

PROTEZIONE DA DORIFORA IN MELANZANE TRASFORMATE CON IL GENE PER L'INIBITORE DI PROTEINASI A CISTEINA

LA PORTA N.¹, MENNELLA G.², DELLEDONNE M.³, ROTINO G.L.⁴

¹ Istituto Agrario S. Michele a/Adige, Via E. Mach 1, I-38010 S. Michele all'Adige (TN)

² Istituto Sperimentale per l'Orticoltura, Via dei Cavalleggeri 25, I-84098 Pontecagnano (SA)

³ Istituto di Botanica e Genetica Vegetale, Università Cattolica di Piacenza,

Via Emilia Parmense 84, I-29100 Piacenza

⁴ Istituto Sperimentale per l'Orticoltura, Via Paultese 28, I-26836 Montanaso Lombardo (LO)

RIASSUNTO

Melanzane transgeniche (*Solanum melongena* L.) furono ottenute attraverso trasformazione genetica via infezione di *Agrobacterium tumefaciens*, portante un gene pCYS per l'inibitore di proteinasi a cisteina di soia (*Glycine max* L.). Gli effetti degli regolatori di crescita e degli antibiotici necessari alla trasformazione furono studiati e ottimizzati. Un totale di 25 linee transgeniche indipendenti appartenenti a sei cultivar di melanzana furono ottenute da più di 300 espianti manipolati. L'analisi PCR dei putativi trasformati dimostrò, per tutte le linee saggiate, la presenza del marcatore selettivo NPTII per la resistenza a kanamicina. Gli estratti fogliari di quattro linee analizzate hanno rivelato una percentuale di inibitore sintetizzato sempre superiore al controllo e variante tra lo 0,2 a più del 3% sul totale delle proteine solubili. Negli intestini delle larve di dorifora le linee di melanzana trasformata dimostrarono di poter ridurre l'attività delle proteinasi sulla papaina dell'insetto rispetto al controllo non trasformato tra il 75 e 86% per le larve di prima fase e dal 30 al 35% negli estratti delle larve di seconda fase. L'utilità di tale trasformazione è discussa in relazione alla stabilità della resistenza.

Parole chiave: *Solanum melongena*, trasformazione genetica, inibitori di proteinasi, Dorifora, resistenza a insetti.

SUMMARY

EGGPLANT TRANSFORMATION WITH CYSTEINE PROTEINASE INHIBITOR GENE TO CONFER PROTECTION AGAINST COLORADO POTATO BEETLE

Transgenic eggplants (*Solanum melongena* L.) were recovered as results of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation performed with EHA101 strain carrying the binary plasmid pCYS. Plasmid pCYS contains a cysteine proteinase inhibitor gene derived from soybean (*Glycine max* L.). The effect of growth regulators and antibiotics on eggplant transformation was also studied and optimised. A total of 25 independent transgenic lines were obtained from 300 co-cultivated explants of five eggplants lines. Specific PCR analysis of the putative transformants demonstrates the presence of fragments corresponding to the kanamycin selective marker gene NPTII. The leaf extract from 4 transgenic lines revealed a cysteine protease inhibitory activity, up to 3% of the total soluble proteins. In the larval gut analyses, the transformed lines showed a reduced papain activity ranging from 75-86% for the 1st instar to 30-35% for the 2nd instar larvae extracts compared to the untransformed control. The value of such transformants is discussed in relation to the management of field resistance to Colorado potato beetle.

Key word: *Solanum melongena*, genetic transformation, proteinase inhibitor, *Leptinotarsa decemlineata*, pest resistance

INTRODUZIONE

La melanzana (*Solanum melongena* L.), con una produzione mondiale annua di nove milioni di tonnellate è una delle più importanti solanacee in Asia e nel Bacino del Mediterraneo e rappresenta un importante prodotto orticolo nella dieta degli abitanti di questi Paesi. Tra i paesi europei l'Italia risulta essere il primo produttore con circa 11.000 ha di superficie coltivata e una produzione annua superiore alle 300.000 tonnellate (Setti, 1997).

La produzione commerciale di melanzana in Europa e in America è continuamente minacciata dai devastanti attacchi del coleottero crisomelide dorifora (*Leptinotarsa decemlineata* Say). I danni sono prodotti dalle larve della dorifora che si alimentano delle foglie delle piante causando arresto della produzione e perfino morte della pianta stessa.

