante dalla capacità che gli insetti bersaglio hanno di adattarsi a diversi inibitori enzimatici di origine vegetale (Jongsma e Bolter, 1997; Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001), nonché problemi di tossicità nei confronti di vertebrati, uomo compreso (Czapla, 1997).

Le *simbiosi antagonistiche insetti-artropodi* sono un'ulteriore fonte di molecole ad attività insetticida estremamente interessanti, già utilizzate in alcune applicazioni biotecnologiche di controllo degli insetti, come nel caso delle neurotossine isolate da artropodi predatori, quali scorpioni e ragni, e da imenotteri ectoparassitoidi (Binnington e Baule, 1993; Tremblay, 1994; Inceoglu *et al.*, 2001). Gli insetti endoparassitoidi sono, spesso, capaci di regolare finemente la fisiologia dell'ospite, al fine di favorire lo sviluppo della propria progenie. Le principali alterazioni sono a carico del sistema immunitario, endocrino e riproduttivo dell'ospite, in modo da consentire la sopravvivenza degli stadi giovanili e di garantire loro un pabulum alimentare di elevato valore nutrizionale (Strand e Pech, 1995; Vinson *et al.*, 2001). Negli ultimi anni si è registrata una continua crescita degli studi molecolari finalizzati all'isolamento di geni di origine parassitaria a potenziale azione insetticida. Le secrezioni materne iniettate nell'ospite dalla femmina adulta del parassitoide al momento dell'ovideposizione, quali veleno (Digilio *et al.*, 2000) e peculiari forme virali simbiotiche (Polydnavirus) (Webb, 1998; Pennacchio *et al.*, 2000; 2001; Varricchio *et al.*, 1999; Falabella *et al.*, 2002) sono un vero e proprio concentrato di molecole e geni in grado di indurre profonde alterazioni fisiologiche negli insetti fitofagi. L'estrema specializzazione dei rapporti simbiotici che i parassitoidi endofagi instaurano con i loro ospiti sono garanzia che le molecole e i geni coinvolti nelle patologie da essi indotte sono caratterizzati da un buon livello di selettività primaria. In definitiva, tali studi offrono le informazioni necessarie per cercare di imitare strategie e meccanismi naturali di controllo degli insetti fitofagi, molto specifici, in quanto derivanti da lunghi processi di coevoluzione. L'enorme biodiversità generata da questi processi è un'importante risorsa naturale da studiare, utilizzare e proteggere.

I virus entomopatogeni possono offrire interessanti opportunità di isolamento di molecole interessanti per il controllo degli insetti. Molti baculovirus, ad esempio, sono in grado di produrre chitinasi e metalloproteasi, coinvolte nella degradazione della membrana peritrofica e del tegumento dell'ospite (Christian *et al.*, 1993). Tali enzimi possono essere utilizzati per aggredire la membrana peritrofica, sia per alterarne la normale funzionalità e i processi digestivi (Tellam, 1996), sia per facilitare il contatto con l'epitelio intestinale di agenti patogeni o di sostanze insetticide di natura peptidica-proteica, il cui assorbimento è indispensabile per raggiungere recettori a localizzazione emocelica (Christian *et al.*, 1993). Altre chitinasi prese in considerazione, con le stesse finalità, sono quelle prodotte dagli insetti (Kramer e Muthukrishnan, 1997).

Lo studio delle basi endocrine dello sviluppo e riproduzione degli insetti e dei due principali ormoni non-peptidici che le regolano, ecdisone e ormone giovanile, ha consentito, dopo molti anni, grandi progressi in campo tossicologico, culminati nella individuazione di nuove famiglie di molecole insetticide sintetiche in grado di alterare i delicati equilibri endocrini (Dhadialla *et al.*, 1998). Studi più recenti hanno portato a caratterizzare una serie enorme di peptidi ad azione ormonale, coinvolti nella regolazione di quasi tutti i processi fisiologici e comportamentali degli insetti (Predel e Eckert, 2000). Normalmente questi peptidi regolativi sono presenti a titoli funzionali bassissimi, la cui modificazione, diretta o attraverso l'alterazione del loro metabolismo e/o biosintesi, è in grado di ingenerare alterazioni letali dell'omeostasi fisiologica. Questa idea, più volte suggerita in passato su basi puramente speculative (Keeley e Hayes, 1987; Menn e Borkovec, 1989) ha oggi notevoli possibilità di applicazione, visti i notevoli progressi conoscitivi in campo fisiologico e biotecnologico (vedi paragrafo seguente).

