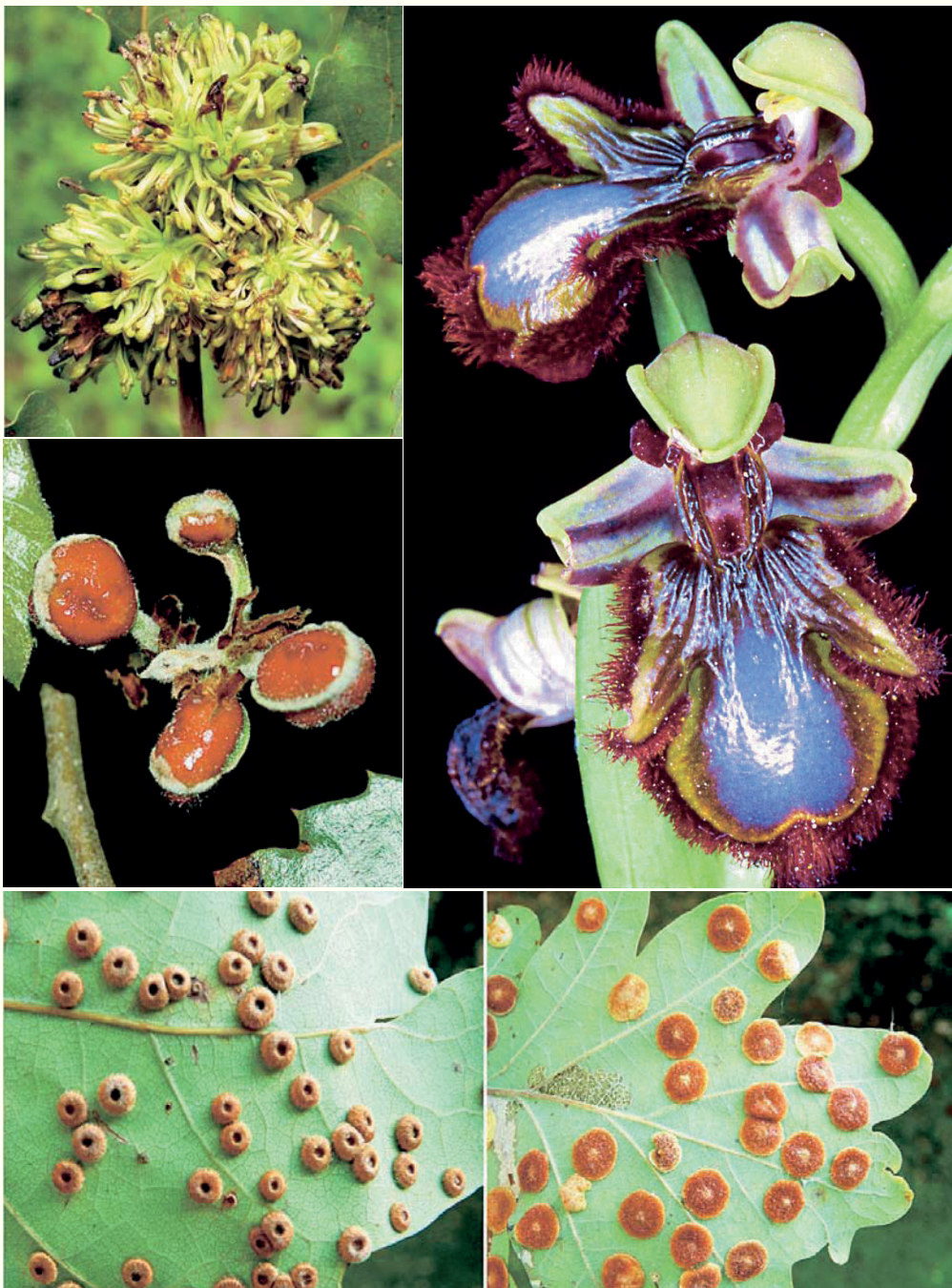




Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XXXI. INSECT-PLANT INTERACTIONS



Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXV - 2017



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XXXI. INSECT-PLANT INTERACTIONS

Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXV - 2017

In copertina: a sinistra e in basso:

- galle di Imenotteri Cynipidae (*Andricus grossulariae*, *Plagiotrochus quercusilicis*, *Neuroterus numismalis*, *Neuroterus quercusbaccarum*) su gemme e foglie di quercia (foto di Giuseppina Pellizzari);

in alto a destra:

- fiore d'orchidea (*Ophrys ciliata*) con mimesi sessuale (foto di Salvatore Cozzolino).

PRESENTAZIONE

La Tavola Rotonda “Insect-plant interactions”, organizzata dalla Accademia Nazionale Italiana di Entomologia e coordinata dagli accademici Angharad M.R. Gatehouse e Maria Cristina Digilio, parte dalla importante considerazione dell’incremento annuale della popolazione mondiale a cui non corrisponde una adeguata disponibilità alimentare che risulta, pertanto, insufficiente a soddisfare le esigenze delle popolazioni. Come è stato ben sottolineato nell’intervento iniziale, questo aspetto rappresenta una delle maggiori sfide che la Scienza e la Società debbono affrontare per aumentare la produzione agricola, senza tuttavia disattendere il rispetto dell’ambiente.

Gli argomenti trattati nella Tavola Rotonda spa-

*ziano dalle interazioni trofiche e la dinamica delle popolazioni della tortrice del pino (*Choristoneura fumiferana*), alla coevoluzione ed i segnali di comunicazione fra piante e animali nelle *Orchideaceae*, con particolare riferimento ai meccanismi di impollinazione, al network di segnali che sono alla base delle risposte di difesa delle piante. Infine è stato preso in esame l’interessante e innovativo aspetto dell’evoluzione delle peculiari strategie utilizzate dagli insetti per modificare l’attività della pianta ospite a loro vantaggio.*

ROMANO DALLAI

Presidente Accademia Nazionale Italiana di Entomologia

INDICE

Tavola Rotonda su:

INSECT-PLANT INTERACTIONS

ANGHARAD M.R. GATEHOUSE – <i>Plant Response to Biotic Stress: Can this be exploited for Crop Protection?</i> ..	Pag. 175
DEEPA S. PURESWARAN – <i>Trophic interactions in eastern spruce budworm population ecology</i>	» 179
SALVATORE COZZOLINO – <i>Piante troppo furbe o insetti troppo ingenui?</i>	» 181
ROSA RAO – <i>La Sistemina e il network di segnali alla base delle risposte di difesa delle piante</i>	» 185
DAVID GIRON, ANTOINE GUIGUET, CARLOS LOPEZ-VAAMONDE, ISSEI OHSHIMA – <i>Are leaf-miners and gall-inducers part of a continuum of plant manipulators?</i>	» 191
MARIA CRISTINA DIGILIO – <i>Difese indotte nelle piante: l'interazione con insetti e microrganismi</i>	» 197

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 17 NOVEMBRE 2017

Tavola Rotonda su:

INSECT-PLANT INTERACTIONS

Coordinatori:

ANGHARAD M.R. GATEHOUSE e MARIA CRISTINA DIGILIO, Accademiche

PLANT RESPONSE TO BIOTIC STRESS: CAN THIS BE EXPLOITED FOR CROP PROTECTION?

ANGHARAD M.R. GATEHOUSE (*)

(*) Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE1 7RU, UK; e-mail: A.M.R.Gatehouse@newcastle.ac.uk
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insect-plant interactions". Seduta pubblica dell'Accademia - Napoli, 17 novembre 2017

Plant Response to Biotic Stress: Can this be exploited for Crop Protection?

A major challenge to both Science and Society is to increase agricultural productivity by an estimated 70% to feed an additional 2.3 billion people by 2050. Strategies to increase crop production must be both resilient and environmentally sustainable, requiring a paradigm shift in current practices. The commercialization of Bt-expressing Biotech (transgenic) crops in the mid-1990s has gone some way to meet these needs. However, it is clear that other technologies and molecules are required to meet future demands. One such approach is to exploit endogenous resistance mechanisms, which form part of the plants' defence armoury. These defences can be either constitutive or induced, the latter often involving extensive reprogramming of defence-signalling pathways. Although endogenous resistance in many crops is currently not adequate to combat heavy pest infestations in an agricultural environment, increased knowledge of these mechanisms provides increased scope for enhancing endogenous defence against phytophagous insects in crops by conventional breeding strategies. The level of partial resistance against pest species achieved using inherent genetic resources may well be sufficient to give adequate protection to a crop under a suitable IPM programme, especially with an increased contribution from predators and parasitoids of the pest. Functional genomics provides a powerful platform to study these responses. Examples from different cropping systems with a view to their subsequent exploitation in breeding programmes to enhance crop resistance to insect pests will be presented.

KEY WORDS: biotech crops, resistance genes, IPM, defence pathways, cereal crops

INTRODUCTION

The current world population of 7.6 billion is expected to reach 8.6 billion by 2030, 9.8 billion by 2050 and 11.2 billion by 2100, equating to an annual increase of approximately 83 million people year on year (UN, World Population Prospects: The 2017 Revision). This predicted population increase poses a major challenge to both Science and Society to increase agricultural productivity. However, strategies to increase crop production must be both resilient and environmentally sustainable, requiring a paradigm shift in current practices.

The commercialization of crops expressing genes encoding the entomocidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* (Bt) in the mid-1990s has gone some way to meet these needs. It is estimated that the global area of Biotech crops is now in excess of 185 million hectares (ISAAA Briefs 2016), with approximately 23 and 75 million hectares for insect resistant crops and those expressing the dual trait for insect resistance and herbicide tolerance, respectively. However, it is clear that other technologies and molecules are required to meet future demands, not least as resistance to Bt Cry proteins is now beginning to

emerge in the field (TABASHNIK, 2016); furthermore, one order of insect, the Homoptera, which are major vectors of disease, are insensitive to Bt. Developing strategies that are efficacious, but at the same time pose negligible risks to beneficial organisms, such as pollinators and those involved in biological control, is therefore both desirable and timely. Many different approaches are currently being investigated, from the use of arthropod-based fusion proteins (NAKASU *et al.*, 2014), to RNA interference-based approaches via the delivery of dsRNA (PRICE and GATEHOUSE, 2008; ABD EL HALIM *et al.*, 2016), either as biopesticides or via expression in transgenic crops. Another such approach is to exploit endogenous resistance mechanisms, which form part of the plants' defence armoury.

UNRAVELLING ENDOGENOUS DEFENCE MECHANISMS

Endogenous defences can be either constitutive or induced, the latter often involving extensive reprogramming of defence-signalling pathways. Although endogenous resistance in many crops is currently not adequate to combat heavy pest infestations in an agricultural environment,

increased knowledge of these mechanisms provides increased scope for enhancing endogenous defence against herbivores in crops, without necessarily introducing genetic material from outside the available gene pool, by conventional breeding strategies. The level of partial resistance against pest species achieved using inherent genetic resources may well be sufficient to give adequate protection to a crop under a suitable IPM programme, especially with an increased contribution from predators and parasitoids of the pest.

Ecologists have long understood that plants exhibit multimechanistic resistance towards herbivores, but the molecular mechanisms underpinning these complicated responses have remained elusive. Studies with *Arabidopsis* and tobacco as model systems to investigate the plant's herbivore-induced transcriptome have provided novel insights into plant-insect interactions, demonstrating that the jasmonic acid cascade plays a central role in transcript accumulation in plants exposed to herbivory (HERMSMEIER *et al.*, 2001). Baldwin and his group estimate that approximately 500 mRNAs constitute the insect-responsive transcriptome in tobacco (BALDWIN *et al.*, 2001). However, many of these genes are of unknown function, and many changes in gene expression do not represent induction of defence-related proteins. Photosynthetic genes, for example, are downregulated in tobacco plants in response to insect attack; microarray analysis has demonstrated putative upregulation of defence-associated transcripts and downregulation of growth-associated transcripts (HUJO *et al.*, 2003). This analysis provided evidence for the simultaneous activation of salicylic acid, ethylene, cytokinin and jasmonic acid-regulated pathways during herbivore attack. Similar co-activation of numerous signalling cascades in response to various stresses has also been reported for *Arabidopsis* (CHEN *et al.*, 2002) and supports the concept of a network of interacting signal cascades. Microarray analysis also identified direct defensive responses in dramatic increases in protease inhibitor transcripts, and increases in transcripts encoding putrescine N-methyl transferase, which catalyses the first committed step of nicotine biosynthesis, as well as metabolic commitment to terpenoid-based indirect defences.

Deciphering the signals that regulate herbivore-responsive gene expression will afford many opportunities to manipulate the response. Signalling molecules such as salicylic acid, jasmonic acid and ethylene do not activate defences independently by linear cascades, but rather

establish complex interactions that determine specific responses. Knowledge of these interactions can be exploited in the rational design of transgenic plants with increased disease/insect resistance (ROJO *et al.*, 2003).

Recent studies have focused more on the response of agronomically important crops rather than those of model systems. Whilst none of the commercial wheat varieties grown in Europe are resistant to the grain aphid *Sitobion avenae* or other cereal aphids of European origin (MIGUI and LAMB, 2003; FERRY *et al.*, 2011), some commercial wheat has partial resistance towards Russian wheat aphids, (RWA; *Diuraphis noxia*). Ten RWA resistance genes (*Dn* genes) have been identified in *T. aestivum*. Microarray and real-time PCR analysis revealed that more than 180 genes up-regulated on attack by *D. noxia* are related to reactive oxygen species, signalling, pathogen defence and arthropod allelochemical and physical defence (SMITH and CHUANG, 2014). In a further study, superoxide dismutase, glutathione reductase and ascorbate peroxidase were uniquely up-regulated in the RWA-resistant wheat cultivar TugelaDN, compared to the RWA-susceptible cultivar Tugela post *D. noxia* infestation. These findings suggest the involvement of antioxidative enzymes in the RWA-wheat resistance response to minimise toxic effects to plant cells.

A proteomics-based approach showed that in a commercial variety of wheat, Claire, which exhibits partial tolerance to aphids, 67 protein spots were significantly differentially expressed between non-infested control plants and infested plants following 24 h of aphid (*S. avenae*) feeding, with 27 and 11 up-regulated, and 8 and 21 down-regulated, in local and systemic tissues, respectively (FERRY *et al.*, 2011). After 8 days, 80 protein spots differed significantly between control and aphid treatments with 13 and 18 up-regulated and 27 and 22 down-regulated in local and systemic tissues, respectively. As positive controls, plants were treated with salicylic acid or methyl jasmonate; 81 and 37 differentially expressed protein spots, respectively, were identified for these treatments. Peptide Mass Fingerprinting revealed that the majority of proteins altered by aphid infestation were involved in metabolic processes and photosynthesis. Other proteins identified were involved in signal transduction, stress and defence, antioxidant activity, regulatory processes, and hormone responses. Responses to aphid attack at the proteome level in this commercial wheat line were broadly similar to basal non-specific defence and stress responses in wheat, with evidence of down-regu-

lation of insect-specific defence mechanisms, in agreement with the observed lack of aphid resistance in commercial wheat lines.