In assenza di un effettivo programma di controllo parassitario l'insetto può causare la totale distruzione della coltura (Cotty e Lashomb, 1982; Maini *et al.*, 1990; Arpaia *et al.*, 1995). La lotta chimica oltre ad avere un costo economico non indifferente per il coltivatore è considerata avere un forte impatto ambientale (Dulmage, 1980). Il miglioramento genetico tradizionale per sviluppare varietà di alta qualità e che siano nello stesso tempo resistenti alla dorifora richiede spesso più di 12 anni di sforzi concertati tra genetisti ed entomologi per iniziare ad ottenere dei risultati (Roberts *et al.*, 1988; Stoner, 1992). Inoltre nel pool genico della melanzana scarse sono le fonti di resistenza alla dorifora.

Numerosi sono gli esempi di colture geneticamente trasformate che sono pronte per essere introdotte nel mercato (Grumet, 1995; Mol *et al.*, 1995; Woodson, 1997). Nel campo della resistenza a insetti nelle specie coltivate i geni delle endotossine di *Bacillus thuringiensis* (Bt) si sono rivelati finora la più importante risorsa genetica per le manipolazioni biotecnologiche (McGaughey e Whalon, 1992; Fischhoff, 1996). Inoltre, sono state identificate endotossine specificamente attive contro Lepidotteri, Ditteri, Coleotteri e contro sia Lepidotteri che Ditteri (Peferoen *et al.*, 1990; Gill *et al.*, 1992). Vari ceppi e formulazioni di *B. thuringiensis* sono comunemente utilizzati come insetticidi microbiologici contro varie specie di insetti.

Lo sviluppo concomitante di un efficiente protocollo di rigenerazione (Gleddie *et al.*, 1983; Rotino *et al.*, 1987) e trasformazione genetica in melanzana (Rotino e Gleddie, 1990) ha recentemente offerto l'opportunità di trasferire nuovi caratteri di interesse nei validi genotipi già a disposizione del mercato. Melanzane transgeniche resistenti alla dorifora per mezzo della tossina Bt sono già state ottenute con successo (Arpaia *et al.*, 1997; Iannacone *et al.*, 1997).

Un'altra famiglia di geni interessante per la resistenza a insetti sono quelli che codificano per gli enzimi inibitori delle proteinasi dei sistemi digestivi animali (Ryan, 1990). Le proteasi sono mediatori enzimatici essenziali per la digestione delle proteine vegetali degli erbivori.

Diversi geni di inibitori di proteinasi sono stati saggianti: si classificano come serine-cisteine-aspartico- o metallo-proteasi in funzione dell'amminoacido attivo al centro della reazione (Ryan, 1990). Gli insetti generalmente usano uno o una combinazione di proteasi come principali enzimi proteolitici digestivi (Ryan *et al.*, 1981). Gli inibitori a proteinasi di cisteina sono identificati per mezzo di fitocistatine, le quali inibiscono le proteasi della superfamiglia papaina. In alcuni Coleotteri e Emitteri, le maggiori attività proteolitiche sono apparentemente il risultato di proteinasi a cistatina papaina-simili, le quali sono suscettibili di inibizione da parte degli inibitori vegetali di proteinasi a cistatina. Piante transgeniche esprimenti inibitori a cisteina mostrano un'aumentata resistenza contro gli insetti indicando un uso funzionale di tali inibitori (Johnson *et al.*, 1990; Urwin *et al.*, 1995; Bolter e Latoszekgreen, 1997).

Nel presente studio è stato utilizzato un gene dell'inibitore a cisteina di soia per conferire resistenza a dorifora in melanzana. Lo scopo finale è quello di combinare nel medesimo ibrido transgenico di melanzana tale resistenza con inibitori con quella già ottenuta con l'endotossina Bt in modo da poter evidenziare effetti sinergici e/o mantenere nel tempo un alto livello di resistenza a dorifora.

