

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DIPARTIMENTO DI AGRARIA

Dottorato di Ricerca in
INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
XXVII ciclo

Studio del veleno del parassitoide di afidi
Aphidius ervi

Relatore

Ch.mo Prof.

Francesco PENNACCHIO

Candidata

Fatima ADEN ABDI

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

Ad Annella Anna

INDICE

ABSTRACT.....	5
1. INTRODUZIONE.....	7
1.1 Lotta integrata.....	8
1.2 Lotta biologica.....	9
1.3 Predatori e parassitoidi.....	10
1.4 I parassitoidi.....	13
1.4.1 Ectoparassitoidi.....	13
1.4.2 Endoparassitoidi.....	15
1.4.3 Idiobionti e coinobionti.....	17
1.5 I fattori di virulenza.....	19
1.5.1 Il veleno e la sua azione immunosoppressiva.....	22
1.5.2 Uso dei fattori di virulenza degli antagonisti naturali per nuove strategie di controllo.....	25
1.6 Nuove molecole candidate come bioinsetticidi.....	27
1.7 Vettori di espressione dei fattori di virulenza.....	29
1.8 Strategie di difesa basate sull'RNA interference.....	33
1.9 Il sistema modello: <i>A. ervi</i> - <i>A. pisum</i>	35
1.9.1 Ciclo biologico di <i>A. ervi</i>	37
1.9.2 Alterazioni indotte nell'ospite dal veleno di <i>A. ervi</i>	41
1.10 La gamma-glutammina transpeptidasi (γ -GT).....	43
1.11 Scopo della tesi.....	45
2. MATERIALI E METODI.....	47
2.1 Allevamento degli insetti.....	47
2.2 Titolazione del glutatione (GSH).....	48
2.2.1 Riduzione e derivatizzazione dei campioni.....	49
2.2.2 Determinazione cromatografica della concentrazione del GSH.....	50
2.2.3 Retta di taratura.....	51
2.3 Livello trascrizionale della due <i>Ae</i> - γ -GT nelle ghiandole del veleno di <i>A. ervi</i>	51
2.3.1 Condizioni di allevamento.....	51
2.3.2 Estrazione dell'RNA totale.....	52

2.3.3	Disegno dei primer.....	53
2.3.4	RT-PCR quantitativa.....	54
2.3.5	Metodo $\Delta\Delta CT$	56
2.4	Analisi del livello trascrizionale della due <i>Ae-γ-GT</i> in presenza ed assenza dell'ospite.....	56
2.5	Produzione delle molecole di dsRNA <i>Ae-γ-GT1</i> e dsRNA <i>Ae-γ-GT2</i>	57
2.5.1	Reazione di retrotrascrizione (RT).....	57
2.5.2	Amplificazione del cDNA (PCR).....	59
2.5.3	PCR con primer con estremità T7.....	60
2.5.4	Trascrizione <i>in vitro</i> delle molecole di dsRNA.....	63
2.6	Somministrazione del dsRNA attraverso microiniezioni nella pupa di <i>A. erwi</i>	65
2.7	Somministrazione del dsRNA alle larve di <i>A. erwi</i> attraverso microiniezioni nell'ospite.....	66
2.8	Somministrazione del dsRNA alle larve di <i>A. erwi</i> attraverso l'alimentazione dell'ospite.....	68
2.9	Le proteine ricombinanti <i>Ae-γ-GT1</i> e <i>Ae-γ-GT2</i>	70
2.10	Clonaggio - RF cloning.....	72
2.10.1	Scelta cloni dalla cDNA library.....	73
2.10.2	Disegno dei primer.....	76
2.10.3	Prima amplificazione.....	76
2.10.4	Purificazione del prodotto di prima amplificazione (PCR Long Template).....	77
2.10.5	Clonaggio delle due forme di γ -GT nel vettore d'espressione pACEBac1.....	78
2.10.6	Digestione del prodotto di clonaggio e trasformazione batterica.....	80
2.10.7	Purificazione del DNA plasmidico.....	82
2.10.8	Digestione dei cloni positivi con l'enzima BamH1.....	82
2.10.9	Sequenziamento dei cloni.....	83
2.11	Produzione dei bacmidi ricombinanti.....	84
2.11.1	Trasformazione di cellule DH10Bac.....	84
2.11.2	Purificazione dei bacmidi ricombinanti.....	86

2.12 Prove di espressione delle proteine ricombinanti.....	88
2.12.1 Produzione dei baculovirus ricombinanti.....	88
2.12.2 Trasfezione cellulare.....	89
2.12.3 Amplificazione del baculovirus ricombinante per la produzione dello stock virale.....	90
2.12.4 Estrazione proteica.....	91
2.13 Produzione delle proteine ricombinanti.....	94
2.13.1 Determinazione della concentrazione virale dello stock virale P3.....	94
2.13.2 Produzione delle proteine ricombinanti.....	95
2.14 Dosaggio dell'attività enzimatica delle <i>Ae-γ-GT</i> ricombinanti.....	95
2.15 Analisi statistica.....	96
3. RISULTATI DISCUSSIONE.....	98
3.1 Titolazione del GSH.....	98
3.2 Real time PCR su ghiandole del veleno e del resto del corpo di femmine di <i>A. ervi</i>	101
3.3 Real time PCR su ghiandole del veleno di <i>A. ervi</i> in presenza o assenza dell'ospite.....	106
3.4 Produzione di dsRNA <i>Ae-γ-GT1</i> e dsRNA <i>Ae-γ-GT2</i>	108
3.5 Esperimenti di silenziamento della γ -GT1.....	110
3.5.1 Livello trascrizionale dell'isoforma <i>Ae-γ-GT1</i> a seguito della somministrazione intraemocelica del dsRNA in pupe di <i>A. ervi</i>	111
3.5.2 Livello trascrizionale dell'isoforma <i>Ae-γ-GT1</i> a seguito della somministrazione orale del dsRNA alle larve di <i>A. ervi</i>	112
3.6 Produzione delle proteine ricombinanti <i>Ae-γ-GT1</i> e <i>Ae-γ-GT2</i>	116
3.6.1 Produzione del long template.....	117
3.6.2 Clonaggio del cDNA nel vettore di espressione pACEBac1.....	117
3.6.3 Produzione di bacmidi ricombinanti.....	119
3.6.4 Valutazione dell'espressione delle proteine ricombinanti nella produzione su piccola scala.....	120
3.7 Produzione delle proteine ricombinanti su larga scala.....	122
3.8 Conclusioni.....	122
BIBLIOGRAFIA.....	124

ABSTRACT

Aphidius ervi (Hymenoptera, Braconidae) is an endophagous parasitoid of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera, Aphididae) and of various cereal aphids.

Parasitized aphids show a notable inhibition of reproductive activity and metabolic alterations, which are nutritionally relevant for the developing wasp juveniles. Host regulation factors produced by *A. ervi* and responsible of these alterations are both of maternal origin, injected at the oviposition along with the egg, and of embryonic origin, in particular released by cells derived from the dissociation of the serosal membrane of the parasitoid embryo, denoted as teratocytes.

The venom, injected at the oviposition, is the major factor responsible for the castration of the hosts, which is caused by the induction of apoptosis in the germarial cells of the aphid ovarioles. This event is triggered by a γ -glutamyl transpeptidase (*Ae- γ -GT*), which may likely induce an oxidative stress in germarial cells.

Here this hypothesis was firstly tested, assessing if the exposure to *Ae- γ -GT* induce a change of glutathione (GSH) titer in the host tissues. GSH, measured by high performance liquid chromatography, was found to be significantly reduced in parasitized aphids and this difference was largely due to GSH decrease in the ovaries. Due to GSH role in the protection of oxidative stress, its decrease in parasitized aphids corroborates the experimental hypothesis.

Transcriptomic analysis of the venom gland by RNAseq *Ae- γ -GT* allowed the identification of two isoforms of *Ae- γ -GT* (*Ae- γ -GT1* and *Ae- γ -GT2*), which showed 51% sequence identity. Quantitative

studies of their expression profile in venom glands and in the rest of the body have been performed using quantitative Real Time PCR, assessing the changes of the transcription rates as affected by time and oviposition activity.

These two isoforms of *Ae- γ -GT* were produced *in vitro* in insect cells by recombinant baculovirus to carry out a more comprehensive molecular and functional characterization, aiming to shed light on their role in the host regulation process.

This objective was also tentatively pursued by developing a gene silencing approach by RNAi (RNA interference). Indeed, three administration methods for the delivery of dsRNA targeting the *Ae- γ -GT1* have been designed and their efficiency comparatively assessed. The first experimental approach consisted of haemocoelic injections of dsRNA in *A. ervi* pupae, then the delivery through the host aphid was attempted, by injecting dsRNA in the haemocoel of parasitized host aphids, or by feeding these latter on a liquid diet containing the dsRNA. The obtained results did not allow to select any of the experimental approaches pursued, as the results were inconsistent and further research work is necessary to develop a reliable and effective protocol to silence *Ae- γ -GT*.

1 INTRODUZIONE

Il phylum degli Artropodi comprende circa il 75% delle specie animali, e la classe degli insetti ne rappresenta la parte più cospicua. Al fine di attribuire una connotazione quantitativa all'aggettivo "cospicua", basti pensare che il solo ordine dei Coleotteri comprende un numero di specie di gran lunga superiore a quello di tutti i *phyla* animali presi assieme (Tremblay, 2005). Gli insetti sono tra i più antichi abitatori delle terre emerse tant'è che, molte delle specie rinvenute nei reperti fossili, risalgono al Paleozoico e al Devoniano.

In un arco di tempo così lungo essi hanno lentamente conquistato qualsiasi angolo delle terre emerse, moltiplicandosi ed evolvendosi in una molteplicità di forme ed adattamenti tali da consentirgli di colonizzare ogni tipo di ecosistema, persino luoghi dalle condizioni ambientali proibitive per qualsiasi altro animale, purché in presenza di materia organica da consumare (Tremblay, 2005). In virtù di quanto precedentemente affermato, e grazie all'instaurarsi di peculiari associazioni simbiotiche, l'impressionante numero di nicchie ecologiche colonizzate dagli insetti non ha eguali in nessun'altra classe di viventi.

L'enorme varietà di adattamenti ha consentito l'affermazione di numerosi ruoli ecologici, ognuno dei quali, anche se interpretato da protagonisti di dimensioni spesso ai limiti del visibile, risulta essere fondamentale per il mantenimento degli equilibri ambientali (Pennacchio, 2010). Senza nulla voler togliere al ruolo positivo svolto dagli insetti nei vari contesti ecologici, (insetti decompositori coinvolti nel processo di riciclo dei nutrienti, impollinatori, ausiliari nella lotta biologica per il controllo dei parassiti vegetali e tanto altro), essi sono

causa di ingenti perdite nelle colture di tutto il mondo (Oerke e Dehne, 2004). La necessità di limitare i danni provocati da questi artropodi, a lungo perseguita con l'ausilio di insetticidi di sintesi (Casida e Quistad, 1998), è sempre risultata di preminente importanza in agricoltura. Purtroppo, i benèfici effetti immediati, ottenuti con l'uso intensivo dei mezzi chimici di controllo, sono stati ben presto superati dai notevoli problemi che questi pongono, quali lo sviluppo di resistenza negli insetti bersaglio, la contaminazione ambientale, la tossicità per gli insetti non-target e la drastica riduzione delle popolazioni di specie impollinatrici. Questa consapevolezza ha portato alla ricerca e allo sfruttamento di alternative di origine biologica, da introdurre nell'ambito di strategie integrate di gestione degli insetti dannosi (Dent, 1995).

1.1.Lotta integrata

Sulla scorta dell'introduzione dei concetti di soglie economiche, e la conseguenziale rivalutazione dei concetti di danno, il controllo Integrato o *Integrated Pest Management* (IPM) (Fig. 1.1) si pone come obiettivo il controllo dei fitofagi, e non la loro eradicazione, attraverso l'integrazione di tutte le tecniche disponibili (agronomiche, chimiche e biologiche), nel rispetto dei principi ecologici, tossicologici ed economici (Tremblay, 2005; Viggiani, 1994).

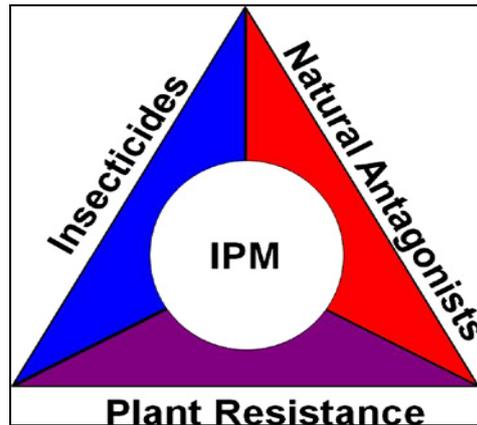


Figura 1.1. Modello di IPM
(*Integrated Pest Management*).

Il termine IPM, impiegato per la prima volta da Smith e van den Bosch (1967), spesso erroneamente associato al controllo dei soli insetti, in realtà prende in considerazione tutti gli organismi che interferiscono con le attività umane, inclusi altri invertebrati, vertebrati, patogeni (funghi e batteri) e piante: i *pest*. Si può quindi affermare che l'obiettivo dei programmi di IPM è quello di contenere le popolazioni di organismi dannosi in un agroecosistema, al di sotto della soglia economica di danno, ovvero, il livello della popolazione del fitofago oltre il quale il danno alla coltura cresce in modo logaritmico (Tremblay, 2005).

Uno degli strumenti chiave dell'IPM è, senza dubbio, il controllo biologico degli insetti, una strategia che viene impiegata ormai da ben oltre un secolo con successo (Viggiani, 1994; Bale et al., 2008).

1.2 Lotta biologica

La lotta biologica classica pone le fondamenta nello sfruttamento degli antagonismi naturali che insistono tra gli insetti fitofagi (De

Bach, 1964) e diversi agenti di contenimento biotico appartenenti a svariati gruppi sistematici (artropodi entomofagi, piante resistenti, nematodi entomopatogeni e vari patogeni degli insetti). Nella fattispecie, la maggior parte dei nemici naturali degli insetti dannosi per l'agricoltura risultano ascrivibili alla medesima categoria tassonomica e rientrano in due gruppi principali: predatori e parassitoidi.

Il controllo biologico, nella sua accezione più ampia, può essere descritto in termini di manipolazione/gestione dei rapporti biologici interspecifici, tra specie dannosa e antagonisti naturali (*e.g.* predazione/parassitismo), o intraspecifici, cioè nell'ambito della stessa specie dannosa (*e.g.* uso dei feromoni) (Viggiani, 1977; Tremblay, 2005). In quest'ottica, si considera controllo biologico non solo l'uso diretto di organismi antagonisti (lotta biologica classica), ma anche quello dei loro prodotti (tossine, feromoni, ormoni, fagodeterrenti, fagostimolanti).

1.3 Predatori e parassitoidi

Gli insetti entomofagi si distinguono in due principali categorie: predatori e parassitoidi.

In sintesi, i predatori risultano sovente caratterizzati da una spiccata mobilità, cacciano attivamente la preda e, in genere, durante tutti gli stadi di sviluppo (da larva ad adulto), si alimentano a spese di più individui vittime. I parassitoidi, manifestano un comportamento intermedio tra la predazione e il parassitismo in senso stretto: si differenziano dai veri parassiti in quanto legati all'ospite solo durante

lo stadio larvale sviluppandosi a spese di un'unica vittima che, al momento della parassitizzazione, può essere soppressa o coesistere per breve periodo e interagire con essi (Fig. 1.2).

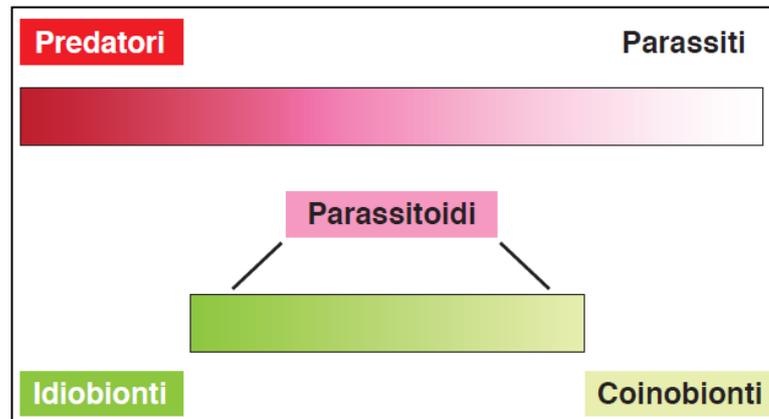


Figura 1.2: Zoofagia: predatori, parassiti e parassitoidi.

Di seguito una tabella con le principali caratteristiche discriminanti le tre categorie di zoofagi (Tab. 1.1):

Predatori	Parassitoidi	Parassiti
Consumano più di un individuo della specie vittima per giungere a maturità.	Lo sviluppo del parassitoide comporta la morte dell'ospite.	I veri parassiti, generalmente, non conducono a morte l'ospite.
	Non si verifica cambiamento d'ospite durante il loro ciclo vitale.	Il completamento del loro ciclo vitale prevede più ospiti intermedi.
La preda, in genere, appartiene alla stessa classe.	L'ospite, di norma, appartiene alla stessa classe.	Gli ospiti possono appartenere a Phyla diversi.
Possono essere entomofagi allo stadio larvale, da adulti o in entrambi gli stadi.	Di norma i parassitoidi si comportano da tali allo stadio larvale. Gli adulti sono, in genere, glicifagi.	Il loro comportamento è uniforme per tutto il loro ciclo vitale.
Le dimensioni dei predatori, di solito, sono maggiori di quelle della preda.	Le dimensioni del parassitoide sono comparabili a quelle dell'ospite.	Sovente le differenze dimensionali con l'ospite sono eclatanti.
	L'effetto sulla dinamica di popolazione ospite è assimilabile a quello esercitato dai predatori.	

Tab 1.1. Principali caratteristiche discriminanti le tre categorie di zoofagi: predatori, parassitoidi, parassiti.

A seconda delle modalità di parassitizzazione, la larva di un parassitoide può vivere a carico dell'individuo ospite, nutrendosene dall'esterno (ectoparassitismo) o consumandolo dall'interno (endoparassitismo) (Tremblay, 2005) benché, tra questi due estremi, esista un gradiente di forme intermedie. Si ritiene che i parassitoidi (inclusi i parassiti veri) costituiscano il 10-20% delle specie di insetti,

distribuiti in diversi ordini: Imenotteri, Ditteri e Strepsitteri (questi ultimi da considerarsi più correttamente parassiti).

Tuttavia, è tra gli Imenotteri, il gruppo più ampio e diversificato di insetti antagonisti, che si riscontrano le forme più spinte di specializzazione parassitaria, caratterizzate da evolute strategie di colonizzazione e sfruttamento della vittima (Godfray, 1994; Quicke et al., 1997; Whitfield, 2003; Pennacchio, 2010). Tali strategie di sviluppo, mirate ad assoggettare l'ospite, sono mediate da una vasta gamma di molecole i cui effetti spaziano da quelli letali alla fine manipolazione della sua fisiologia (Pennacchio e Strand, 2006). Nell'ambito degli imenotteri parassitoidi si individuano una cospicua serie di specifici adattamenti a tale stile di vita, tra i quali l'ovipositore (o terebra) rappresenta uno dei principali adattamenti morfologici caratterizzanti l'attività di tali entomofagi.

1.4 I parassitoidi

1.4.1 Ectoparassitoidi

La transizione dal regime generalista al regime carnivoro, avvenuta in un gruppo ancestrale di imenotteri xilofagi, è stata favorita dalla presenza dell'ovipositore (o terebra) che, unitamente all'uovo, consentiva di rilasciare veleno ed altre secrezioni in grado di bloccare e assoggettare l'ospite.

Nelle forme primitive, quali gli idiobionti, le strategie messe in atto per colonizzare e sfruttare le proprie vittime, provocandone in genere la paralisi, hanno lo scopo di limitare il rischio di mortalità per

i loro stadi pre-immaginali. È utile ricordare che, nel caso degli ectoparassiti, questi ultimi devono affrontare la risposta immunitaria indotta da ferita che attiva la coagulazione e la melanizzazione dell'emolinfa dell'ospite (Lemaitre e Hoffmann, 2007), cosa che evidentemente può interferire con l'assorbimento dei nutrienti (Strand e Pech, 1995). La soppressione della reazione immunitaria dell'ospite da parte degli ectoparassitoidi è stata oggetto, finora, soltanto di pochi studi.

Nel caso della specie idiobionte *Nasonia vitripennis*, il veleno sortisce un effetto negativo su entrambe le componenti della risposta immunitaria, umorale e cellulare, dell'ospite (Rivers et al., 2002).

Negli ectoparassitoidi coinobionti, invece, i dati disponibili relativi alla specie *Eulophus pennicornis* (Fig. 1.3) suggeriscono che l'immunosoppressione dell'ospite è dovuta principalmente alle secrezioni salivari prodotte dalla larva (Richards et al., 2002), mentre poco si conosce circa ruolo dei fattori materni.

Nel complesso, i pochi studi attualmente disponibili, carenti dal punto di vista delle informazioni molecolari, indicano che le barriere difensive dell'ospite costituiscono un problema anche per quelle specie che depongono l'uovo all'esterno della vittima.



Figura 1.3: Esempio di ectoparassitoide gregario. *Eulophus sp.* (Chalcidoidea, Eulophidae).