Modern wheat varieties are hexaploid and have low genetic diversity for insect resistance traits (OGBONNAYA *et al.*, 2013), however, a screen of ancient diploid wheat genotypes revealed that many exhibited higher levels of resistance to *S. avenae* than modern cultivars of wheat. For example, one accession, ACC20 PGR1755, of the diploid ancestral wheat Einkorn (*T. monococcum*), exhibited partial resistance to aphids (MIGUI and LAMB, 2004) and thus may be a useful, and novel source of genes for improving resistance to these pest species in modern wheat. However, no previous studies had been carried out to investigate differential gene expression in these lines in response to aphid infestation. In our studies we adopted a proteomics-based approach to decipher the molecular response of this particular accession to *S. avenae* feeding. Approximately 50 % of all differentially expressed protein spots were identified by a combination of database searching with MS and MS/MS data, revealing that the majority of proteins up-regulated by aphid infestation were involved in metabolic processes (including photosynthesis) and transcriptional regulation. However, in the resistant line only, several stress response proteins (including NBS-LRR-like proteins) and oxidative stress response proteins were identified as up-regulated in response to aphid feeding, as well as proteins involved in DNA synthesis/replication/repair indicating that the resistant diploid line ACC20 PGR1755 may provide a valuable resource in breeding wheat for resistance to aphids (GUAN *et al.*, 2015).

Using a similar approach to that described by GUAN *et al.* (2015), DONG *et al.* (2017) demonstrated that proteins induced in rice by the small brown planthopper (SBPH) were involved mainly in stress response, photosynthesis, protein metabolism, carbohydrate metabolism, energy metabolism, cell wall-related proteins, amino acid metabolism and transcriptional regulation. They also showed that the levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were considerably higher in the resistant than the susceptible rice during SBPH infestation, whilst catalase (CAT) activity and hydroxyl radical inhibition were lower in the resistant than the susceptible line. Based on their results they hypothesised that resistant rice plants defend themselves against SBPH through activation of the salicylic acid (SA)-dependent systemic acquired resistance pathway.

PROOF OF CONCEPT:

EXPLOITING ENDOGENOUS DEFENCE MECHANISMS

Proof of concept that genes induced in response to insect attack do indeed play a role in defence has been provided by their over-expression in plants. Such studies, while limited, appear to have focused predominantly on rice. Ethylene responsive factors (ERFs) are a large family of plant-specific transcription factors that are involved in the regulation of stress responses. Studies by LU *et al.* (2011) revealed that an ERF gene in rice, *OsERF3*, was rapidly up-regulated in response to feeding by the rice striped stem borer (SSB) *Chilo suppressalis*. Over-expression and antisense studies of this ERF affected transcript levels of two *MAPKs* genes and two other TF (*WRKY*) genes in addition to the levels of jasmonate (JA), salicylate (SA) and trypsin inhibitors. Interestingly, whilst over expression of *OsERF3* was found to enhance resistance to SSB, a chewing insect pest, it increased susceptibility to BPH, which, as a sap-sucking insect, exhibits a very different mode of feeding. Based on their findings these authors propose that *OsERF3* affects early components of herbivore-induced defence responses by suppressing MAPK repressors and modulating JA, SA, ethylene and H₂O₂ pathways and thus, host plant resistance.

In a related study, HU *et al.* (2011) showed that BPH feeding in WT rice rapidly initiated the ethylene signalling pathway up-regulating *Bphi008a* transcript levels; conversely, blocking ethylene transduction reduced *Bphi008a* transcript levels. Regulation of this gene was accompanied by different changes in transcription levels of MAPKs in transgenic plants, with plants overexpressing (OE) *Bphi008a* exhibiting increased levels of OsMPK5 protein and RNAi plants decreased levels, post BPH feeding. As proof of concept these authors demonstrated that OE plants were more resistant (in terms of reduced plant damage, reduced feeding as measured by EPG studies and reduced honeydew production) to BPH than either WT or RNAi plants, supporting the suggestion that *Bphi008a* expression enhances rice resistance to BPH by impairing BPH feeding.

CONCLUSIONS

Studies on the molecular interactions between plants and insects, at both the transcriptional and proteome levels, have enabled us to gain a more profound insight into these dynamic, and often

subtle, interactions. Over expression, or knock-down, of identified genes has provided a proof of concept, enabling a demonstration of ‘cause and effect’. However, before this approach can be fully exploited in crop protection, it is important to ensure that we fully understand any potentially antagonistic effects that may arise as a consequence of modulating different defence pathways.

RIASSUNTO

LA RISPOSTA DELLA PIANTA AGLI STRESS BIOTICI: PUÒ ESSERE UTILIZZATA NELLA DIFESA DELLE COLTURE?

Una sfida per la Scienza e per la Società è rappresentata dall’aumento della produttività agricola, si stima del 70%, per sfamare una popolazione destinata a crescere di 2,3 miliardi per il 2050. Le strategie per aumentare la produzione agraria devono essere resilienti e sostenibili, e questo richiede un cambiamento paradigmatico nelle pratiche attuali. La commercializzazione delle colture esprimenti la tossina *Bt* (piante transgeniche), a partire dalla metà degli anni '90, sta andando in questa direzione, però, per poter rispondere alle richieste future, è chiaro che sono necessarie ulteriori molecole e tecnologie. Un approccio possibile risiede nello sfruttamento dei meccanismi endogeni di resistenza che fanno parte dell’armamentario difensivo della pianta. Queste difese possono essere costituzionali o indotte, e queste ultime spesso comprendono un’estesa riprogrammazione dei percorsi difensivi basati su molecole-segnale. In molte colture, le resistenze endogene non sono attualmente adeguate a combattere forti infestazioni, ma l’aumento delle conoscenze di tali meccanismi amplia le prospettive di potenziamento delle difese endogene contro gli insetti fitofagi attraverso strategie di miglioramento genetico convenzionale. Il livello di resistenza parziale agli insetti dannosi, raggiunto attraverso l’utilizzo delle risorse genetiche, può fornire una protezione adeguata delle colture, soprattutto se inquadrato in programmi idonei di gestione integrata, con un contributo incentivato di predatori e parassitoidi. La genomica funzionale fornisce una piattaforma potente per studiare queste risposte della pianta, e qui si presentano alcuni esempi, ricavati da agroecosistemi diversi, del loro utilizzo in programmi di miglioramento genetico volti al miglioramento della resistenza agli insetti dannosi.

REFERENCES

- ABD EL HALIM, 2016 – *RNAi-mediated knockdown of the voltage gated sodium ion channel *TcNa_v* causes mortality in *Tribolium castaneum**. - Scientific Reports 6, Article number: 29301
- BALDWIN I.T., HALITSCHKE R., KESSLER A., SCHITTKO U., 2001 – *Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions*. - Curr Opin Plant Biol, 4: 351-358.
- CHEN W.Q., PROVART N.J., GLAZEBROOK J., KATAGIRI F., CHANG H.S., EULGEM T., MAUCH F., LUAN S., ZOU G.Z., WHITHAM S.A. ET AL., 2002 – *Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses*. - Plant Cell, 14: 559-574.
- DONG ET AL., 2017 – *Comparative Proteomic Analysis of Susceptible and Resistant Rice Plants during Early Infestation by Small Brown Planthopper*. - Frontiers Plant Sci 8; article 1744
- GUAN W., FERRY N., EDWARDS M.G., BELL H.A., OTHMAN H., GATEHOUSE J.A., GATEHOUSE A.M.R., 2015 – *Proteomic Analysis Shows that Stress Response Proteins are Significantly Up-regulated in Resistant Diploid Wheat (Triticum monococcum) in Response to Attack by the Grain Aphid (Sitobion avenae)*. - Molecular Breeding, 35: 57. DOI 10.1007/s11032-015-0220-x
- HERMSMEIER D., SCHITTKO U., BALDWIN I.T., 2001 – *Molecular interactions between the specialist herbivore Manduca sexta (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host Nicotiana attenuata. I. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defence-related plant mRNAs*. - Plant Physiol., 125: 683-700.
- HU ET AL., 2011 – *The Bphi008a Gene Interacts with the Ethylene Pathway and Transcriptionally Regulates MAPK Genes in the Response of Rice to Brown Planthopper Feeding*. - Plant Physiol., 156(2): 856-872.
- HUI D.Q., IQBAL J., LEHMANN K., GASE K., SALUZ H.P., BALDWIN I.T., 2003 – *Molecular interactions between the specialist herbivore Manduca sexta (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host Nicotiana attenuata: V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs*. - Plant Physiol., 131:1877-1893.
- LU ET AL., 2011 – *An EAR-motif-containing ERF transcription factor affects herbivore-induced signaling, defense and resistance in rice*. - The Plant Journal, 68: 583-596.
- MIGUI S.M., LAMB R.J., 2004 – *Seedling and adult plant resistance to Sitobion avenae (Hemiptera: Aphididae) in Triticum monococcum (Poaceae), an ancestor of wheat*. - Bull. Entomol. Res., 94: 35-46.
- NAKASU E.Y.T., WILLIAMSON S.M., EDWARDS M.G., FITCHES E., GATEHOUSE J.A., WRIGHT G.A., GATEHOUSE A.M.R., 2014 – *Novel biopesticide based on spider venom neurotoxin shows no adverse effects on honeybees*. - Proc. R. Soc. B, 281: 20140619.
- OGBONNAYA F.C., ABDALLA O., MUJEEB-KAZI A., KAZI A.G., XU S.S., GOSMAN N., LAGUDAH E.S., BONNETT D., SORRELLS M.E., TSU- JIMOTO H., 2013 – *Synthetic Hexaploids: Harnessing Species of the Primary Gene Pool for Wheat Improvement*. In: Janick J (ed) Plant Breeding Reviews, vol 37. Wiley, New York, pp 35-122. doi:10.1002/9781118497869.ch2
- PRICE R.G., GATEHOUSE J.A., 2008 – *RNAi-mediated crop protection against insects*. - Trends in Biotechnology, 26: 393-400.
- ROJO E., SOLANO R., SANCHEZ-SERRANO J.J., 2003 – *Interactions between signaling compounds involved in plant defence*. - J. Plant Growth Regul., 22: 82-98.
- SMITH C.M., CHUANG W.P., 2014 – *Plant resistance to aphid feeding: behavioral, physiological, genetic and molecular cues regulate aphid host selection and feeding*. - Pest Management Sci., 70: 528-540.
- TABASHNIK B.E., 2016 – *Tips for battling billion-dollar beetles*. - Science, 354: 552-553.

TROPHIC INTERACTIONS IN EASTERN SPRUCE BUDWORM POPULATION ECOLOGY

DEEPA S. PURESWARAN (*)

(*) *Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Quebec City, QC, Canada, G1V 4C7*; e-mail: deepa.pureswaran@canada.ca

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insect-plant interactions". Seduta pubblica dell'Accademia - Napoli, 17 novembre 2017.

Trophic interactions in eastern spruce budworm population ecology

Our understanding of the main factors influencing low density spruce budworm populations and the causes of population density increases from these low levels is limited. Recent research on the ecology of the early phase of spruce budworm cycles reveals that mate-finding failure occurs in low density populations and might be overcome by density-dependent immigration of moths into low density areas, leading to outbreaks. Similarly, mass immigration could also aid the transition between low and rising populations by overwhelming generalist parasitoids, which have been the principal mortality factor keeping spruce budworm populations low. This presentation addresses theories of spruce budworm outbreak processes from a historic perspective, re-considers the relative roles of weather, host tree quality, natural enemies, mating success and dispersal on the population ecology of the insect, examines gaps in current knowledge, and suggest avenues for future research to better understand the mechanisms that "push" low density populations over the edge.

KEY WORDS. Population dynamics, density-dependence, natural enemies, immigration, bottom-up vs. top-down factors.

INTRODUCTION

Outbreaking herbivorous insects have been the subject of particularly intensive study due to their widespread economic and ecological impact on agricultural and forestry systems. Theoretical debates towards understanding animal population dynamics can be traced to pioneering studies involving herbivorous insects. Spruce budworm has been a favoured model system for the study of population dynamics because of its economic impact on the boreal forest. During an outbreak, spruce budworm densities increase several orders in magnitude with hundreds of larvae per branch, causing severe defoliation, growth loss and mortality. Three hypotheses have been proposed to explain spruce budworm population dynamics: the Silvicultural Hypothesis, Multiple Equilibria Hypothesis, and Oscillatory Hypothesis. Spruce budworm is the major defoliator of fir and spruce throughout Canada and the northeastern United States. Larvae develop through six instars while feeding within the protective confines of silken webbing that they construct between the needles. Pupation generally occurs in or near the feeding tunnel and male and female moths emerge in late summer to mate and lay egg masses on host needles. Within two weeks, first-instar larvae hatch, moult into second instars and walk or balloon on silken threads to locate overwintering sites among

scales and furrows of branches and trunks. After overwintering, second instar larvae emerge the following spring to continue the cycle.

RECENT ADVANCES

The Oscillatory Hypothesis that mortality by natural enemies is the main cause of the primary cyclic trend in budworm population density has been mostly upheld. While ROYAMA (1984) argued for the exclusivity of natural enemies in driving population cycles, the life table work by NEALIS and RÉGNIÈRE (2004) and RÉGNIÈRE and NEALIS (2007, 2008) during the 1980s suggested that resource limitation could under some circumstances contribute dramatically to population decline. Several researchers have also revisited the importance of climate and moth dispersal in the regional synchronization of populations. Recent research has also focussed on the potential role climate change may play in changing the distribution and duration of outbreaks, though it is still not expected to alter significantly the outbreak cycle itself. All of the hypotheses have particular explanations for how spruce budworm populations escape the control of natural enemies at the onset of an outbreak. Recent work has sought to address gaps and in a surprising twist has led to some reconsideration previously rejected elements of the Multiple Equilibria

Hypothesis. The prolific mass flight of male moths, in particular, from areas of high density source stands to low density areas could counteract a local mate-finding Allee Effect by enhancing the availability of mates for females that might otherwise go unmated (RÉGNIERE *et al.*, 2013). This recent experimental work suggests the need for further study of low and rising populations and that some hybridized version of the Oscillatory and Multiple Equilibrium models may be needed to represent spruce budworm dynamics across different scales.

CONCLUSIONS

Four key questions that have been implicated in debates around spruce budworm population dynamics. In summary, control by natural enemies and to a lesser extent, decline in resource availability appear to be responsible for the decline of outbreaks. Natural enemies are also the primary agent keeping populations low between outbreaks. There is strong evidence for some degree of spatial synchronization of relatively unconnected populations across a landscape, which is driven primarily by climate with lesser contributions from moth immigration. Although significant progress has been made we are yet to settle on a completely parsimonious hypothesis for spruce budworm population dynamics. In many ways, we appear to have come full circle in terms of support for the various paradigms of spruce budworm population ecology and this has led to renewed debate around how we should manage spruce budworm outbreaks.

ACKNOWLEDGEMENTS

I thank my colleagues for stimulating discussions on spruce budworm population ecology.

RIASSUNTO

INTERAZIONI TRITROFICHE NELL'ECOLOGIA DELLE POPOLAZIONI DELLA TORTRICE DEL PINO, *CHORISTONEURA FUMIFERANA*

La comprensione dei principali fattori che influenzano la bassa densità delle popolazioni della tortrice del pino, *Choristoneura fumiferana*, e le cause che conducono ad aumenti della densità di popolazione è attualmente limitata. Ricerche recenti sull'ecologia della fase iniziale dei cicli della tortrice mostrano, nelle popolazioni a bassa densità, che lo scarso successo dell'accoppiamento può essere superato da immigrazioni dipendenti dalla densità, che possono determinare esplosioni di popolazione. Allo stesso modo, le immigrazioni di massa possono aiutare la transizione verso livelli di densità di popolazione crescenti, rendendo trascurabile l'azione dei parassitoidi generalisti, che sono il principale fattore che ha mantenuto basse le popolazioni della tortrice in Quebec negli ultimi 20 anni. Qui sono presentate le teorie sui processi di esplosione della tortrice da un punto di vista storico, riconsiderando il ruolo di clima, qualità dell'ospite, nemici naturali, successo degli accoppiamenti e dispersione sull'ecologia della popolazione, ed esaminando i vuoti nelle attuali conoscenze. Infine, si suggeriscono linee di ricerca da intraprendere per comprendere meglio i meccanismi che spingono oltre la soglia le popolazioni a bassa densità.