MATERIALI E METODI

Materiale impiegato

Per l'esperimento di trasformazione sono state impiegate le seguenti linee di melanzana: Tina, Tal 8-1, Tal 1-1, SM5-44, DR8 e DR2. I semi per la crescita *in vitro* delle piante sono stati sterilizzati in superficie immergendoli in una soluzione di 70% etanolo per 30 secondi, seguita da una soluzione di ipoclorito di calcio al 7% per 20 minuti e infine lavati abbondantemente con acqua sterile, quindi fatti germinare in piastre Petri (25-30 per piastra) su un filtro di carta bagnato con acqua sterile e incubati al buio a 28°C. Dopo 7-10 giorni i semi germinati sono stati trasferiti in scatole GA7 sterili (Magenta Corp.) contenenti 40 ml di substrato V3 addizionato al

2% (w/v) di saccarosio e 0.6% agar, pH 5,8 (KOH 0,2 N prima dell'autoclavaggio). Le piante sono state mantenute in una camera di crescita a 25°C con 16 ore di luce sotto lampade fluorescenti ($50 \mu\text{Em}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

Per la trasformazione è stato utilizzato il ceppo EHA105 di *Agrobacterium tumefaciens* (Hod et al., 1993), derivato non-oncogenico del ceppo A281, il quale porta il plasmide *helper* Ti pTiBo542. Il plasmide vettore pBI-Sbcys contiene una sequenza sintetica di 450 bp codificante il peptide maturo della cistatina di soia (Hines et al., 1991). La sequenza sintetica codificante per la *Sbcys* fu poi introdotta in un vettore binario pBI121 (Clontech), usando come promotore il CaMV35S del virus del mosaico del cavolfiore che rimpiazzava la sequenza codificante *uidA*. Il risultante plasmide binario pBI-Sbcys fu mobilitato nel ceppo disarmato EHA105. Le colture batteriche furono fatte crescere in MS liquido per circa 12 ore fino a raggiungere una densità finale di 0.6 (OD_{600}) utile alla trasformazione.

Primo protocollo di trasformazione

La procedura di trasformazione della melanzana si basa essenzialmente su quella descritta da Rotino e Gleddie (1990) e da Rotino et al. (1992) con alcune minori modificazioni. Espianti di foglie, cotiledoni e ipocotili furono pre-coltivati per due giorni in substrato con macro- e micronutrienti MS, Gamborg vitamine, 0,5 g l⁻¹ di MES, 20 μM di acetosiringone (Aldrich) aggiunto con regolatori di crescita (mg l⁻¹): 0,5 ZEA, 0,3 BAP, 0,2 KIN e 0,1 NAA; il substrato liquido fu solidificato con due gl⁻¹ di Phytigel (Sigma) a pH 5,8.

Per eseguire l'infezione degli espianti, una coltura liquida di *A. tumefaciens* fu centrifugata e il pellet risospeso ad una densità di 0,1 OD_{600} in un substrato base MS con 2% glucosio, 200 μM di acetosiringone, pH 5,5. Un fine margine intorno alle foglie e ai cotiledoni e le estremità degli ipocotili furono tagliati per avere una maggior superficie di ferita. Il materiale così trattato venne immerso nella soluzione batterica per cinque minuti, poi asciugato su filtro di carta sterile ed infine ricollocato sulle piastre Petri originarie. Dopo 48 ore di co-coltivazione al buio gli espianti furono trasferiti su un substrato selettivo senza acetosiringone e addizionato con 50 mg l⁻¹ di kanamicina (Sigma) e 500 mg l⁻¹ di cefotaxime (Hoechst). La differenziazione di gemme dal callo e la successiva formazione ed allungamento dei germogli fu ottenuto tramite il trasferimento di porzioni di callo che presentavano compatti noduli verdi nello stesso substrato selettivo sopra descritto senza però l'aggiunta di NAA. I germogli furono in seguito radicati e propagati in substrato V3 (Arpaia et al., 1997) in assenza di antibiotici. Le piante rigenerate furono identificate ed etichettate secondo il callo di origine (primo numero) e il germoglio (secondo numero). Una volta che fossero ben sviluppate le putative piante transgeniche furono allevate in vaso in serra, previo un periodo di acclimatazione in una serra speciale con elevata umidità atmosferica.