1.4.2 Endoparassitoidi

L'ingresso nella cavità emocelica dell'ospite ha determinato, negli endoparassitoidi, l'evoluzione di strategie immunosoppressive molto efficaci (Strand, 2008) e sottoposte ad una stringente pressione selettiva, al fine di garantire un idoneo milieu per la sopravvivenza della progenie.

In tal senso, per superare le difese dell'ospite, gli endoparassitoidi hanno messo a punto una serie di strumenti grazie a quali, in modi e tempi diversi, riescono a superare le difese della vittima colpendo numerosi bersagli molecolari del sistema immunitario (Pennacchio e Strand, 2006; Strand, 2012).

Le strategie adottate possono realizzarsi su meccanismi passivi che, fondamentalmente, impediscono il contatto con gli emociti dell'ospite. Tale obiettivo può essere perseguito, ad esempio, con la deposizione dell'uovo in uno stadio giovanile della vittima, il cui sistema immunitario è ancora in fase di sviluppo, oppure occultando le

uova “iniettandole” nei gangli nervosi o nei corpi grassi, al fine di evitare il contatto diretto con le difese dell’ospite, come osservato nell’imenottero braconide del genere *Asobara* (Beckage, 1998; Pennacchio e Strand, 2006).

Tattiche di immunoevasione molto più sofisticate si basano su meccanismi di mimetismo molecolare, grazie ai quali la superficie delle uova e degli stadi immaturi del parassitoide non vengono riconosciute come non-self, in quanto ricoperte da un rivestimento di secrezioni ovariche e/o membrane extra-embrionali e/o deposizione di molecole protettive.

Queste strategie passive possono coadiuvare, con la loro azione, meccanismi attivi di soppressione immunitaria che, in certi casi, non intervengono subito dopo l’ovideposizione, potendosi anche attenuare con lo sviluppo del parassitoide, consentendo un recupero delle funzionalità del sistema immunitario e delle difese contro altri patogeni, potenzialmente pericolosi sia per l’ospite sia per il parassitoide stesso (Beckage, 1998; Pennacchio e Strand, 2006).

I fattori di virulenza più efficaci usati dagli endoparassitoidi consistono di secrezioni iniettate dalla femmina al momento dell’ovideposizione (Fig. 1.4). Oltre all’uovo, infatti, vengono rilasciati veleno e fluidi ovarici che, in alcuni casi, possono contenere dei virus simbiotici appartenenti a diversi gruppi tassonomici. I virus più studiati finora sono quelli della famiglia Polydnviridae, un gruppo di virus esclusivamente associati agli imenotteri braconidi ed icneumonidi, parassiti di larve di lepidotteri (Strand, 2010).

Questi fattori materni sono in grado di proteggere la progenie del parassitoide, rendendo inefficaci entrambe le componenti, umorali

e cellulari, del sistema immunitario dell'ospite, spesso con effetti multipli e sovrapposti su differenti bersagli molecolari.



Figura 1.4: Adulto dell'endofago *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera Braconidae) che parassitizza una larva di *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae).

1.4.3 Idiobionti e coinobionti

Dal punto di vista delle interrelazioni con i “partners” biocenotici è possibile operare dei distinguo tra gli entomoparassiti, in base ad alcuni aspetti del loro peculiare stile di vita:

- stadio dell'ospite attaccato (ooparassitoidi, parassitoidi ovolarvali, larvali, pupali), numero di uova deposte da ciascuna femmina (parassitoidi solitari o gregari) oppure numero di embrioni che originano dal singolo uovo deposto (poliembrionici),

- parassitismo secondario o terziario (si realizza nel momento in cui il parassitoide è a sua volta vittima di un ulteriore entomoparassita),

- multiparassitismo (presenza contemporanea di più specie entomoparassite sullo stesso ospite),

- autoparassitismo (parassitismo a carico della propria specie),
- superparassitismo (stessa vittima che ospita un elevato numero di individui dello stesso entomoparassita),
- rapporti con l'ospite, in questo caso i parassitoidi possono essere distinti in idiobionti e coinobionti.

Gli idiobionti sono considerati le forme più ancestrali. Essi possono svilupparsi come ectoparassitoidi, su ospiti allo stadio larvale, o, più raramente, come endoparassitoidi all'interno di uova e pupe. L'ovideposizione sancisce l'arresto dello sviluppo dell'ospite, che fungerà da risorsa nutrizionale per la larva del parassitoide in via di sviluppo (Vinson et al., 2001).

I coinobionti, caratterizzati da evidenti apomorfie, manifestano un maggior grado di specializzazione. Questi parassitoidi non inducono l'arresto dello sviluppo dell'ospite, ma ne regolano le funzioni metaboliche, al fine di creare un contesto favorevole per la nutrizione e la crescita della propria progenie (Pennacchio e Strand, 2006). La maggioranza dei coinobionti si comporta da endoparassitoide di stadi larvali, ma possono anche mostrare comportamenti da ectoparassitoide.

Le numerose strategie di virulenza, evolute per superare le barriere difensive dell'ospite, hanno influenzato in maniera significativa il processo di radiazione adattativa degli imenotteri parassitoidi (Pennacchio e Strand, 2006; Poirè et al., 2009). D'altro canto, l'attività di questi nemici naturali ha indubbiamente contribuito a modellare la composizione attuale delle comunità naturali degli insetti ospiti poiché, in molti casi, alla base delle interazioni fra il sistema immunitario dell'ospite e le tattiche di virulenza del parassitoide vi sono, spesso, elevati livelli di specificità molecolare

che hanno sicuramente favorito la frammentazione delle popolazioni, determinando lo sviluppo di entità geneticamente isolate (Dupas et al., 2009).

In sintesi, la diversità dei meccanismi immunosoppressivi nelle diverse linee evolutive degli imenotteri parassitoidi riflette il loro lungo percorso evolutivo che, partendo dalle forme di adattamento più ancestrali, tipiche degli ectoparassitoidi (Orussidae), arriva a quelle più derivate presenti negli endofagi coinobionti.

1.5 I fattori di virulenza

Le cosiddette “strategie di virulenza” contemplano molteplici adattamenti che consentono ai parassitoidi di perseguire il successo nella parassitizzazione; in antitesi, gli adattamenti che consentono all’ospite di difendersi dall’attacco del parassitoide sono denominati “meccanismi di resistenza” (Dupas et al., 2003).

I fattori di virulenza impiegati dai parassitoidi per superare le barriere erette dal sistema difensivo dell’ospite, attraverso un fine meccanismo di regolazione, sono numerosi e di varia natura. In tal senso, risulta proficuo effettuare un distinguo tra i fattori di origine materna e quelli di origine embrionale; tra questi ultimi, si citano, in particolare, quelli provenienti dalla dissociazione della membrana extraembrionale verificatesi in seguito alla schiusa dell’uovo e la fuoriuscita della larva neonata.

I fattori materni, rilasciati al momento dell’ovideposizione, spaziano dalle proteine secrete dalle ghiandole del veleno, annesse al sistema riproduttivo, alle VLP (Virus-like Particles), fino a virus

simbionti quali i Polydnavirus (PDV) (Asgari, 2006; Asgari e Rivers, 2011; Gatti et al., 2011; Pennacchio e Strand, 2006; Poirié et al., 2009).

Tra questi ultimi, i PDV risultano particolarmente rilevanti ai fini della parassitizzazione. Nella fattispecie, i virus simbionti della famiglia Polydnaviridae appaiono specificamente associati a circa 40.000 specie di imenotteri parassitoidi di larve di lepidotteri ascrivibili alle famiglie Braconidae e Ichneumonidae, e rispettivamente denominati, *Bracovirus* (BV) e *Ichnovirus* (IV). I PDV sono indispensabili per il successo parassitario in quanto implicati nella soppressione delle reazioni immunitarie e nell'alterazione dello sviluppo dell'ospite (Choi et al., 2009; Pennacchio e Strand, 2006; Strand, 2012; Webb e Strand, 2005).

Il genoma dei PDV è suscettibile di esistere in due diverse forme:

1) come provirus integrato stabilmente nel genoma dei parassitoidi e trasmesso da una generazione all'altra lungo la linea germinale (trasmissione transovarica) (Strand e Burke, 2012);

2) come doppio filamento di DNA circolare multipartito (composto da più molecole), in grado di replicarsi nelle cellule del calice ovarico (Webb et al., 2006).

In queste ultime, i virus si replicano asintomaticamente; in seguito i virioni si raccolgono nel lume degli ovidotti formando una sospensione di virus e proteine denominata fluido del calice (Beck e Strand, 2005). Una volta iniettati nell'ospite, i virus pervengono nell'emolinfa dove infettano gli emociti (pars figurata dell'emolinfa che interviene nelle reazioni di fagocitosi e incapsulamento) ed altri tessuti (Strand e Pech, 1995).

Tuttavia, pur essendo i PDV incapaci di replicarsi nell'ospite, si verifica, in quest'ultimo, l'espressione di alcuni geni virali (Kroemer e Webb, 2004). Questi geni sono implicati nella soppressione della risposta immunitaria, nell'alterazione del metabolismo e del bilancio endocrino dell'ospite, risultando quindi di fondamentale importanza per l'esito positivo della parassitizzazione (Beckage, 1998; Bradleigh Vinson et al., 1998; Kroemer e Webb, 2004; Malva et al., 2004).

Nondimeno, è utile sottolineare che l'iniezione dei fattori parassitari di origine materna non garantisce, di per se, una regolazione prolungata dell'ospite (Pennacchio e Strand, 2006) quindi, i parassitoidi rilasciano una serie di fattori di regolazione di origine embrionale e larvale, tra i quali i teratociti (Beckage e Gelman, 2004) assumono un ruolo preminente.

I teratociti rappresentano particolari tipi cellulari che derivano dalla dissociazione delle membrane extraembrionali in seguito alla schiusa dell'uovo del parassitoide all'interno dell'ospite; presentano la capacità di aumentare in dimensione e grado di ploidia senza andare incontro a divisione cellulare (Dahlman e Vinson, 1993; Strand e Wong, 1991). Trattasi di cellule con funzione secretoria che rilasciano, nell'emolinfa dell'ospite, proteine di importanza nutrizionale e regolativa (Beckage e Gelman, 2004; Tanaka e Wago, 1990; Bell et al., 2004; Caccia et al., 2012; Falabella et al., 2000; Falabella et al., 2005; Falabella et al., 2009; Schepers et al., 1998; Zhang et al., 1997). Sono dotate di un reticolo endoplasmatico molto sviluppato, un elevato numero di mitocondri e una membrana con numerosi microvilli. Alcune delle proteine secrete, le TSP (Teratocytes Secreted Proteins), manifestano attività istolitica diretta contro l'apparato riproduttivo dell'ospite (ovari). Tale attività,

combinata all'azione del veleno iniettato all'ovideposizione, garantisce il successo della parassitizzazione (Falabella et al., 2009). L'attività dei teratociti è stata ampiamente documentata nella specie *Aphidius ervi* (Haliday), parassitoide endofago di afidi (Caccia et al., 2012; Falabella et al., 2000; Falabella et al., 2005; Falabella et al., 2009).

Finora sono stati riscontrati teratociti tra le superfamiglie *Ichneumonoidea*, *Platyastroidea* e *Calcidoidea* (Pedata et al., 2003; Pennacchio e Strand, 2006; Shaw e Huddleston, 1991).

Numerosi studi hanno dimostrato che anche la membrana extra-embryonale che circonda l'embrione, e dalla quale originano i teratociti, svolge un ruolo importante quale fattore di parassitizzazione (Pennacchio et al., 1994). In *Toxoneuron nigriceps* (Braconidae) si è osservato che questa complessa struttura realizza una duplice funzione: da un lato, contribuisce all'elusione della risposta immunitaria dell'ospite e, dall'altro, coadiuva l'attività alimentare delle larve, favorendo la sottrazione di nutrienti dall'emolinfa, analogamente a quanto avviene per la specie *Aphidius ervi* (de Eguileor et al., 2001; Giordana et al., 2003; Grimaldi et al., 2006).

1.5.1 Il veleno e la sua azione immunosoppressiva

Nell'ordine degli Hymenoptera il veleno è prodotto da speciali ghiandole annesse al sistema riproduttore femminile e "somministrato" attraverso un peculiare adattamento morfo-funzionale: l'ovipositore. Quest'ultimo, come accennato in precedenza, rappresenta indubbiamente uno dei più importanti adattamenti morfologici che ha favorito in maniera significativa

l'intenso processo evolutivo e di radiazione adattativa di questo gruppo di insetti (Quicke, 1997). L'ovipositore, infatti, insieme alla complessa miscela di veleno e secrezioni ovariche che inietta, ha conferito agli imenotteri parassitoidi la capacità unica di modulare finemente l'ambiente destinato ad ospitare la propria progenie.

L'effetto di tali secrezioni, nel caso dei parassitoidi endofagi, va ben oltre la neurotossicità che comunemente si osserva negli ectofagi. La loro attività in molti casi è, infatti, responsabile della soppressione della risposta immunitaria e di alterazioni dello sviluppo dell'ospite, spesso in sinergia con altri fattori di origine materna ed embrionale (Asgari, 2006; Pennacchio, 2010).

Il veleno prodotto da numerosi gruppi di parassitoidi endofagi può sortire effetti sia diretti che indiretti sul sistema immunitario dell'ospite. Nell'ultimo caso, in particolare, il veleno può comportarsi da agente coadiuvante nel facilitare sia la persistenza sia l'infezione dei tessuti della vittima, da parte di alcuni virus simbiotici immunosoppressivi, iniettati assieme all'uovo (Stoltz et al., 1988; Kaeslin et al., 2010).

Per quanto concerne gli effetti diretti del veleno, sulla risposta immunitaria dell'ospite, sono stati descritti diversi casi. Negli icneumonidi idiobionti appartenenti al genere *Pimpla*, sono presenti delle componenti proteiche che hanno un effetto citotossico che induce apoptosi negli emociti (Er et al., 2010). Dalla soppressione degli emociti, ne consegue un numero inferiore di cellule immunitarie circolanti con ridotta capacità diffusiva e di aggregazione, evidenti ripercussioni sul processo di incapsulamento e inibizione della melanizzazione.

Nel parassitoide pupale, *Pteromalus puparum*, sviluppatosi nella pupa del lepidottero *Pieris rapae*, il veleno sortisce effetti multipli sul sistema immunitario della vittima, determinando un'alterazione nel numero e nella morfologia degli emociti (Ye et al., 2007), inibendone il processo di diffusione e incapsulamento (Wu et al., 2008) fino a interferire con l'attività fenolossidasi nell'emolinfa (Zhu et al., 2010). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che il veleno di alcune specie è in grado di silenziare, negli emociti dell'ospite, i geni codificanti lectine di tipo C (ampia famiglia di recettori in grado di riconoscere e legare i carboidrati con modalità calcio-dipendenti) che espletano un importante ruolo nella modulazione della risposta immunitaria innata (Fang et al., 2011).

Il veleno delle specie coinobionti comprende diverse componenti bioattive, alcune delle quali possono manifestare somiglianze, seppur limitate, con molecole presenti negli idiobionti. La proteina calreticulina, ad esempio, presente nel veleno di alcuni coinobionti, quando iniettata nel corpo dell'ospite compete con la calreticulina endogena, coinvolta nella regolazione delle prime fasi dell'incapsulamento (Choi et al., 2002), alterandone le funzioni.

Analogo ruolo sembra essere svolto da una proteina simile alla calreticulina individuata, però, nel veleno di alcuni parassitoidi idiobionti, (Rivers et al., 2009; Rivers e Brogan, 2008). Tale strategia offensiva di tipo "competitivo", osservata in diverse linee evolutive, può essere interpretata alla luce dell'evoluzione convergente.

Un altro esempio di presenza di componenti immunosoppressive nel veleno è offerto dalla specie *Leptopilina boulardi*, un parassitoide larvale di *Drosophila sp.*

Il veleno prodotto da questo parassitoide contiene delle proteine non funzionali, simili a quelle dell'ospite, coinvolte nell'alterazione della risposta dinamica del citoscheletro ed essenziali per l'incapsulamento dei corpi estranei (Labrosse et al., 2005; Colinet et al., 2007). Tali fattori di virulenza sono associati a un inibitori della serina proteasi in grado di bloccare la cascata fenolossidasica nell'emolinfa dell'ospite (Colinet et al., 2009).

La combinazione degli effetti disfunzionali a carico degli emociti e della reazione di melanizzazione è un tema comune osservato in numerosi casi.

Ad esempio in *Cotesia rubecola* l'impatto negativo descritto nel caso della risposta cellulare immunitaria mediata dalla calreticulina (Zhang et al., 2006), è associato all'inibizione della melanizzazione, causata da una proteina presente nel veleno ma cataliticamente inattiva, chiamata Vn50, la quale esibisce significative somiglianze con degli omologhi della serina proteasi coinvolta nei processi di attivazione della fenol ossidasi (Asgari et al., 2003).

1.5.2 Uso dei fattori di virulenza degli antagonisti naturali per nuove strategie di controllo

I fattori di virulenza impiegati dai parassitoidi per assoggettare le proprie vittime, polydnavirus inclusi, rappresentano una fonte naturale di molecole con potenziale attività bioinsetticida. L'identificazione dei geni che regolano le interazioni molecolari tra gli ospiti e i parassitoidi offre l'opportunità di isolare nuovi fattori di virulenza ed i rispettivi recettori bersaglio all'interno dell'ospite, strumenti che possono essere

sfruttati proficuamente per la messa a punto di biotecniche innovative per il controllo degli insetti dannosi.

Un primo tentativo in questa direzione è stato realizzato attraverso studi sul Braconide *Microplitis croceipes*, parassitoide larvale di lepidotteri nottuidi appartenenti alle specie *Heliothis/Helicoverpa*. In seguito alla schiusa dell'uovo di *M. croceipes*, la membrana extraembrionale si dissocia nei teratociti, che sintetizzano le TSP (Teratocyte Secreted Proteins). Di particolare rilevanza è la proteina TSP14, il cui target specifico è il tessuto adiposo dell'ospite. Da queste osservazioni è scaturita l'idea di valutare l'attività orale della TSP14, inducendone l'espressione in piante di tabacco transgeniche usate per alimentare larve di *Heliothis virescens*. L'esperimento ha fornito risultati soddisfacenti evidenziando la riduzione della crescita e dello sviluppo delle larve, con conseguente incremento della mortalità e riduzione del danno per le piante (Maiti et al., 2003).

Parallelamente ai primi esperimenti pionieristici, compiuti da Dahlman con le piante transgeniche di tabacco, sono stati condotti studi che prevedevano l'espressione in pianta del gene *TnBVank1* (la cui sequenza è caratterizzata da domini di ankirina) presente nel bracovirus associato al parassitoide *Toxoneuron nigriceps* (Dahlman e Vinson, 1993; Di Lelio et al., 2014; Falabella et al., 2007). L'espressione del gene in pianta conferiva un significativo incremento della protezione, determinando ritardo della crescita e ridotto livello di sopravvivenza del fitofago dannoso *Spodoptera littoralis*. Da tali risultati emergeva la capacità di *TnBVank1* di interferire, con effetti pleiotropici, su diverse funzioni cellulari, interferendo con l'assorbimento dei nutrienti, giungendo ad inficiare le attività vitali

dell'ospite, da cui la possibilità di un futuro utilizzo quale promettente molecola bioinsetticida (Di Lelio et al., 2014). Piuttosto interessante, infine, da un punto di vista applicativo, è l'alterazione del profilo di espressione proteica indotta da *TnBVank1* nelle piante. Quest'ultimo, infatti, inducendo sovraespressione di alcuni geni coinvolti nella risposta immunitaria diretta verso alcuni funghi patogeni, incrementava la resistenza della pianta (Rao et al. dati non pubblicati).

Un altro interessante studio ha previsto la somministrazione di proteine Cys-motif alle larve di *Heliothis virescens*, attraverso alimentazione o iniezione, provocando una marcata riduzione della crescita larvale ed un cospicuo incremento della mortalità pupale. Ciò ha posto, ulteriormente, in evidenza la capacità di proteine con attività immunosoppressiva, di aumentare la suscettibilità del fitofago target, all'azione di agenti patogeni (Fath-Goodin et al., 2006; Washburn et al., 2000).

1.6 Nuove molecole candidate come bioinsetticidi

Per quanto concerne i PDV, o altri geni parassitari, è al momento difficile predire su basi puramente teoriche, quali possano essere i candidati ideali da impiegare in maniera proficua per il controllo delle specie dannose.

La scelta di un buon candidato è determinata non solo dalle sue caratteristiche molecolari e funzionali intrinseche, ma anche dall'attività orale esercitata quando tali componenti vengono ingerite con il cibo. Quest'ultimo aspetto è largamente influenzato dalla

presenza di bersagli molecolari nell'intestino e/o dalla capacità delle molecole ingerite di attraversare la barriera intestinale ed entrare nell'emocele per essere trasportate fino ai tessuti bersaglio in forma attiva.

Sulla base delle funzioni dell'ospite che si intendono colpire è possibile definire gruppi di molecole con attività immunosoppressiva, neurotossica o capaci di alterare la fisiologia, lo sviluppo e/o la riproduzione. Per quanto, i primi studi pionieristici condotti sulle neurotossine, effettuati principalmente su parassitoidi idiobionti, non abbiano avuto un grande seguito a dispetto delle numerose specie che potrebbero essere utilizzate quale fonte di nuove e potenti neurotossine. In tale prospettiva, potrebbe risultare interessante focalizzare l'attenzione su quelle specie in grado di indurre rapida paralisi e conseguente morte dell'ospite (Weaver et al., 2001).