La ricerca di nuovi geni per il contenimento degli insetti dovrebbe, in linea di principio generale, puntare anche su prodotti di espressione aventi una blanda attività insetticida. Tale caratteristica fornisce interessanti opportunità di integrazione di biotecnologie basate sull'uso di questi geni e di metodologie classiche di controllo integrato. Infatti, un'attività insetticida blanda comporta un minore impatto negativo nei confronti degli antagonisti naturali, aspetto, questo, di importanza non secondaria nella gestione razionale degli agroecosistemi (Schuler *et al.*, 1999; van Emden, 1999). Inoltre, sfruttando eventuali sinergie ed effetti additivi di geni a bassa attività insetticida, si possono ridurre anche i rischi di insorgenza della resistenza (Gould, 1998).

STRATEGIE DI SVILUPPO DI NUOVE BIOTECNOLOGIE PER IL CONTROLLO DEGLI INSETTI FITOFAGI

Gli organismi e i microrganismi vettori e le strategie di espressione di molecole ad attività insetticida vanno definiti puntando ad un'azione efficace, cercando di massimizzare la selettività secondaria delle molecole impiegate. La validità di un

metodo dipende in larga parte dalla scelta del vettore biologico di espressione, in funzione del tipo di molecola ad attività insetticida che si intende adottare. Fattori essenziali che determinano la scelta del vettore biologico più idoneo sono il comportamento alimentare della specie di insetto bersaglio e se il prodotto genico che deve essere utilizzato è tossico per via orale o meno. Il comportamento alimentare della specie bersaglio è anche importante per la scelta della strategia di espressione. Ad esempio, notevoli vantaggi in termini di selettività secondaria si possono raggiungere se l'espressione di un transgene in pianta è localizzata nei tessuti su cui si alimenta il fitofago e, se possibile, solo nel caso in cui esso sia presente. Ciò è tecnicamente possibile attraverso l'uso di promotori tessuto-specifici e inducibili da ferita (Jouanin *et al.*, 1998).

I vettori biologici più comunemente presi in considerazione per l'espressione di molecole ad attività insetticida sono *virus entomopatogeni*, *microrganismi e piante*. I virus sono idonei vettori per un ampio numero di geni, codificanti molecole attive sia in cavo intestinale sia nella cavità emocelica. Piante e batteri, invece, sono, in genere, ma non sempre, più idonei per molecole che hanno bersagli molecolari localizzati nella cavità intestinale e, pertanto, tossiche per via orale. Infatti, nella quasi totalità dei casi, le piante transgeniche sviluppate finora sono basate su sostanze insetticide aventi tale caratteristica (Carozzi e Koziel, 1997). Analogamente, interessanti nuovi biopesticidi batterici sono stati proposti, inserendo i geni delle tossine Bt in batteri non patogeni, epifiti o endofiti, o ubiquitari (Kaur, 2000).

I *baculovirus entomopatogeni* sono importanti agenti di controllo biologico, usati con successo in ambienti forestali e agrari (Mishra, 1998; Cross *et al.*, 1999). La considerevole selettività di questi virus li rende particolarmente interessanti dal punto di vista applicativo. Tuttavia, il loro uso è, in alcuni casi, limitato, poiché il tempo necessario per portare a morte l'ospite, soprattutto se usato su stadi di sviluppo avanzati, è abbastanza lungo, tale da rendere l'azione di controllo meno efficace e comparativamente più costosa di quella ottenibile con gli insetticidi (Christian *et al.*, 1993). Pertanto, la possibilità di esaltare la patogenicità dei baculovirus attraverso l'inserimento di geni ad attività insetticida, quali enzimi regolanti il metabolismo endocrino, peptidi ad azione ormonale, neurotossine e tossine Bt, ha fortemente stimolato lo sviluppo di baculovirus ricombinanti, il cui uso è, al momento, frenato dalle ridotte conoscenze sull'impatto ambientale che questa biotecnologia può avere (Richards *et al.*, 1998; Inceoglu *et al.*, 2001). I baculovirus entomopatogeni sono vettori biologici molto interessanti per diversi motivi e, in particolare, per la relativamente semplice manipolabilità del loro genoma e per la loro capacità di infettare le cellule intestinali e, successivamente, tutti gli altri tessuti del corpo. Questa caratteristica, infatti, rende possibile l'uso di un ampio numero di geni, codificanti molecole ad attività insetticida con bersagli molecolari presenti sia nel cavo intestinale che in quello emocelico, essendo il problema dell'assorbimento intestinale di macromolecole superato dalle caratteristiche biologiche del ciclo infettivo virale.