Secondo protocollo di trasformazione

Venne eseguito per confronto un secondo protocollo. Questo secondo protocollo fu sperimentato per la melanzana cv Hibush da Billings et al. (1997) e differisce dal precedente per il substrato di rigenerazione il quale contiene 0,1 μM thidiazuron (TDZ) combinato con dosi crescenti da 10 a 20 μM di N-6-(isopentyl) adenine (2iP). Augmentin a 300 mg l⁻¹ fu usata al posto del cefotaxime dopo la co-coltivazione per eliminare l'*A. tumefaciens*.

Per ognuno dei suddetti protocolli furono usati 300 espianti

Verifica dell'avvenuta trasformazione

Dischi fogliari da putativi trasformati furono coltivati su un substrato di rigenerazione contenente 30 mg l⁻¹ di kanamicina per verificare la loro capacità di produrre callo.

L'espressione del gene marcatore NPTII fu anche monitorata subito dopo l'acclimatazione delle piante spruzzando le piante stesse con 300 mg l⁻¹ di soluzione di kanamicina secondo il

metodo di Sunseri *et al.* (1993).

Giovani tessuti fogliari di melanzana furono utilizzati per l'estrazione di DNA secondo il metodo di Doyle e Doyle (1990). L'analisi PCR fu effettuata utilizzando i *primer* che amplificavano un frammento di 839-bp della regione codificante il gene NPTII. Per rilevare il suddetto frammento è stato usato il protocollo PCR di Arpaia *et al.* (1997).

Saggio dell'inibizione delle proteinasi

Foglie di piante non trasformate e di putativi trasformati furono raccolte e omogeneizzate in 10 mM (pH 8.0) e centrifugate a 4°C per 20 min a 13 000 x g. I campioni furono diluiti ad una concentrazione proteica standard (800 µg ml⁻¹), e il loro contenuto in inibitore di proteinasi a cisteina fu saggiato come segue. Un estratto di proteine vegetali (100 µl) fu mescolato con 10 µl di soluzione di papaina (10 mg ml⁻¹, Sigma) e preincubato a 37°C per 15 min per permettere il legame con l'inibitore di proteinasi. Successivamente, furono aggiunti 100 µl di azoalbumina (10 mg ml⁻¹, Sigma) e il campione fu quindi reincubato a 37°C per altri 30 min. Dopodichè ai campioni furono addizionati 480 µl di acido tricloroacetico al 10% e mantenuti in ghiaccio per 30 min prima di essere centrifugati per 3 min a 8.000 x g. Infine, 500 µl di supernatante furono raccolti e mescolati con 100 µl di NaOH 3.3 M per permettere la colorazione della parte proteica non digerita. L'attività inibitoria dell'estratto proteico vegetale fu calcolata confrontando la sua variazione in assorbanza a 440 nm prima (T₀) e dopo (T >30) la fase di incubazione. Una curva, fu ottenuta rimpiazzando gli estratti proteici con differenti quantità (10-50 µl) di una soluzione dell'inibitore E-64 (Sigma, trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido(4-Guanidino)-Butane) ad una concentrazione di 0.714 µg ml⁻¹. L'inibizione fu riferita come % di E64 equivalente sul totale delle proteine solubili vegetali. Cinque diversi esperimenti furono eseguiti e tre repliche di ogni campione furono misurate.

Attività delle proteinasi in *L. decemlineata*

Gli estratti vegetali e l'intestino di larve furono preparati con una procedura modificata del protocollo di Barrett (1981). Al fine di ottenere una sufficiente quantità di estratti di larve, 15 e 10 larve di dorifora rispettivamente di 1^a e 2^a età larvale furono omogeneate in 800 µl di 1 mM EDTA. La riduzione dell'attività papainica fu misurata con tre repliche a 410 nm utilizzando 4 genotipi trasformati di melanzana. Estratti in acqua di 4 genotipi non trasformato furono usati come controllo.

RISULTATI

Con il primo protocollo di trasformazione gli espianti dopo la co-coltivazione dettero origine alla formazione di callo e germogli nel substrato selettivo. Un callo bianco e friabile fu visibile lungo i margini tagliati dei tessuti posti in coltura entro 3-4 settimane dall'infezione con l'*A. tumefaciens*. Nessun germoglio o differenziamento di gemme fu evidenziato in questa fase. Dopo tre o più subculture su substrato selettivo in costante presenza di kanamicina (50 mg l⁻¹), e nonostante il colore giallognolo degli espianti, alcune zone dei calli virarono verso il verde e noduli compatti iniziarono a formarsi. Trentasette calli resistenti all'antibiotico furono selezionati e primordi di germogli si differenziarono dalla maggior parte dei noduli.