Col tempo, la caratterizzazione delle molecole ad azione immunosoppressiva è divenuta sempre più dettagliata. In precedenza, si è già accennato a come la necessità da parte degli ectoparassitoidi di alterare la risposta immunitaria dell'ospite per facilitare la loro attività nutrizionale, e l'esigenza ancor più pressante degli endoparassitoidi di eludere le barriere difensive dell'ospite per sopravvivere, abbiano dato origine ad una grande diversità di molecole bioattive (Pennacchio e Strand, 2006).

Circa le conoscenze molecolari e funzionali dei fattori di virulenza, è opportuno precisare che i dati disponibili sono di gran lunga molto più dettagliati per i fattori immunosoppressivi codificati dai PDV, per i quali sono stati chiariti meccanismi di azione e caratterizzate diverse famiglie geniche (Webb e Strand, 2005).

Relativamente ai principi presenti nel veleno i dati sono molto meno dettagliati.

Per i PDV è interessante sottolineare che l'espressione di numerosi geni in differenti tessuti dell'ospite, suggerisce l'esistenza di un network regolativo in grado di modulare differenti alterazioni indotte dai parassitoidi e riguardanti l'equilibrio endocrino, l'alimentazione, il metabolismo e la riproduzione (Pennacchio e Strand, 2006). Relativamente a quest'ultimo punto, uno degli esempi più calzanti circa l'impatto della parassitizzazione sul sistema riproduttivo dell'ospite, è fornito dal parassitoide endofago di afidi, *A. ervi*, oggetto del lavoro di Tesi. L'impressionante eterogeneità delle alterazioni indotte dai parassitoidi mette in luce l'esistenza di una grande varietà di molecole bioattive. Tuttavia, le informazioni attualmente disponibili circa i loro meccanismi di azione e recettori associati, restano ancora molto limitate rispetto a quanto si conosce dei fattori di virulenza con attività immunosoppressiva, per i quali sono prevedibili usi in tempi relativamente più rapidi.

1.7 Vettori di espressione dei fattori di virulenza

Il rilascio delle macromolecole bioinsetticide richiede l'uso di vettori biologici in grado di esprimerne i geni codificanti, oppure l'impiego di formulati idonei che consentano la distribuzione delle proteine ricombinanti nell'ambiente.

Esiste una sostanziale divisione fra le molecole bioattive agenti su recettori esposti nel lume intestinale e quelle che devono

raggiungere recettori localizzati a livello dell'epitelio intestinale o nell'emolinfa. La prima categoria di molecole, esplicando la sua azione sull'intestino, consente l'impiego di strategie di distribuzione orali, mentre le altre molecole citate vengono veicolate molto più efficacemente attraverso simbionti e patogeni specifici degli insetti (Inceoglu et al., 2006; Whetstone e Hammock, 2007). In relazione a quest'ultimo punto, particolare importanza rivestono i virus entomopatogeni appartenenti alla famiglia Baculoviridae ed ascrivibili a due generi: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). Gli NPV sono caratterizzati dal contenere uno o multipli nucleocapsidi per involucro (pericapside o peplos), differentemente dai GV che ne contengono soltanto uno. L'infezione virale dell'insetto ospite avviene per via orale attraverso l'ingestione di OB (occlusion bodies), grossi corpi proteici denominati rispettivamente poliedri o granuli, a seconda si tratti di NPV o GV, contenenti diversi virioni ODV (occlusion-derived viruses) immersi in una matrice proteica. Quest'ultima negli OB, costituita essenzialmente da poliedrina (NPV) o granulina (GV), svolge il compito fondamentale di proteggere i virioni dall'ambiente esterno.

Una volta penetrati nel lume dell'intestino medio gli OB si dissolvono, a causa del pH basico e dell'azione di proteasi presenti nel lume intestinale, liberando gli ODV che, grazie ad una metalloproteasi, alterano la struttura della membrana peritrofica, raggiungendo ed infettando così l'epitelio intestinale. Questo peculiare aspetto del ciclo dei baculovirus (Fig. 1.5), unitamente alla relativamente facile manipolazione del loro genoma, risultano di notevole interesse ai fini applicativi consentendo di potenziare la virulenza di ceppi transgenici mediante l'espressione di molecole

tossiche capaci di incrementare la velocità di soppressione e di ampliare la varietà di ospiti (Inceoglu et al., 2006; Kamita et al., 2005).

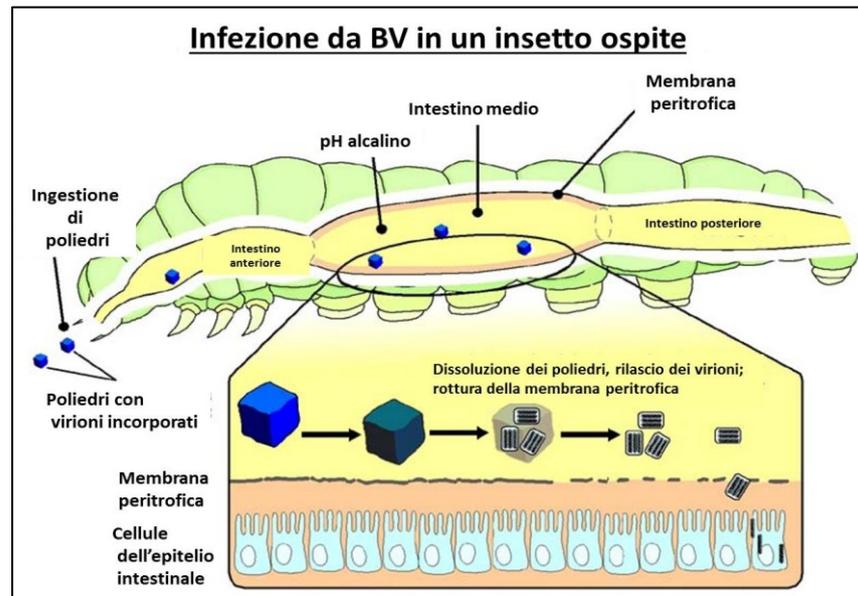


Figura 1.5. Rappresentazione schematica del ciclo infettivo di un *Baculovirus*.

E' opportuno precisare che l'applicazione di tali tecniche è al momento fortemente limitata dalle preoccupazioni dell'opinione pubblica sui potenziali rischi per l'ambiente e per gli organismi non bersaglio legati all'impiego dei baculovirus ricombinanti (Whetstone e Hammock, 2007). L'assunzione orale di macromolecole con attività insetticida resta la via preferibile di ingresso. Pertanto, l'applicazione diretta di molecole ricombinanti o di organismi ricombinanti che le esprimono, necessita della presenza di recettori specifici nel lume intestinale. Questo è il caso delle piante GM (geneticamente modificate) che esprimono una o più tossine prodotte dal batterio sporigeno entomopatogeno *Bacillus thuringiensis* (Vacek et al., 1987).

L'uso crescente delle piante *Bt* ha consentito una significativa riduzione dell'impiego di pesticidi, con risvolti positivi sull'ambiente e sui costi di produzione e senza conseguenze negative per gli insetti benefici (Toenniessen et al., 2003; Brookes e Barfoot, 2005; Bale et al., 2008). La possibilità di poter utilizzare fonti alternative di molecole bioattive, come quelle presenti negli antagonisti naturali degli insetti, è molto allettante e costituisce una riserva di biodiversità molecolare tanto preziosa quanto inesplorata.

Un'analisi generale di queste molecole e dei rispettivi bersagli indica chiaramente che il maggiore ostacolo da affrontare dopo l'ingestione è la loro stabilità nell'ambiente intestinale e l'assorbimento di quantità adeguate in forma attiva.

L'uso di batteri epifiti, quali vettori di rilascio, rappresenta un'interessante alternativa alle piante transgeniche ed ha riportato dei risultati soddisfacenti per il controllo delle larve di processionaria del pino, usando una tossina *Bt* (Alberghini et al., 2005; 2006). In natura tali batteri vengono ingeriti con il substrato fogliare da essi colonizzato, ed ogni molecola da loro espressa, come avviene per la piante GM, deve legarsi ad un recettore intestinale o superare le barriere intestinali. Pertanto, l'obiettivo di aumentare il livello di permeabilità intestinale alle macromolecole rappresenta un traguardo da raggiungere al fine di facilitare lo sviluppo di nuove biotecnologie per il controllo degli insetti.

1.8 Strategie di difesa basate su RNA interference

L'RNA *interference* (RNAi) è un meccanismo di regolazione post-trascrizionale, presente sia negli eucarioti superiori che negli invertebrati, evolutosi per conferire protezione nei confronti dei virus (Matranga e Zamore, 2007; van Rij e Berezikov, 2009). Questo meccanismo molecolare offre l'opportunità di sviluppare strategie innovative di controllo degli insetti dannosi in agricoltura, la cui efficacia dipende dalla scelta del gene bersaglio e dalla letalità del fenotipo indotto dal suo silenziamento, ovvero dalla sua mancata espressione.

Tale processo può essere schematicamente ripartito in tre fasi principali. Nella prima un dsRNA (double strand RNA), espresso o introdotto nella cellula, viene scisso dall'enzima Dicer (una ribonucleasi di tipo III caratterizzata da diversi domini funzionali) in molecole più piccole di RNA a doppio filamento chiamati siRNA (short interfering RNA). Questi ultimi, nella fase successiva, vengono riconosciuti e legati dalla proteina Ago2 (Argonauta) facente parte del complesso RISC (RNA-induced silencing complex). I filamenti dei dsRNA vengono separati ed il filamento antisenso noto come filamento guida, resta associato al complesso RISC, indirizzandolo così verso l'mRNA che presenta le sequenze nucleotidiche complementari e, legandosi a queste ultime, ne determina la degradazione (Winter et al., 2009) (Fig. 1.6).

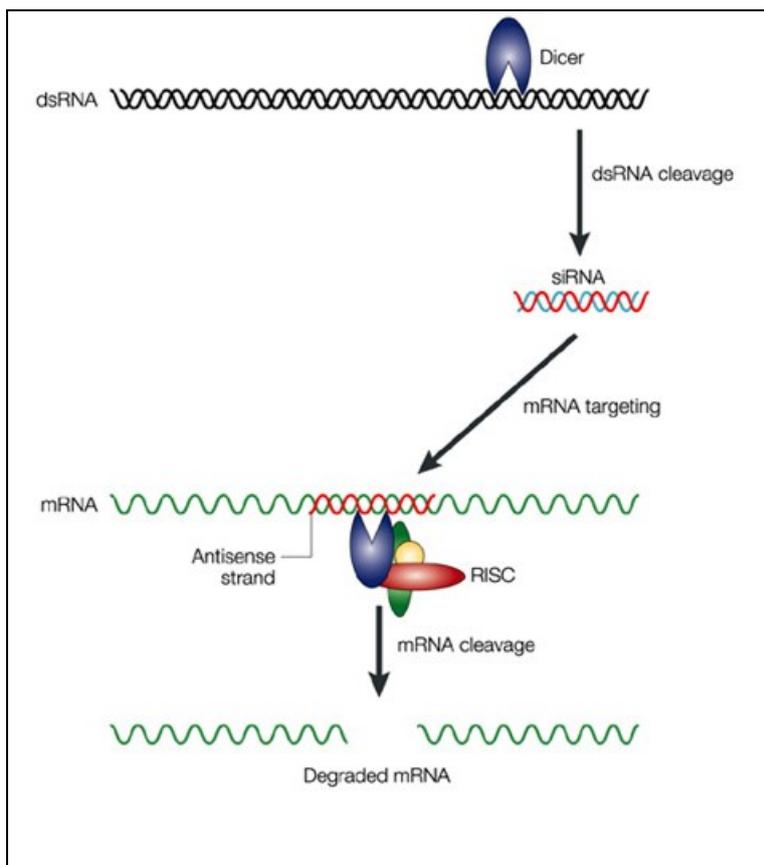


Figura 1.6. Rappresentazione schematica del silenziamento genico.

Strategie di controllo basate sul meccanismo appena descritto risultano particolarmente promettenti in quanto, una volta identificati geni essenziali per l'insetto che si vuole controllare, è possibile, grazie al loro silenziamento, ridurre la fitness e/o la fecondità, oppure limitarne la capacità quali vettori di agenti patogeni per l'uomo, gli animali e le piante. Il grande vantaggio di strategie basate sul silenziamento genico risiede nella selettività del metodo che consente, in seguito ad un'attenta scelta di regioni di sequenza poco conservate su cui progettare il dsRNA, di limitare al massimo gli effetti su organismi non-bersaglio. Ciò, in linea di principio, contribuisce a

rendere l'RNAi una tecnica di controllo potenzialmente sicura, sia per l'ambiente che per gli organismi non-target.

Lo studio delle interazioni ospite-parassitoide e la definizione dei bersagli molecolari dei fattori di virulenza, nell'ospite, offre la possibilità di individuare geni che controllano importanti funzioni vitali e la risposta immunitaria. L'analisi dei meccanismi molecolari di regolazione dell'ospite può, pertanto, consentire lo sviluppo di tecnologie di controllo basate sull'uso dell'RNAi, attraverso il silenziamento di geni scelti puntando a riprodurre strategie di aggressione dell'ospite messe in atto dai parassitoidi, la cui efficacia è garantita da meccanismi modellati da processi co-evolutivi di lunga durata. Ciò rappresenta un interessante esempio di tecnologie "biomimetiche", ovvero, ispirate da fenomeni biologici e che rappresenta una delle frontiere più moderne del biocontrollo, basate sull'uso di antagonisti naturali non solo come organismi ma anche come fonte di molecole ed informazioni utili ai fini della limitazione degli insetti dannosi.

1.9 Il sistema modello: *A. ervi* -*A. pisum*

Gli afidi o pidocchi delle piante (Rhynchota: Sternorrhyncha) sono insetti fitofagi ben noti agli agricoltori per gli ingenti danni arrecati alle coltivazioni. Questi succhiatori di linfa vegetale (fitomizi), presentano dimensioni piuttosto contenute, sempre però visibili ad occhio nudo (5-7 mm allo stadio adulto), esoscheletro molle e vivono in colonie numerose. Il marcato polimorfismo, carattere ricorrente negli afidi, è associato all'eventuale complessità del loro

ciclo che può essere completo (olociclo), con alternanza di generazioni anfigoniche e partenogenetiche, parziale (paraciclo), con soppressione temporanea della generazione anfigonica, ed incompleto (anolociclo), con permanenza della sola generazione partenogenetica. Al tipo normale, provvisto di ali, si affiancano forme attere che vanno interpretate come adattamento ad una fase specifica del ciclo. Lo sviluppo postembrionale passa attraverso quattro stadi, con differenze marcate fra individui alati e atteri: negli alati si susseguono due stadi di neanide, uno di preninfa e uno di ninfa; in quelli atteri si passa attraverso quattro stadi di neanide (N1:N4). Le differenze morfologiche fra stadi giovanili ed adulto, negli individui atteri, riguardano il numero di articoli delle antenne e la forma della codicola e dei sifoni.

Per quanto concerne l'olociclo, la riproduzione sessuale e l'oviparità sono eventi circoscritti al periodo tardo estivo-invernale e garantiscono il perpetuarsi della specie e la variabilità genetica; durante il resto del ciclo, spetterà alle femmine vivipare e partenogenetiche diffondere le colonie nell'ambiente. Alla partenogenesi è collegato l'interessante fenomeno dell'“inscatolamento delle generazioni”, per cui una femmina possiede al suo interno figlie già formate che ancor prima di nascere contengono a loro volta altri embrioni in via di sviluppo.

A. pisum, o afidone verdastro del pisello, è un grosso afide di colore verde più o meno scuro, con forme alate e attere, infeudato alle leguminose ed in particolare al pisello. Nei climi più freddi presenta olociclo che si svolge a carico di un solo ospite (monoico). Il ciclo riproduttivo contempla una fase sessuale che darà luogo all'uovo d'inverno e diverse generazioni partenogenetiche. Quantunque, il

ciclo può essere facilmente completato sulla pianta ospite in condizioni di laboratorio, caratteristica questa che ha contribuito a rendere l'afide un'ottima specie modello.

A. ervi (Hymenoptera: Aphidiinae) è un endoparassitoide coinobionte polifago di afidi, appartenente alla famiglia Braconide. Si tratta di una specie di origine Palearctica in grado di adattarsi a diverse condizioni climatiche, dall'Europa continentale ad ambienti costieri e desertici (González et al., 1978).

A. ervi venne introdotto in Nord America, negli anni 60', per il controllo biologico di *A. pisum* (Mackauer e Campbell, 1972). Su questo sistema modello sono stati condotti studi di carattere ecologico, comportamentale e fisiologico (Battaglia et al., 2000; Caccia et al., 2012; de Eguileor et al., 2001; Digilio et al., 2000; Falabella et al., 2000; Falabella et al., 2005; Falabella et al., 2007; Falabella et al., 2009; Giordana et al., 2003; Guerrieri et al., 1993, 1997; He e Wang, 2006; Pennacchio et al., 2005; Powell et al., 1998; Sequeira e Mackauer, 1992; Tremblay et al., 1998).

1.9.1 Ciclo biologico di *A. ervi*

Solitamente la femmina ovidepone un singolo uovo all'interno dell'emocele dell'afide (Fig. 1.7).



Figura 1.7. Disegno di *A. pisum* parassitizzato da *A. ervi*.

L'ovideposizione può avvenire in tutti gli stadi di sviluppo di *A. pisum*, dalla neanide di primo stadio all'adulto. A 20°C l'uovo schiude nell'arco 3 giorni dall'ovideposizione.

Il parassitoide completa i tre stadi larvali in 6-9 giorni, in base alla temperatura di allevamento, durante i quali l'ospite viene consumato dall'interno (Pennacchio e Digilio, 1990; Sequeira e Mackauer, 1992). Nelle prime fasi di sviluppo, la larva è in grado di assorbire carboidrati ed amminoacidi presenti nell'emolinfa dell'ospite attraverso l'epidermide (de Eguileor et al., 2001; Giordana et al., 2003).

La larva di terza età, o matura (circa 110 ore dall'ovideposizione a 25°C) è dotata di mandibole sviluppate che le consentono di consumare attivamente i tessuti dell'ospite (Pennacchio e Digilio, 1990). La larva matura fissa l'afide al substrato vegetale attraverso secrezioni delle ghiandole salivari e si impupa. La fase di pupa dura

circa 4 giorni a 25°C e avviene all'interno della cuticola dell'afide ormai svuotata, di colore bronzeo e consistenza pergamenacea, detta "mummia" (Stary, 1962) (Fig. 1.8).



Figura 1.8. Mummie di *A. pisum* parassitizzato da *A. ervi*.

Alla fine di questa fase il parassitoide pratica un foro circolare a livello della cuticola per consentire lo sfarfallamento dell'adulto (Fig. 1.9).

I maschi e le femmine manifestano un diverso comportamento. Le femmine appena sfarfallate attraversano un breve periodo ricettivo, durante il quale si accoppiano non più di una volta (Gilchrist, 1996); in assenza di accoppiamento deporranno uova che daranno origine per partenogenesi a soli individui maschi e aploidi (arrenotochia) (He e Wang, 2008; King, 1989). Al contrario, i maschi sfarfallano in media nove ore prima, per avere maggiore probabilità di incontrare femmine non ancora accoppiate, raggiungendo la maturità sessuale solo quattro ore dopo lo sfarfallamento (He et al., 2004; Quicke et al., 1997).

Gli effetti della parassitizzazione sul singolo individuo e sulla popolazione di afidi variano in base alla fase di sviluppo in cui

avviene l’ovideposizione. Gli afidi parassitizzati entro 1-2 giorni (neanide di I-II età) non superano lo stadio di neanide di IV età. Quelli parassitizzati a 3-6 giorni (neanide di III-IV età) riescono a raggiungere lo stadio di adulto e se l’ovideposizione avviene dopo il quarto giorno di età, gli afidi sono anche in grado di riprodursi (He et al., 2005). Fattori parassitari di origine materna, embrionale e larvale, causano nell’ospite alterazioni dello sviluppo e delle funzioni riproduttive.