REFERENCES

- NEALIS V.G., RÉGNIERE J., 2004 – *Insect-host relationships influencing disturbance by the spruce budworm in a boreal mixedwood forest*. - Can. J. For. Res., 34: 1870-1882.
- NEALIS V.G., RÉGNIERE J., 2007 – *Ecological mechanisms of population change during outbreaks of the spruce budworm*. - Ecol. Entomol., 32: 461-477.
- RÉGNIERE J., V. NEALIS V., 2008 – *The fine-scale population dynamics of spruce budworm: survival of early instars related to forest condition*. - Ecol. Entomol., 33: 362-373.
- RÉGNIERE J., DELISLE J., PURESWARAN D.S., TRUDEL R., 2013 – *Mate-finding Allee effect in spruce budworm population dynamics*. - Entomol. Exp. Appl., 146: 112-122.
- ROYAMA T., 1984 – *Population dynamics of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana**. - Ecol. Monogr., 54: 429-462.

PIANTE TROPPO FURBE O INSETTI TROPPO INGENUI?

SALVATORE COZZOLINO (*)

(*) Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Napoli Federico II
Via Cinthia, 80126 Napoli, Italy; e-mail: cozzolin@unina.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insect-plant interactions". Seduta pubblica dell'Accademia - Napoli, 17 novembre 2017

Smart plants or naive insects?

Plant-pollinator relationship represents a fundamental ecosystem service. Rather than a coevolution of communication signals between animals and plants, these latter have adopted pre-existing signals in animal behaviour/communication. Nowadays, plant-pollinator relationship has not been considered as a symbiotic interaction but a sort of arm-race, with each partner evolving optimizing strategies for increasing its fitness by imposing a cost to the other partner. Orchids are renewed for their peculiar pollination strategies based on pollinator deception and absence of reward. Orchid floral deception is based on mimicking of forms and colours of rewarding flowers or, in the most special case, on the sexual attraction of pollinators with the orchid flower mimicking their female partner both in shape and in scent. In this most extreme case, orchid flowers have evolved visual and olfactory clues to parasitize pre-existing sexual communication channels within animal species.

KEY WORDS: food deception, nectarless flowers, Orchids, pollination, sexual deception.

Le Orchidaceae, rappresentano quasi certamente la famiglia di piante a fiore più ricca di specie nel regno vegetale avendo evoluto una estrema diversità di forme, da quelle epifitiche delle zone tropicali a quelle terrestri delle zone temperate (DRESSLER, 1981). Sin dai tempi di Darwin, che dedicò molta attenzione allo studio delle orchidee (DARWIN, 1862), si è tradizionalmente ritenuto che gli spettacolari adattamenti dei loro fiori verso gli insetti impollinatori e gli affascinanti meccanismi di impollinazione rappresentassero il miglior esempio di processo coevolutivo: in conseguenza di un reciproco vantaggio, i fiori ed i loro impollinatori sono portati ad evolvere simultaneamente funzioni e strutture per ottimizzare il processo. Recentemente però si è visto che più che trattarsi di una coevoluzione di segnali comunicativi tra piante ed animali si è trattato dell'adozione da parte delle piante di segnali legati a comportamenti innati già presenti nel regno animale. In quest'ottica la relazione tra piante ed impollinatori può essere interpretata anche in chiave conflittuale, con ciascuno dei partner che evolve strategie per ottimizzare i propri interessi anche a discapito della controparte.

Mentre la maggior parte delle piante a fiore attira gli insetti impollinatori attraverso l'offerta di una ricompensa, di solito sostanze zuccherine raccolte in parti modificate del fiore, molte orchidee invece esplorano relazioni preesistenti tra altre piante ed i loro impollinatori. Circa un terzo delle specie di orchidee (tra le 6500 e le 9000 specie) non producono alcuna ricompensa per gli insetti impollinatori, e li attirano attraverso strategie basate sull'inganno alimentare

(mimesi alimentare) (VAN DER PIJL e DODSON, 1966). Queste orchidee (Fig. 1) prive di nettare esplorano il comportamento innato degli insetti impollinatori e, per meglio ingannare questi ultimi, hanno evoluto segnali fiorali tipici delle specie nettariifere (es. i colori vistosi, il labello per facilitare l'atterraggio degli insetti, le guide del nettare, il lungo sperone) (DAFNI, 1984). Queste orchidee hanno di solito come impollinatori degli insetti appena fuoriusciti dall'ibernazione invernale e quindi non ancora in grado di distinguere tra piante nettariifere e piante prive di nettare. I loro fiori hanno un elevato polimorfismo nel colore, nell'odore e nei tratti fiorali che ha lo scopo di ritardare le capacità associative dell'insetto e quindi di rendere più difficile la scoperta dell'inganno (GUMBERT e KUNZE, 2001). Gli Imenotteri sono i principali impollinatori, ma anche Lepidotteri, Ditteri e Coleotteri sono ingannati da varie specie di orchidee (VAN DER CINGEL 1995, 2001) (Tab. 1). In casi più specializzati, alcune specie di orchidee sono impollinate grazie al fatto che mimano esclusivamente una specifica pianta nettariifera (mimetismo Batesiano – DAFNI, 1984; JOHNSON 1994, 2000; NILSSON, 1983) e la selezione naturale spinge il fiore dell'orchidea ad essere quasi indistinguibile dal suo modello nettariifero, con l'impollinatore che non appare in grado di distinguere il mimo dal modello.

Un meccanismo ancora più specifico si è evoluto in alcune orchidee prive di nettare nelle quali l'impollinazione è assicurata attraverso un meccanismo di inganno sessuale (CORREYON e POUYANNE, 1916) (Tab. 2). In questo caso il fiore dell'orchidea emette



Fig. 1 – *Anacamptis morio*, un orchidea con mimesi alimentare.

Tab. 1 – Principali impollinatori delle orchidee con mimesi alimentare (VAN DER CINGEL, 1995).

	Coleoptera	Diptera	Hymenoptera	Lepidoptera
<i>O. mascula</i>	-	+	+	+
<i>O. pauciflora</i>	-	+	+	+
<i>O. provincialis</i>	-	-	+	-
<i>O. quadripunctata</i>	-	+	-	-
<i>O. anthropophora</i>	+	+	+	-
<i>O. simia</i>	+	+	+	+
<i>O. italica</i>	-	-	+	-
<i>O. purpurea</i>	+	-	+	-
<i>A. palustris</i>	-	-	+	-
<i>A. pyramidalis</i>	+	+	+	+
<i>A. laxiflora</i>	-	-	+	-
<i>A. morio</i>	-	-	+	+
<i>A. papilionacea</i>	-	-	+	+
<i>N. ustulata</i>	+	+	-	-
<i>N. tridentata</i>	+	+	+	+
<i>D. sambucina</i>	-	-	+	+
<i>D. saccifera</i>	+	+	+	+
<i>D. romana</i>	-	-	+	-

Tab. 2 – Impollinatori delle orchidee con mimesi sessuale (VAN DER CINGEL, 1995).

<i>Ophrys sphegodes</i>	<i>Andrena nigroaenea</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys lutea</i> subsp. <i>murbeckii</i>	<i>Andrena flavipes</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys holoserica</i>	<i>Eucera longicornis</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys holoserica</i>	<i>Eucera tuberculata</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys crabronifera</i>	<i>Anthophora retusa</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys incubacea</i>	<i>Andrena morio</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys bombyliflora</i>	<i>Eucera oraniensis</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys tenthredinifera</i>	<i>Eucera nigrilabis</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys bertolonii</i>	<i>Chalicodoma parietina</i>	Hymenoptera
<i>Ophrys lacaitae</i>	<i>Eucera eucnemidea</i>	Hymenoptera

un odore che imita il segnale olfattivo o i feromoni sessuali della femmina dell'insetto impollinatore, attraendo così gli insetti maschi in cerca di un partner per la riproduzione (KULLENBERG *et al.*, 1984). L'impollinazione avviene quando gli insetti maschi tentano di accoppiarsi con il fiore dell'orchidea (pseudocopulazione) (PAULUS e GACK, 1990). Tale meccanismo di impollinazione è stato studiato approfonditamente nel genere *Ophrys* nel Mediterraneo (Fig. 2) ed in alcuni generi di orchidee australiane. Visivamente l'orchidea mima le sembianze fisiche del partner femminile dell'insetto, ma fondamentali sono gli stimoli olfattivi emessi dal fiore, con una elevata specie-specificità dell'odore della femmina degli insetti impollinatori e quello dell'orchidea (SCHIESTL *et al.*, 1999). Nel caso, ad esempio, di *Ophrys sphegodes*, un orchidea impollinata dai maschi di *Andrena nigroaenea*, il fiore emette una miscela odorosa costituita principalmente da catene di idrocarburi insaturi (alcheni), con le stesse proporzioni del feromone



Fig. 2 – *Ophrys ciliata*, un orchidea con mimesi sessuale.

sessuale della femmina di *A. nigroaenea* (AYASSE *et al.*, 2000). Addirittura, in altri studi, si è visto che i fiori di *O. sphegodes*, una volta impollinati, cominciavano ad emettere alte quantità di all-trans-farnesyl hexanoate. Allo stesso modo, le femmine degli insetti impollinatori cambiavano il loro odore dopo l'accoppiamento e rilasciavano composti simili (tra cui, per l'appunto, all-trans-farnesyl hexanoate), con il compito di inibire il comportamento sessuale dei maschi (SCHIESTL e AYASSE, 2001). Si è ipotizzato che questo meccanismo possa essersi evoluto parallelamente nell'orchidea per dissuadere gli insetti maschi dal compiere ulteriori visite ad un fiore ormai già impollinato. Sorprendentemente però la mimesi tra odore dell'orchidea e la femmina dell'insetto impollinatore non è estremamente precisa come dovrebbe essere in conseguenza dell'azione della selezione naturale. Si è visto infatti che le orchidee tendano a produrre un odore leggermente diverso da quello prodotto dalle femmine locali dell'insetto pronubo. In tal modo esse riescono ad essere ancora più attrattive per gli insetti maschi, sfruttando la preferenza di questi ultimi ad accoppiarsi con femmine di popolazioni diverse (e con odore leggermente differente dalle femmine locali) per promuovere l'esoincrocio (VERECKEN e SCHIESTL, 2008). Le orchidee ingaggiano quindi un sorta di competizione con le femmine degli insetti per attrarre i maschi al punto tale che questo meccanismo di impollinazione rappresenta quasi una forma di parassitismo da parte della pianta nei confronti dei suoi insetti impollinatori.

A differenza di quelle mediterranee, le orchidee australiane che adottano analoghe strategie di mimesi sessuale usano uno o pochi composti per attrarre i loro impollinatori. Ad esempio, nell'orchidea *Chiloglottis* è stata identificata una molecola, il chiloglottone, ritrovata esclusivamente nell'orchidea e nella femmina della sua vespa impollinatrice (SCHIESTL *et al.*, 2003). Varie specie del genere *Chiloglottis* differiscono per piccole modifiche del chiloglottone emesso e così facendo attirano specie diverse di vespe *Thynnine*.

Queste differenze nei meccanismi di attrazione escogitati dalle specie di orchidee europee ed australiane dimostrano chiaramente che strategie di impollinazione apparentemente molto simili siano il risultato di indipendenti processi evolutivi e biochimici e sono il frutto dell'esplorazione, da parte della pianta, di specifici gruppi di impollinatori disponibili nel loro ambiente.

Numerose ipotesi sono state proposte per spiegare l'evoluzione e la diffusione delle strategie di inganno nelle orchidee. Quella più accreditata (*outcrossing hypothesis*, ipotesi dell'esoincrocio), propone che le strategie di inganno riducano il trasporto di polline tra fiori appartenenti alla stessa infiorescenza e favoriscono invece lo scambio di polline tra piante lontane (COZZOLINO e WIDMER, 2005). Gli impollinatori,

infatti, al cospetto di un'infiorescenza priva di ricompensa, visitano meno fiori e, dopo essere stati ingannati, tendono a volare lontano dalla pianta. Questo si associa anche al fatto che le orchidee esportano il loro polline in strutture chiamate pollinodi (strutture contenenti granuli di polline, agglutinati a formare due masse compatte claviformi) che rendono il processo dell'impollinazione molto efficiente anche con una sola visita dell'impollinatore.

Questo breve excursus testimonia come le strategie di impollinazione ingannevoli delle orchidee rappresentino una ricca fonte per gli studi di evoluzione ed adattamento e soprattutto costituiscono un chiaro esempio di come i fiori hanno evoluto segnali visivi e olfattivi per "sfruttare" a proprio fine la comunicazione già esistente tra animali senza alcun beneficio, anzi a volte anche con uno svantaggio per quest'ultimi.

RIASSUNTO

La relazione tra fiori ed impollinatori è fondamentale per la funzionalità degli ecosistemi terrestri. Però più che trattarsi di una coevoluzione di segnali comunicativi tra piante ed animali si è trattato dell'adozione da parte delle piante di segnali legati a comportamenti innati già presenti nel regno animale. La relazione tra piante ed impollinatori può quindi essere interpretata anche in chiave conflittuale, con ciascuno dei partner che evolve strategie per ottimizzare i propri interessi anche a discapito della controparte. Nelle orchidee si sono evolute peculiari strategie di impollinazione basate sull'inganno dell'insetto impollinatore e sull'assenza di una ricompensa. L'inganno si basa su una mimesi nella forma e nei colori dei fiori di altre piante che forniscono nettare o, nei casi più estremi, sull'attrazione sessuale dell'insetto pronubo, con il fiore dell'orchidea che assomiglia nella forma e soprattutto nell'odore alla femmina dell'insetto. In questi casi i fiori hanno evoluto segnali visivi e olfattivi per "sfruttare" a proprio fine la comunicazione già esistente tra animali senza alcun beneficio, anzi con uno svantaggio, per quest'ultimi.