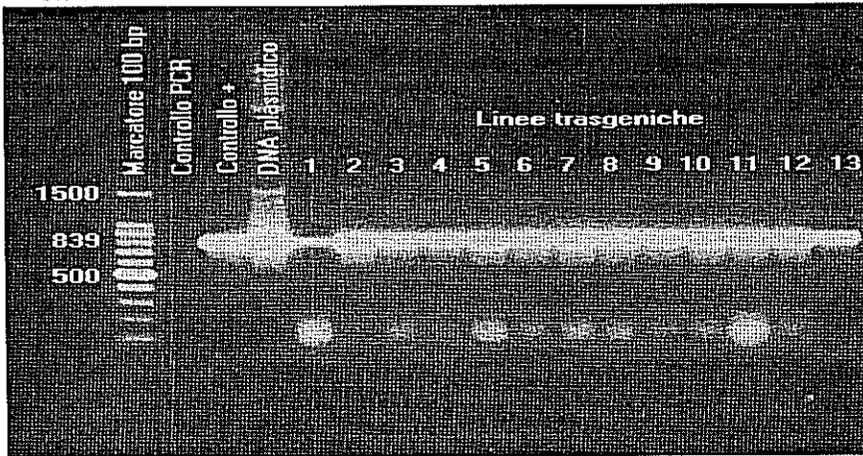
Trentacinque linee trasgeniche furono infine ottenute dai 300 espianti co-coltivati, con una frequenza di trasformazione di 8,3%. Nessun callo o organogenesi di germoglio furono osservati nelle colture di espianti controllo coltivati su substrato selettivo. Questo risultato indicò che la kanamicina alla concentrazione di 50 mg l⁻¹ produce un efficiente livello di selezione.

Gli espianti soggetti al trattamento di Billings si svilupparono inizialmente mostrando un brillante colore verde e formando abbondante massa di callo friabile. Ciò nonostante, dopo la seconda subcoltura gli espianti necrotizzarono improvvisamente e invano si cercò di trasferirli su

substrati freschi con turni più frequenti e di ripulirli delle masse di callo necrotico: deperirono massivamente nel breve arco di 3-4 settimane.

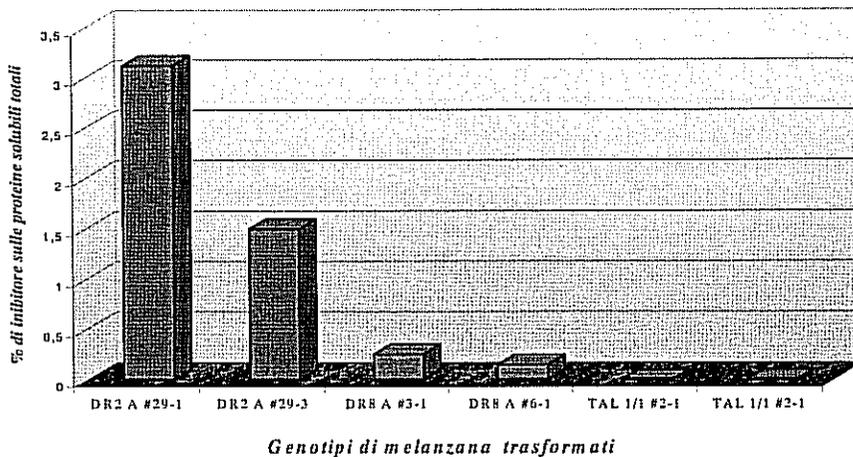
L'amplificazione del DNA (analisi PCR) mostrò chiaramente la presenza di un frammento del gene marcatore NPTII in tutti gli eventi di trasformazione ottenuti (Fig. 1). La presenza di un'attività del gene NPTII fu anche confermata dall'assenza di clorosi dopo il trattamento *in vivo* con una soluzione di kanamicina.