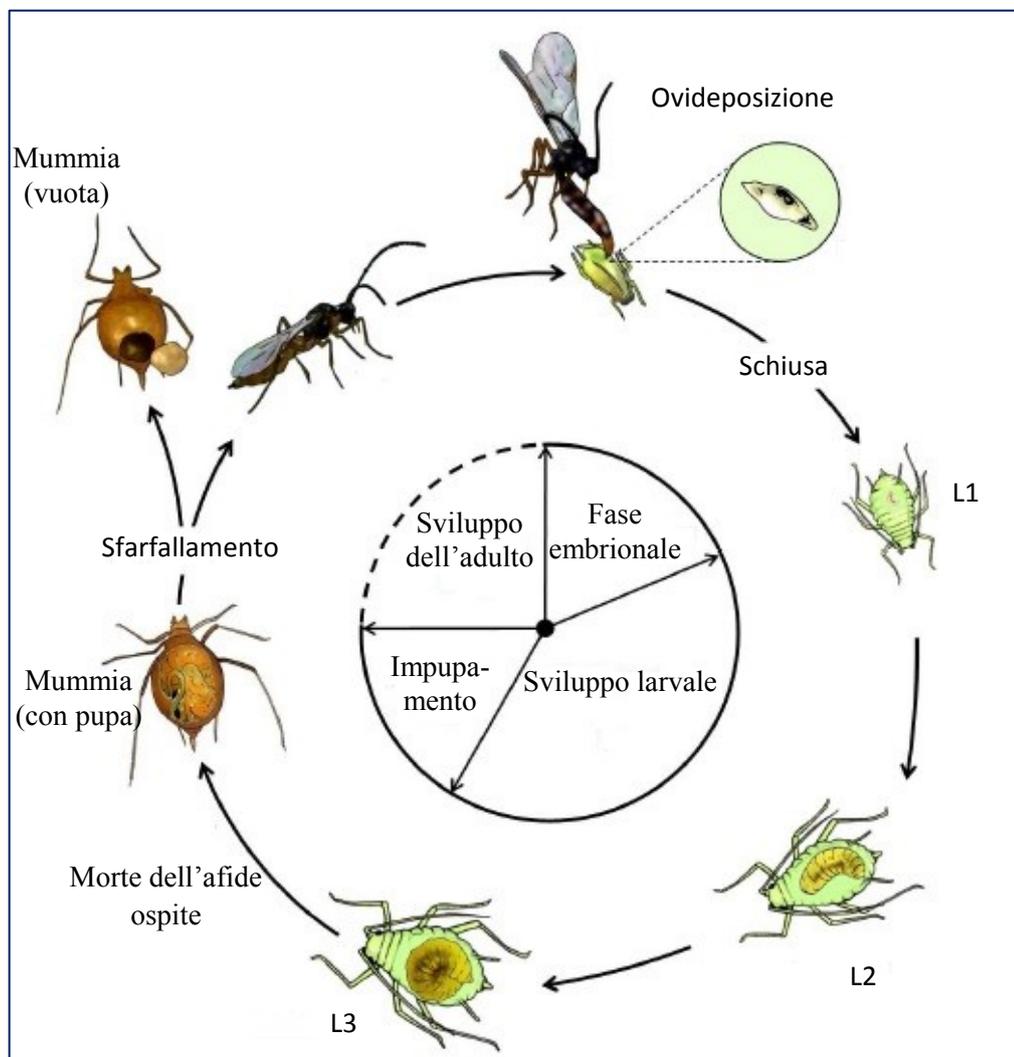


Figura 1.9. Ciclo biologico del sistema *Acyrthosiphon pisum*-*Aphidius ervi*

1.9.2 Alterazioni indotte nell'ospite dal veleno di *A. ervi*

In *A. ervi* il veleno costituisce il principale fattore di origine materna e fonte di fattori di regolazione dell'ospite. Alcune sue componenti sono in grado di indurre castrazione dell'ospite innescando apoptosi nelle cellule del germario degli ovaroli (Polaszek, 1986), senza causare alterazioni rilevabili in altri distretti tissutali (Digilio et al., 2000). Nella fattispecie, la componente responsabile di tali alterazioni risulta essere l'enzima γ -glutammina transpeptidasi, che interferendo nel ciclo del glutatione causa uno stress ossidativo (Falabella et al., 2007).

Questa forma di castrazione spiega l'assenza e/o ridotta attività riproduttiva negli ospiti parassitizzati, durante i vari stadi di sviluppo (He et al., 2005; Kring e Kring, 1988). Nella vittima, la differenziazione degli oociti risulta bloccata mentre continua la produzione di amminoacidi da parte dei batteri simbiotici che, accumulandosi nell'emolinfa, verranno utilizzati dai teratociti per la produzione di proteine, utili allo sviluppo del parassitoide (Falabella et al., 2000; Pennacchio et al., 2005; Tremblay et al., 1998).

Insieme alle alterazioni dei tessuti riproduttivi è stata osservata una ridotta concentrazione di ecdisteroidi nell'emolinfa di ospiti parassitizzati nel primo stadio di neanide (Pennacchio et al., 2005). Una delle principali cause è la degenerazione delle ghiandole protoraciche, deputate alla produzione di ecdisione (Johnson, 1965). Queste perturbazioni dei normali livelli ormonali sono compatibili con:

- l'arresto dello sviluppo dell'ospite, che in questo caso non supera il quarto stadio di neanide (He et al., 2005);

- la comparsa prematura di caratteri tipici dell'adulto, osservata in individui di quarta età (Johnson, 1965);

- la frequenza di deformazioni a carico delle ali in forme alate (maschi e virginopare) (Christiansen-Weniger e Hardie, 2000).

Secondo un'interessante ipotesi, lo status di "*impasse* endocrino", precedentemente descritto, potrebbe essere superato grazie all'azione vicariante degli embrioni maturi dell'afide che contribuirebbero alla produzione degli ecdisteroidi necessari al compimento dell'ultima muta (Hardie, 1987; Pennacchio et al., 2005). Ciò spiegherebbe perché gli afidi parassitizzati in I età, nei quali non avviene la produzione di embrioni, non riuscirebbero a superare la IV età: la castrazione potrebbe essere la causa dell'arresto dello sviluppo (Polaszek, 1986).

Emerge quindi un quadro plausibile che interpreta la strategia della "castrazione" in termini di ridirezionamento del flusso di nutrienti a vantaggio del parassitoide sottraendolo, in tal senso, al naturale impiego nel ciclo vitale dell'afide. Ciò è confermato dall'aumento delle concentrazioni di nutrienti nell'emolinfa dell'ospite (Pennacchio et al., 2005), nelle fasi finali dello sviluppo del parassitoide.

Studi funzionali sui teratociti hanno evidenziato, inoltre, la loro capacità di sintetizzare e rilasciare l'enzima enolasi, che, attraverso digestione extra-orale degli embrioni maturi dell'afide, aumenta la solubilità dei nutrienti rendendoli meglio fruibili dall'embrione del parassitoide in via di sviluppo (Falabella et al., 2009). La sinergica combinazione dell'attività enzimatica e del veleno, costituisce un

importante fattore di elusione del sistema immunitario dell'ospite contribuendo, ancora una volta, al reindirizzamento delle risorse metaboliche dell'ospite a favore dello sviluppo del parassitoide (Falabella et al., 2000; Pennacchio e Strand, 2006).

1.10 La gamma-glutammina transpeptidasi

Il glutathione (L- γ -glutammina-L-cisteinil-glicina, GSH) è un tripeptide che agisce, a livello intracellulare, come antiossidante consentendo il permanere delle proteine in forma ridotta ed espletando funzione protettiva nei confronti delle cellule eucariotiche. È, inoltre, utilizzato da diversi enzimi come cofattore in numerose reazioni di detossificazione di xenobiotici (Pompella et al., 2003).

Seguendo il proprio gradiente diffusivo, il GSH è trasportato all'esterno della cellula. I livelli intracellulari della proteina sono ristabiliti attraverso l'attivazione del "ciclo del glutathione" (Fig. 1.10), che vede direttamente coinvolta la γ -GT. La γ -GT catalizza la proteolisi della quota di GSH extracellulare nei suoi costituenti (glutammina, cisteinil-glicina) che, in questo modo, ulteriormente processati, verranno riassorbiti e recuperati per ripristinarne i valori funzionali a livello endocellulare (Meister, 1995).

La γ -GT, *Ae- γ -GT* in *A. ervi*, è la componente più abbondante e meglio caratterizzata del veleno (Falabella et al., 2007). Il gene è costituito da 6 esoni e 5 introni. Si esprime in maniera sesso e tessuto specifica, con livelli maggiori nelle femmine della specie. In *A. ervi* il gene codifica per una proteina di 541 amminoacidi e massa molecolare di 56,9 kDa.

L'enzima *Ae-γ-GT* è stato il primo fattore di regolazione individuato in *A. ervi* con effetti diretti sui tessuti riproduttivi degli afidi parassitizzati. In *A. ervi*, il meccanismo con cui questa proteina induce apoptosi negli ovaroli dell'ospite è mediato, presumibilmente, dall'alterazione del metabolismo del GSH con conseguente stress ossidativo (Falabella et al., 2007). Tuttavia, se e come ciò avviene resta ancora da dimostrare.

Si ipotizza che la *Ae-γ-GT* interferisca con l'attività enzimatica della γ -GT endogena dell'ospite, competendo per lo stesso substrato, alterando l'omeostasi del GSH. Ciò porterebbe all'abbassamento dei livelli intracellulari di GSH, esponendo la cellula bersaglio a stress ossidativo e attivazione dei meccanismi apoptotici (Falabella et al., 2007; Pennacchio e Mancini, 2012). Quantunque, questa sembrerebbe non essere l'unica ipotesi in grado di spiegare l'induzione di stress ossidativo ad opera della *Ae-γ-GT*. Infatti, secondo alcuni studi, gli stessi cataboliti del GSH potrebbero fungere da pro-ossidanti, ingenerando reazioni di ossidoriduzione che determinando la formazione di ROS (Reactive Oxygen Species) e radicali liberi, attiverrebbero *pathway* proliferativi e apoptotici inducendo risposte eterogenee nei diversi tipi cellulari (Dominici et al., 2005; Paolicchi et al., 2002).

Qualsiasi rottura del delicato bilancio del GSH, che controlla lo stato ossidativo dei microambienti intra- ed extracellulare, è suscettibile di causare significativi cambiamenti della proliferazione e della mortalità cellulare.

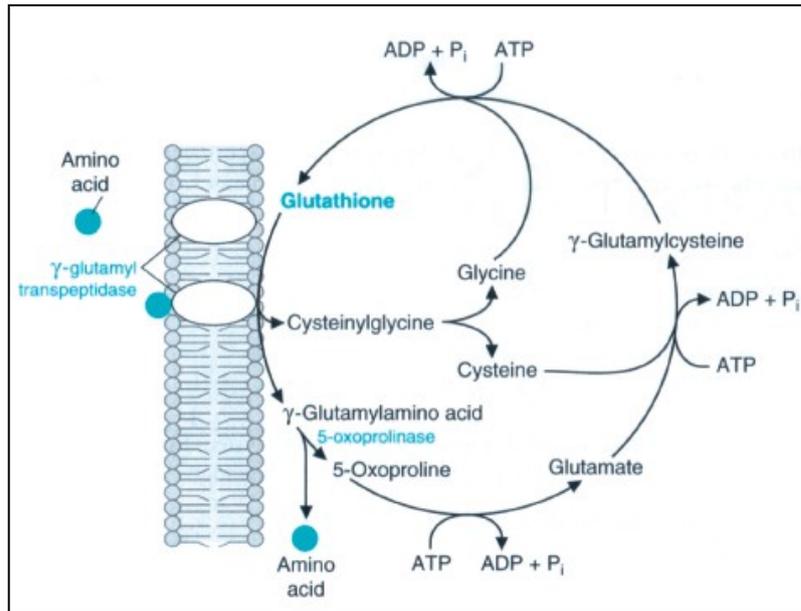


Figura 1.10. Ciclo del GSH e ruolo dell'enzima gamma-glutammina transpeptidasi (γ -GT).

1.11 Scopo della tesi

La grande biodiversità molecolare offerta dalle associazioni simbiotico/antagonistiche, discusse nell'introduzione della tesi, offre interessanti spunti per la ricerca e la caratterizzazione di nuove sostanze insetticide, sempre più difficili e costose da individuare con la sola chimica di sintesi, e di cui abbiamo crescente bisogno vista la continua diminuzione di principi attivi disponibili sul mercato.

Nel sistema ospite-parassitoide *A. pisum*-*A. ervi*, il veleno causa la castrazione dell'ospite attraverso l'induzione dell'apoptosi nelle cellule del germario degli ovaroli. Il fattore contenuto nel veleno responsabile di questo effetto è una gamma-glutammina transpeptidasi, denominata *Ae*- γ -GT. Questo lavoro di tesi mira ad una dettagliata definizione dei meccanismi molecolari, responsabili della castrazione parassitaria dell'afide *A. pisum*, sottesi all'attività della *Ae*- γ -GT. Scopo, inoltre, di questo lavoro di tesi è la messa a punto di un sistema

di espressione *in vitro* per la produzione di *Ae-γ-GT* ricombinante da utilizzare per saggi funzionali *in vivo* ed *in vitro*. Per meglio comprendere il meccanismo d'azione di quest'enzima si vuole inoltre silenziare il gene della *Ae-γ-GT* nelle femmine di *A. ervi* tramite la tecnica dell'RNA interference.

In definitiva, l'ampliamento delle conoscenze molecolari e la comprensione dei meccanismi d'azione dei fattori di virulenza nell'organismo bersaglio potranno fornire l'opportunità di sviluppare nuove tecniche di controllo basate sull'imitazione delle strategie naturali adottate da questa sorprendente categoria di entomofagi, i parassitoidi, per assoggettare e sopprimere i propri ospiti.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Allevamento degli insetti

Per gli studi effettuati in questo progetto di ricerca, sono stati allestiti due allevamenti, uno per l'afide *Acyrtosiphon pisum* (Harris) ed uno per l'endoparassitoide *Aphidius ervi* (Haliday).

Gli afidi sono stati allevati su piantine di fava (*Vicia faba* var major) in condizioni termoigrometriche controllate, in camera climatica a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, con umidità relativa (U.R.) del $70 \pm 5\%$ e regime fotoperiodico di 18 ore di luce/6 ore di buio (L18:D6). La riproduzione è avvenuta esclusivamente per partenogenesi telitoca (Digilio e Pennacchio, 1989).

Il parassitoide *A. ervi* è stato allevato su *A. pisum* a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ con U.R. al $70 \pm 5\%$ e con un fotoperiodo di L18:D6. Gli afidi e i parassitoidi sono stati allevati in camere climatiche separate.

Gli esperimenti, descritti in questo lavoro, sono stati effettuati su afidi il cui sviluppo è stato sincronizzato, mettendo degli adulti a partorire su piantine di fava per 12 ore, ottenendo così neanidi della stessa età.

Per avere parassitoidi della stessa età sono state effettuate delle esposizioni controllate: neanidi N2 e N3 di *A. pisum* (paragrafo 1.9), sono state messe a contatto con i parassitoidi per 12 ore. Per ogni 100 afidi è stata utilizzata una femmina di *A. ervi* per ridurre eventi di superparassitismo (Mackauer, 1983; Digilio e Pennacchio, 1989).

Inoltre, per ottenere il maggior numero di femmine possibile nella progenie, le femmine del parassitoide utilizzate per la ovideposizione sono state lasciate a contatto con i maschi per 6 ore per permettere l'accoppiamento.

2.2 Titolazione del glutathione (GSH)

Per verificare se l'esposizione alla *Ae-γ*-GT induca un decremento del glutathione (GSH) (paragrafo 1.10) nei tessuti dell'ospite, è stata misurata la sua concentrazione in diversi tessuti di afidi non parassitizzati e parassitizzati.

Alcuni afidi in N3 sono stati parassitizzati singolarmente e posti su fava nelle condizioni di allevamento del parassitoide. Il controllo negativo è rappresentato da afidi non parassitizzati messi nelle condizioni appena descritte.

Dopo 24 e 48 ore, gli afidi sono stati prelevati dalle piantine di fava, anestetizzati per immersione in etanolo al 70%, lavati in acqua sterile, asciugati su carta da filtro autoclavata e quindi dissezionati al microscopio binoculare. Ogni afide è stato posto su un vetrino portaoggetti e dissezionato in 5 μ L di PBS (Phosphate Buffered Saline). Un'aliquota di emolinfa (4 μ L in PBS) è stata raccolta con una pipetta.

L'emolinfa raccolta da 10 afidi è stata centrifugata per 10 minuti a $300 \times g$, a 4°C, per allontanare emociti ed altri tessuti. Il sopranatante (plasma) è stato trasferito in una eppendorf in cui è stata aggiunta una soluzione per l'estrazione dei tioli contenete HCl 0,1 M ed EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) 1mM.

Il pellet di emociti è stato omogenato con un pestello da eppendorf in 15 μ L di PBS, dopodiché è stata aggiunta la soluzione d'estrazione; successivamente la sospensione è stata centrifugata a $4500 \times g$, a 4°C, per 5 minuti ed il sopranatante è stato quindi trasferito in un'altra eppendorf tenuta in ghiaccio.

Le carcasse di afide sono state immerse in PBS, con l'ausilio di una micropinzetta sono stati prelevati gli ovari, posti in una provetta contenente 15 μL di PBS e trattati come il pellet di emociti. I campioni di plasma, emociti e ovari sono stati portati ad un volume finale di 50 μL con PBS.

Ogni prova biologica è stata ottenuta con i tessuti di 10 afidi e per ogni punto sperimentale sono state allestite tre prove biologiche. In parallelo sono stati preparati campioni di plasma, emociti e ovari da afidi non parassitizzati (controlli negativi). Inoltre, sono stati raccolti afidi non dissezionati a 24 e 48 ore (parassitizzati e non parassitizzati), anch'essi trattati secondo il protocollo appena descritto.

2.2.1 Riduzione e derivatizzazione dei campioni

La determinazione del contenuto del tiolo GSH è stata effettuata tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC: high performance liquid chromatography), dopo l'applicazione di un protocollo di derivatizzazione che prevede la marcatura dei gruppi tiolici con un molecola fluorescente (SBD-F) (4-Fluoro-7-Sulfobenzofurazan) (Masi et al., 2002).

I tioli detti anche mercaptani sono composti organici che contengono un gruppo $-\text{SH}$ (Fig. 2.1).

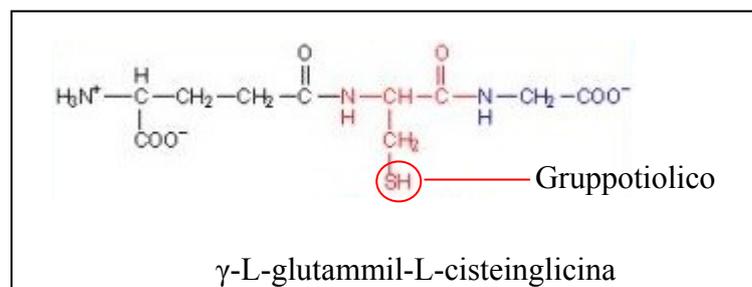


Fig. 2.1 Gruppo tiolico del glutatione.

In tubi eppendorf da 1,5 mL è stata preparata una miscela composta da 50 μ L di ogni campione, plasma, emociti, ovari di afidi e afidi non dissezionati (paragrafo 2.2), 117 μ L di buffer borato 1M (pH 10.5), 33 μ L di tributyl-fosfina (TBP) all'1% (v/v) e 33 μ L di SBD-F allo 0,3% (w/v). La TBP è un forte riducente in ambiente alcalino e determina la rottura dei ponti disolfuro del glutatione in soluzione: i gruppi -SH liberi saranno poi in grado di legarsi all'SBD-F dando prodotti fluorescenti.

La miscela ottenuta è stata incubata per 60 minuti in bagno termostato Dubnoff a 60°C e mantenuta in agitazione. Le provette sono state quindi trasferite in ghiaccio e dopo 2-3 minuti addizionate con HCl 4M al fine di bloccare la reazione di derivatizzazione e stabilizzare i coniugati fluorescenti.

2.2.2 Determinazione cromatografica della concentrazione del GSH

I campioni così derivatizzati (20 μ L) sono stati iniettati in un sistema HPLC (Beckman Coulter System Gold 126) ed i composti sono stati separati attraverso una colonna RP C18 (150 mm \times 4,6 mm, dimensione delle particelle 3 μ m: Luna, Phenomenex) utilizzando come fase mobile un buffer NH_4 -formiato 75 mM (pH 2.9) - metanolo (97:3). Il metodo prevede una eluizione isocratica con un flusso di 0,3 mL/minuto a temperatura ambiente.

I derivati fluorescenti sono stati rilevati con un fluorimetro Yasco 821 FP (λ_{ex} 386 nm; λ_{em} 516 nm) e identificati confrontando i tempi di ritenzione con quelli di composti standard. La misura della

concentrazione dei derivati fluorescenti del glutatione è stata ottenuta attraverso una curva di calibrazione.

2.2.3 Rette di taratura

La misura della concentrazione del glutatione prevede la calibrazione del sistema cromatografico utilizzando soluzioni di glutatione a titolo noto. Le diluizioni seriali di standard (da 25 a 125 μM) sono state prodotte a partire da soluzioni madri 50 μM in HCl 0,1 M.

Le diluizioni (50 μL) sono state sottoposte agli stessi trattamenti dei campioni (derivatizzazione e separazione in HPLC). I risultati ottenuti da queste analisi sono stati utilizzati per l'allestimento di una retta di taratura.

2.3 Livello trascrizionale della due *Ae- γ -GT* nelle ghiandole del veleno di *A. ervi*

2.3.1 Condizioni di allevamento

Le mummie di afide (paragrafo 1.9.1), ottenute da un'esposizione controllata di afidi ad *A. ervi*, sono state raccolte e poste singolarmente in tubi di plastica chiusi con cotone idrofilo. Gli adulti del parassitoide sono stati alimentati con acqua e miele.

Sono state raccolte femmine del parassitoide a 0 ore (femmine presenti ancora nella mummia a 24 ore dallo sfarfallamento), 4 ore, 24 ore e 48 ore dallo sfarfallamento. Per ogni tempo di campionamento

sono state effettuate due prove biologiche, ognuna costituita da 10 femmine. Ogni insetto è stato dissezionato, dopo essere stato anestetizzato con l'anidride carbonica, per estrarre le ghiandole del veleno dal resto del corpo.

2.3.2 Estrazione dell'RNA totale

Per estrarre l'RNA totale, i campioni (ghiandole e resto del corpo) sono stati posti in provette contenenti 20 μ L di TRIzol (Ambion) e sono stati omogenati con micropestelli. L'RNA totale comprende una popolazione molto eterogenea di RNA. Gli RNA non codificanti (costituiti per l'80-85 % da RNA ribosomiali (28S, 18S, 5S) e per il resto da tRNA e altri piccoli RNA) rappresentano circa il 96% dell'RNA totale estratto e quelli codificanti (mRNA) solo il 4%.