BIBLIOGRAFIA

- AYASSE M., SCHIESTL F. P., PAULUS H. F., LOFSTEDT C., HANSON B. S., IBARRA F., FRANCKE W., 2000 – *Evolution of reproductive strategies in the sexually deceptive orchid Ophrys sphegodes: how does flower-specific variation of odor signals influence reproductive success?* - Evolution, 54: 1995-2006.
- CORREYON H., POUYANNE M., 1916 – *Un curieux cas de mimétisme chez les Ophrydées*. - Jour. Soc. Nat. d'Hort. France, 4: 29-47.
- COZZOLINO S., WIDMER A., 2005 – *Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?* - Trends Ecol. Evol., 20: 487-494.
- DAFNI A., 1984 – *Mimicry and deception in pollination*. - Annu. Rev. Ecol. Syst., 15: 259-278.
- DARWIN C., 1862 – *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects*. J. Murray (Ed), London.
- DRESSLER R., 1981 – *The orchids – natural history and classification*. Harvard Univ Press, Cambridge.
- GUMBERT A., KUNZE J., 2001 – *Colour similarity to rewarding*

- model affects pollination in a food deceptive orchid, Orchis boryi*. - Biol. J. Linn. Soc., 72: 419-433.
- JOHNSON S. D., 1994 – *Evidence for Batesian mimicry in a butterfly pollinated orchid*. - Biol. J. Linn. Soc., 53: 91-104.
- JOHNSON S. D., 2000 – *Batesian mimicry in the non-rewarding orchid Disa pulchra, and its consequences for pollinator behavior*. - Biol. J. Linn. Soc., 71: 119-132.
- KULLENBERG B., BORG-KARLSON A. K., KULLENBERG A. Z., 1984 – *Field studies on the behaviour of the Eucera nigrilabris male in the odour flow from flower labellum extract of Ophrys tenthredinifera*. Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis Ser. V.
- NILSSON L. A., 1983 – *Mimesis of bellflower (Campanula) by the red helleborine orchid Cephalanthera rubra*. - Nature, 305: 799-800.
- PAULUS H. F., GACK C., 1990 – *Pollinators as prepollinating isolation factors: Evolution and speciation in Ophrys (Orchidaceae)*. - Isr. J. Bot., 39: 43-79.
- SCHIESTL F. P., AYASSE M., 2001 – *Post-pollination emission of a repellent compound in a sexually deceptive orchid: a new mechanism for maximizing reproductive success?* - Oecologia, 126: 531-534.
- SCHIESTL F. P., AYASSE M., PAULUS H. F., LÖFSTEDT C., HANSSON B. S., IBARRA F., FRANCKE W., 1999 – *Orchid pollination by sexual swindle*. - Nature, 399: 421-422.
- SCHIESTL F. P., PEAKALL R., MANT J., IBARRA F., SCHULZ C., FRANCKE S., FRANCKE W., 2003 – *The chemistry of sexual deception in an orchid–wasp pollination system*. - Science, 302: 437-438.
- VAN DER CINGEL N. A., 1995 – *An atlas of orchid pollination. European orchids*. A. A. Balkema, Rotterdam.
- VAN DER CINGEL N. A., 2001 – *An atlas of orchid pollination. America, Africa, Asia and Australia*. A. A. Balkema, Rotterdam.
- VAN DER PIJL L., DODSON C. H., 1966 – *Orchid Flowers: Their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, USA.
- VERECKEN N. J., SCHIESTL F. P., 2008 – *The evolution of imperfect floral mimicry*. - Proc. Natl. Acad. Sciences USA, 105: 7484-7488.

LA SISTEMINA E IL NETWORK DI SEGNALI ALLA BASE DELLE RISPOSTE DI DIFESA DELLE PIANTE

ROSA RAO (*)

(*) *Università degli Studi di Napoli Federico II*

Dipartimento di Agraria. Via Università 100. Portici 80055, Italia; e-mail: rao@unina.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insect-plant interactions". Seduta pubblica dell'Accademia - Napoli, 17 novembre 2017.

Systemin and the signaling network triggering plant defense responses

Reactions of plants to insect pests include the activation of a local and systemic defence response essentially based on transcriptional changes that are mainly controlled and coordinated by phytohormones. The attacked plant perceives the invading organism by recognizing herbivore-associated elicitors that selectively induce different defence responses. These latter are enhanced by endogenous plant molecules associated with plant damage (DAMP - Damage Associated Molecular Patterns), that include small peptides present in several plant species. Peptide DAMP are released from larger precursors and bind to membrane receptors to activate signaling cascades that induce local and systemic immunity. The level of protection is conferred by the deep transcriptomic modifications induced by insect damage, which underpin a wealth of metabolic changes. Beside producing new metabolites that are toxic or repellent for insect herbivores or that are able to recall their natural enemies, the metabolic profile of attacked plants can alert neighboring con-specific plant and prime them for a more effective response against a stress agent present in the environment (defense priming). This presentation will focus on the role played by Systemin and its precursor in plant immunity activation and in plant-to-plant communication.

KEY WORDS: inducible plant defence, DAMP, defence priming

INTRODUZIONE

Le piante vivono in ambienti complessi in cui sono costantemente esposte a una vasta gamma di interazioni biotiche che spesso ne danneggiano lo sviluppo e la sopravvivenza. Una considerevole parte della produzione agricola mondiale è distrutta o resa inutilizzabile da parassiti e patogeni, e le perdite stimate delle principali *cash crops* vanno dal 26 al 40% (OERKE, 2006). Gli artropodi, ed in particolare gli insetti, sono tra le principali cause della riduzione della resa produttiva.

L'interazione pianta-insetto è caratterizzata da una serie di eventi che si succedono rapidamente. Il cambiamento del potenziale della membrana plasmatica (Vm), il comparto cellulare direttamente a contatto con l'ambiente, è probabilmente uno dei primi eventi che si verificano nella pianta a seguito di uno stress, immediatamente seguito dal cambiamento della concentrazione intracellulare di ioni calcio, la produzione di specie reattive dell'ossigeno, l'incremento dell'espressione di geni che codificano per le chinasi e il cambiamento della concentrazione di fitormoni tra cui l'acido jasmonico (JA) e l'acido salicilico (SA), (EBEL e MITHÖFER, 1998; MAFFEI *et al.*, 2007). Per minimizzare il successo dell'attacco di parassiti, le piante hanno evoluto sofisticati meccanismi di difesa alla base dei quali c'è il riconoscimento di 'firme molecolari' (o elicitori) di patogeni o insetti e la con-

seguente attivazione delle risposte immunitarie. Gli elicitori sono solitamente delle strutture altamente conservate che caratterizzano gli insetti o i patogeni, come ad esempio proteine della parete cellulare batterica, o le bruchine associate all'ovideposizione (HOWE e JANDER, 2008). Dal punto di vista molecolare, gli elicitori degli insetti, denominati *Herbivore Associated Molecular Patterns* (HAMPs) possono essere riconosciuti da recettori di membrana e il complesso formatosi innesca la risposta immunitaria della pianta (WALLING, 2009). Gli HAMPs contenuti nelle secrezioni orali di alcuni erbivori inducono modifiche del flusso ionico e della Vm la cui conseguenza è l'attivazione della trasduzione del 'segnale difesa' (HOGENHOUT e BOS, 2011). La propagazione sistemica del segnale determina la riprogrammazione del trascrittoma della pianta attaccata, l'attivazione di geni associati alla difesa e la conseguente produzione di metaboliti attivi contro gli organismi invasori.

Le strategie di difesa attuate dalle piante attaccate sono molteplici e diversificate. Ad esempio, una strategia attiva contro i patogeni biotrofici, che stabiliscono una lunga interazione con le cellule vegetali per attingere sostanze nutritive, è principalmente rappresentata dalla morte programmata delle cellule vegetali mentre l'infezione di agenti patogeni necrotrofici, che prima distruggono le cellule ospiti e poi si nutrono del loro contenuto, viene solitamente contrastata mediante la

produzione di composti antimicrobici (GLAZEBROOK, 2005). Per difendersi dagli insetti erbivori, le piante attivano diverse tipologie di difesa solitamente indicate come difese dirette e indirette. Le prime includono la produzione di sostanze che interferiscono direttamente con la crescita e la sopravvivenza degli insetti, come sostanze tossiche o dismetaboliche (HOWE e JANDER, 2008), mentre le seconde includono la produzione di composti che attraggono i nemici naturali di insetti erbivori come i composti organici volatili o i nettari extra-fiorali (DICKE, 2015; HEIL, 2015). La complessa rete di segnali che consente alle piante di attivare risposte difensive efficaci contro gli organismi invasori e bilanciare difesa e crescita, è controllata dai fitormoni. Le vie di segnalazione mediate da questi interagiscono in modo antagonistico o sinergico determinando l'esito delle risposte attivate. Le interazioni ormonali formano collettivamente il network di segnali ormonali che mediano l'immunità nonché la crescita e le risposte allo stress abiotico (PIETERSE *et al.*, 2009).

LA SISTEMINA E IL SUO PRECURSORE

Modifiche del flusso ionico intra ed extra cellulare sono indotte non solo dalle molecole contenute nelle secrezioni salivari degli insetti erbivori, ma anche da sostanze della pianta, che vengono prodotte in seguito al danno causato da un insetto o da una ferita meccanica e che pertanto, vengono comunemente chiamate *Damage Associated Molecular Pattern* (DAMP). Infatti, una risposta immunitaria, difficilmente può essere basata esclusivamente sul rilevamento di sostanze estranee (*non self*) (HEIL, 2014). Ad esempio, l'enorme diversità di (micro)organismi che danneggiano le piante rende difficile immaginare che un singolo ospite possa evolvere specifici recettori per rilevare individualmente ognuno dei suoi potenziali nemici. In realtà, sono state descritte oltre un milione di specie di artropodi, in gran parte erbivori, ma si conosce solo una manciata di molecole derivate da insetti che inducono le risposte di difesa della pianta (WU e BALDWIN, 2010). Quindi, le piante, similmente ad altri organismi multicellulari, devono essere in grado di rilevare la presenza di un danno (*self*) in base alla percezione di segnali endogeni che indicano la presenza di un pericolo e di attivare le corrispondenti risposte genetiche, tra cui l'induzione di un stato alterato che consente un rilevamento rapido ed efficiente del *non-self*.

In pomodoro, DAMP con ruolo chiave nell'attivazione delle difese della pianta includono gli oligosaccaridi derivati dalla parete cellulare a seguito del danno prodotto dall'insetto erbivoro o da ferita meccanica e il peptide segnale Sistemina (RYAN, 2000). La Sistemina (Sys) è stato il primo peptide segnale scoperto nelle piante (PEARCE *et al.*, 1991). È un peptide di 18 ammi-

noacidi, che deriva dal terminale carbossilico di un precursore di 200 amminoacidi chiamato Prosistemina di localizzazione citosolica. A seguito di uno stimolo ambientale il gene (*ProSys*) incrementa la sua espressione e la proteina prodotta viene processata determinando il rilascio del peptide Sys che appare interagire con un recettore localizzato sulla membrana cellulare. L'interazione innesca una complessa cascata di segnali che induce la produzione di composti di difesa tra cui gli inibitori delle proteasi (IP), composti che interferiscono con i processi digestivi dell'insetto limitandone la crescita e la sopravvivenza (RYAN, 2000; SCHEER e RYAN, 2002). La percezione di Sys sulla superficie cellulare stimola la depolarizzazione della membrana cellulare, che induce un efflusso di K^+ e l'afflusso di Ca^{2+} nella cellula (RYAN, 2000). Questi eventi si accompagnano all'attivazione di una MAP-chinasi e di una calmodulina, che attivano una fosfolipasi promuovendo il successivo rilascio di acido linolenico dalle membrane tilacoidi. L'acido linoleico viene quindi convertito in acido jasmonico (JA) e altre ossilipine, che regolano l'espressione dei geni di difesa e la conseguente sintesi dei metaboliti associati alla difesa della pianta (RYAN, 2000). Sys e JA interagiscono per attivare in modo sistemico le difese della pianta: la sistemina è prodotta nella foglia danneggiata dove innesca la produzione di JA che, a sua volta, promuove la risposta di difesa in modo sistemico (SCHILLMILLER e HOWE, 2005; SUN *et al.*, 2011). La regolazione della produzione e del rilascio di Sys è ancora in gran parte sconosciuta, ma il processamento enzimatico del suo precursore sembra essere mediato da una fitaspase (BELOSHISTOV *et al.*, 2017). Tuttavia la possibilità che sia la Prosistemina ad interagire con il recettore di membrana non è del tutto esclusa.

Il genoma di pomodoro contiene una sola copia del gene *ProSys*; esso è composto da 4176 bp ed è strutturato in 11 esoni, di cui l'ultimo codifica per la Sistemina. Il ruolo degli altri esoni non è stato chiarito ma è stato osservato che sono organizzati in cinque coppie ripetute, lasciando supporre che il gene possa aver subito numerosi cicli di duplicazione ed allungamento (MCGURL e RYAN, 1992). Sequenze omologhe di *ProSys* sono state trovate in altre specie appartenenti alla famiglia delle *Solanaceae* come patata e peperone, ma non nel tabacco, in cui sono stati, invece, identificati degli omologhi funzionali (PEARCE *et al.*, 2001).

La modulazione delle difese dirette e indirette contro vari insetti erbivori da parte della Sys è stata ampiamente caratterizzata. L'espressione costitutiva del gene *ProSys* in piante di pomodoro (RSYS) determina la produzione di elevate quantità di IP ed altri composti difensivi e rende le piante tolleranti ad insetti fitofagi e fitomizi, a diversi funghi fitopatogeni e ad agenti dello stress abiotico (MCGURL *et al.*, 1992; MCGURL *et al.*, 1994; RYAN, 2000; ORSINI *et al.*, 2010; COPPOLA *et al.*, 2015).

Inoltre le piante RSYS sono caratterizzate da un incremento delle difese indirette mostrando un più elevato livello di attrattività di nemici naturali dei fitofagi (CORRADO *et al.*, 2007; DEGENHARDT *et al.*, 2010), (Fig. 1). Ciò è la probabile conseguenza della profonda riprogrammazione del trascrittoma osservata nelle piante RSYS che mostrano più di 500 geni differenzialmente espressi rispetto alle piante controllo (COPPOLA *et al.*, 2015). L'analisi di questi geni ha evidenziato che Sys, da un lato riduce l'espressione dei geni connessi al metabolismo dei carboidrati e dall'altro promuove l'espressione di una serie di geni di difesa che dipendono da diverse vie di segnalazione. Oltre alla via di segnalazione del JA, che ha ruolo chiave dell'induzione delle difese contro insetti, le alterazioni dell'espressione genica si sovrappongono parzialmente alle risposte della pianta associate alla difesa contro patogeni o contro stress abiotici indicando che i prodotti finali della via di segnalazione sistemina-dipendente sono molteplici. Quindi, un singolo peptide è capace di stimolare percorsi di difesa multipli per la protezione della pianta contro una ampia gamma di agenti di stress (CORRADO *et al.*, 2007). Il meccanismo molecolare alla base di una così ampia capacità 'antistress' potrebbe anche in parte dipendere dalla struttura della Prosistemina. Infatti, molto recentemente è stato dimostrato che la proteina è intrinsecamente disordinata (IDP) (BUONANNO *et al.*, 2017) cioè priva di una struttura tridimensionale stabile o ordinata. Le IDP svolgono un ruolo centrale nella regolazione delle vie di trasduzione di vari segnali, tra i quali il 'segnale difesa' da stress, e in altri processi cellulari cruciali, compresa la regolazione della trascrizione e della traduzione (OLDFIELD *et al.*, 2008). La caratteristica flessibilità delle IDP consente loro di assumere un ampio spettro di stati da completamente non strutturati a parzialmente strutturati che è alla base della possibile interazione con partner molecolari diversi (TOMPA *et al.*, 2002). Questa osservazione suggerisce che la

Prosistemina possa avere un ruolo biologico ben più importante del mero contenimento del peptide Sys. Essa, infatti, legandosi a partner macromolecolari indotti da specifiche condizioni ambientali potrebbe, di volta in volta, innescare l'attivazione di geni e segnali coinvolti nella protezione della pianta contro diversi agenti dello stress ambientale (Fig. 2). È interessante osservare che i geni che codificano per le IDP presentano delle caratteristiche organizzazioni simili a quella del gene *ProSys*. Sono in corso ulteriori studi volti ad una maggiore comprensione del ruolo della Prosistemina nella difesa del pomodoro.