L'assorbimento intestinale di macromolecole proteiche e peptidiche è stato consi-

derato per lungo tempo pressoché nullo. Questa idea è risultata non vera in assoluto, e vi sono crescenti evidenze scientifiche che indicano la reale possibilità di assorbimento intestinale di macromolecole, sia negli insetti che nei vertebrati (Raina *et al.*, 1994; Bavoso *et al.*, 1995; Daugherty e Mrsny, 1999a; 1999b). L'effettiva capacità del tubo digerente degli insetti di assorbire peptidi e proteine non è stata studiata in vitro, benché dati di letteratura dimostrino che piccoli peptidi e proteine assunte da larve di lepidotteri con la dieta si ritrovano in misura determinabile nel liquido emocelico (Raina *et al.*, 1994; Bavoso *et al.*, 1995). In analogia con quanto osservato nell'intestino di mammifero, è ragionevole assumere che anche nell'insetto la via di passaggio di peptidi o proteine possa essere rappresentata, a seconda delle loro dimensioni, dalla via paracellulare o da quella transcitotica. Entrambe le vie richiedono di essere caratterizzate affinché sia possibile utilizzarle e potenziarle, come in mammifero (Madara, 1997; Daugherty e Mrsny, 1999a; 1999b), per rendere efficace la somministrazione orale di molecole a effetto insetticida nel cavo emocelico. Attività di ricerca in corso su questi aspetti consentiranno di sviluppare una base di conoscenze su cui definire strategie per incrementare la permeabilità intestinale di peptidi o proteine, modificando opportunamente la molecola o utilizzando specifici agenti permeabilizzanti, analogamente a come già fatto in campo farmacologico umano (Madara, 1997; Uchyama *et al.*, 1999; Futaki *et al.*, 2001).

La verifica della possibilità, anche ridotta, di assorbimento di peptidi nell'intestino di lepidotteri (Raina *et al.*, 1994; Bavoso *et al.*, 1995) e lo sviluppo di nuove biotecnologie vegetali in grado di consentire l'espressione in piante di geni sintetici codificanti piccoli peptidi (Rao *et al.*, 1996), hanno reso tecnicamente possibile l'uso di peptidi ormonali di insetti per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti ad insetti. Recentemente, infatti, sono state prodotte piante di tabacco transgeniche esprimenti un gene sintetico, codificante copie multiple di un peptide isolato dalla zanzara *Aedes aegypti* (TMOF-Trypsin Modulating Oostatic Factor), spaziate da residui di arginina, definiti siti di processamento endoproteolitico. Tali piante sono risultate in grado di rallentare significativamente crescita e sviluppo delle larve di un lepidottero notturno, determinandone anche un leggero aumento di mortalità (Tortiglione *et al.*, 2002).

Incrementare la permeabilità gastrica di peptidi in grado di interferire con la fisiologia degli insetti fitofagi non solo consente di allargare il numero dei geni utilizzabili in vettori biologici che rilasciano il prodotto di espressione nel cavo intestinale, ma anche di rendere attuabile la produzione di nuovi pesticidi ricombinanti, la cui distribuzione nell'ambiente avvenga attraverso tecniche di microincapsulamento in polimeri bioerodibili e/o in associazione ad altre molecole protettive e che ne esaltino la permeabilità transepiteliale (Binnington e Baule, 1993). Gli enormi progressi che si stanno continuamente registrando in analoghi settori nel campo farmacologico umano potrebbero fornire un notevole impulso a queste nuove biotecnologie di controllo degli insetti fitofagi.

BIOTECNOLOGIE PER POTENZIARE E MANIPOLARE I MECCANISMI DI DIFESA INDIRETTA DELLE PIANTE

Le piante sono continuamente aggredite da agenti biotici di varia natura e per potersi proteggere devono mettere in atto una serie di misure di difesa che siano in grado di bloccare l'attacco esterno con un costo metabolico ed energetico che non comprometta la loro vitalità e capacità riproduttiva. Il livello di flessibilità necessaria per centrare entrambi questi obiettivi è assicurato da diversi livelli di integrazione fra difese costitutive e difese indotte (Baldwin e Preston, 1999).