Successivamente sono stati aggiunti altri 180 μ L di TRIzol e i campioni sono stati centrifugati a $10000 \times g$, per 10 minuti a 4°C per rimuovere eventuale materiale insolubile. Il soprannatante è stato quindi trasferito in un'altra eppendorf e lasciato 5 minuti a temperatura ambiente. La purificazione dell'RNA totale è stata effettuata seguendo le indicazioni della casa produttrice del TRIzol. L'RNA purificato è stato risospeso in acqua-DEPC (acqua con dietilpirocarbonato, un potente inibitore delle RNasi).

La concentrazione di RNA totale è stata misurata allo spettrofotometro (BioPhotometer, Eppendorf) alla lunghezza d'onda di 260 nm ed inoltre sono stati controllati i rapporti 260/280 e 260/230, per verificare eventuali contaminazioni da proteine o da TRIzol. Mediante elettroforesi su gel di agarosio (allo 0,8% di agarosio (w/v) in Tris Borato EDTA (TBE: Tris HCl 89 mM, acido

borico 89 mM, EDTA 2 mM) si è controllato che l'RNA totale non fosse degradato.

2.3.3 Disegno dei primer

Per misurare il livello trascrizionale della *Ae-γ-GT1* e della *Ae-γ-GT2*, nelle ghiandole del veleno e nel resto del corpo di femmine del parassitoide *A. ervi*, è stata utilizzata la tecnica della qRT-PCR (Real Time quantitative-Reverse Transcription PCR).

La misura dell'espressione genica delle due *Ae-γ-GT* è avvenuta mediante un'analisi quantitativa relativa utilizzando come gene *endogeno* l'RNA ribosomiale 28S di *A. ervi* (subunità beta 2). Questo gene è attivamente trascritto e tradotto in maniera costante in tutti i tessuti. L'elaborazione dei dati è avvenuta mediante il metodo $\Delta\Delta C_t$ che prevedeva la normalizzazione dei risultati in relazione al gene *endogeno*.

Le coppie di primer, utilizzate nelle reazioni di qRT-PCR, sono state disegnate con il software Primer Express, versione 1.0 (PE Applied Biosystems) e sono elencate nella tabella 2.1.

Nome	Sequenza 5' → 3'
<i>Ae-γ</i> -GT1 F 132 pb	CATTATCATCAATGGCTCCTTCA
<i>Ae-γ</i> -GT1 R 132 pb	GTTTCGACCACAAGTATCTAGCA
<i>Ae-γ</i> -GT2 F 125pb	CTCCTGTTCCCTCCAATAACAAC
<i>Ae-γ</i> -GT2 R 125 pb	CTGGAGGCGAAGAAACTCAAGAT
28Sb2 F	GCTCAGCGAGGACAGAAAC
28Sb2 R	TCGATAGGCCGTGTTTCGC

Tabella 2.1. Primer utilizzati nella qRT-PCR per misurare il livello trascrizionale delle due *Ae-γ*-GT.

2.3.4 RT-PCR quantitativa

Le reazioni di qRT-PCR sono state condotte con il sistema StepOne™ Real Time PCR utilizzando il Green RT-PCR secondo il protocollo consigliato dal produttore (PE Applied Biosystems).

Il fluorocromo SYBR Green I (reagente SYBR), quando viene aggiunto ad un campione, si lega a tutti i DNA a doppia elica. Durante la PCR, la DNA polimerasi AmpliTaq Gold^R amplifica il target, creando il prodotto della PCR, o “amplicone”, il fluorocromo quindi si lega ad ogni nuova copia di DNA a doppia elica. Con il progredire della PCR, viene creata una maggiore quantità di amplicone. Poiché il fluorocromo SYBR Green si lega a tutto il DNA a doppia elica, si

ottiene un aumento di intensità della fluorescenza proporzionale alla quantità di prodotto della PCR a doppia elica che viene prodotto.

Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 20 μL , e l'esatta composizione della miscela è riportata in tabella 2.2.

Reagente	Volume	Conc. finale
RT-PCR mix 2X	10 μL	1X
Primer forward 10 μM	0,6 μL	300 nM
Primer reverse 10 μM	0,6 μL	300 nM
RT-enzyme mix 125X	0,16 μL	1X
Acqua	8,64 μL	
RNA totale	1 μL	4 ng/ μL

Tabella 2.2. Reagenti utilizzati nella reazione di qRT-PCR.

Il ciclo termico adottato è riportato in tabella 2.3.

Fase	Cicli	Temperatura	Tempo
Retrotrascrizione	1	48°C	30 min
	1	95°C	10 min
Amplificazione	40	95°C	15 sec
		60°C	1 min
Curva di Melting	1	95°C	15 sec
		60°C	1 min
		95 °C	15 sec

Tabella 2.3. Ciclo termico della qRT-PCR.

Per ogni campione sono state effettuate tre reazioni di qPCR per valutare:

- il livello trascrizionale dell'allele *Ae-γ-GT1*,
- il livello trascrizionale dell'allele *Ae-γ-GT2*,
- il livello trascrizionale del gene 28Sβ2.

2.3.5 Metodo ΔΔCT

Per la quantificazione relativa è stato utilizzato il metodo ΔΔCT, che prevede una normalizzazione dei valori di Ct¹(Cycle threshold) dei target con quelli dell'endogeno, utilizzando la seguente formula: ΔCT = Ct (*Ae-γ-GT1* o *Ae-γ-GT2*) - Ct (28Sβ2).

Utilizzando la formula: ΔΔCT = ΔCT (target) - ΔCT (calibratore) e la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), è stato possibile calcolare l'espressione relativa di *Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2*.

2.4 Analisi del livello trascrizionale delle due *Ae-γ-GT* in presenza ed assenza dell'ospite

Femmine vergini di *A. ervi* sono state messe a contatto con gli afidi (100 *A. pisum* per ogni parassitoide) per 24 ore o 48 ore, e sono state alimentate con acqua e miele.

Ogni femmina di parassitoide è stata posta in una piastra Petri, contenente gli afidi, forata al centro e chiusa con una reticella per permettere il passaggio dell'aria (Fig. 2.2); i controlli negativi sono stati ottenuti ponendo le femmine in piastra Petri senza la presenza di

¹ Numero del ciclo (o frazione di questo) in cui la curva di amplificazione del campione in fase esponenziale taglia la linea-soglia.

afidi. Il campione al tempo zero è rappresentato da femmine sfarfallate entro 12 ore.



Figura 2.2. Piastra Petri modificata per permettere il passaggio dell'aria.

Le piastre sono state successivamente poste in una cella climatica, nelle stesse condizioni di allevamento del parassitoide. L'RNA totale estratto dalle ghiandole del veleno (paragrafo 2.3.2) è stato utilizzato per effettuare reazioni di qRT-PCR per determinare il livello trascrizionale delle due proteine *Ae- γ -GT*. I risultati ottenuti sono stati normalizzati con il gene *endogeno* 28S β 2, utilizzando il metodo $\Delta\Delta$ Ct (paragrafo 2.3.5).

2.5 Produzione delle molecole di dsRNA *Ae- γ -GT1* e dsRNA *Ae- γ -GT2*

2.5.1 Reazione di retrotrascrizione (RT)

Dalle ghiandole del veleno di *A.ervi* sono state estratte le molecole di RNA totale che abbiamo utilizzato nella reazione di

retrotrascrizione. Incubando il suddetto RNA con l'enzima trascrittasi inversa insieme a deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), soluzione tampone e ioni bivalenti Mg^{2+} è possibile, in presenza della sequenza complementare oligo (dT), dare il via alla formazione di un filamento di cDNA (DNA copia o complementare).

L'innesco o primer della reazione è l'oligo dT, una catena di circa venti residui di timina che si appaia alla coda di poliA⁺ presenti nelle molecole dell'RNA messaggero, permettendo così la loro retrotrascrizione.

La miscela di reazione è stata preparata utilizzando il kit di retro trascrizione, RETROscript^R (Invitrogen), seguendo le indicazioni della casa produttrice. L'RNA è stato prima denaturato con il calore per eliminare le strutture secondarie. La miscela, con la composizione riportata in tabella 2.4, è stata incubata a 85°C per 3 minuti, posta in ghiaccio e poi centrifugata per qualche secondo.

Reagente	Volume
RNA totale 200 ng/ μ L	5 μ L
Oligo dT 50 mM	2 μ L
Acqua	5 μ L

Tabella 2.4. Reagenti utilizzati nella reazione di denaturazione dell'RNA totale.

Sono stati poi aggiunti altri reagenti come riportato in tabella 2.5.

Reagente	Volume
RT buffer 10X	2 μ L
dNTP mix (2,5 mM ogni dNTP)	4 μ L
RNase Inhibitor(10 units/ μ L)	1 μ L
MMLV-RT (100 units/ μ L)	1 μ L

Tabella 2.5. Reagenti aggiunti nella reazione di retro trascrizione.

La miscela è stata quindi incubata a 42°C, per 1 ora. L'enzima è stato poi disattivato ponendo la miscela di reazione a 92°C per 10 minuti e poi in ghiaccio per qualche secondo.

2.5.2 Amplificazione del cDNA (PCR)

I cDNA ottenuti dalla reazione di retrotrascrizione sono stati utilizzati come stampo per amplificare, attraverso reazioni di PCR, le nostre sequenze di interesse. Gli oligonucleotidi utilizzati per l'annealing sono riportati in tabella 2.6. E' stato amplificato un frammento di 567 pb per l'*Ae- γ -GT1* e di 936 pb per l'*Ae- γ -GT2*.

	Nome primer	Sequenza 5'→ 3'
<i>Ae-γ-GT1</i>	<i>Ae-γ-GT1 F</i> 567 pb	GTTGATGTAGATGTTCAAGA
	<i>Ae-γ-GT1 R</i> 567 pb	ATTGGATCCTTGAACACTT
<i>Ae-γ-GT2</i>	<i>Ae-γ-GT2 F</i> 936 pb	ACAACTTCCACTAGATGA
	<i>Ae-γ-GT2 R</i> 936 pb	TTGGACCAGT TACTGTTGGAG

Tabella 2.6. Coppie di primer utilizzati nell'amplificazione del cDNA.

La reazione è stata effettuata in duplicato per ogni coppia di primer e con un controllo negativo (in cui è stato aggiunto 1 μ L di acqua anziché di cDNA). La taq polimerasi utilizzata nella reazione di amplificazione è una DNA polimerasi ad alta affinità, con attività esonucleasica 3'-5' (Phusion, Invitrogen). La miscela di reazione è stata preparata seguendo il protocollo della casa produttrice (Invitrogen) ed è stato utilizzato un termociclatore, secondo il programma riportato in tabella 2.7.

Fase	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	98°C	30 sec
Amplificazione 30 cicli	98°C	10 sec
	59°C	30 sec
	72°C	30 min
Estensione finale	72°C	5 min
Mantenimento	4°C	

Tabella 2.7. Condizioni della reazione di amplificazione del cDNA

Gli amplificati sono stati caricati su un gel di agarosio (allo 0,8% di agarosio (w/v) in TBE) insieme ad un marker contenente frammenti di DNA di lunghezza nota per identificare la lunghezza degli amplificati.

2.5.3 PCR con primer con estremità T7

I frammenti ottenuti dall'amplificazione del cDNA sono stati utilizzati come template nella reazione di PCR con primer che

presentavano alla loro estremità la sequenza del primer T7 (5'_TAATACGACTCACTATAGGGAG_3').

In questa reazione sono stati ottenuti dei frammenti di cDNA di circa 400 pb aventi alle estremità la sequenza del primer T7, a cui si lega l'enzima che catalizza la trascrizione *in vitro* delle molecole del dsRNA.

Le coppie di primer utilizzate sono descritte nella tabella 2.8.

	Nome primer	Sequenza 5 → 3'
<i>Ae-γ-GT1</i>	ds <i>Ae-γ-GT1</i> T7F	TAATACGACTCACTATAGGGAG GGTGTTCAGTGAATCAACT
	ds <i>Ae-γ-GT1</i> T7R	TAATACGACTCACTATAGGGAG AGCACAAATGGCACTGGTGA
<i>Ae-γ-GT2</i>	ds <i>Ae-γ-GT2</i> T7F	TAATACGACTCACTATAGGGAG CCGACTATGAAGCTGAATGG
	ds <i>Ae-γ-GT2</i> T7R	TAATACGACTCACTATAGGGAG ACTGATACTTGAGCTGTTCC

Tabella 2.8. Coppie di primer utilizzati nell'amplificazione del cDNA, in grassetto la sequenza dell'oligoT7.

Sono state assemblate 4 reazioni di PCR per ogni template (*Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2*), per ottenere una quantità maggiore di amplificato da utilizzare nella trascrizione *in vitro* delle molecole di dsRNA. Sono state utilizzate le stesse condizioni descritte nella precedente amplificazione, ad eccezione per la temperatura di appaiamento che è stata impostata a 70°C.

Utilizzando una corsa elettroforetica su gel d'agarosio (allo 0,8% di agarosio (w/v) in TBE) è stata valutata la presenza di bande della lunghezza attesa. In particolare è stato ottenuto un amplificato di 430 pb per l'*Ae-γ-GT1* e uno di 447 pb per l'*Ae-γ-GT2*, mostrati in figura 2.3 (in grassetto la sequenza dell'oligoT7).

>Amplificato *Ae-γ-GT1-T7* (430 pb)

TAATACGACTCACTATAGGGAGGGTGTTGTCAGTGAATCAACTGTATTATATTAA
 ACAGTGCATTGAGTGATTTTTACCAAATCAAAGCCAATGAAATTGCACCAA
 TAAAAGACCATTATCATCAATGGCTCCTTCAATTATTGTTGATTCAAATGACAA
 GTCAAGTTGGTTATTGGAGCAACTGGAGGAGCTAAAATAACAACAGCTGTTTCAT
 CAGTACTTGCTAGATACTTGTGGTCGAAACAAGGACTTAAAGAAGCTGTTGATGC
 ACCAAGATTGCATCAAGAAATCTTCCCATGGAACCTTCTTATGAAGAATCAAGT
 GATGTCATCACACAACCTAAAGAAGTTTATAAACATAATACTGTTGAAATGAAAG
 GAATCACCAGTGCCATTTGTGCT**CTCCCTATAGTGAGTCGTATTA**

>Amplificato *Ae-γ-GT2-T7* (447 pb)

TAATACGACTCACTATAGGGAGCCGACTATGAAGCTGAATGGCTTGAACCACTTT
 CAATAAACTATCAAATGATTTAACACTACATACGTCAAGTGTACCAAGTAGCGG
 TGGACTCTTGACACTTATAATGAATATTCTCAATGAATTTAATTTTACTCCAAAC
 AGTTTAAATGGTACTGATAATACATCATTGACATATCACAAAATAATGGAATCAT
 TTAAATGGTCATTTCCACAAAATACAAACCTAGGAGATTCTAAATTTTCCAAAA
 AATATTAGATTTATTGGTCAATGAATTTACTTCAAAGATTATGCAAAATCTATA
 AAGAAAAAATTAATGAAAAAAAACATCAAACAAAGAAAGTGATTATGGTGGTA
 AAGAATCAGTTGAAGATCAAGGAACAGCTCAAGTATCAGT**CTCCCTATAGTGAGT
 CGTATTA**

Figura 2.3. Amplificati *Ae-γ-GT1-T7* e *Ae-γ-GT2-T7*, in grassetto la sequenza dell'oligoT7.

I campioni di cDNA sono stati sottoposti a precipitazione aggiungendo sodio acetato ottenendo una concentrazione finale di 300 mM e 3 volumi di etanolo 100%. I campioni sono stati congelati a -20°C per 12 ore e poi centrifugati a 4°C per 15 minuti a $15000 \times g$. Sono stati aggiunti 500 μL di etanolo al 75% (v/v) al pellet e si è quindi centrifugato nelle stesse condizioni. Il sopranatante è stato

eliminato e l'etanolo residuo è stato fatto evaporare a temperatura ambiente. Il pellet è stato risospeso in acqua.

2.5.4 Trascrizione *in vitro* delle molecole di dsRNA

La reazione di trascrizione *in vitro* è stata effettuata utilizzando il kit MEGAscript RNAi (Ambion). La miscela è stata preparata secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice (Tab. 2.9) e incubata a 37°C per 12 ore. L'enzima è stato poi disattivato a 75°C per 5 minuti.

Reagente	Quantità
DNA stampo (250 ng/μL)	8 μL
10X T7 reaction buffer	2 μL
ATP	2 μL
CTP	2 μL
GTP	2 μL
UTP	2 μL
T7 polimerase mix	2 μL

Tabella 2.9. Reagenti nella reazione di trascrizione *in vitro* del dsRNA.

Successivamente la miscela è stata trattata con gli enzimi DNase I e *single-strand* RNase, per degradare il template di DNA ed eventuali ssRNA non appaiati. La reazione di digestione è stata allestita come riportato nella tabella 2.10 ed incubata a 37°C per 1 ora.

Reagente	Quantità
dsRNA	20 μ L
10X Digestion Buffer	5 μ L
DNase I	2 μ L
<i>Single-strand</i> RNase	2 μ L
Acqua	21 μ L

Tabella 2.10. Reagenti utilizzati nella reazione di digestione del DNA e dei ssRNA.

Per purificare il dsRNA è stata preparata la miscela illustrata nella seguente tabella (Tab. 2.11).

Reagente	Quantità
dsRNA	50 μ L
10X Binding Buffer	50 μ L
Etanolo 100%	250 μ L
Acqua	150 μ L

Tabella 2.11. Reagenti utilizzati nella reazione di purificazione del dsRNA.

La miscela è stata caricata nelle colonnine “Filter Cartridge”, centrifugata a $14000 \times g$ per 2 minuti. Il dsRNA viene trattenuto nelle colonne mentre l’eluito è stato allontanato. Sono stati aggiunti nelle colonnine 500 μ L di una soluzione di lavaggio e poi nuovamente centrifugate a $14000 \times g$ per 2 minuti. Il lavaggio è stato ripetuto due volte e quindi il dsRNA è stato eluito utilizzando 100 μ L di una soluzione di eluizione fornita dal kit (Tris-HCl 10 mM pH 7, EDTA 1mM). L’eluito è stato incubato a 65°C per 2 minuti e centrifugato a $14000 \times g$ per 2 minuti.

La concentrazione del dsRNA è stata determinata mediante lettura allo spettrofotometro (260 nm) ed inoltre sono stati controllati i rapporti 260/280 e 260/230. La presenza di frammenti della lunghezza attesa è stata valutata con una corsa elettroforetica su gel d'agarosio (agarosio allo 0,8% (w/v) in TBE).

2.6 Somministrazione del dsRNA attraverso microiniezioni nella pupa di *A. ervi*

Per questa prova sono state scelte pupe del parassitoide (ottavo giorno dall'ovideposizione) ottenute sincronizzando il loro sviluppo attraverso esposizioni controllate di afidi N2 (paragrafo 2.1).

Alle pupe sono stati iniettati 50 nL di una soluzione contenente dsRNA 0,4 ng/nL in PBS 1,7X.

Le mummie degli afidi sono state poste su un vetrino portaoggetti e sono state aperte con degli aghi da dissezione per isolare la pupa del parassitoide. La soluzione contenente dsRNA è stata somministrata nella parte dorsale del torace della pupa (Fig. 2.4), con la strumentazione descritta nel paragrafo 2.6. Sono state iniettate 30 pupe per ogni trattamento (dsRNA controllo o dsRNA *Ae-γ-GT1*).

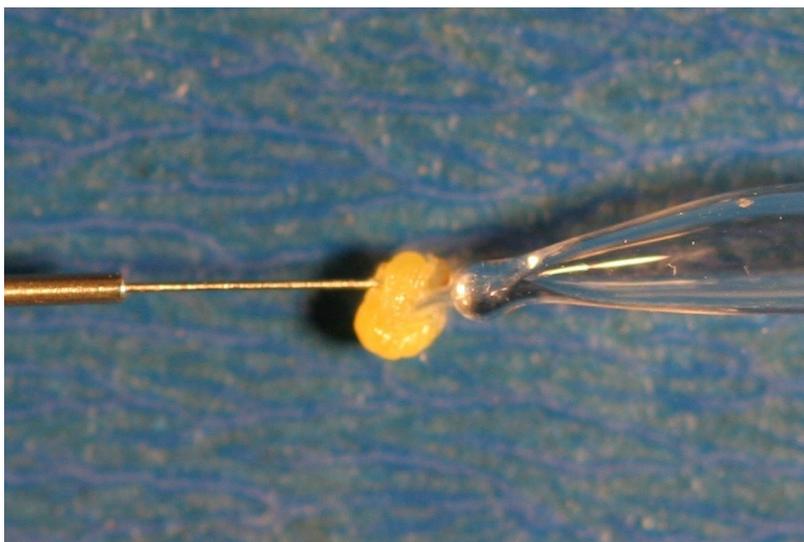


Figura 2.4. Iniezione di dsRNA nel torace della pupa di *A. ervi*.

Ogni pupa è stata poi messa in un pozzetto, di una multiwell da 48 pozzetti, chiuso con cotone idrofilo imbevuto con acqua per garantire il mantenimento delle condizioni di umidità. La piastra è stata mantenuta nelle condizioni di allevamento del parassitoide fino al completamento dello sviluppo nell'adulto.

L'RNA totale è stato estratto dalle ghiandole del veleno delle femmine sviluppatesi dalle pupe iniettate ed è stato utilizzato per valutare il livello trascrizionale della *Ae- γ -GT1* nel parassitoide tramite reazioni di qPCR (paragrafi 2.3.2 e 2.3.4).