LA SISTEMINA PROMUOVE

LA COMUNICAZIONE PIANTA-PIANTA

È stato recentemente osservato che i composti organici volatili (VOCs) oltre a mediare i meccanismi di difesa indiretta, intervengono nella comunicazione intra e inter-pianta. Le piante danneggiate dagli insetti erbivori emettono miscele di VOCs che sono percepite, ad esempio, dalle piante adiacenti nelle quali è innescato uno stato di allerta che consente una più rapida ed efficace risposta al susseguente attacco del fitofago (ENGELBERTH *et al.*, 2004). Questo tipo di fenomeno è definito *defense priming* (DP) un processo fisiologico attraverso il quale le funzioni e le attività di una pianta non sollecitata sono in parte dedicate a supportare una risposta più rapida e robusta contro una probabile sfida futura. Il DP può essere innescato da diversi segnali come agenti patogeni, insetti nocivi, molecole di origine microbica e stress abiotici. I meccanismi molecolari legati all'innescamento sono diversi e implicano l'attivazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, l'accumulo di precursori di proteine recettori, l'aumento di alcuni composti di difesa e la modifica della cromatina per una più veloce

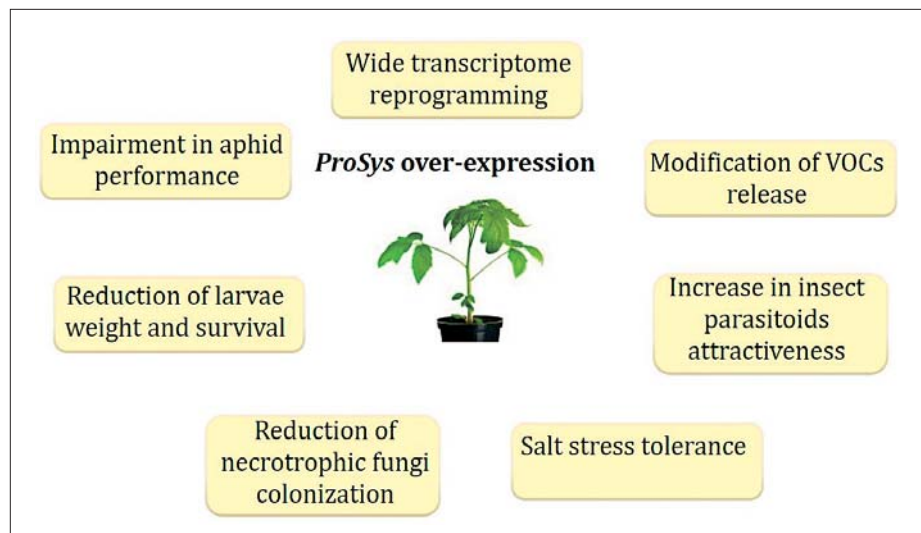


Fig. 1 – Effetti molecolari e biologici osservati in piante di pomodoro RSYS che esprimono in maniera costitutiva il gene della Prosistemina.

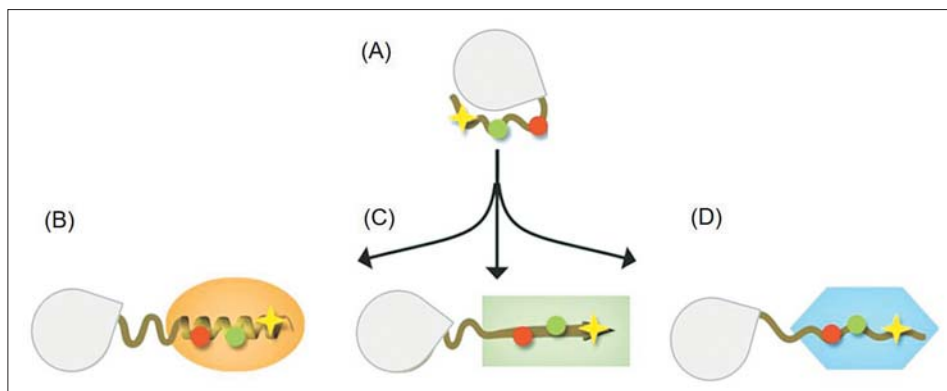


Fig. 2 – Ipotesi di interazione della proteina (A), con diversi partner molecolari (B, C e D).

attivazione dei geni (FROST *et al.*, 2008). È stato evidenziato, ad esempio, che il meccanismo di DP in piante soggette ad un secondo attacco si verifica in seguito all'accumulo di metaboliti inattivi che vengono successivamente attivati in caso di attacco (PASTOR *et al.*, 2013). Un esempio di metaboliti 'dormienti' è rappresentato dall'accumulo di MAP chinasi che vengono attivate in risposta ad un secondo stimolo e amplificano la trasduzione del segnale 'difesa' (CONRATH, 2011). Sono inoltre disponibili evidenze di una regolazione epigenetica dei fattori di difesa con modifiche che avvengono a carico degli istoni (VAN DEN BURG e TAKKEN, 2009; BERR *et al.*, 2010). Queste modifiche partecipano alla regolazione dell'espressione genica. In questo ambito sono stati effettuati studi volti a comprendere l'effetto del trat-

tamento delle piante di pomodoro con il peptide Sys sulla comunicazione pianta-pianta. È stato osservato che l'esposizione di piante sane (R) a piante trattate con il peptide (S) attiva geni e segnali tipici del DP e rende le piante R resistenti ad un successivo attacco di larve di *Spodoptera littoralis* Boisduval (COPPOLA *et al.*, 2017). Anche in questo caso, la resistenza è la probabile conseguenza della profonda riorganizzazione trascrittomica indotta nelle piante R dalla vicinanza delle piante S. Infatti, il sequenziamento del trascrittoma delle piante R ha evidenziato l'espressione differenziale di oltre 1100 trascritti rispetto ai controlli esposti a piante non trattate. L'annotazione funzionale di questi trascritti ha rivelato l'alterazione di diversi processi associati alla risposta allo stress (Fig. 3). Tra questi i principali includono l'induzione di geni codificanti

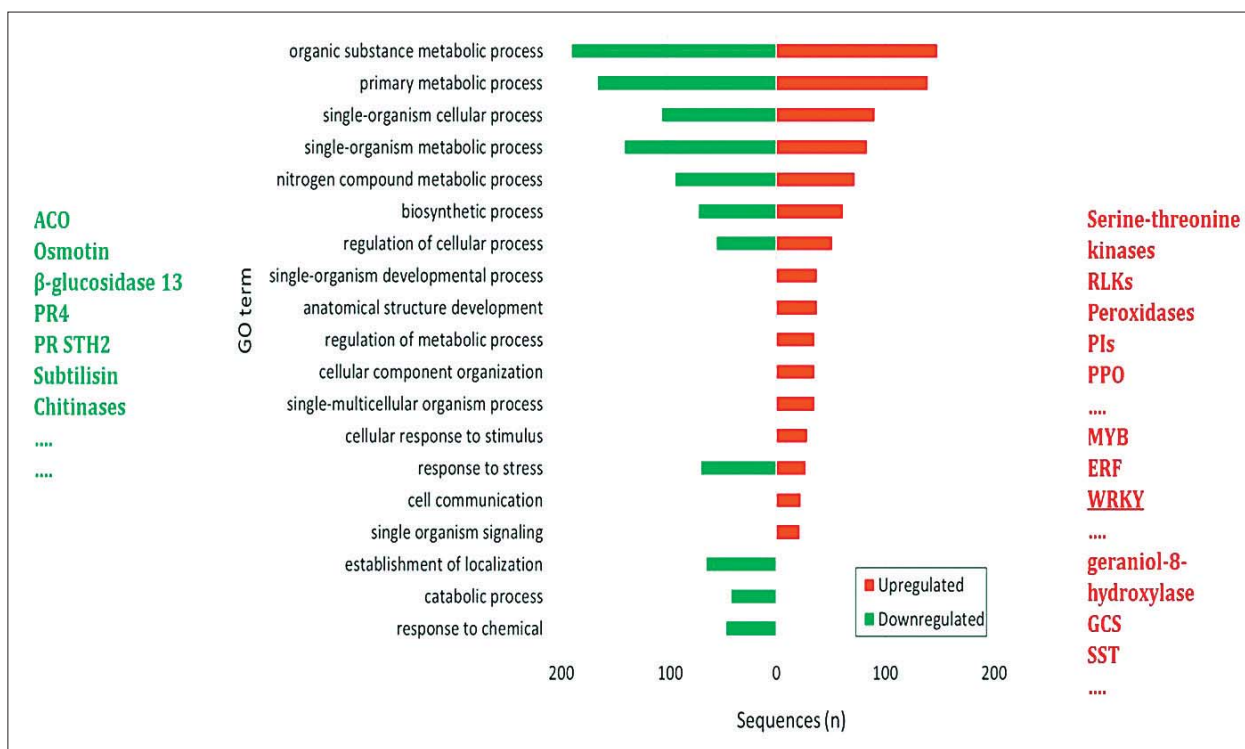


Fig. 3 – Distribuzione in categorie ontologiche del dominio 'Processo biologico' dei geni up (barre rosse) e down (barre verdi) regolati in piante R esposte a piante trattate con Sys. Esempi di geni down e up-regolati sono elencati a sinistra (in verde) e a destra (in rosso) rispettivamente.

per chinasi, recettori di membrana e per membri di diverse famiglie di fattori di trascrizione che regolano tipicamente le risposte delle piante allo stress. Le prime hanno un ruolo centrale nella segnalazione e riconoscimento di (micro)organismi invasori; le seconde hanno un ruolo chiave nella percezione e nell'adattamento della pianta allo stress mentre i fattori di trascrizione associati alla difesa, sono considerati potenziali regolatori del DP.

La Sistemina dunque, innesca in pomodoro il DP attraverso la rimodulazione del trascrittoma della pianta con la conseguente attivazione rapida ed efficace delle risposte di difesa contro successivi invasori

PROSPETTIVE FUTURE E CONCLUSIONI

La sostituzione in agricoltura dei pesticidi chimici con biopesticidi naturali potrà contribuire alla salvaguardia della salute umana e dell'ambiente, come peraltro fortemente richiesto dalle politiche agricole, ambientali e dai consumatori, in quanto essa favorisce la riduzione dei residui tossici negli alimenti e dell'inquinamento ambientale, permettendo, altresì, di limitare la continua riduzione di biodiversità. Gli studi degli eventi molecolari alla base delle interazioni pianta-insetto hanno evidenziato l'intricata rete di risposte di difesa delle piante, ancora non del tutto chiarita. I molti progressi fatti hanno, tuttavia, consentito di identificare geni e segnali che le piante utilizzano per contrastare i danni imposti dagli invasori e per segnalare la presenza di un pericolo imminente nel circondario dell'attacco. Queste conoscenze aprono nuovi scenari per il controllo degli insetti dannosi mediante l'uso di sostanze di origine vegetale attive nell'induzione delle risposte di difesa. Gli studi effettuati sulla Sistemina hanno dimostrato che il peptide è in grado di proteggere la pianta di pomodoro da un'ampia gamma di agenti di stress in conseguenza della stimolazione di diverse vie di segnalazione associate ai principali fitormoni coinvolti nella difesa, acido jasmonico, acido salicilico ed etilene. Inoltre, Sys promuove la comunicazione pianta-pianta innescando il DP che rende la pianta abile a montare una rapida ed efficace difesa contro un successivo attacco di un parassita. Il peptide rappresenta, dunque, un potenziale nuovo agente per la protezione del pomodoro e di altre specie ortive e potrà fornire una valida alternativa all'utilizzo di agrochimici anche in strategie di controllo integrato.

RIASSUNTO

Le reazioni delle piante ai parassiti includono l'attivazione di una risposta di difesa locale e sistemica basata essenzialmente su cambiamenti trascrizionali che sono principalmente

controllati e coordinati dai fitormoni. La pianta attaccata percepisce l'organismo invasore riconoscendo elicitori associati agli erbivori che inducono selettivamente diverse risposte di difesa. Questi ultimi sono potenziati da molecole vegetali endogene associate al danno della pianta (DAMP - *Damage Associated Molecular Patterns*), che includono piccoli peptidi presenti in diverse specie di piante. Il peptide DAMP viene rilasciato da precursori più grandi e si lega ai recettori di membrana per attivare cascate di segnalazione che inducono immunità locale e sistemica. Il livello di protezione è conferito dalle profonde modificazioni trascrittomiche indotte dal peptide, che sostiene una ricchezza di cambiamenti metabolici. Oltre a produrre nuovi metaboliti che sono tossici o repellenti per gli erbivori di insetti o che sono in grado di ricordare i loro nemici naturali, il profilo metabolico delle piante attaccate può allertare le piante con-specifiche vicine e innescare una risposta più efficace contro un agente stressante presente nell'ambiente (priming della difesa). Questa presentazione si concentrerà sul ruolo della Sistemina e del suo precursore nell'attivazione dell'immunità delle piante e nella comunicazione pianta-pianta.