Limitandosi alle interazioni che gli organismi vegetali instaurano con gli insetti fitofagi, si rimane colpiti dalla complessità e diversità dei meccanismi molecolari che i processi co-evolutivi hanno generato. Un considerevole danno fogliare di un insetto con apparato boccale masticatore è completamente diverso da quello causato da insetti succhiatori, in termini di elicitori circolanti e di geni che da essi vengono attivati (Walling, 2000). Senza voler entrare nei dettagli molecolari affascinanti, e sempre più descritti con precisione (Ryan, 2000), di queste complesse interazioni insetto-pianta, possiamo, in termini generali, distinguere due tipi di risposta di difesa: diretta e indiretta.

La difesa diretta delle piante si concretizza con l'induzione di meccanismi biochimici in grado di interferire con l'alimentazione, il metabolismo, la crescita e la riproduzione dei fitofagi. Come già detto in precedenza, molte di queste molecole, quali inibitori di enzimi digestivi, enzimi antinutrizionali, lectine, metaboliti secondari con diversi tipi di attività insetticida ecc. (Felton e Gatehouse, 1996), sono state studiate approfonditamente e già utilizzate e/o proposte per l'utilizzo in diverse strategie di controllo degli insetti fitofagi, anche di tipo biotecnologico (Carozzi e Koziel, 1997).

La difesa indiretta delle piante deriva dalla loro capacità di produrre, in risposta all'attacco dei fitofagi, specifici metaboliti secondari volatili o alterazioni dei normali profili di volatili, che risultano attrattivi per i nemici naturali degli insetti fitofagi che li hanno indotti (Dicke e van Loon, 2000). Gli effetti multitrofici di queste sostanze volatili indotte dall'attività alimentare degli insetti sono estremamente complessi e si inseriscono in una rete, ancora poco conosciuta, di comunicazione chimica anche fra piante (Chamberlain *et al.*, 2001; Preston *et al.*, 2001). Il ruolo di questi volatili è quello di esaltare la capacità di contenimento naturale dei fitofagi, senza passare attraverso fenomeni di tossicità diretta.

La conoscenza sempre più dettagliata a livello molecolare di queste interazioni multitrofiche apre nuove opportunità di interventi di protezione delle piante, attraverso la gestione-manipolazione degli agenti di contenimento naturale esistenti nell'ambiente o che possono essere introdotti con interventi di controllo biologico classico. Limitandosi alle sole strategie di tipo più strettamente biotecnologico, così come definite nell'introduzione, per esaltare i meccanismi di difesa indiretta delle piante possiamo puntare sia sul *miglioramento genetico assistito da marcatori molecolari* che sulla *trasformazione genetica*.

Per quanto riguarda il *miglioramento genetico*, esso può contare su un'apprezzabile variabilità naturale delle diverse linee e cultivars di piante coltivate, nella loro capacità di attrarre nemici naturali (Dicke e van Loon, 2000). Recentemente, sono stati avviati studi in collaborazione (Università di Napoli, Università della Basilicata e CNR) su diverse accessioni di germoplasma di pomodoro che includono linee di introgressione di *L. pennellii* nel pomodoro coltivato (Eshed e Zamir, 1995) al fine di caratterizzare la variabilità genetica della loro capacità attrattiva nei confronti di braconidi endofagi di afidi, finalizzata all'individuazione di QTL associati ai geni coinvolti in tale capacità attrattiva. I primi risultati ottenuti sembrano indicare l'esistenza di interessanti margini d'intervento per incrementare le capacità di difesa indiretta di varietà di interesse economico.