2.7 Somministrazione del dsRNA alle larve di *A. ervi* attraverso microiniezioni nell'ospite

Le femmine del parassitoide sono utilizzate per parassitizzare singolarmente afidi N2. Gli afidi sono stati messi su pianta (*Vicia faba*) ed allevati nelle condizioni stabilite per il parassitoide.

Dopo 4 giorni dalla parassitizzazione gli afidi contenenti il parassitoide al primo giorno della L3 sono stati iniettati con 50 nL di una soluzione contenente dsRNA 1 ng/nL in PBS 1,7X.

Per poter effettuare le iniezioni è stato utilizzato il microiniettore UltraMicroPump III (World Precision Instruments, WPI) controllato dalla pompa Micro4 Controller (WPI). L'iniezione è stata effettuata con una siringa Nanofil da 10 μ L (WPI) collegata tramite l'Intra Ocular injection kit (WPI) ad un microago, con diametro esterno di 110 μ m e diametro interno di 35 μ m (WPI).

Gli afidi anestizzati con CO₂ sono stati disposti su un vetrino portaoggetti ed è stato loro iniettato il dsRNA (*Ae- γ -GT1* e controllo) nella coxa di una zampa posteriore (Fig. 2.5).

Dopo l'iniezione gli afidi sono stati posti su piante di fava fino allo sviluppo delle mummie, queste sono state poi messe singolarmente in provette di plastica chiuse da cotone idrofilo e lasciate in camera climatica nelle condizioni di allevamento del parassitoide.



Figura 2.5. Iniezione di dsRNA nella zampa posteriore di *A. pisum*.

Sono stati raccolti gli adulti di *A. ervi* sfarfallati dalle mummie e le femmine sono state anestetizzate con l'anidride carbonica e dissezionate al microscopio ottico con l'ausilio di micropinzette. Dalle ghiandole del veleno prelevate è stato estratto l'RNA totale ed è stata valutata l'espressione relativa della variante allelica *Ae-γ-GT1* mediante qPCR (paragrafi 2.3.2 e 2.3.4) utilizzando i primer specifici (Tab. 2.12).

Nome primer	Sequenza 5' → 3'
<i>Ae-γ-GT1</i> F 119 pb	ATCAAAGGCTGGTGTCAATTCA
<i>Ae-γ-GT1</i> R 119 pb	AGTTCAATTGTTGGTTCGAACA

Tabella 2.12. Coppia di primer utilizzata nelle reazioni di pPCR negli esperimenti di RNAi.

2.8 Somministrazione del dsRNA alle larve di *A. ervi* attraverso l'alimentazione dell'ospite

Larve in L3 del parassitoide (quarto giorno dall'ovideposizione) sono state allevate come descritto nel paragrafo precedente.

Gli afidi contenenti larve di *A. ervi* in L3 sono stati alimentati con una dieta artificiale liquida per 24 ore nelle condizioni di allevamento del parassitoide. La dieta artificiale conteneva saccarosio, IPL 41 Insect Media (Sigma) e dsRNA (*Ae-γ-GT1* o controllo), la composizione della dieta è descritta di seguito (Tab. 2.13 e Tab. 2.14).

Componente	Quantità	Conc. finale
dsRNA 1238 ng/μL	30,3 μL	750 ng/μL
Saccarosio 1,5 M	14,7 μL	15%
IPL-41	5 μL	10%

Tabella 2.13. Componenti della dieta artificiale contenente dsRNA controllo.

Componente	Quantità	Conc. finale
dsRNA 1238 ng/μL	30,3 μL	750 ng/μL
Saccarosio 1,5 M	14,7 μL	15%
IPL-41	5 μL	10%

Tabella 2.14. Componenti della dieta artificiale contenente dsRNA *Ae-γ-GT1*.

La dieta (50 μL) è stata messa in un camera d'aria ottenuta da due fogli di Parafilm ed utilizzando una piastra Petri (diametro di 5,5 cm) è stata creata una camera di alimentazione (Fig. 2.6).

In ogni camera sono stati posti 11 afidi e la somministrazione è stata effettuata in triplicato per entrambi i trattamenti.



Figura 2.6. Camera di alimentazione. Base della piastra Petri (1); strato superiore di Parafilm (2); dieta artificiale (3); strato inferiore di Parafilm (4); coperchio della piastra Petri (5).

Dopo 24 ore gli afidi sono stati messi su piantine di fava fino allo sviluppo delle mummie. Le mummie sono state raccolte come descritto nel paragrafo precedente, le femmine adulte sfarfallate sono state dissezionate e da esse sono state prelevate le ghiandole del veleno.

L'RNA totale è stato estratto dai campioni iniettati ed utilizzato per valutare il livello trascrizionale della *Ae-γ-GT1* nel parassitoide tramite reazioni di qPCR (paragrafi 2.3.2 e 2.3.4).

2.9 Le proteine ricombinanti *Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2*

Le due forme native della proteina *Ae-γ-GT* presenti nelle ghiandole del veleno delle femmine del parassitoide *A. ervi*, sono costituite da 541 amminoacidi (*Ae-γ-GT1*) e da 570 amminoacidi (*Ae-γ-GT2*). Le proteine ricombinanti *Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2*, prodotte in questo lavoro di tesi, sono invece costituite rispettivamente da 550 amminoacidi (Fig. 2.7) e da 579 amminoacidi (Fig. 2.8).

La regione N-terminale in entrambe le proteine ricombinanti presenta un peptide, il tag FLAG formato da 8 amminoacidi (DYKDDDDK). Questo octapeptide è necessario per il processo di purificazione della proteina tramite cromatografia di affinità e per il riconoscimento da parte di anticorpi specifici in esperimenti di Western blot. Il tag FLAG è preceduto da una metionina, amminoacido ottenuto dalla traduzione del codone (ATG) necessario alla sua traduzione.



Figura 2.7. Sequenza e rappresentazione schematica della FLAG-*Ae- γ -GT1*.

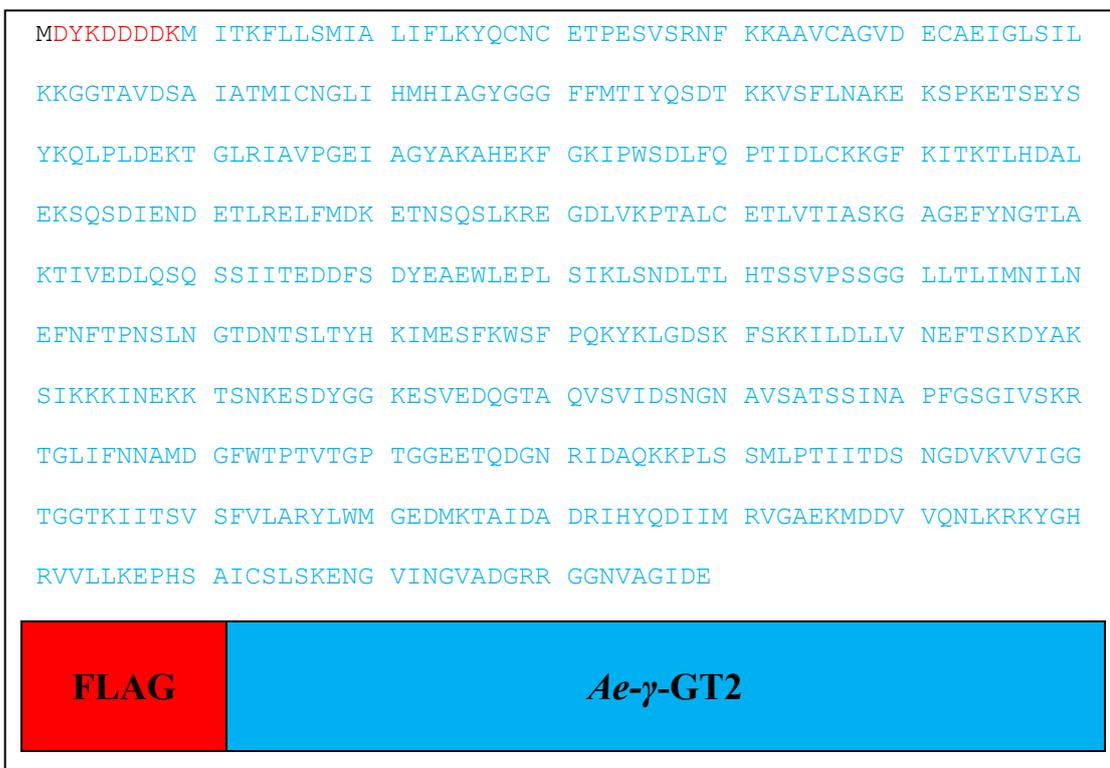


Figura 2.8. Sequenza e rappresentazione schematica della FLAG-*Ae- γ -GT2*.

2.10 Clonaggio – RF cloning

Per clonare i cDNA di nostro interesse (*Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2*) in un vettore d'espressione è stata utilizzata una tecnica di clonaggio che non necessita di enzimi di restrizione, l'RF-cloning (Restriction Free cloning) (Fig. 2.9). A differenza del clonaggio convenzionale, in cui l'efficienza è correlata all'attività enzimatica, l'RF-cloning è ispirato alla mutagenesi sito-diretta, che permette di inserire interi geni in maniera sito-specifica all'interno del vettore senza introdurre altri residui (Van den Ent e Lowe, 2006; Tamar Unger et al, 2010).

I cDNA sono stati prima amplificati tramite una reazione di PCR con due oligonucleotidi specifici opportunamente scelti sulla sequenza del cDNA e del vettore (prima amplificazione). Il prodotto di questa reazione è stato purificato (paragrafo 2.10.4) ed usato come “*megaprimer*” in una seconda reazione di amplificazione lineare, dove funge da lungo innesco a singolo filamento, parzialmente complementare al vettore. La DNA polimerasi ad alta fedeltà amplifica in entrambe le direzioni, formando una molecola ibrida di DNA a doppio filamento.

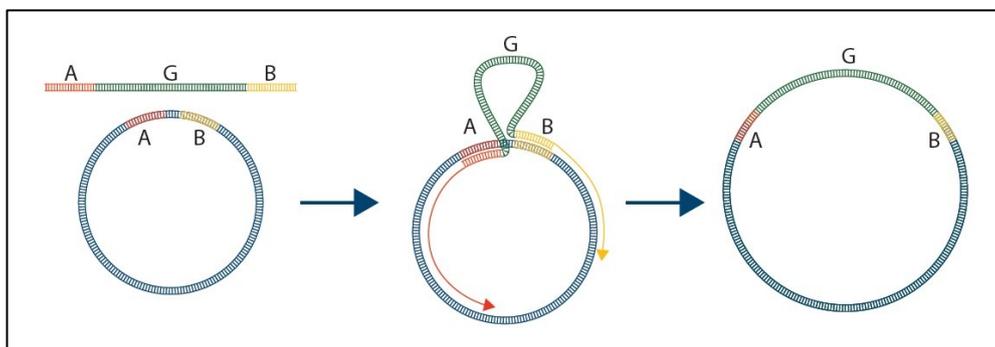


Figura 2.9. Rappresentazione schematica dell' RF-cloning.

2.10.1 Scelta dei cloni dalla cDNA library

I cloni contenenti il cDNA d'interesse sono stati selezionati da una libreria di cDNA costituita da frammenti di DNA complementare, ottenuti dal RNA messaggero (mRNA) (ottenuto dall'RNA totale estratto dalle ghiandole del veleno di femmine di *A. ervi*) ad opera della trascrittasi inversa (RT).

Utilizzando degli oligo dT in reazioni di trascrizione inversa (RT) sono state ottenute delle copie complementari (cDNA) dei soli mRNA (paragrafo 2.5.1). I cDNA ottenuti dalle reazioni di RT sono stati inseriti nel plasmide pDNR-LIB (Fig. 2.10) utilizzando il KIT Creator SMART cDNA Library Construction Kit (BD Biosciences) (Falabella et al, 2007) ottenendo una genoteca (cDNA library) delle ghiandole del veleno di femmine di *A. ervi*.

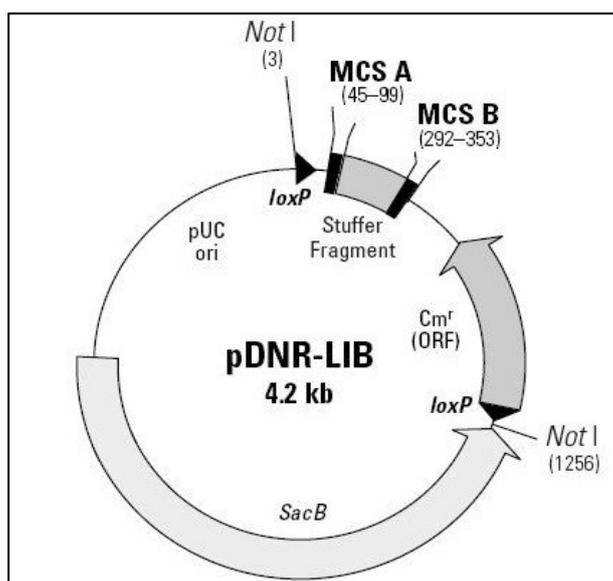


Figura 2.10. Mappa del vettore pDNR-LIB.

Dall'analisi bioinformatica delle sequenze di tutti i cloni della library le sequenze proteiche più rappresentate avevano un'alta identità di sequenza con gli enzimi γ -GT. Sono stati quindi selezionati un clone *Ae- γ -GT1* (Fig. 2.11) ed un clone *Ae- γ -GT2* (Fig. 2.12).

>Ae- γ -GT1 1850 pb

```
ACAAACAAATCTTCAGTCTTCAAAGTATTAATTTCTGAATTTGAAAAGCAAAAACAACGT
TATTATTCTCGAAAATGTTTTTCGAAATATATACTGACAACAACAGTTGCATTGGTATTGT
TAAAATACCAATGTTACTCTGCAGATCCAAGTGTCTCTGCTCAATTTAAAAAATCAGCAG
TTTGTGCTGGTGCAAACAAGTGTGCTGAAATTTGGATCATCAACTTTGAATAATGGAGGTT
CAGCAGTTGATGCTGCAATAGCAACAATGATCTGCAACAATTTGGTTACCCACATTTGG
CTGGTTATGGAGGTGGATTTTTTCATGACAGTTTATGATCGAGCAAATAAAAATGTTGACT
TTTTAAATGCTAGAGAAAAGCACCAGGTGATATTTCAAAGCATCAAAGACTGGTGTC
ATTCAATTGCTGTTCCCTGGTGAAATTGCTGGTTATGGAGTTGCTCATAAAAAATATGGTA
AATTATCATGGGAAAAATTGTTTCGAACCAACAATTGAACTCTGTGAAAGTGGATATCAAA
TATCAAAGCACTTGCAAAGCTATTGCTTCATCAGCTGATACTATCAAACAAGATGACA
CTTTAACGGCATTATATACAAATGGTGGTGCTTTGAAAAAGAAGGTGACACTGTAAATC
CAGGTAAACTTTGTGATACATTGAAAACAATTGCATCAGGAGGTGCTGATGAATTTTACA
AGGGTGATCTTGCTTCAAGTATCATTGGTGATTTAAGTAAAAAATCAAGTGCATTGACAA
AAGATGATTTGTCAAGTTACACAGCTAAATGGGCAAGTCCATTGAAAACAACATTGTTAA
ATGATTTAACATTATACACAGCAAATGCACCAGGTGGTGGAGCTCCTCTTGCACTTGCTT
TAAATATTATTGATGAATATGGAAACGATTTGGTAAGCTCTGATGCAGCATTGAACTTC
ACCGACTTTCTGAAATATGGAAATACTCTGTAGCAGCAAAAAGCAAATGGGGTGATCCTG
ATGTTAGCTCACTTGATGAGTTATTGAAAACAATAACTTCTGATGCATATGCAAAAAGAAA
TTAAGTCAAAAATTAATGATAAAGAAACATCACATGAAGCAAGTCATTATGGTGTGATG
TAGATGTTCAAGATGAAGGTACAGCTCAAGTATCAATTATTGATGCTGATGGTAATGCTG
TATCAGCAACAAGCAGTCTTAATGGAGTATTTGGTAGTGGTGTGTCAGTGAATCAACTG
GTATTATATTAACAGTGCATTGAGTGATTTTTCCACAAAATCAAAGCCAATGAAATTG
CACCAAATAAAAGACCATTATCATCAATGGCTCCTTCAATTATTGTTGATTCAAATGACA
ATGTCAAGTTGGTTATTGGAGCAACTGGAGGAGCTAAAATAACAACAGCTGTTTCATCAG
TACTTGCTAGATACTTGTGGTCGAAACAAGGACTTAAAGAAGCTGTTGATGCACCAAGAT
TGCATCAAGAAATCTTCCCATGGAACCTTCTTATGAAGAATCAAGTGATGTCATCACAC
AACTTAAAGAAGTTTATAAACATAATACTGTTGAAATGAAAGGAATCACCAGTGCCATTT
GTGCTTTGTCAAGAGAAGGTGATAGTATCCTTGGTGTGCTGATGGACGTAGAGGTGGAA
GTGTTCAAGGATCCAATTAATCCATCAACACATATCACTACTGGCTTATTTATAAATGAA
TTTGGCTAATTTTTGATGGATTGAATATGATTAACACATTTTAATATCACTTAATAATAC
TTTATAATTTGCACTTTATCATGAAGACTCTAGTCTTCATGTTTATTATG
```

Figura 2.11. Sequenza nucleotidica del clone *Ae- γ -GT1*. In verde la sequenza codificante (CDS) (GenBank: AM411396).

> *Ae-γ-GT2* 1963 pb

```
AGTTTAATTTTTTCATATACCTTCAGTCGTCCTCAAACCTTCATTTCCGATTCAACGTGAAT
TTAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAACATTTAAATTATTTTTTTAAAAATGATTACGAAA
TTTCTATTGTCAATGATTGCATTGATATTTTTTAAAATATCAATGTAATTGTGAAACTCCA
GAAAGTGTATCTCGTAATTTTTAAAAAAGCAGCAGTTTTCGCTGGTGTAGATGAATGCGCA
GAAATTGGATTATCAATTTTTAAAAAAGGAGGAACAGCAGTTGATTTCAGCAATAGCAACA
ATGATTTGTAATGGTTTAATTCACATGCATATAGCAGGATATGGTGGTGGATTTTTTCATG
ACAATTTATCAAAGTGATACTAAAAAAGTATCATTTTTTAAATGCCAAAGAAAAATCACCA
AAAGAAACATCAGAATATTCATATAAACAACCTTCCACTAGATGAAAAAATGGTCTTCGC
ATTGCAGTACCTGGTGAATTTGCTGGTTATGCTAAAGCTCATGAAAAATTTGGTAAAATT
CCATGGTCTGATTTATTTTCAGCCAACAATTGATCTTTGTAAAAAAGGATTTAAAATAACA
AAAACATTGCATGATGCTCTTGAAAAATCACAAAGTGACATAGAAAATGATGAAACATTTG
AGAGAATTATTTATGGATAAAAGAAACAAATAGTCAGTCGTTAAAACGAGAAGGAGACTTG
GTAAAACCAACAGCACTTTGTGAGACACTCGTTACAATTGCATCAAAGGTGCAGGTGAA
TTTTATAATGGTACACTTGCTAAAACAATCGTTGAAGATTTACAAAGTCAATCAAGTATC
ATAACAGAAGATGATTTTTCCGACTATGAAGCTGAATGGCTTGAACCACTTTCAATAAAA
CTATCAAATGATTTAACTACATACGTCAAGTGTACCAAGTAGCGGTGGACTCTTGACA
CTTATAATGAATATTCTCAATGAATTTAATTTTACTCCAACAGTTTAAATGGTACTGAT
AATACATCATTGACATATCACAAAATAATGGAATCATTTAAATGGTCATTTCCACAAAAA
TACAACTAGGAGATTCTAAATTTTCCAAAAAATATTAGATTTATTGGTCAATGAATTT
ACTTCAAAGATTATGCAAAATCTATAAAGAAAAAATTAATGAAAAAAAACATCAAAC
AAAGAAAGTGATTATGGTGGTAAAGAATCAGTTGAAGATCAAGGAACAGCTCAAGTATCA
GTTATAGATTCAAATGGTAATGCTGTTTTCGGCAACAAGTAGTATTAACGCTCCCTTTGGA
AGTGGTATTGTTAGTAAGCGTACTGGTCTTATTTTTAACAATGCAATGGATGGTTTTTTGG
ACTCCAACAGTAACTGGTCCAACCTGGAGGCGAAGAACTCAAGATGGTAATAGAATTGAT
GCTCAAAAAAACCATTGTCATCAATGCTTCCAACAATTATAACTGATTCAAATGGAGAT
GTTAAAGTTGTTATTGGAGGAACAGGAGGAACGAAAATAATAACATCTGTTTCATTTGTG
CTTGCTAGATATTTGTGGATGGGAGAGGATATGAAAACAGCTATTGATGCAGATAGAATT
CATTATCAAGATATTATTATGAGAGTTGGTGTGAAAAAATGGACGATGTCGTTCAAAT
CTGAAGAGAAAAATATGGTCATAGAGTCGTTCTTTTGAAAGAACCACACAGTGCTATTTGC
AGTCTATCAAAGGAAAAATGGTGTATCAATGGTGTGCTGATGGTTCGTAGAGGAGGAAAT
GTTGCTGGTATTGATGAATAAAATTTTGTGTTATATAACTTATTCATAAAAATTAAT
TCTTGTAATGATTGATAAATCATTTATTTTTTAACTTATTAACCTTAATATTGTTGAT
GTAATCATATAAAAAATAAACTAAAAAATTAACCTATTTAG
```

Figura 2.12. Sequenza nucleotidica del clone *Ae-γ-GT2*. In verde la sequenza codificante (CDS).