Fig. 1 – Amplificazione del frammento di DNA di 839-bp della regione codificante il gene NPTII che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina



Gli estratti fogliari di 7 linee trasgeniche selezionate rivelarono una quantità dell'inibitore di proteinasi a cisteina superiore al controllo per 4 di loro. Nella linea migliore l'inibitore suddetto rappresentò più del 3% di del totale delle proteine solubili della pianta (Fig. 2).

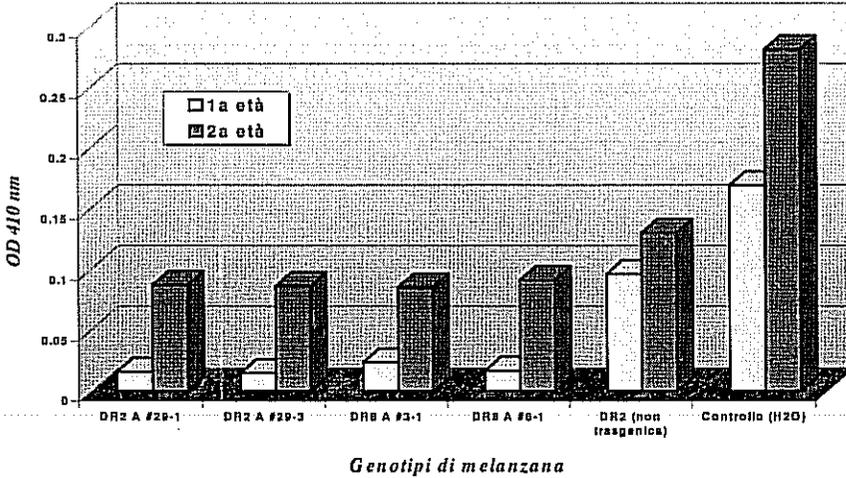
Fig. 2 – Quantità dell'inibitore di proteinasi a cisteina in foglie



Interessanti risultati scaturirono anche dall'analisi degli intestini larvali, nei quali le linee trasformate nel confronto con quelle non trasformate mostrarono una effettiva riduzione

dell'attività della papaina che variava da 75-86% nella prima età larvale a 30-35% nelle larve di seconda età (Fig. 3).

Fig. 3 – Attività della papaina su estratti di larve di 1^a e 2^a età.



DISCUSSIONE

Il positivo risultato dell'esperimento di trasformazione è anche dovuto alla relativa facilità con cui è possibile manipolare la melanzana, tanto da farne una specie modello per gli esperimenti di trasformazione genetica. Come possibile spiegazione del fallimento degli espianti trattati col protocollo di Billings si è ipotizzata una forte interazione del trattamento col diverso genotipo di melanzana utilizzato nella trasformazione. Billings e collaboratori (1997) avevano utilizzato solamente la cv. di melanzana Hibush che non era inclusa tra le nostre linee. Tuttavia, anche con il primo protocollo, il successo della trasformazione non è avvenuto uniformemente per tutte le 6 linee utilizzate, ma alcune linee, come per esempio Tal 8-1 e SM5-44, hanno dato deludenti risultati, mentre altre, come DR2 e DR8, hanno dimostrato una pronta e particolarmente positiva risposta al protocollo utilizzato. Ciò potrebbe richiedere in futuro l'ottimizzazione di protocolli linea-specifici.

Il successo dell'espressione di geni eterologhi in una pianta è generalmente influenzato da diversi fattori, primi tra tutti: le qualità delle diverse unità del costrutto genico (promotore, terminatore, sequenze *enhancer*), la struttura e la stabilità dell'mRNA, i segnali regolatori della pianta, la posizione dell'inserzione genica, il numero di copie integrate stabilmente nel genoma, ecc. E' verosimile che differenze riscontrate in Fig. 1, con le diverse percentuali di proteina espressa nelle diverse linee, siano soprattutto dovute agli ultimi due o tre fattori sopracitati dato che gli altri sono stati mantenuti costanti all'interno di questo esperimento. Riguardo la riduzione *in vitro* dell'attività della papaina (Fig. 2), questa si è manifestata molto più spiccatamente nelle larve di prima età rispetto a quelle di seconda in tutti i genotipi analizzati. Ciò è probabilmente da mettere in relazione anche con il differente corredo di proteasi espresso dalla dorifora nelle diverse fasi di sviluppo. Nonostante la diversa quantità di inibitore riscontrata nei diversi genotipi, non si è però manifestata una chiara correlazione tra la quantità di inibitore prodotto e la riduzione dell'attività papainica. Probabilmente ciò dimostra che anche relativamente basse quantità di inibitore prodotto raggiungono il *plateau* della possibile attività inibitoria.