Relativamente ai possibili interventi di *trasformazione genetica*, andrebbe valutato l'impatto della manipolazione dell'espressione di molecole segnale ad azione sistemica in pianta, quali la sistemina e altri peptidi segnali più recentemente descritti (Ryan, 2000; Pearce *et al.*, 2001). È ben noto che l'aumento di espressione di tali molecole segnale induce un aumento del livello di difesa diretta attraverso un'induzione più intensa del percorso metabolico dell'acido ottadecanoico, che porta sia alla produzione di acido jasmonico, coinvolto nell'attivazione di geni di difesa diretta, che di metaboliti secondari volatili (Ryan, 2000; Walling, 2000). Dati sperimentali dimostranti un'effettiva modificazione del profilo/livello dei metaboliti secondari volatili prodotti da piante «super-stimolate» non sono ancora disponibili, ma sono in corso studi in collaborazione (Università di Napoli, Università della Basilicata e CNR) finalizzati alla verifica di questa affascinante ipotesi.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Quanto trattato in questa breve presentazione non ha la pretesa di esaurire l'ampio argomento preso in esame. Abbiamo considerato solo alcuni aspetti relativi allo sviluppo di biotecnologie di controllo degli insetti fitofagi. Esistono numerosi altri aspetti ed opportunità che le biotecnologie, nell'accezione corrente, possono offrire nella definizione di tecnologie innovative di supporto al controllo degli insetti dannosi in agricoltura. Vale la pena ricordare ampi settori di studio, di notevole rilevanza applicata, quali l'uso delle metodologie molecolari nel campo della sistematica entomologica e nella caratterizzazione di biotipi, nello studio dei rapporti fra insetti e patogeni e nella definizione di tecniche diagnostiche relative, nella produzione in vitro di parassitoidi, nella soppressione selettiva di femmine per l'applicazione della tecnica del maschio sterile, attraverso l'espressione inducibile, sesso-specifica, di geni letali e, infine, nella valutazione dell'impatto eco-tossicologico delle stesse biotecnologie.

Il nostro ridotto livello di conoscenza dei fenomeni biologici che si intendono gestire è il principale aspetto condizionante lo sviluppo di efficaci e sicure applicazioni biotecnologiche in campo entomologico. Tale limite conoscitivo diventa

ancora più evidente per tutti gli aspetti che non sono studiabili in modo esaustivo senza l'integrazione di diverse competenze scientifiche. Il problema fondamentale che la ricerca scientifica «pubblica» è chiamata ad affrontare è lo sviluppo di un solido patrimonio di conoscenze di base. Ciò non deve conoscere limiti o imposizioni. Solo in questo modo si può assicurare la base per un fruttuoso ed equilibrato sviluppo di applicazioni biotecnologiche a livello industriale, sulla cui opportunità l'intera società civile deve essere correttamente informata e chiamata ad esprimersi, in nome del bene collettivo, libera da vincoli dettati da interessi di parte o da fondamentalismi ideologici.

BIBLIOGRAFIA

- Bavoso A., Falabella P., Giacometti R., Jama Halane A., Ostuni A., Pennacchio F. & Tremblay E. (1995). Intestinal absorption of proctolin in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera Noctuidae) larvae. *REDIA*, 78, 173-185.
- Baldwin I.T. & Preston C.A. (1999). The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta*, 208, 137-145.
- Binnington K.C. & Baule V.J. (1993). Naturally occurring insecticidal molecules as candidates for genetic engineering. In: Oakeshott J. & Whitten M.J., Eds. *Molecular approaches to fundamental and applied entomology*. Springer-Verlag, New York, pp. 38-89.
- Carozzi N. & Koziel M. (1997). *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. Taylor & Francis, London.
- Chamberlain K., Guerrieri E., Pennacchio F., Petterson J., Pickett J.A., Poppy G.M., Powell W., Wadhams L.J. & Woodcock (2001). Can aphid-induced plant signals be transmitted aerially and through the rizosphere? *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 1063-1074.
- Christian P.D., Hanzlik T.N., Dall D.J. & Gordon K.H. (1993). Insect viruses: new strategies for pest control. In: Oakeshott J. & Whitten M.J., Eds., *Molecular approaches to fundamental and applied entomology*. Springer-Verlag, New York, pp. 128-163.
- Cross, J.V., Solomon M.G., Chandler D., Jarrett P., Richardson P.N., Winstanley D., Bathon H., Huber J., Keller B., Langenbruch G.A. & Zimmerman G. (1999). Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe: 1. Microbial agents and nematodes. *Biocontrol Science Tech.*, 9, 125-149.
- Czapla T.H. (1997). Plant lectins as insect control proteins in transgenic plants. In: Carozzi N. & Koziel M., Eds., *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. Taylor & Francis, London, pp. 123-138.
- Daugherty A.L. & Mrsny R.J. (1999a). Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2, 144-151.
- Daugherty A.L. & Mrsny R.J. (1999b). Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier. *Pharm. Sci. Technol. Today*, 2, 281-287.
- Dhadialla T.S., Carlson G.R. & Le D.P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 545-569.
- Dicke M. & van Loon J.J. (2000). Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Ent. Exp. Appl.*, 97, 237-249.
- Digilio M.C., Isidoro N., Tremblay E. & Pennacchio F. (2000). Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *J. Insect Physiol.*, 46, 1041-1050.