2.10.2 Disegno dei primer

I primer sono stati disegnati per ottenere frammenti di cDNA, aventi all'estremità una sequenza complementare al plasmide pACEBac1, necessaria per il loro clonaggio nel vettore (Tab. 2.15). In particolare il primer forward ha 24 basi complementari al 5' del vettore, un sito EcoRI di 6 pb per *Ae-γ-GT1* ed un sito BamHI per *Ae-γ-GT2*, un codone di start (ATG), un tag FLAG di 24 pb e 25 basi di sequenza specifica al 5' del gene. Il primer reverse si lega al vettore con 24 pb complementari al 3', seguite da un sito Hind III di 6 pb e 25 pb al 3' del gene contenenti il codone di stop.

Nome	Sequenza 5'→3'
<i>Ae-γ-GT1</i> F	GCGGATCCCGGTCCGAAGCGCGCGGAATTCATG GACTACAAAGACGATGACGATAAAATGTTTTTCG AAATATATACTGACAA
<i>Ae-γ-GT1</i> R	TATGATCCTCTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTA ATTGGATCCTTGAACACTTCCA
<i>Ae-γ-GT2</i> F	TCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCCATG GACTACAAAGACGATGACGATAAAATGATTACG AAATTTCTATTGTCAA
<i>Ae-γ-GT2</i> R	TATGATCCTCTAGTACTTCTCGACAAGCTTTTA ATTGGATCCTTGAACACTTCCA

Tabella 2.15. Coppie di primer utilizzati nell'RF cloning. In verde la sequenza codificante (CDS) del clone.

2.10.3 Prima amplificazione

L'amplificazione è stata condotta con una polimerasi Taq Phusion DNA (Phusion High-Fidelity DNA Polimerase, Thermo Scientific F-530S), ad alta fedeltà e processività, con attività esonucleasica 3'-5'. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume finale di 50 µL, assemblate come riportato nella seguente tabella (Tab. 2.16).

Reagente	Volume	Conc. finale
Phusion Buffer 5X	10 μ L	1X
dNTPs 10 mM	2 μ L	400 μ M
Primer forward 10 μ M	1 μ L	0,2 μ M
Primer reverse 10 μ M	1 μ L	0,2 μ M
Taq Phusion DNA polimerase 2 U/ μ L	0,5 μ L	0,02 U/ μ L
Acqua distillata	34,5 μ L	
Templato di DNA 1 μ g/ μ L	1 μ L	200 ng/ μ L

Tabella 2.16. Composizione della miscela della prima reazione di amplificazione.

Sono state preparate 3 reazioni ed un controllo negativo (contenente 1 μ L di acqua anziché di templato) per ogni clone di *Ae- γ -GT*. La reazione è stata amplificata, utilizzando un termociclatore, secondo il programma riportato nella tabella 2.17.

Fase	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	98°C	30 sec
Amplificazione 29 cicli	98°C	30 sec
	55°C	1 min
	72°C	3 min
Mantenimento	4°C	

Tabella 2.17. Condizioni della prima reazione di amplificazione.

2.10.4 Purificazione del prodotto di prima amplificazione (PCR Long Template)

I prodotti di amplificazione della PCR sono stati caricati su gel d'agarosio (allo 0,8% (w/v) in TBE) ed è stata effettuata una corsa elettroforetica per valutare la presenza delle bande della lunghezza

attesa. Le bande di interesse sono state visualizzate ponendo il gel su un transilluminatore a luce ultravioletta ed isolate tagliando il pezzo di gel che le conteneva con l'aiuto di un bisturi.

Per recuperare gli amplificati dalle bande di gel è stato utilizzato il kit PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. La loro concentrazione è stata determinata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 260 nm.

2.10.5 Clonaggio delle due forme di γ -GT nel vettore d'espressione pACEBac1

I frammenti recuperati dal gel sono stati sottoposti ad una seconda amplificazione lineare in presenza del vettore accettore pACEBac1 (Fig. 2.13).

Il plasmide pACEBac1 (2904 pb) contiene siti di clonaggio multipli (MCS) che a monte presentano il promotore forte della poliedrina (polh) e a valle la sequenza terminale di poliA (SV40). Questo modulo permette l'integrazione di cassette multiple di geni (ORFs e regioni regolatorie associate) ma nel nostro caso è stato inserito un solo cDNA. La sequenza Tn7 usata per la trasposizione, compresa tra Tn7L e Tn7R, include i siti di clonaggio multipli (MCS) ed il gene per la resistenza alla gentamicina.

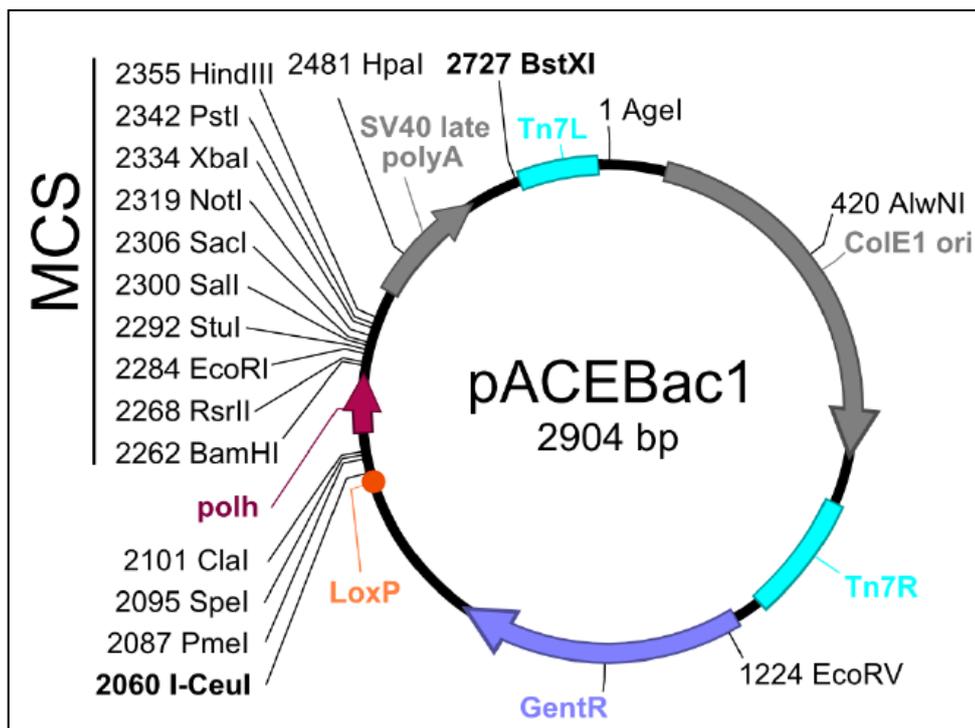


Figura 2.13. Mappa del vettore pACEBac1.

Le miscele di amplificazione sono state preparate come riportato qui di seguito (Tab. 2.18).

Reagente	Volume	Conc. finale
Phusion Buffer 5X	10 μ L	1X
dNTPs 10 Mm	2 μ L	400 μ M
Vettore pACEBac1 50 ng/ μ L	1 μ L	1 ng/ μ L
Taq Phusion DNA polim. 2 U/ μ L	0,5 μ L	0,02 U/ μ L
Acqua (Milli-Q)	6,5 μ L	
DNA template 10 ng/ μ L	30 μ L	6 ng/ μ L

Tabella 2.18. Reagenti utilizzati nella reazione di seconda amplificazione.

Sono state allestite due reazioni per ogni prodotto di prima amplificazione, per ottenere una maggiore quantità di prodotto da utilizzare per la trasformazione dei batteri.

La reazione è stata amplificata, utilizzando un termociclatore, secondo il programma indicato in tabella 2.19.

Fase	Temperatura	Tempo
Denaturazione iniziale	95°C	30 sec
Amplificazione 34 cicli	95°C	30 sec
	60°C	1 min
	72°C	10 min
Mantenimento	4°C	

Tabella 2.19. Condizioni della seconda amplificazione.

2.10.6 Digestione del prodotto di clonaggio e trasformazione batterica

I prodotti della seconda amplificazione sono stati trattati con l'enzima Dpn1 (Invitrogen) allo scopo di digerire i plasmidi senza inserto. Questo enzima taglia la sequenza GmATC (A è metilata) presente nel vettore pACEBac1 ottenuto da una coltura di *Escherichia coli* e non da una reazione di PCR.

I prodotti di seconda amplificazione sono stati digeriti con l'enzima di restrizione DpnI. La reazione di digestione (Tab. 2.20) è avvenuta a 37°C per un'ora e terminata tramite disattivazione dell'enzima a 75°C per 15 minuti.

Reagente	Volume	Conc. finale
Buffer DNA 10X	2,5 μ L	1X
Dpn1 10 U/ μ L	1 μ L	0,4 U/ μ L
Acqua (Milli-Q)	1,5 μ L	
DNA templato (Long template)	20 μ L	1ng/ μ L

Tabella 2.20. Composizione della reazione di digestione con l'enzima DpnI.

Un'aliquota di 25 μ L è stata utilizzata per la trasformazione delle cellule competenti, 50 μ L di One Shot®TOP 10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). La miscela di trasformazione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti ed in seguito sottoposta a shock termico per 30 secondi a 42°C e poi lasciata in ghiaccio per qualche minuto.

Alle cellule così trasformate, sono stati aggiunti 250 μ L di terreno di crescita, SOC medium (Super Optimal Broth con l'aggiunta di glucosio 20 mM) (Invitrogen). La coltura è stata lasciata in agitazione a 200 rpm per 1 ora a 37°C. Successivamente, le cellule sono state piastrate su terreno LB (Luria Bertani Broth) Agar a cui è stato aggiunto l'antibiotico gentamicina (7 μ g/mL), ed incubate 12 ore a 37°C. La presenza di gentamicina ha permesso la crescita selettiva solo delle cellule trasformate.

Nelle piastre seminate con le colture batteriche sono cresciute centinaia di colonie dei batteri contenenti i plasmidi con gli inserti delle due forme. Sono stati preparati diversi inoculi, trasferendo singole colonie in tubi contenenti 5 mL di LB con gentamicina (7 μ g/mL) e sono stati lasciati in agitazione 12 ore a 37°C.

2.10.7 Purificazione del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico delle colture batteriche è stato purificato con il kit Perfect Prep Spin Mini (5 PRIME) secondo il protocollo descritto dall'azienda produttrice.

Il pellet di DNA plasmidico ottenuto è stato risospeso in 50 μL del buffer d'eluizione fornito nel kit (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5).

2.10.8 Digestione dei cloni positivi con l'enzima BamH1

Un'aliquota di DNA plasmidico è stata linearizzata con l'enzima di restrizione BamH1 (Sigma). La composizione della miscela di digestione è riportata in tabella 2.21.

Componente	Volume	Conc. finale
Buffer 10X	1,5 μL	1X
BamH1 10 U/ μL	1 μL	0,6 U/ μL
Acqua distillata	11 μL	
DNA plasmidico 60 ng/ μL	2 μL	4 ng/ μL

Tabella 2.21. Componenti utilizzate nella digestione enzimatica con BamH1.

La miscela di digestione è stata incubata per due ore a 37°C, l'enzima è stato poi disattivato a 60°C per 15 minuti.

Nei cloni positivi *Ae- γ -GT2* è presente un solo sito di taglio enzimatico nel vettore pACEBac1, invece nei cloni *Ae- γ -GT1* l'enzima taglia, oltre che nel vettore, anche nell'inserto producendo così due frammenti.

2.10.9 Sequenziamento dei cloni

I cloni contenenti l'inserto delle dimensioni attese sono stati sequenziati presso la Primm Biotech, utilizzando varie coppie di primer per permettere il completo sequenziamento dell'inserto e della parte del vettore necessaria per la trasposizione (paragrafo 2.12.1). Le coppie di primer utilizzate sono indicate nella tabella 2.22.

	Nome primer	Sequenza 5 → 3'
Cloni <i>Ae-γ</i>-GT1	Tn7R	CACAGCATAACTGGACTGATT
	Tn7L	ATTTGCTTACGACGCTACACC
	pACEBac1 F	CGCGACCTACTCCGGAAT
	pACEBac1 R	AACCACAACCTAGAATGCAGTG
	<i>Ae-γ</i> -GT1 F 124 pb	TCATGACAGTTTATGATCGAG
	<i>Ae-γ</i> -GT1 R 132 pb	GTTTCGACCACAAGTATCTAGCA
Cloni <i>Ae-γ</i>-GT2	Tn7R	CACAGCATAACTGGACTGATT
	Tn7L	ATTTGCTTACGACGCTACACC
	pACEBac1 F	CGCGACCTACTCCGGAAT
	pACEBac1 R	AACCACAACCTAGAATGCAGTG
	<i>Ae-γ</i> -GT2 F 936 pb	ACAACCTCCACTAGATGA
	<i>Ae-γ</i> -GT2 R 741 pb	TGGACCAGTTACTGTTGGAG

Tabella 2.22. Primer utilizzati per il sequenziamento dei cloni.

Le sequenze sono analizzate con il software Chromas, allo scopo di verificare che le sequenze nucleotidiche corrispondessero a quelle delle due forme di *Ae-γ-GT*.

2.11 Produzione dei bacmidi ricombinanti

2.11.1 Trasformazione di cellule DH10Bac

I plasmidi ricombinanti (Recombinat Donor Plasmid) sono stati inseriti in cellule competenti *E.coli* DH10Bac, contenenti il bacmide MultiBac^{Turbo} (Fig. 2.14).

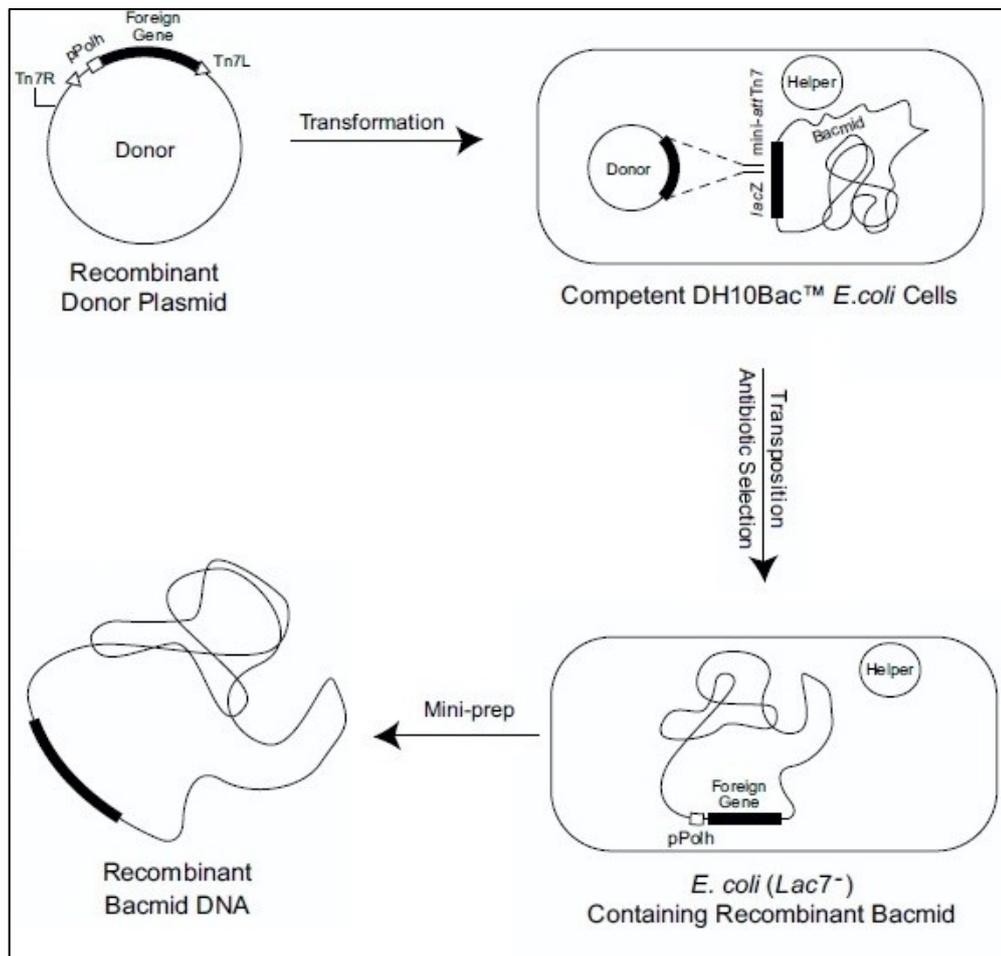


Figura 2.14. Schema della produzione dei bacmidi ricombinanti.

Il vettore di trasferimento MultiBac^{Turbo}, presente nelle cellule elettrocompetenti DH10Bac, è un bacmide contenente il replicone F, il marker di resistenza alla kanamicina ed un segmento di DNA che codifica per il peptide *lacZα*. Il gene *lacZα* codifica per un'enzima capace di utilizzare il substrato cromogenico X-gal e dare una colorazione blu. All'estremità N-terminale di *lacZα* è presente il sito mini-*attTn7*, a cui l'elemento trasponibile Tn7 del plasmide pACEBac1 si lega, con l'ausilio di una trasposasi codificata dal plasmide helper.

Questo plasmide conferisce alle cellule batteriche DH10Bac resistenza alla tetraciclina. L'espressione di due geni, *v-Cath* e *Chia*, codificanti rispettivamente una cistein-proteasi ed una chitinasi, è stata interrotta per ridurre la lisi cellulare durante l'infezione e la produzione della proteina (Fig. 2.15).

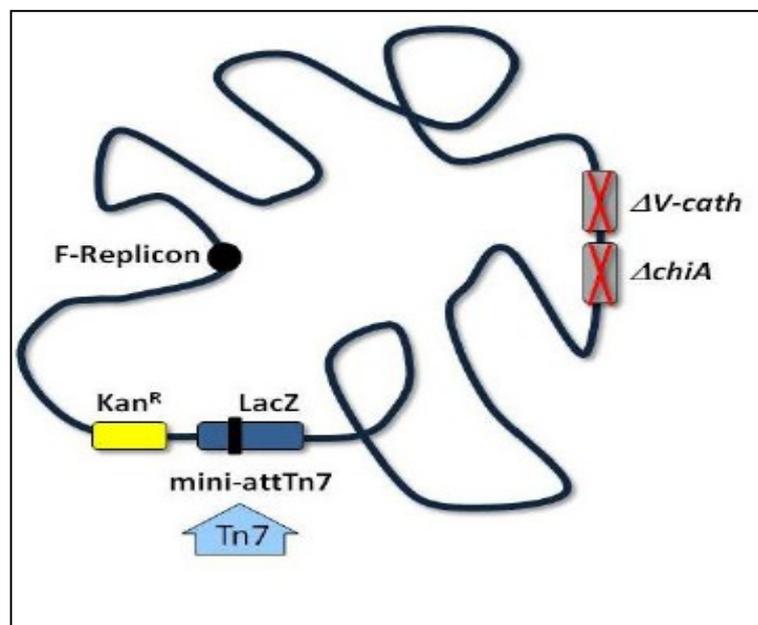


Figura 2.15. Vettore di trasferimento MultiBac^{Turbo}.

Per la trasformazione, 5 μL di plasmidi ricombinanti (Recombinat Donor Plasmid) sono stati aggiunti a 100 μL di cellule competenti DH10Bac. Le cellule sono state incubate per 30 minuti in ghiaccio e successivamente è stato indotto uno shock termico, tenendo la miscela a 42°C per 45 secondi e raffreddando rapidamente in ghiaccio per 2 minuti.

Alle cellule DH10Bac, così trasformate, sono stati aggiunti 900 μL di SOC medium e lasciate in incubazione a 37°C, per 4 ore, in agitazione (225 rpm). In presenza di terreno con antibiotici selettivi, le uniche cellule batteriche in grado di crescere sono quelle in cui la trasformazione è avvenuta.

Sono stati piastrati 100 μL di diverse diluizioni (1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v), utilizzando il terreno liquido SOC medium, per un volume finale di 1 mL) su terreno LB Agar contenente kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gentamicina (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), il substrato cromogenico X-gal (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e l'induttore IPTG (isopropiltiogalattoside) (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Quest'ultimo lega il repressore *lac* batterico e consente l'espressione del frammento clonato nel vettore.

Le piastre sono state poste in termostato per 24 ore a 37°C. Le colonie bianche, cresciute su tale terreno, possiedono il bacmide ricombinante, in quanto l'integrazione al Multibac del pACEBac1 ricombinante, silenzia il gene *lacZ α* .

2.11.2 Purificazione dei bacmidi ricombinanti

Le colonie bianche, contenenti il bacmide ricombinante, sono state inoculate in 5 mL di LB contenente kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$),

gentamicina (7 µg/ml) e tetraciclina (10 µg/ml). Le colture sono state poste a 37°C per 12 ore, in agitazione (225 rpm). Dopo l'incubazione, si è proceduto alla purificazione dei bacmidi a partire da 1,5 mL di coltura batterica.

La sospensione batterica è stata centrifugata a $14000 \times g$ per 1 minuto ed il pellet è stato risospeso in 100 µL di soluzione I (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) e 200 µL di soluzione II (0,2 M NaOH, 1% (w/v) sodio dodecil solfato, SDS) per lisare le cellule batteriche. La sospensione è stata quindi lasciata in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti.