BIBLIOGRAFIA

- BELOSHISTOV R.E., DREIZLER K., GALIULLINA R.A., TUZHNIKOV A.I., SEREBRYAKOVA M.V., REICHARDT S., SHAW J., TALIANSKY M.E., PFANNSTIEL J., CHICHKOVA N.V., STINTZI, A., SCHALLER A., VARTAPETIAN A.B., 2017 – *Phytaspase mediated precursor processing and maturation of the wound hormone systemin*. - *New Phytol.*, doi: 10.1111/nph.14568.
- BERR A., MCCALLUM E.J., ALIOUA A., HEINTZ D., HEITZ T., SHEN W-H., 2010 – *Arabidopsis Histone Methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 Mediates Induction of the Jasmonate/Ethylene Pathway Genes in Plant Defense Response to Necrotrophic Fungi*. - *Plant Physiol.*, 154: 1403-1414.
- BUONANNO M., COPPOLA M., DI LELIO I., MOLISSO D., LEONE M., PENNACCHIO F., LANGELLA E., RAO R., MONTI S.M., 2017 – *Prosystemin, a prohormone that modulates plant defense barriers, is an intrinsically disordered protein*. - *Protein Sci.*, 27: 620-632.
- CONRATH U., 2011 – *Molecular aspects of defence priming*. - *Trends Plant Sci.*, 16: 524-531.
- COPPOLA M., CORRADO G., COPPOLA V., CASCONI P., MARTINELLI R., DIGILIO M.C., PENNACCHIO F., RAO R., 2015 – *Prosystemin Overexpression in Tomato Enhances Resistance to Different Biotic Stresses by Activating Genes of Multiple Signaling Pathways*. - *Plant Mol. Biol. Report*, 33: 1270-1285.
- COPPOLA M., CASCONI P., MADONNA V., LELIO I., ESPOSITO F., AVITABILE C., ROMANELLI A., GUERRIERI E., VITIELLO A., PENNACCHIO F., CORRADO G., RAO R., 2017 – *Plant-to-plant communication triggered by systemin primes anti-herbivore resistance in tomato*. - *Sci. Rep.*, 7: 15522.
- CORRADO G., SASSO R., PASQUARIELLO M., IODICE L., CARRETTA A., CASCONI P., ARIATI L., DIGILIO M.C., GUERRIERI E., RAO R., 2007 – *Systemin Regulates Both Systemic and Volatile Signaling in Tomato Plants*. - *J. Chem. Ecol.*, 4: 669-681.
- DEGENHARDT D.C., REFI-HIND S., STRATMANN J.W., LINCOLN, D.E., 2010 – *Systemin and jasmonic acid regulate constitutive and herbivore-induced systemic volatile emissions in tomato, Solanum lycopersicum*. - *Phytochemistry*, 71: 2024-2037.
- DICKE M., 2015 – *Herbivore-induced plant volatiles as a*

- rich source of information for arthropod predators: fundamental and applied aspects. - J. Indian Inst. Sci., 95: 35-42.
- EBEL J., MITHÖFER A., 1998 – *Early events in the elicitation of plant defence*. - Planta, 206: 335-348.
- ENGELBERTH J., ALBORN H.T., SCHMELZ E.A., TUMLINSON, J.H., 2004 – *Airborne signals prime plants against insect herbivore attack*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 101: 1781-1785.
- FROST C.J., MESCHER M.C., CARLSON J.E., DE MORAES C.M., 2008 – *Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle*. - Plant Physiol., 146: 818-824.
- GLAZEBROOK J., 2005 – *Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens*. - Annu. Rev. Phytopathol., 43: 205-27.
- HEIL M., 2014 – *Herbivore-induced plant volatiles: targets, perception and unanswered questions*. - New Phytol., 204: 297-306.
- HEIL M., 2015 – *Extrafloral nectar at the plant-insect interface: a spotlight on chemical ecology, phenotypic plasticity, and food webs*. - Annu. Rev. Entomol., 60: 213-232.
- HOGENHOUT S.A., BOS J.I., 2011 – *Effector proteins that modulate plant-insect interactions*. - Curr. Opin. Plant Biol., 14: 422-428.
- HOWE G.A., JANDER G., 2008 – *Plant immunity to insect herbivores*. - Annu. Rev. Plant Biol., 59: 41-66.
- MAFFEI M.E., MITHÖFER A., BOLAND W., 2007 – *Before gene expression: early events in plant-insect interaction* - Trends Plant. Sci., 12: 310-316.
- MCGURL B., RYAN C.A., 1992 – *The organization of the prosystemin gene*. - Plant Mol. Biol., 20: 405-409.
- MCGURL B., PEARCE G., OROZCO-CARDENAS M., RYAN C.A., 1992 – *Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene*. - Science, 255: 1570-1573.
- MCGURL B., OROZCO-CARDENAS M., PEARCE G., RYAN C.A., 1994 – *Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 91: 9799-9802.
- OERKE E.C., 2006 – *Crop losses to pests*. - J. Agric. Sci., 144: 31-43.
- OLDFIELD C.J., MENG J., YANG J.Y., YANG M.Q., UVERSKY V.N., DUNKER A.K., 2008 – *Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners*. - BMC genomics, 9: S1.
- ORSINI F., CASCONI P., DE PASCALE S., BARBIERI G., CORRADO G., RAO R., MAGGIO A., 2010 – *Systemin-dependent salinity tolerance in tomato: evidence of specific convergence of abiotic and biotic stress responses*. - Physiol. Plant, 138: 10-21.
- PASTOR V., LUNA E., MAUCH-MANIC B., TON J., FLORS V., 2013 – *Primed plants do not forget*. - Environ. Exp. Bot., 94: 46-56.
- PEARCE G., STRYDOM D., JOHNSON S., RYAN C.A., 1991 – *A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins*. - Science, 253: 895-897.
- 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.
- PIETERSE C.M., LEON-REYES A., VAN DER ENT S., VAN WEES, S.C., 2009 – *Networking by small-molecule hormones in plant immunity*. - Nat. Chem. Biol., 5: 308.
- RYAN C.A., 2000 – *The systemin signalling pathway: differential activation of plant defensive genes*. - Biochim. Biophys. Acta, 1477: 112-121.
- SCHEER J.M., RYAN C.A., 2002 – *The systemin receptor SR160 from Lycopersicon peruvianum is a member of the LRR receptor kinase family*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 99: 9585-9590.
- SCHILMILLER A.L., HOWE G.A., 2005 – *Systemic signaling in the wound response*. - Curr. Opin. Plant Biol., 8: 369-377.
- SUN J.Q., JIANG H.L., LI C.Y., 2011 – *Systemin/Jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato*. - Mol. Plant, 4: 607-615.
- TOMPA P., 2002 – *Intrinsically unstructured proteins*. - Trends Biochem. Sci., 27: 527-533.
- VAN DEN BURG H.A., TAKKEN F.L.W., 2009 – *Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance?* - Trends Plant Sci., 14: 286-294.
- WALLING L.L., 2009 – *Adaptive defense responses to pathogens and insects*. - Adv. Bot. Res., 51: 551-612.
- WU J., BALDWIN I.T., 2010 – *New insights into plant responses to the attack from insect herbivores*. - Annu. Rev. Genet., 44: 1-24.

ARE LEAF-MINERS AND GALL-INDUCERS PART OF A CONTINUUM OF PLANT MANIPULATORS?

DAVID GIRON (*) ⁽¹⁾ - ANTOINE GUIGUET(*) (**) - CARLOS LOPEZ-VAAMONDE (***)
ISSEI OHSHIMA (**)

(*) *Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI), UMR 7261, CNRS/Université de Tours, Tours, France*

(**) *Department of Life and Environmental Science, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan*

(***) *INRA, UR 0633 Zoologie Forestière, Orléans, France*

¹ Correspondence: david.giron@univ-tours.fr

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insect-plant interactions". Seduta pubblica dell'Accademia - Napoli, 17 novembre 2017

Are leaf-miners and gall-inducers part of a continuum of plant manipulators?

Plants constitute key nutritional resources for many organisms on Earth and protect these resources by enhancing interactions with mutualists while reducing interactions with antagonists. Interactions with different members of their ecological community can lead to a profound reconfiguration of the plant's physiology, which favors beneficial organisms like symbionts and harms antagonists like pathogens or herbivores. Among the insect herbivores that attack plants, some species have evolved a peculiar feeding strategy that allows them to hijack the plant's machinery for their own benefit. By 'reprogramming' the plant genome, the insect forces the plant to create specialized nutritional resources that benefit the insect at the expense of the plant's growth and reproduction. Mechanisms underlying this attack strategy and the evolutionary origin of these plant-manipulating insects remain largely unknown. Our research focus on secreted salivary effectors that are produced by insect reprogrammers to alter plant metabolic processes. We also compare various feeding strategies using an evolutionary framework to discover similarities and differences in plant manipulation strategies. Our results show converging strategies between gall-inducers and leaf-miners. Recently discovered species that have evolved an unique mixed-feeding strategy (first larval instars being leaf-miners while late larval instars are gall-inducers) offers an unique opportunity to identify genes that are responsible for the induction of galls. These species may represent an intermediate state along the continuum between leaf-miners and gall-inducers.

KEY WORDS: Insects, plant manipulation, leaf-miners, gall-inducers.

The evolution and adaptive significance of the endophytophagous feeding habit (i.e. living within plant tissues) still remain unclear (CONNOR & TAVERNER, 1997; STONE & SCHÖNRÖGGE, 2003). Three major hypotheses have been proposed to explain this feeding life history mode: The nutrition, the microenvironment and the enemy hypothesis (CONNOR & TAVERNER, 1997; STONE & SCHÖNRÖGGE, 2003). The nutrition hypothesis states that galling or mining, two major forms of endophytophagy in insects, provide enhanced nutrition over other external-feeding modes, and allow organisms to avoid major plant defenses. The microenvironment hypothesis states that feeding internally protects the organism from unfavorable abiotic conditions, particularly desiccation. Finally, the enemy hypothesis maintains that concealed feeding strategies serve as defenses against natural enemies.

Among these hypotheses, feeding selectively on most nutritional tissues is undoubtedly considered as one of the main advantages. Indeed, nutritional requirements of animals are multidimensional and change qualitatively and quantitatively as an

individual grows, develops, becomes reproductively active, then senesces (SCHOONHOVEN *et al.*, 2005; BEHMER, 2009; RAUBENHEIMER *et al.*, 2009). Likewise, the nutritional environment is frequently highly variable both in space and time. Thus, food intake for any given life stage is not necessarily matched to life-history trait requirements for that life-stage. Plant tissues specifically are also often considered nutritionally suboptimal for herbivores (SCHOONHOVEN *et al.*, 2005). To rectify these potential mismatches, animals have evolved a suite of elegant behavioral and physiological pre- and post-ingestive regulatory mechanisms (BEHMER, 2009; RAUBENHEIMER *et al.*, 2009; BODY, 2013).

Organisms such as gall-inducer (Fig. 1) and permanent leaf-miner insects are peculiar because they simultaneously live in, and eat their food (STONE & SCHÖNRÖGGE, 2003). As a consequence, while endophagous insects by their feeding habit secure their nutrition and shelter for either shorter or longer periods of their life history, they also have evolved specific feeding strategies (STONE & SCHÖNRÖGGE, 2003). Such intimate associations are indeed expect-



Fig. 1 – Gall-inducing insects are iconic examples in the manipulation and reprogramming of plant development, inducing spectacular morphological and physiological changes of host-plant tissues within which the insect feeds and grows. Despite decades of research, basic mechanisms of gall formation remain unknown. © David Giron & Mélanie Body / IRBI

ted to facilitate close interactions between independent genomes leading to biochemical and hormonal cross-talk between arthropods and plants, and setting the ground for altered host-plant's gene expression. This allows them to manipulate their host plant in a way to best meet their needs, including counteracting plant defenses, and compensating for variation in food nutritional composition (STONE & SCHÖNROGGE, 2003). Gall-inducer insects have long been known to alter the plant morphology and physiology for their own benefits and they are usually distinguished from other insect-generated shelters by the fact that they involve

active differentiation of highly nutritive tissues (STONE & SCHÖNROGGE, 2003; SHORTHOUSE & ROHFRTSCH, 1992). However, plant manipulation appears now to be not restricted to gall-inducer, as suggested by the autumnal formation of 'green-island' (Fig. 2) around mining caterpillars in yellow leaves (KAISER *et al.*, 2010; GIRON *et al.*, 2016).

Results obtained at the Insect Biology Research Institute in Tours have demonstrated an ability of Gracillariidae leaf-mining moths to manipulate their host-plant in a way to best meet their nutritional requirements. More specifically, *Phyllonorycter blancardella* creates an enhanced nutritional micro-



Fig. 2 – Green-island induced on apple tree leaves by the leaf-mining moth *Phyllonorycter blancardella* (Lepidoptera: Gracillariidae). © David Giron & Mélanie Body / IRBI

environment and buffer against seasonal variations of the leaf nutritional quality. Through a manipulation of the phytohormonal balance (BODY *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016) leaf-miner caterpillars can regulate the soluble sugar and protein profile in their feeding area (BODY *et al.*, 2013; BODY *et al.*, 2015). Morphology of larval mouthparts and the resulting morphological impact on leaf tissues have been characterized in this system showing that young and late larval instars evolved different feeding strategies allowing insects to cope with a confined nutritional space. Insects also prevent mined tissues from senescing through endosymbiotic bacteria (*Wolbachia*) mediated release of cytokinins (KAISER *et al.*, 2010; BODY *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016; GIRON *et al.*, 2007; GIRON *et al.*, 2013). Host-plant manipulation and endosymbiotic infections by *Wolbachia* have been associated through the evolutionary diversification of Gracillariidae (GUTZWILLER *et al.*, 2015).

Because of their concealed habit in a confined environment, endophagous arthropods show specialized and, to some extent, convergent characteristics in their nutritional physiology and behaviors, highlighting generalized processes associated with the colonization of plants by endophytic organisms. Additionally, the sedentary

behavior of endophagous arthropods during their development renders them ideal systems for interpreting the ecological and evolutionary mechanisms of herbivory and related questions such as host-plant resistance or host-plant physiological manipulation.

Understanding the evolution and adaptive significance of the endophytophagous feeding mode needs to contrast feeding strategies of different endophagous species in an evolutionary framework. It also needs to understand how insects manipulate the physiology and the anatomy of their host-plant focusing specifically on salivary effectors that are produced and delivered to the plant by the insect. Our research aims to answer these questions by investigating salivary effectors produced by the Japanese species *Caloptilia cecidophora* (Lepidoptera: Gracillariidae) that has evolved an unique mixed-feeding strategy. The Gracillariidae family contains around 2000 species. The majority of species are leaf-miners but it includes (at least) three galligenous species. Among them, *Caloptilia cecidophora* induces a gall on leaves of *Glochidion obovatum* (Phyllanthaceae) (Fig. 3). We conducted a complete histological study of the development of *C. cecidophora* galls. It appears



Fig. 3 – Galls induced by *Caloptilia cecidophora* (Lepidoptera: Gracilaridae) on leaves of *Glochidion obovatum* (Phyllanthaceae). © Antoine Guiguet / IRBI

that first and second instars of *C. cecidophora* are leaf-miners while later instars turn into gall-inducers. Late larval instars induce the development of new tissues absent from the normal leaf but found in complex galls like those made by Cynipidae. By showing a mix-strategy between leaf-mining and gall-inducing and a convergence in complex gall structures, our results shed light on the origin of gall induction by insects and help to understand the mechanisms of gall morphogenesis. This species may also represent an intermediate state along the continuum between leaf-miners and gall-inducers and an unique opportunity to identify genes that are responsible for the induction of galls. Through a combination of transcriptomic and proteomic approaches, candidate effectors are in the process of being identified and contrasted to plant histological alterations. To unravel similarities and differences between various feeding strategies, data obtained on closely-related insect species known to induce different degree of plant manipulation (a leaf-miner, a gall-inducer and a leaf-roller) are also currently compared.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the ENS Lyon for the PhD scholarship to Antoine Guiguet and the PRC project 1724 Origen funded by the National Center for Scientific Research and the Japan Society for the Promotion of Science.

RIASSUNTO

I MINATORI FOLIARI E GLI INDUTTORI DI GALLE SONO PARTE DI UN CONTINUUM DI MANIPOLATORI DELLA PIANTA?

Le piante, costituendo l'alimento chiave per molti organismi terrestri, si proteggono favorendo le interazioni con organismi mutualisti e minimizzando invece quelle con gli antagonisti.

Le interazioni con membri diversi delle comunità ecologiche possono generare profonde riconfigurazioni della fisiologia della pianta, atte a favorire organismi benefici come i simbionti ed a danneggiare gli antagonisti, patogeni ed erbivori. Tra gli erbivori, alcune specie di insetti hanno evoluto strategie alimentari peculiari, che gli consentono di dirottare a proprio vantaggio gli apparati della pianta; questi insetti, riprogrammando il genoma vegetale, costringono la pianta a produrre, a loro vantaggio, risorse nutrizionali specializzate, che vanno a

discapito della crescita e riproduzione della pianta stessa. I meccanismi alla base delle strategie di attacco degli insetti che manipolano le piante, così come la loro origine evolutiva, sono molto poco noti. La nostra ricerca si focalizza sugli effettori salivari degli insetti riprogrammatori, in grado di alterare i processi metabolici della pianta. Inoltre, confrontiamo diverse strategie alimentari in un quadro evolutivo, in modo da mettere in risalto similarità e differenze nelle strategie di manipolazione delle piante. I nostri risultati sugli induttori di galle e sui minatori mostrano strategie convergenti. Specie di recente scoperta, con un modo di alimentarsi peculiare (la larva di prima età è minatrice, mentre gli stadi successivi producono galle), hanno offerto l'opportunità unica di identificare i geni responsabili dell'induzione delle galle. Queste specie rappresentano quindi uno stato intermedio tra minatori e induttori di galle.