- Eshed Y. & Zamir D. (1995). An introgression line population of *Lycopersicon pennelli* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, 141, 1147-1162.
- Falabella P., Varricchio P., Gigliotti S., Pennacchio F. & Malva C. (2002). A polydnavirus gene with a putative aspartyl protease domain is highly expressed in tobacco budworm larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps*. *Insect Mol. Biol.*, in stampa.
- Felton G.W. & Gatehouse J.A. (1996). Antinutritive plant defence mechanisms. In: Lehane M.J. & Billingsley P.F., Eds., *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall, London, pp. 373-416.
- Fernandez-Cornejo J. & McBride W.D. (2000). Genetically engineered crops for pest management in U.S. Agriculture: farm-level effects. Economic Research Service, USDA. *Agricultural Economic Report*, No. 786.
- Ffrench-Constant R. & Bowen D. (1999). *Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides. *Curr. Opinion Microbiol.*, 2, 284-288.
- Ffrench-Constant R. & Bowen D. (2000). Novel insecticidal toxins from nematode-symbiotic bacteria. *Cell. Mol. Life Sc.*, 57, 828-833.
- Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K. & Sugiura Y. (2001). An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol.Chem.*, 276, 5836-5840.
- Gould F. (1994). Potential problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. *Bio-control Science Technol.*, 4, 451-461.
- Gould F. (1998). Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 701-726.
- Inceoglu A.B., Kamita S.G., Hinton A.C., Huang Q.H., Severson T.F., Kang K.D. & Hammock B.D. (2001). Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science*, 57, 981-987.
- James C. (2001). Global review of commercialized transgenic crops: 2000. *ISAAA Briefs*, No. 21, Preview. ISAAA, Ithaca, NY.
- Jongsma M.A. & Bolter C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43, 885-895.
- Jouanin L., Bonadé-Bottino M., Girard C., Morrot G. & Giband M. (1998). Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*, 131, 1-11.
- Kaur S. (2000). Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *World J. Microbiol. Biotech.*, 16, 781-793.
- Keeley L.L. & Hayes T.K. (1987). Speculation on biotechnology applications for insect neuroendocrine research. *Insect Biochem.*, 17, 639-651.
- Kramer K.J. & Muthukrishnan S. (1997). Insect chitinases - molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27, 887-900.
- Lozzia G.C. (1999). Biodiversity and structure of ground beetle assemblages (Coleoptera: Carabidae) in Bt corn and its effects on non target insects. *Boll. Zool. Agr. Bachic. Ser. II*, 31, 37-58.
- Madara J.L. (1997). The chameleon within: improving antigen delivery. *Science*, 277, 910-911.
- Malone L. & Pham-Delegue M-H. (2001). Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, 32, 1-18.
- Mazier M., Pannetier C., Tourner J., Jouanin L. & Giband M. (1997). The expression of *Bacillus thuringiensis* toxin genes in plant cells. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 3, 313-347.
- Mazumdar-Leighton S. & Broadway R.M. (2001). Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 31, 633-644.
- McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J., Hogan P.S., Stalker D.M. & Maliga P. (1995). Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology*, 15, 362-365.