La capacità delle popolazioni di insetti di superare la resistenza delle colture ha rappresentato un costante problema per i programmi di miglioramento genetico per la resistenza. Questo si è rivelato un serio limite di molti programmi di miglioramento convenzionale per la resistenza ad insetti (Gracen, 1985), e si prevede che lo possa essere ancor maggiormente per le resistenze ottenute tramite ingegneria genetica. In diverse specie di insetti sono già state individuate popolazioni che hanno evoluto resistenza nei confronti di *B. thuringiensis* in situazioni dove questo viene spruzzato intensivamente come insetticida biologico od in prove di laboratorio (McGaughey, 1985; Shelton *et al.*, 1993).

Colture orticole trasformate, come la melanzana, che esprimono geni eterologhi per inibitori di proteinasi possono divenire, una volta determinata la reale resistenza a Dorifora con esperimenti in campo, prezioso materiale per incrociare con altre linee di melanzana trasformate con la tossina *Bt*. Tutto questo con lo scopo finale di accoppiare due fundamentalmente diversi sistemi di resistenza dentro un unico individuo con resistenza multigenica che possa esprimere un auspicabile effetto sinergico e una appropriata stabilità nel tempo sulla resistenza stessa.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare il Dr. Arpaia per gli apprezzati consigli metodologici nelle prove con gli insetti e le Dr.sse Belloni V. e D'Alessandro M. per il prezioso supporto tecnico fornito nell'esecuzione del lavoro.

LAVORI CITATI

- ARPAIA S., LASHOMB J.H., VAIL K., 1995. Valutazione dell'attività trofica di *Leptinotarsa decemlineata* (Say) su melanzana. *Informatore Fitopatologico* 2: 55-57.
- ARPAIA S., MENNELLA G., ONOFARO V., PERRI E., SUNSERI F., ROTINO L.L., 1997. Production of transgenic eggplants (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Theoretical and Applied Genetics* 95: 329-334.
- ARPAIA S., CHIRIATTI K., GIORIO G., 1998. Predicting the adaptation of Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) to transgenic eggplants expressing cryIII toxin: the role of gene dominance, migration, and fitness costs. *J. Econ. Entom.* 91, 21-29.
- BARRETT A.J., 1981. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods in Enzymology* 80, 771-778.
- BILLINGS S., JELENKOVIC G., CHIN C.K., EBERHARDT J. 1997. The effect of growth regulators and antibiotics on eggplant transformation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 158-162.
- BOLTER C.J., LATOSZEKGREEN M., 1997. Effect of chronic ingestion of cysteine protease inhibitor E-64 on Colorado Potato Beetle gut proteinases. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 83: 295-303.
- BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- COTTY S., LASHOMB J., 1982. Vegetative growth and yield response of eggplant to varying first generation Colorado potato beetle densities. *Journal N.Y. Entomology Society*. 90: 4, 220-228.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- DULMAGE H.T., 1980. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: H.D. Burges Ed. *Microbial control of pest and plant disease 1970-1980*. p. 193-222. Academic Press, London.
- FISCHHOFF D.A., 1996. Insect resistant crop plants. In Persley G.J. Ed. *Biotechnology and integrated pest management*. Biotechnology in agriculture no. 15 CAB International UK, pp. 214-227.
- GILL S.S., COWLES E.A., PIETRANTONIO P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37: 515-636.
- GLEDDIE S., KELLER W.A., SETTERFIELD G., 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspension of *Solanum melongena* (eggplant). *Canadian Journal of Botany* 61: 656-606.
- GRACEN V.E., 1985. Host plant resistance for insect control in some important crop plants. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*. 4: 277-291.