REFERENCES

- BEHMER S.T., 2009 – *Insect herbivore nutrient regulation* – Annu. Rev. Entomol., 54: 165-187.
- BODY M., 2013 – *Plant Manipulation by endophagous organisms: physiological mechanisms, signaling, and nutritional consequences in a leaf-miner insect*. (Ph.D. thesis). Université François-Rabelais de Tours, Tours, France, 400 pages.
- BODY M., KAISER W., DUBREUIL G., CASAS J., GIRON D., 2013 – *Leaf-miners co-opt microorganisms to enhance their nutritional environment*. - J. Chem. Ecol., 39: 969-977.
- BODY M., BURLAT V., GIRON D., 2015 – *Hypermetamorphosis in a leaf-miner allows insects to cope with a confined nutritional space*. - Arthropod-Plant Interact., 9: 75-84.
- CONNOR E.F., TAVERNER M.P., 1997 – *The evolution and adaptive significance of the leaf-mining habit* – Oikos, 79: 6-325.
- GIRON D., KAISER W., IMBAULT N., CASAS J., 2007 – *Cytokinin-mediated leaf manipulation by a leaf-miner caterpillar*. - Biol. Lett., 3: 340-343.
- GIRON D., FRAGO E., GLEVAREC G., PIETERSE C.M.J., DICKE M., 2013 – *Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence*. - Funct. Ecol., 27: 599-609.
- GIRON D., HUGUET E., STONE G.N., BODY M., 2016 – *Insect-induced effects on plants and possible effectors used by galling and leaf-mining insects to manipulate their host-plant*. - J. Insect Physiol., 84: 70-89.
- GUTZWILLER F., DEDEINE F., KAISER W., GIRON D., LOPEZ-VAAMONDE C., 2015 – *Correlation between the green-island phenotype and Wolbachia infections during the evolutionary diversification of Gracillariidae leaf-mining moths*. - Ecol. Evol., 5: 4049-4062.
- KAISER W., HUGUET E., CASAS J., COMMINS C., GIRON D., 2010 – *Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts*. - Proc. R. Soc. Biol. Sci., 277: 2311-2319.
- RAUBENHEIMER D., SIMPSON S.J., MAYNTZ D., 2009 – *Nutrition, ecology and nutritional ecology: toward an integrated framework*. - Funct. Ecol., 23: 4-16.
- SCHOONHOVEN L.M., VAN LOON J.J.A., DICKE M. (EDS.), 2005 – *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press, 421 pp.
- SHORTHOUSE J.D., ROHFRTSCH O. (EDS.), 1992 – *Biology of Insect-Induced Galls*. Oxford University Press, New York.
- STONE G.N., SCHÖNROGGE K., 2003 – *The adaptive significance of insect gall morphology* – Trends Ecol. Evol., 18: 512-522.
- ZHANG H., DUGÉ DE BERNONVILLE T., BODY M., GLEVAREC G., REICHEL T., UNSICKER S., BRUNEAU M., RENOU J.-P., HUGUET E., DUBREUIL G., GIRON D., 2016 – *Leaf-mining by Phyllonorycter blancardella reprograms the host-leaf transcriptome to modulate phytohormones associated with nutrient mobilization and plant defense*. - J. Insect Physiol., 84: 114-127.

DIFESE INDOTTE NELLE PIANTE: L'INTERAZIONE CON INSETTI E MICRORGANISMI

MARIA CRISTINA DIGILIO (*)

(*) Università degli Studi di Napoli Federico II

Dipartimento di Agraria. Via Università 100. Portici 80055, Italia; e-mail: digilio@unina.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insect-plant interactions". Seduta pubblica dell'Accademia - Napoli, 17 novembre 2017.

Insects and microorganisms interactions and the induction of plant defence

Insect-plant interactions are modulated by a number of factors regulating plant metabolism and response. In fact, the attacking herbivore is the first source of molecules active on plants, with the secretions necessary for its feeding activity. Among these, salivary secretions and gut regurgitate play a key role. Thus, the insect feeding produces a mechanical damage that activates plant signaling, and this is reinforced by elicitors delivered at the feeding site. The network of molecular pathways underlying the plant metabolic response is further conditioned by the microbiota associated with plants.

KEY WORDS: induced defence; salicylic and jasmonic acid metabolic pathway; saliva; PGPF.

Quando gli insetti danneggiano le attività o la salute dell'uomo, li definiamo dannosi, e in inglese li qualifichiamo "pest". Tra gli insetti dannosi annoveriamo quelli che si mettono in competizione con noi perché attaccano le piante coltivate. Nel XXI secolo, possiamo dare per esaurito l'approccio basato principalmente sulla somministrazione di composti tossici, ma siamo orientati verso tecniche di controllo più olistiche, e tutte decisamente inquadrare nell'ambito del controllo integrato. In questo tipo di approccio appaiono molto interessanti le difese inducibili delle piante: infatti le piante, oltre alle barriere fisiche e chimiche che oppongono costitutivamente all'attacco degli insetti, sono in grado di modulare difese aggiuntive, inducibili, in seguito alla fitofagia, producendo composti difensivi in quantità maggiori rispetto a quelli presenti costitutivamente, oppure sintetizzando nuovi composti, non presenti in quei tessuti soggetti all'attacco. Per esempio, una pianta in seguito alla fitofagia può produrre più tricomi, oppure aumentare la quantità di glucosinolati o la traslocazione di nicotina rispetto alla dose costitutiva, o ancora può sintetizzare *de novo* inibitori di enzimi digestivi nella parte attaccata.

Le *difese inducibili*, rispetto alle difese costitutive, hanno minore costo metabolico per la pianta e maggiore specificità, e conoscere i meccanismi di induzione è particolarmente interessante, soprattutto in un'ottica di utilizzo per la difesa delle colture.

Gli *insetti fitofagi* in senso stretto, cioè dotati di apparato boccale masticatore, durante l'attacco

rompono le membrane cellulari con le mandibole, producendo un danno che la pianta percepisce come abiotico, il cosiddetto "wounding". La prima descrizione di difese inducibili è di GREEN & RYAN (1972): in pomodoro, dopo un danno operato mediante uno strumento oppure dalla Dorifora, si innesca una serie di reazioni che porta al rapido accumulo di inibitori di proteasi, composti difensivi particolarmente efficaci contro gli insetti masticatori. Adesso conosciamo molti dettagli di quello che intercorre tra l'attacco e la produzione di composti che costituiscono le difese inducibili della pianta. Le membrane danneggiate rilasciano acidi grassi, principalmente acido α -linolenico; questo subisce una serie di trasformazioni enzimatiche e perossidazioni, fino ad essere trasformato in acido jasmonico. Questa via metabolica è definita ottadecanoica, perché le molecole coinvolte sono catene di acidi grassi (ossilipine) a 18 atomi di carbonio. L'acido jasmonico può essere ulteriormente trasformato, dando luogo ad un gruppo di composti, gli jasmونات, fitoormoni che hanno un ruolo nel regolare la crescita e lo sviluppo della pianta, ma soprattutto la sua interazione con altri organismi: il suo derivato metilico, il metil-jasmonato, è un composto volatile percepito dagli insetti, tra cui i nemici naturali, che lo utilizzano per localizzare la pianta attaccata dai fitofagi; se coniugato con aminoacidi, come la isoleucina, funziona come molecola di segnale, mentre decarbossilato diventa cis-jasmone (la componente principale del profumo del gelsomino - genere *Jasminum*, ha dato il nome a questa famiglia di composti), è percepito dagli insetti, a seconda dei casi, come attrattivo o come repellente, ed è anche utiliz-

zato come feromone sessuale (MATSUI *et al.*, 2017 e riferimenti ivi citati).

Le difese inducibili che coinvolgono i jasmonati sono attivate dalla pianta in conseguenza di un danno meccanico, provocato con uno strumento, e anche quando il danno è inferto dalle mandibole di un bruco o di un coleottero. Però, quando l'attacco è di natura biotica, è presente un'altra componente essenziale: infatti, durante l'alimentazione, le ghiandole labiali e mandibolari rilasciano secrezioni salivari, ed inoltre sulla ferita prodotta dalle mandibole è depositato anche materiale che proviene dall'intestino (intestino anteriore ma anche medio), il cosiddetto rigurgitato, e di conseguenza interviene un ulteriore livello trofico, i batteri simbiotici. L'insetto, per potersi alimentare, costituisce attraverso la saliva un *continuum* tra tessuto vegetale e contenuto intestinale (Fig. 1). Proprio questo fa la differenza tra gli strumenti meccanici usati per ferire la pianta, quali le lime e le perforatrici usate da GREEN & RYAN (1972) nella prima descrizione di difese inducibili, e gli insetti. Infatti, è ampiamente dimostrato che il rilascio di saliva e rigurgitato è essenziale per il risultato dell'interazione tra pianta e insetto: un componente essenziale della saliva dei bruchi è l'enzima glucosio ossidasi, che contrasta l'attivazione del percorso metabolico del jasmonato (FELTON & EICHENSEER, 2000), quello maggiormente attivo contro i bruchi. Sono note, al contrario, molecole rilasciate dagli insetti che inducono risposte difensive nella pianta, quali la β -glucosidasi rilasciata dalla larva di *Pieris brassicae* (L.) (MATTIACCI *et al.*, 1995) e la volicitina di *Spo-*

doptera exigua (Hübner) (ALBORN *et al.*, 1997); quest'ultimo composto è sintetizzato a partire da componenti della pianta (acidi grassi) e del bruco (glutamina) (PARÉ *et al.*, 1998). Diversi esperimenti sono stati congegnati per consentire di comprendere in cosa si differenzia il danno abiotico (wounding), paragonato al danno meccanico operato dalle mandibole dei fitofagi, e quello realmente prodotto da bruchi e coleotteri. L'utilizzo di una larva robotica (MecWorm), uno strumento in grado di operare in maniera riproducibile un danno abiotico, ha mostrato come la pianta non reagisce all'insulto singolo, mentre reagisce ad eventi multipli con il rilascio di composti volatili (VOC) (MITHÖFER *et al.*, 2005), che sono piuttosto specifici nell'attrarre nemici naturali (DE MORAES *et al.*, 1998). Solo quando al wounding è associata l'applicazione di saliva e rigurgitato, si osserva, oltre al rilascio di VOC, anche la depolarizzazione delle membrane, tipica dell'attacco reale (BRICCHI *et al.*, 2010). Gli esperimenti con il MecWorm hanno consentito di separare le componenti del danno, quella meccanica e lo stimolo chimico, chiarendo che per ottenere gli stessi effetti della fitofagia è necessaria l'attività delle secrezioni salivari.

L'interazione tra piante e fitomizi presenta caratteristiche molto diverse da quelle descritte per i masticatori. Infatti, in questo caso, il danno di natura meccanica appare piuttosto limitato, mancando una vistosa sottrazione di tessuto, mentre, attraverso gli stiletti, c'è un'abbondante iniezione di saliva nei tessuti dell'ospite. I fitomizi più studiati dal punto di vista del loro rapporto con la pianta sono gli afidi, e



Fig. 1 – *Spodoptera littoralis* (Boisduval) con secrezioni orali (foto Ilaria Di Lelio).

lo studio di questa interazione alimentare può essere proficuamente affrontato mediante un approccio multidisciplinare, che prende in considerazione da una parte tessuti e secrezioni dell'insetto e dall'altra la risposta genetica, molecolare e biochimica della pianta. Una volta inseriti gli stiletti, è possibile riconoscere, grazie a tecniche di registrazione elettrica della penetrazione stilettare (TJALLINGII, 1988), le fasi in cui gli afidi rilasciano la saliva; questa infatti viene secreta ad intervalli, come saliva gel e come saliva acquosa (MILES, 1965). La saliva gel, prodotta dalle parte più sviluppata delle ghiandole salivari (ghiandola principale) (Fig. 2), appena emessa gelifica, formando un tunnel protettivo che guida, avvolge e protegge gli stiletti. La meta è il tessuto vascolare, e gli stiletti per raggiungerlo navigano tra le cellule, cercando nelle pareti rigide un punto debole, che consenta la penetrazione all'interno delle cellule. La saliva gel sigilla le membrane forate dagli stiletti (WILL & VAN BEL, 2006), rendendo minimo il danno meccanico, mentre lo sbocco superiore dei canali alimentare e salivare, verso l'apertura orale, rimane chiuso per evitare la perdita di turgore (TJALLINGII, 2006). Durante questo percorso, spigoloso perché costeggia le pareti cellulari, l'afide emette anche saliva acquosa (che non gelifica, ed è prodotta dalla ghiandola accessoria), e fa punture di assaggio, in modo da inviare campioni del contenuto delle cellule nella cavità orale, dove si trovano i chemiorecettori. Il viaggio degli stiletti termina nel floema, riconosciuto grazie a pH e concentrazione zuccherina più elevati; qui inizia un'abbondante secrezione di saliva acquosa, che si miscela con la linfa e viene ingerita passivamente, trovandosi la

linfa nel floema in elevata pressione di turgore. Però, se la penetrazione fino al floema è potuta avvenire quasi in incognito, facendo piccoli danni immediatamente riparati, le cellule floematiche danneggiate dalla penetrazione degli stiletti allestiscono una chiara reazione difensiva: nei pressi della puntura rilasciano ioni Ca^{++} , e le cellule vicine mostrano depolarizzazione delle membrane, tappando immediatamente i singoli elementi del floema e successivamente deponendo callosio (FURCH *et al.*, 2009). La pianta, in altri termini, cerca di impedire all'afide di proseguire nel suo attacco. Gli afidi, a questo punto, sarebbero impossibilitati ad alimentarsi, eppure, nelle interazioni compatibili, riescono a controbattere, iniettando nell'ospite molecole in grado di sopprimere le difese della pianta, in modo da riuscire ad assumere la linfa ed a sviluppare nuove colonie. Gli studi sulle proteine salivari degli afidi sono iniziati da alcuni anni, e stanno consentendo l'identificazione di proteine e meccanismi di azione che cercano di spiegare come fanno gli afidi a far penetrare gli stiletti in maniera subdola (dal punto di vista della pianta) e ad ostacolare le capacità difensive della pianta.