- McGurl B., Orozco-Cardenas M., Pearce G. & Ryan C. (1994). Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 9799-9802.
- Menn J.J. & Borkovec A.B. (1989). Insect neuropeptides: potential new control agents. *J. Agr. Food Chem.*, 37, 271-278.
- Mishra S. (1998). Baculoviruses as biopesticides. *Current Science*, 75, 1015-1022.
- Naylor L.R. & Ehrlich P.R. (1997). Natural pest control services in agriculture. In: Daily G. Ed., *Nature's services.*, Island Press, Washington D.C., pp. 151-174.
- Pearce G., Moura D.S., Stratmann J. & Ryan C.A. (2001). Production of multiple plant hormones from a single polypeptide precursor. *Nature*, 411, 817-820.
- Pennacchio F., Falabella P., Varricchio P., Sordetti R., Vinson S.B., Graziani F. & Malva C. (2000). Molecular basis of developmental alteration in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Cardiobiles nigriceps*. In: Austin A. Ed., *The Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control.*, CSIRO Publishing, Canberra, pp. 17-22.
- Pennacchio F., Malva C. & Vinson S.B. (2001). Regulation of host endocrine system by the endophagous braconid *Cardiobiles nigriceps* and its polydnavirus. In: Edwards J.P. & Weaver R.J. Eds., *Endocrine interactions of insect parasites and pathogens.* BIOS, Oxford, pp. 123-132.
- Pimentel D., Acquay H., Biltonen M., Rice P., Silva M., Nelson J., Lipner V., Giordano S., Horowitz A. & D'Amore M. (1993). Assessment of environmental and economic impacts of pesticide use. In: Pimentel, D., Lehman, H., Eds., *The pesticide question: environment, economics, ethics.*, Chapman & Hall, London, pp. 85-105.
- Predel R. & Eckert M. (2000). Neurosecretion: peptidergic systems in insects. *Naturwissenschaften*, 87, 343-350.
- Preston C.A., Laue G. & Baldwin I.T. (2001). Methyl jasmonate is blowing in the wind, but can it act as a plant-plant airborne signal? *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 1007-1023.
- Raina A.K., Rafaeli A. & Kingan T.G. (1994). Pheromonotropic activity of orally administered PBAN and its analogues in *Helicoverpa zea*. *J. Insect Physiol.*, 40, 393-397.
- Rao R., Manzi A., Filippone E., Manfredi P., Spasiano A., Colucci G., et al. (1996). Synthesis and expression of genes encoding putative insect neuropeptide precursor in tobacco. *Gene*, 175, 1-5.
- Richards A., Matthews M. & Christian P. (1998). Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 493-517.
- Ryan C. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477, 112-122.
- Ryan C. & Pierce G. (2001). Polypeptide hormones. *Plant Phys.*, 125, 63-68.
- Schuler T.H., Poppy G.M., Kerry B.R. & Denholm I. (1999). Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Tibtech*, 17, 210-216.
- Strand M.R. & Pech L.L. (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annu. Rev. Entomol.*, 40, 31-56.
- Tellam R.L. (1996). The peritrophic matrix. In: Lehane M.J. & Billingsley P.F., Eds., *Biology of the insect midgut.* Chapman & Hall, London, pp. 86-114.
- Tortiglione C., Fanti P., Pennacchio F., Malva C., Breuer M., De Loof A., Monti L.M., Tremblay E. & Rao R. (2002). The expression in tobacco plants of *Aedes aegypti* Trypsin Modulating Oostatic Factor (Aea-TMOF) alters growth and development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Mol. Breeding*, in stampa.
- Tremblay E. (1993). La ricerca di nuovi mezzi per la difesa delle piante dai parassiti animali. *Atti della LXII Riunione della Società Italiana per il Progresso delle Scienze (Viterbo, 1993)*: pp. 273-280.
- Tremblay E. (1994). Management of host-parasitoid relationships in endophagous Hymenoptera. *Bulletin de l'Organisation Internationale de Lutte Biologique*, OILB/SROP, 17/7:25-36.

- Uchyama T., Sugiyama T., Quan Y.S., Kotani A., Okada N., Fujita T., Muranishi S. & Yamamoto A. (1999). Enhanced permeability of insulin across rat intestinal membrane by various absorption enhancers: their intestinal mucosal toxicity and absorption-enhancing mechanism of n-lauryl-(D)-maltopyranoside. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 1241-1250.
- van Emden H.F. (1999). Transgenic host plant resistance to insects – some reservations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 92, 788-797.
- Varricchio P., Falabella P., Sordetti R., Graziani F., Malva C. & Pennacchio F. (1999). *Cardiobiles nigriceps* Polydnavirus: molecular characterization and gene expression in parasitized *Heliothis virescens* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29, 1087-1096.
- Viggiani G. (1997). *Lotta biologica e integrata nella difesa fitosanitaria*. Volume secondo. Liguori Editore, Napoli.
- Vinson S.B., Pennacchio F. & Consoli F.L. (2001). The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective. In: Edwards J.P. & Weaver R.J. Eds., *Endocrine interactions of insect parasites and pathogens*. BIOS, Oxford, pp. 187-206.
- Walling L.L. (2000). The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.*, 19, 195-216.
- Webb B.A. (1998). Polydnavirus biology, genome structure and evolution. In: Miller L.K. & Andrew L., Eds., *The insect viruses*. Plenum Publishing Corporation, N.Y., pp. 105-139.