- GRUMET R., 1995. Genetic engineering for crop virus resistance. *Hortscience* 30: 449-456.
- JONHSON R., NARVAEZ J., AN G., RYAN C., 1990 Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings National Academy Science USA* 86: 9871-9875.
- HINES M.E., OSUALA C.I., NIELSEN S.S., 1991. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. *J. Agric. Food. Chem.* 39, 1515-1520.
- HOOD E.E., GELVIN S.B., MELCHERS L.S., HOEKEMA A., 1993. New Agrobacteria helper plasmid for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2, 208-218.
- IANNACONE R., GRIECO P.D., CELLINI F., 1997. Specific sequence modifications of a cry3B endotoxin gene result in high level of expression and insect resistance. *Plant Molecular Biology* 34: 485-497.
- MAINI S., NICOLI G., MANZAROLI G. 1990. Evaluation of the egg parasitoid *Edovum puttleri* Grissel. (Hym. Eulophidae) for biological control of *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Col. Chrysomelidae) on eggplant. *Boll. Ist. Entomol. 'G. Grandi', Univ. Bologna*, XLIV: 161-168.
- MCGAUGHEY W.H., 1985. Insecticide resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229: 193-195.
- MCGAUGHEY W.H., WHALON M.E., 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Science* 258: 1451-1455.
- MOL J.N.M., HOLTON T.A., KOES R.E. 1995. Floriculture: Genetic engineering of commercial traits. *Trends in Biotechnology* 13: 350-355.
- PEFEROEN M., JANSSENS S., REYNAERTS A., LEEMAN J., 1990. Potato plants with engineered resistance against insect attack. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Potato*. Vayda M.E., Park W.D. Eds. pp. 193-204. CAB International; Wallingford, UK.
- ROBERTS J.J., FOSTER J.E., PATTERSON F.L., 1988. The Purdue-USDA small grain improvement program: a model of research productivity. *Journal of Production Agriculture* 1: 239-241.
- ROTINO G.L., FALAVIGNA A., FIUME F., NERVO G., RESTAINO F., 1987. Possibility of eggplant (*Solanum melongena* L.) improvement through in vitro techniques. *Genetica Agraria* 41: 314.
- ROTINO G.L., GLEDDIE S., 1990. Transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.) using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Plant Cell Reports* 9: 26-29.
- ROTINO G.L., ARPAIA S., IANNACONE R., IANNAMICO V., MENNELLA G., ONOFARO V., PERRONE D., SUNSERI F., XIKE Q., SPONGA S., 1992. *Agrobacterium* mediated transformation of *Solanum* spp. using a *Bacillus thuringiensis* gene against coleopteran. Proc. VIIIth Meeting *Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant* Rome, Italy September 1992, pp. 295-300.
- RYAN C.A., 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annals Review of Phytopathology* 28: 425-449.
- RYAN C.A., WALKER-SIMMONS M., 1981. Plant proteinases. In: *Biochemistry of Plants. A comprehensive Treatise* (Vol. 6) Ed. Marcus A. Academic Press pp. 321-350.
- SACHS E.S., BENEDICT J.H., TAYLOR J.F., STELLY D.M., DAVIS S.K., ALTMAN D.W., 1996. Pyramiding CryIA(b) insecticidal protein and terpenoids in cotton to resist tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*). *Environmental Entomology* 25, 1257-1266.
- SETTI G., 1997. I dati ITAT per le orticole italiane. *Culture protette* 9: 40-56.
- SHELTON A.M., ROBERTSON J.L., TANG J.D., PEREZ C., EIGENBRODE S.D., WILSEY W.T., COOLEY R.J., 1993. Resistance of diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *Journal of Economic Entomology* 86: 697-705.
- STONER K.A., 1992. Bibliography of plant resistance to arthropods in vegetables, 1977-1991. *Phytoparasitica*. 20: 2, 125-180.
- SUNSERI F., FIORE M.C., MASTROVITO F., TRAMONTANO E., ROTINO G.L., 1993. *In vivo* selection and genetic analysis for kanamycin resistance in transgenic eggplants (*Solanum melongena* L.) *Journal Genetics and Breeding* 47: 299-306.
- URWIN P.E., ATKINSON H.J., WALLER D.A., MCPHERSON M.J., 1995. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *Plant Journal* 8: 121-131.
- WOODSON W.R., 1997. Biotechnology and horticulture. *Hortscience* 32: 1021-1023