Le proteine della saliva gel hanno principalmente una funzione strutturale, ma aiutano anche la penetrazione degli stiletti, degradando la parete cellulare (pectinasi, pectinesterasi, poligalatturonasi, cellulasi). Gli stessi enzimi litici sono presenti anche nella saliva acquosa, dove sono state identificate anche proteine capaci di sopprimere le difese della pianta. Queste possono agire legando gli ioni Ca^{++} liberati in seguito alla puntura degli

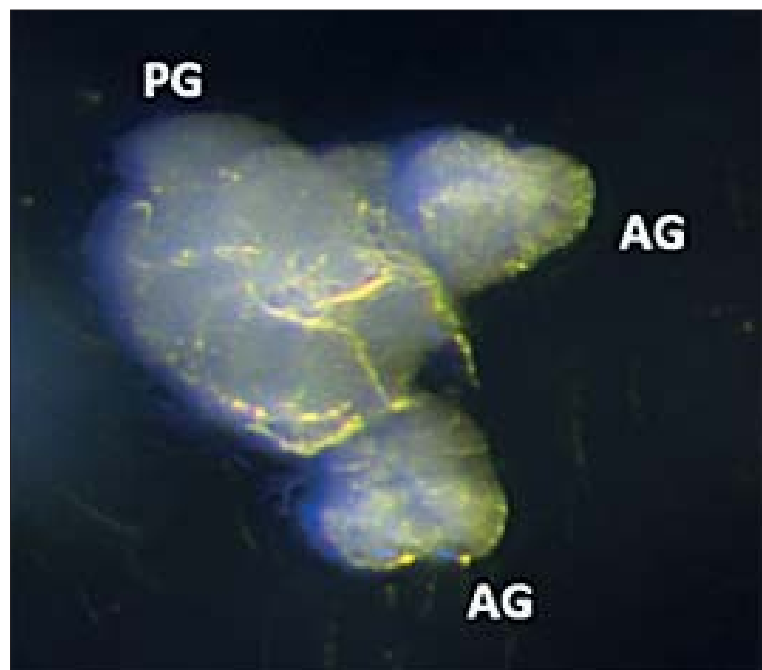


Fig. 2 – Ghiandola salivare di *Aphis gossypii* Glover. PG ghiandola principale. AG ghiandola accessoria (foto Massimo Giorgini).

stiletti, come la regucalcina identificata nella saliva di *Megoura viciae* Buckton (WILL *et al.*, 2007). Le cellule del floema possono essere danneggiate da proteasi immesse con la saliva, e questo, oltre ad ostacolare le difese, aumenta la disponibilità di aminoacidi, che sono un importante nutritivo, ma fortemente limitato per gli afidi. La pianta produce una grande quantità di allelochimici ad azione difensiva, per esempio composti fenolici quali lignine, tannini, cumarine, flavonoidi e polifenoli, oltre a specie reattive dell'ossigeno prodotte in seguito all'attacco; questi composti dannosi per gli insetti sono detossificati da enzimi salivari (alcuni esempi: polifenolossidasi, perossidasi, ossidoreduttasi). Come per i bruchi, anche in questo caso possono partecipare i batteri simbiotici: nella saliva di *Macrosiphum euphorbiae* è stata identificata la proteina GroEL, derivante da *Buchnera aphidicola*, che induce un burst ossidativo nella pianta, e l'induzione di questa risposta difensiva causa una diminuzione di fertilità nell'afide (CHAUDHARY *et al.*, 2014). Anche frammenti di chitina, derivanti da piccoli danni meccanici/enzimatici al tegumento durante la penetrazione degli stiletti, possono rinforzare la risposta di difesa (VAN BEL & WILL, 2016).

Le proteine salivari degli afidi che, immesse nell'ospite, consentono di osservare un effetto sulla performance degli afidi, sono state recentemente definite "effettori", con un termine mutuato dalla patologia vegetale (BOS *et al.*, 2010). A partire da C002, identificato in *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (MUTTI *et al.*, 2008), è iniziata la caratterizzazione di diversi effettori, in particolare di *M. euphorbiae* e di *Myzus persicae* (Thomas) (ATAMIAN *et al.*, 2013; ELZINGA *et al.*, 2014), ma non è facile capire i meccanismi complessi attraverso i quali queste molecole riescono a modulare la risposta difensiva della pianta, pur essendo misurabile l'impatto sulla fertilità degli afidi. Nel nostro gruppo di ricerca, cerchiamo attualmente di identificare le componenti salivari di *Aphis gossypii* Glover che inducono nella pianta di zuccchino la produzione di un composto volatile, il metilsalicilato, che influenza il comportamento degli afidi, spingendoli a spostarsi verso aree diverse della stessa pianta (COPPOLA *et al.*, 2018). Tra gli effettori finora caratterizzati, Me47, una Glutathione-S-Transferasi di *M. euphorbiae*, è in grado di detossificare composti allelochimici come DIMBOA, nicotina e isotiocianati. È stato osservato che Me47, in pomodoro, induce geni di difesa, eppure aumenta la fertilità di *M. euphorbiae*, mentre in *Arabidopsis* diminuisce la fertilità degli afidi, rendendo la pianta più resistente, ma non c'è la stessa induzione osservata

per il pomodoro (KETTLES & KALOSHIAN, 2016). Questo è un esempio di come, per gli effettori, l'effetto sugli afidi possa essere ospite-specifico, essendo dipendente dall'interazione della stessa molecola con piante di specie diverse.

Un'altra interessante induzione delle difese della pianta è quella operata da microrganismi non patogeni, quali i Rizobatteri, ben conosciuti da oltre un secolo, oltre a funghi appartenenti a vari generi, che instaurano, a livello radicale, simbiosi benefiche per lo sviluppo della pianta. Negli ultimi anni si è diffuso in agricoltura l'utilizzo di microrganismi, che hanno mostrato di possedere, direttamente o attraverso metaboliti, anche capacità antagonistiche dei patogeni (LORITO & WOO, 2015). Lo studio della modulazione delle difese inducibili da microrganismi attive contro gli insetti è un'attività di ricerca ancora in fase embrionale, e solo recentemente l'approccio alla comprensione di queste interazioni a tre componenti è diventato più solido, includendo anche un approfondito studio delle cause della qualità alterata della pianta, l'organismo che fa da tramite tra i microbi e gli insetti fitofagi. Le simbiosi micorriziche e con funghi del genere *Trichoderma* hanno mostrato, in diversi studi, un costante miglioramento delle difese indirette della pianta (parassitoidi e predatori), associato all'alterazione del rilascio di VOC (GUERRIERI *et al.*, 2004; BATTAGLIA *et al.*, 2013; COPPOLA *et al.*, 2017; RASSMANN *et al.*, 2017). Invece, relativamente alle difese dirette, non si può dire che si osserva sempre un miglioramento, che è strettamente dipendente dal tipo di interazione dei tre organismi coinvolti: ogni caso va studiato con attenzione, valutando in modo puntuale la suscettibilità del fitofago alle molecole di difesa indotte. Questo non può destare meraviglia negli entomologi, che sanno bene come la maggior parte degli agenti di controllo biologico non presenta ampio spettro di attività, e che è improbabile che un nemico naturale possa costituire un rimedio universale. Nel corso dell'attività del nostro gruppo di ricerca, abbiamo individuato ceppi di *Trichoderma* attivi nei confronti di gruppi di insetti con strategia alimentare diversa (afidi e lepidotteri) (COPPOLA *et al.*, 2017; DIGILIO *et al.*, in prep.). È stato appurato che la colonizzazione di *T. harzianum* T22 e di *M. euphorbiae* induce in pomodoro l'attivazione sia del percorso del jasmonato (JA) che di quello del salicilato (SA), e risulta aumentare la difesa, sia diretta che indiretta, attraverso la riduzione della fertilità degli afidi e la produzione di composti volatili attrattivi per il parassitoide *Aphidius ervi* Haliday (COPPOLA *et al.*, 2017; DIGILIO *et al.*, in prep.). L'interazione con altri ceppi, invece, non ha mostrato un impatto sullo

sviluppo degli afidi, e in un caso è stato osservato aumento della fertilità (BATTAGLIA *et al.*, 2013), una possibile conseguenza dell'effetto di promozione della crescita della pianta. Entrambi i percorsi (JA e SA) sono attivati anche nell'interazione tra *T. harzianum* T78, pomodoro e il nematode galligeno *Meloidogyne incognita*, ma in momenti diversi dell'attacco: nella fase di invasione è attivato il percorso del salicilato, come è attestato dall'accumulo di PR protein, marker specifici di questo tipo di risposta, mentre alla formazione delle galle è attivato JA (accumulo di inibitori di proteasi), per poi tornare all'induzione di SA nella fase di riproduzione del nematode (MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2017). Questo mostra come le difese inducibili consentono alla pianta di modulare le proprie difese nel corso del suo ciclo biologico.

I casi di difese inducibili presentati sono ricchi di possibilità applicative, potendo avere un ruolo importante nella protezione delle colture, attraverso l'uso di elicitori in grado di stimolare i percorsi metabolici di difesa della pianta o mediante l'inoculazione di microrganismi utili. Già sono applicati con successo metodi basati sull'utilizzo dei VOC rilasciati dalla pianta in seguito all'attacco degli insetti fitofagi (per una revisione recente v. TURLINGS & ERB, 2018), che richiamano i nemici naturali ma possono anche essere repellenti o tossici nei confronti dei fitofagi stessi.

BIBLIOGRAFIA

- ALBORN H.T., TURLINGS T.C.J., JONES T.H., STENHAGEN G., LOUGHRIN J.H., TUMLINSON J.H., 1997 – *An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion*. - Science, 276, 945-948.
- ATAMIAN H.S., CHAUDHARY E., DAL CIN V., BAO E., GIRKE T., KALOSHIAN I., 2013 – *In planta expression of potato aphid Macrosiphon euphorbiae effectors Me10 and Me23 enhances aphid fecundity*. - MPMI, 26: 67-74.
- BATTAGLIA D., BOSSI S., CASCONI P., DIGILIO M.C., PRIETO J.D., FANTI P., GUERRIERI E., IODICE L., LINGUA G., LORITO M., MAFFEI M.E., MASSA N., RUOCCO M., SASSO R., TROTTA V., 2013 – *Tomato Below Ground-Above Ground Interactions: Trichoderma longibrachiatum Affects the Performance of Macrosiphum euphorbiae and Its Natural Antagonists*. - MPMI, 26: 1249-1256.
- BOS J.I. B., PRINCE D., PITINO M., MAFFEI M. E., WIN, J., HOGENHOUT S.A., 2010 – *A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species Myzus persicae (green peach aphid)*. PLoS Genetics 6:e1001216. doi: 10.1371/journal.pgen.1001216 et al 2010 effector.
- BRICCHI I., LEITNER M., FOTI M., MITHÖFER A., BOLAND W., MAFFEI M.E., 2010 – *Robotic mechanical wounding (MecWorm) versus herbivore-induced responses: early signaling and volatile emission in Lima bean (Phaseolus lunatus L.)*. - Planta, 232: 719-729.
- CHAUDHARY R., ATAMIAN H.S., SHEN Z., BRIGGS S.P., KALOSHIAN I., 2014 – *GroEL from the endosymbiont Buchnera aphidicola betrays the aphid by triggering plant defense*. - Proc Natl Acad Sci USA 111: 8919-8924.
- COPPOLA M., CASCONI P., CHIUSANO M.L., COLANTUONO C., LORITO M., PENNACCHIO F., RAO R., WOO S.L., GUERRIERI E., DIGILIO M.C., 2017 – *Trichoderma harzianum enhances tomato indirect defense against aphids*. - Insect Science, 24: 1025-1033.
- COPPOLA M., MANCO E., VITIello A., DI LELIO I., GIORGINI M., RAO R., PENNACCHIO F., DIGILIO M.C., 2018 – *Plant response to aphid attack promotes their dispersal behaviour*. - Entomol. Exp. Appl., in stampa.
- DE MORAES C.M., LEWIS W.J., PARÉ P.W., ALBORN H.T., TUMLINSON J.H., 1998 – *Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids*. - Nature, 393: 570-571.
- ELZINGA D.A., DE VOS M., JANDER G., 2014 – *Suppression of plant defenses by a Myzus persicae (green peach aphid) salivary effector protein*. - MPMI, 27: 747-756.
- FELTON GW., EICHENSEER H., 2000 – *Herbivore saliva and its effects on plant defense against herbivores and pathogens*. In: Induced plant defenses against pathogens and herbivores, Agrawal A.A., Tuzun S. & E. Bent Ed., APS Press, pp. 19-38.
- FURCH A.C.U., VAN BEL A.J.E., FRICKER M.D., FELLE H.H., FUCHS M., HAFKE J.B., 2009 – *Sieve element Ca²⁺ channels as relay stations between remote stimuli and sieve tube occlusion in Vicia faba*. - Plant Cell, 21: 2118-2132.
- GREEN T.R., RYAN C.A., 1972 – *Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects*. - Science, 175: 776-777.
- GUERRIERI E., LINGUA G., DIGILIO M.C., MASSA N., BERTA G., 2004 – *Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour?* - Ecological Entomology, 29: 753-756.
- KETTLES G.J., KALOSHIAN I., 2016 – *The potato aphid effector Me47 is a Glutathione-S-Transferase involved in modifying plant responses to aphid infestation*. - Frontiers in Plant Science, 7: 1142.
- LORITO M., WOO S.L., 2015 – *Trichoderma: a multipurpose tool for IPM*. Chapter 36. In: Principles of Plant-Microbe Interactions, B. Lugtenberg Ed., Springer International Publishing, Switzerland, pp. 345-353.
- MARTINEZ-MEDINA A., FERNÁNDEZ I., LOK G.B., POZO M.J., PIETERSE C.M. J., VAN WEES S.C.M., 2017 – *Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by Trichoderma protects tomato against the root knot nematode Meloidogyne incognita*. - New Phytologist, 213: 1363-1377.
- MATSUI R., AMANO N., TAKAHASHI K., TAGUCHI Y., SABURI W., MORI H., KONDO N., MATSUDA K., MATSUURA H., 2017 – *Elucidation of the biosynthetic pathway of cis-jasmone in Lasiodiplodia theobromae*. - Scientific Reports, 7: 6688. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-05851-7>
- MATTIACCI L., DICKE M., POSTHUMUS M.A., 1995 – *beta-Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps*. - PNAS USA, 92: 2036-40.
- MILES P.W., 1965 – *Studies on the salivary physiology of plant-bugs: the salivary secretions of aphids*. - J. Insect Physiol., 11: 1261-1268.
- MITHÖFER A., WANNER G., BOLAND W., 2005 – *Effects of feeding Spodoptera littoralis on lima bean leaves, II: continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission*. - Plant Physiol., 137:1160-1168.
- MUTTI N.S., LOUIS J., PAPPAN L.K., PAPPAN K., BEGUM K., CHEN M.S., 2008 – *A protein from the salivary glands of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum, is essential in feeding*

- on a host plant*. - PNAS USA, 105: 9965–9969. doi: 10.1073/pnas.0708958105 et al 2008 C002
- PARÉ P.W., ALBORN H.T., TUMLINSON J.H., 1998 – Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles. - PNAS USA, 95: 13971-5.
- RASSMANN S., BENNETT A., BIERE A., KARLEY A., GUERRIERI E., 2017 – *Root symbionts: powerful drivers of plant indirect defences*. - Insect Science, 24: 947-960.
- TJALLINGII W.F., 2006 – *Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses*. - J. Exp. Bot., 57: 739-745.
- TJALLINGII W.F., 1988 – *Electrical recording of stylet penetration activities*. In Aphids, Minks A.K. & P. Harrewijn Ed., Elsevier, 2B: 95-108.
- TURLINGS T.C.J., ERB M., 2018 – *Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: mechanisms, ecological relevance, and application potential*. - Annu. Rev. Entomol., 63: 433-452.
- VAN BEL A.J.E., WILL T., 2016 – *Functional evaluation of proteins in watery and gel saliva of aphids*. - Frontiers in Plant Science, 7: 1840. doi: 10.3389/fpls.2016.01840
- WILL T., VAN BEL A.J.E., 2006 – *Physical and chemical interactions between aphids and plants*. - J. Exp. Bot., 57: 729-737.
- WILL T., TJALLINGII W.F., THÖNNESSEN A., VAN BEL A.J.E., 2007 – *Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva*. - PNAS USA, 104: 10536-10541