In seguito alla lisi, ad ogni campione sono stati aggiunti 150 µL di soluzione III (acetato di potassio 3M, acido acetico glaciale 11,5% v/v) e quindi sono stati lasciati in ghiaccio per 10 minuti e poi centrifugati per 10 minuti a $14000 \times g$. Il DNA plasmidico (bacmide ricombinate) è stato precipitato con 800 µL di isopropanolo in ghiaccio per 10 minuti. Si è quindi centrifugato a 4°C, per 15 minuti a $14000 \times g$.

Il pellet, contenente i bacmidi ricombinanti, è stato lavato con 500 µL di etanolo al 70% (v/v) e centrifugato per 5 minuti a $14000 \times g$, il pellet così ottenuto è stato lasciato asciugare all'aria per 10 minuti e poi risospeso in 40 µL di buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) (da MANIATIS, Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

2.12 Prove di espressione delle proteine ricombinanti

2.12.1 Produzione dei baculovirus ricombinanti

Prima di produrre le proteine ricombinanti *Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2* su larga scala, è stata effettuata una prova di espressione su piccola scala per ottimizzare il protocollo di espressione e produzione delle proteine. Le proteine sono state prodotte in cellule d'insetto Sf9 (linea cellulare derivante dagli ovari del lepidottero *Spodoptera frugiperda*, Invitrogen) infettate con baculovirus ricombinanti seguendo il protocollo fornito dal produttore (BaculoDirect™ Baculovirus Expression System, Invitrogen).

I baculovirus ricombinanti sono stati ottenuti facendo reagire i bacmidi ricombinanti con il BaculoDirect™ Linear DNA (Invitrogen) in presenza dell'enzima LR Clonase^RI DNA (Invitrogen) (Fig. 2.16).

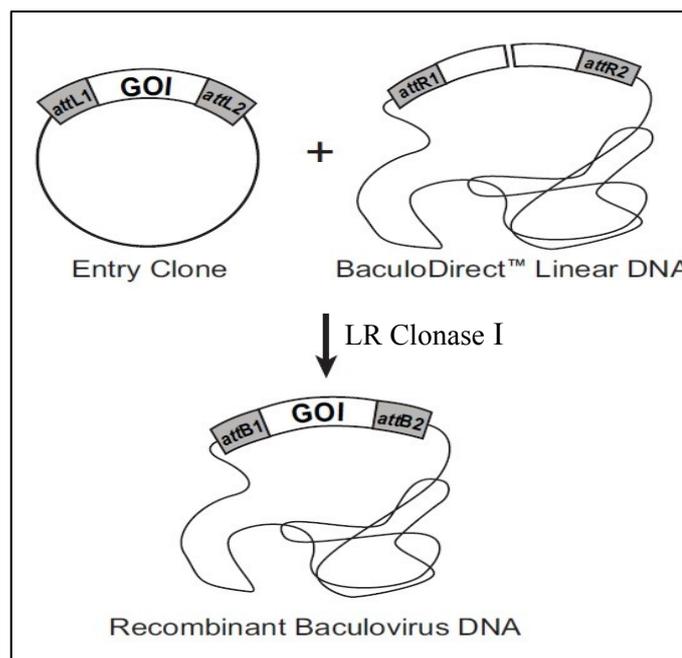


Figura 2.16. Produzione di baculovirus ricombinante.

Per ogni tipologia di bacmide ricombinante (*Ae-γ*-GT1 e *Ae-γ*-GT2) è stata allestita una reazione di ricombinazione i cui componenti sono indicati in tabella 2.23. La reazione di ricombinazione (LR) è stata fatta avvenire a 25°C per 1 ora.

Componente	Volume
Buffer TE pH 8	5 µL
LR Clonase ^R II DNA Mix	4µL
BaculoDirect TM Linear DNA (30 ng/uL)	10 µL
Bacmidi ricombinanti (100 ng/uL)	1 µL

Tabella 2.23. Composizione della reazione per la produzione di baculovirus ricombinanti.

2.12.2 Trasfezione cellulare

I baculovirus ricombinanti sono stati utilizzati per infettare le cellule Sf9. La linea cellulare Sf9 è stata cresciuta in terreno Sf-900TMIIISFM (Gibco), in presenza di antibiotici (gentamicina 10 µg/mL ed amfotericina 0,25 µg/mL), a 27°C ed ottimizzata per ottenere una coltura in crescita esponenziale ($1,5-2,5 \times 10^6$ cellule/mL) con vitalità del 95%.

Per la trasfezione, le cellule sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti, ad una concentrazione di 8×10^5 cellule/pozzetto. La piastra è stata lasciata 15 minuti a temperatura ambiente per permettere l'adesione delle cellule al fondo dei pozzetti.

Il terreno è stato poi allontanato e sostituito con 2 mL di terreno Grace's Insect Medium privo di Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) senza antibiotici.

Successivamente sono state preparate due soluzioni (A e B), ognuna per ogni tipo di baculovirus ricombinante (Tab. 2.24).

	Componente	Volume
Soluzione A	Grace's Insect Medium privo di FBS	100 μ L
	Cellfectin ^R II Reagent (Invitrogen, 12562-062)	8 μ L
Soluzione B	Grace's Insect Medium privo di FBS	100 μ L
	Reazione di ricombinazione LR (<i>Ae-γ-GT1</i> o <i>Ae-γ-GT2</i>)	10 μ L

Tabella 2.24. Composizione delle soluzioni A e B.

Le due soluzioni sono state preparate separatamente come indicato dal kit, sono state poi unite e la soluzione ottenuta è stata incubata a temperatura ambiente per 35 minuti. E' stata poi aggiunta, goccia a goccia, nei pozzetti contenenti cellule Sf9 che poi sono state incubate a 27°C per 5 ore. Trascorso il periodo di incubazione è stato sostituito il mezzo con 2 mL di mezzo di crescita completo (Grace's Insect Medium con FBS al 5% (v/v)) a cui è stato aggiunto ganciclovir ad una concentrazione finale di 100 μ M, un antivirale che inibisce la replicazione dei virus non ricombinanti. Le piastre sono state quindi trasferite a 27°C per 72 ore.

2.12.3 Amplificazione del baculovirus ricombinante per la produzione dello stock virale

Le cellule trasfettate sono state centrifugate a 3000 \times g per 5 minuti. Il sopranatante (stock virale P1) contiene un alto titolo virale (1×10^5 – 1×10^6 pfu²/mL). Per aumentare ulteriormente il titolo virale è

²plaque-forming unit

stato seguito un procedimento simile a quello precedente: 5 μL di stock virale P1 sono stati aggiunti in altri pozzetti contenenti 8×10^5 cellule Sf9. Dopo incubazione a 27°C per 72 ore, sono stati prelevati 2 mL di mezzo da ogni pozzetto e centrifugati in falcon da 15 mL a $3000 \times g$ per 5 minuti per allontanare i detriti cellulari. Il soprnatante ottenuto rappresenta lo stock virale P2 (titolo virale di 5×10^7 - 1×10^8 pfu/mL). La procedura è stata infine ripetuta per ottenere un terzo stock virale P3 (paragrafo 2.13.1).

2.12.4 Estrazione proteica

Le cellule infettate con stock virale P3, sono state centrifugate a $300 \times g$ a 4°C ; il pellet (contenente le cellule) ed il soprnatante (contenente il mezzo di coltura) sono stati raccolti e sottoposti ad esperimenti di Western blot.

Le proteine contenute nel pellet sono state estratte con il reagente Tissue Extraction Reagent (TER) (Invitrogen). Il quantitativo da utilizzare è stato calcolato rispettando la proporzione secondo la quale 10 mL di TER sono sufficienti ad estrarre le proteine da 1 g di cellule. Al TER è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle proteasi (PIC), (AEBSF³ 2mM, aprotinina 0,3 μM , bestatina 130 μM , EDTA 1mM, E-64 14 μM , leupeptina 1 μM).

Dopo pestellamento, l'omogenato è stato centrifugato a $300 \times g$, 4°C . Al soprnatante contenete le proteine è stato aggiunto il PIC, la quantità è stata calcolata seguendo le indicazioni della casa produttrice (1 mL di PIC per 1 mg di proteine). Il soprnatante è stato poi

³ 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride

dializzato in PBS utilizzando tubi da dialisi DiaEasy™ Dialyzer Tubes (Biovision), con membrana avente cut-off di 12-14 kDa,. Il dializzato è stato infine concentrato circa 10 volte utilizzando uno Speed Vacuum a 30°C (Eppendorf, Concentrator 5301).

La concentrazione proteica degli estratti è stata misurata con il metodo di Bradford (Bradford, 1976) utilizzando l'albumina di siero bovino come standard.

I campioni da analizzare sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide (stacking al 4%, running al 12%) in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) in cameretta XCell SureLock (Invitrogen) ad una corrente costante di 150 mA ed ad una differenza di potenziale di 200 V per 30 minuti utilizzando come tampone di corsa: MES 50 mM, Tris 50 mM, SDS allo 0.1% (w/v), EDTA 1 mM, pH 7,3.

Ai campioni è stato aggiunto un agente riducente, il Sample Reducing Agent 10X (500 mM dithiothreitol (DTT)) (Invitrogen) ed un buffer di corsa, il Sample Buffer LDS 4X (contenente dodecil solfato di litio ad un pH 8,4) (Invitrogen) come descritto nella tabella 2.25.

Componente	Quantità
Campione	X µL
Sample Buffer LDS (4X)	2,5 µL
Sample Reducing Agent (10X)	1 µL
Acqua deionizzata	Fino a 6,5 µL

Tabella 2.25. Composizione del campione caricato nel gel di poliacrilammide.

I campioni sono stati incubati a 70°C per 10 min e poi caricati su gel. Come marker di massa molecolare è stato utilizzato il See Blu Plus2 (Invitrogen).

Dopo la separazione mediante corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su una membrana PVDF (polivinilidenfluoruro), utilizzando il sistema di trasferimento iBlot Gel Transfer System (Invitrogen). La membrana è stata quindi incubata per 1 ora a temperatura ambiente con TBS-T (Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,9 % (w/v), Tween-20 0,1% (v/v)) con latte scremato in polvere (LSP) al 5% (w/v). Dopo 3 lavaggi di 15 minuti a temperatura ambiente la membrana è stata incubata 12 ore a 4°C con l'anticorpo primario anti FLAG DDDDK coniugato con perossidasi (Abcam) (1:5000 in TBS-T e LSP al 5% (w/v)). Successivamente sono stati eseguiti tre lavaggi di 15 minuti con TBS-T.

La rivelazione è stata eseguita secondo il protocollo del kit HRP-Chemiluminescent (Invitrogen). La membrana è stata incubata per 5 minuti con la soluzione di rivelazione. La soluzione in eccesso è stata allontanata utilizzando carta assorbente, e la membrana è stata posta in una cassetta di esposizione a contatto con una lastra autoradiografica (Amersham, HyperfilmTM ECL) per un tempo variabile da 5 a 30 minuti.

Successivamente la lastra impressionata è stata sviluppata tramite incubazione con opportuni liquidi di sviluppo e di fissaggio.

2.13 Produzione delle proteine ricombinanti

Messa a punto la produzione delle due proteine ricombinanti su piccola scala, la loro produzione in grandi quantità è stata affidata ad una ditta inglese, la Oxford Expression Technologies (Oxford, UK). Qui di seguito viene descritto brevemente il protocollo da loro seguito.

2.13.1 Determinazione della concentrazione virale dello stock virale P3

La concentrazione virale dello stock virale P3 è stata misurata mediante saggio delle placche di lisi. Questo protocollo si basa sulla capacità delle particelle virali di lisare le cellule e formare dei fori in un monostrato di cellule confluenti, che sono chiamati appunto placche di lisi. Per rendere visibili le placche di lisi le cellule vive vengono colorate con il colorante rosso neutro e quindi le placche vengono visualizzate come placche bianche su fondo rosso.

Sono state preparate delle diluizioni scalari (da 1:1000 a 1:100000 dello stock virale P3 e 100 μ L di ciascuno stock virale diluito sono stati aggiunti a una piastra con cellule Sf21 (in 2 mL di medium) ($1,4 \times 10^6$ cellule/piastra).

Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora in agitazione (200 rpm). L'inoculo virale (stock virale P3) è stato quindi rimosso e sostituito con 2 mL di agarosio LGT (Low Gelling Temperature) all'1% (1 parte di agarosio LGT al 2% (w/v) e 1 parte di terreno TC100 al 10% (w/v) supplementato con siero fetale di vitello (Fetal Calf Serum, FCS) al 5% (v/v)). Nella piastra con le cellule Sf21 è stato aggiunto 1 mL di TC100 medium al 10% supplementato con

FCS al 5% (v/v) ed il tutto è stato incubato a 28°C per 5 giorni. Per rendere visibili le placche le piastre sono state trattate con il colorante rosso neutro allo 0,05% (w/v) in PBS per 4 ore. Il titolo virale è stato quindi misurato contando le placche di lisi.

I titoli ottenuti sono $1,32 \times 10^8$ pfu/mL per lo stock P3 della *Ae-γ-GT1* e $1,05 \times 10^8$ pfu/mL per quello della *Ae-γ-GT2*.

2.13.2 Produzione delle proteine ricombinanti

Per la produzione delle proteine ricombinanti lo stock virale P3 (20 mL) è stato utilizzato per infettare 1L di coltura cellulare (Sf9) con densità di 2×10^6 cellule/mL. Le colture infettate sono state incubate per 5 giorni a 28°C e le cellule sono state raccolte per centrifugazione a $3000 \times g$ per 20 minuti a 4°C.

Il pellet ed il sopranatante ci sono stati spediti in ghiaccio secco e sono stati utilizzati per il dosaggio dell'attività gamma-glutamyl-transpeptidasica (γ -GTasica).

2.14 Dosaggio dell'attività enzimatica delle *Ae-γ-GT* ricombinanti

Le cellule Sf9 esprimenti le due proteine ricombinanti sono state lisate con 20-30 passaggi in omogenizzatore Dounce in un buffer contenente detergente e inibitori delle proteasi (PBS, NaCl 200mM, Triton X-100 0.1% e cocktail di inibitori delle proteasi (Roche) alla concentrazione indicata dalla casa produttrice). Dopo la lisi i campioni

sono stati centrifugati (Optima Ultracentrifuge, Beckman Coulter) a 40.000 rpm per 40 minuti a 4°C con un rotore AML-80.

L'attività γ -GTasica del sovrantante è stata misurata come descritto in Falabella et al., 2007. In breve, l'attività è stata determinata usando la γ -glutamyl-paranitroanilide (GPNA) (Sigma) come substrato donatore e il dipeptide Gly-Gly (Sigma) come substrato accettore. Il rilascio di paranitroanilide nel tempo è stato misurato a 410 nm a 25°C con uno spettrofotometro (BIO-RAD, Benchmark plus microplate spectrophotometer). Le concentrazioni finali nella reazione enzimatica erano i seguenti: GPNA 1mM, Gly-Gly 100mM, buffer (MgSO₄ 6 mM, CaCl₂ 2 mM, KCl 13 mM, Na-citrato 2 mM, KH₂PO₄ 12 mM, saccarosio 425 mM, Hepes 10 mM, Tris 5,9 mM, pH 6,4).

2.15 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate con l'ausilio del software IBM SPSS Statistic 20.

I risultati ottenuti dalla titolazione dei tioli, delle reazioni di qRT-PCR negli esperimenti in cui è stato misurato il livello trascrizionale della due *Ae- γ -GT* nelle ghiandole del veleno e nel resto del corpo di *A.ervi* (paragrafo 2.3), negli esperimenti di valutazione del livello trascrizionale della due proteine *Ae- γ -GT* in presenza ed assenza dell'ospite (paragrafo 2.4) e negli esperimenti di interferenza (paragrafi 2.6, 2.7.e 2.8) sono stati analizzati con il test del *t* di Student. Per analizzare le medie dei livelli trascrizionali delle *Ae- γ -GT*

con una distribuzione non normale è stato utilizzato il test U-Mann Whitney.

I livelli trascrizionali nei diversi tempi dopo lo sfarfallamento negli esperimenti in cui è stato misurato il livello trascrizionale della due proteine in diversi tessuti di *A. ervi* sono stati invece confrontati utilizzando il test One way Anova. La differenza è significativa quando $P < 0,05$.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Titolazione del GSH

Nel sistema ospite-parassitoide *A. pisum-A. ervi*, il veleno causa la castrazione dell'ospite attraverso l'induzione dell'apoptosi nelle cellule del germario degli ovariooli. Il fattore contenuto nel veleno responsabile di questo effetto è una gamma-glutamyl transpeptidasi, la *Ae-γ-GT* (Falabella et al., 2007). Le γ -GT hanno un ruolo fondamentale nel metabolismo del glutatione (GSH), ed in particolare sono deputate alla sua degradazione nell'ambiente extracellulare. Il GSH è coinvolto in molti processi cellulari e l'alterazione della sua omeostasi contribuisce a innescare fenomeni di stress ossidativo (Aquilano et al., 2014). Per questa ragione, si è voluto innanzitutto chiarire se negli afidi parassitizzati si verificasse una qualche alterazione del pool di GSH. Tale fenomeno infatti, alterando lo stato redox nelle cellule del germario, potrebbe rappresentare l'innesco dei pathway di apoptosi.

La concentrazione del glutatione (GSH) è stata misurata utilizzando la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). I risultati ottenuti evidenziano che, mentre a 24 ore dalla ovideposizione, negli afidi parassitizzati, non si evidenziano differenze significative nel titolo di GSH, una riduzione significativa si osserva a 48 ore e questa differenza è in gran parte dovuta alla diminuzione del suo titolo negli ovari (Fig. 3.1).

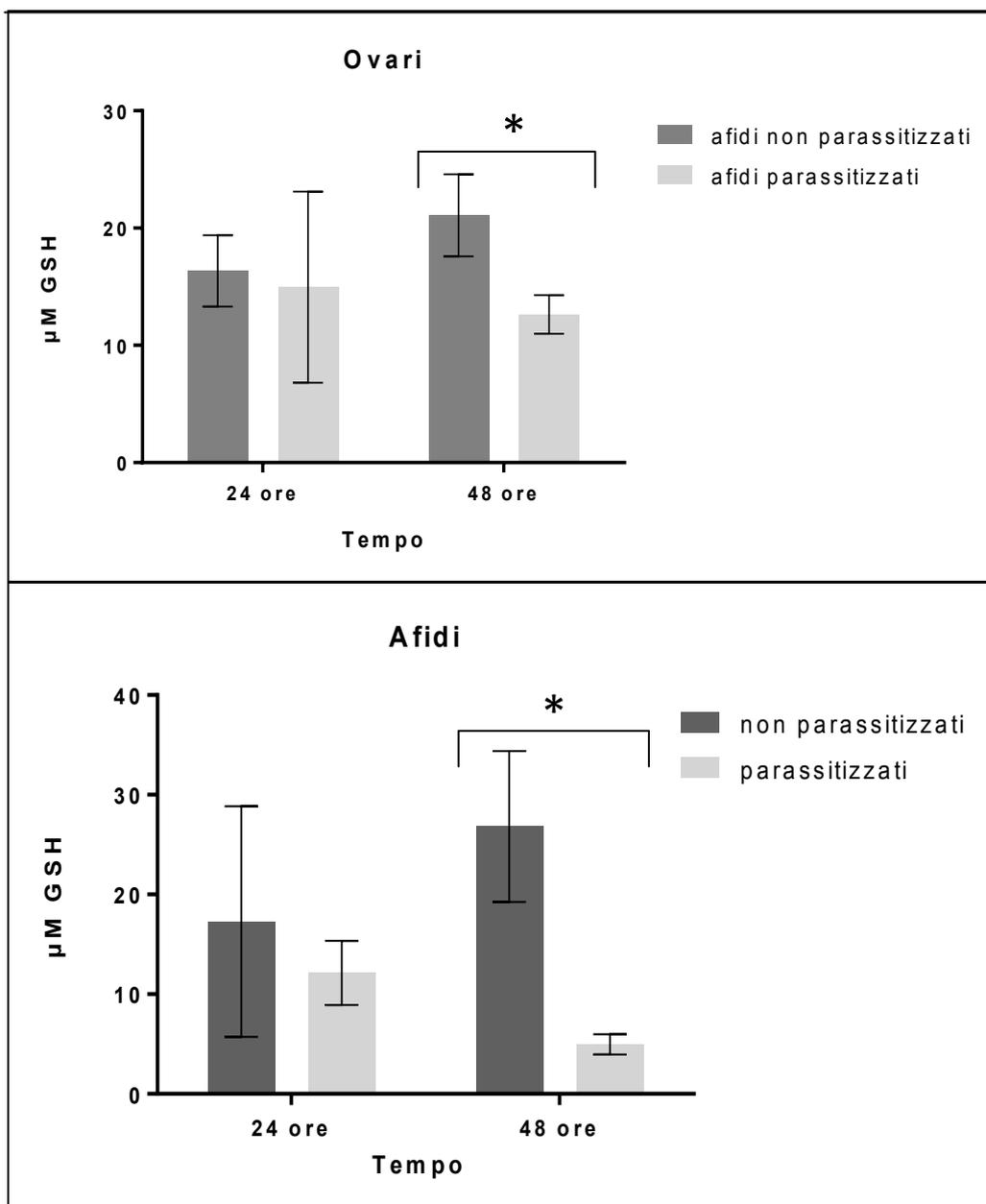


Figura 3.1. Concentrazione del GSH in afidi interi e in ovari (* $P < 0,05$, test t -Student).

Nei campioni di emociti e plasma, non si evidenzia invece una differenza significativa del titolo di GSH tra gli afidi parassitizzati e non parassitizzati (Fig. 3.2).

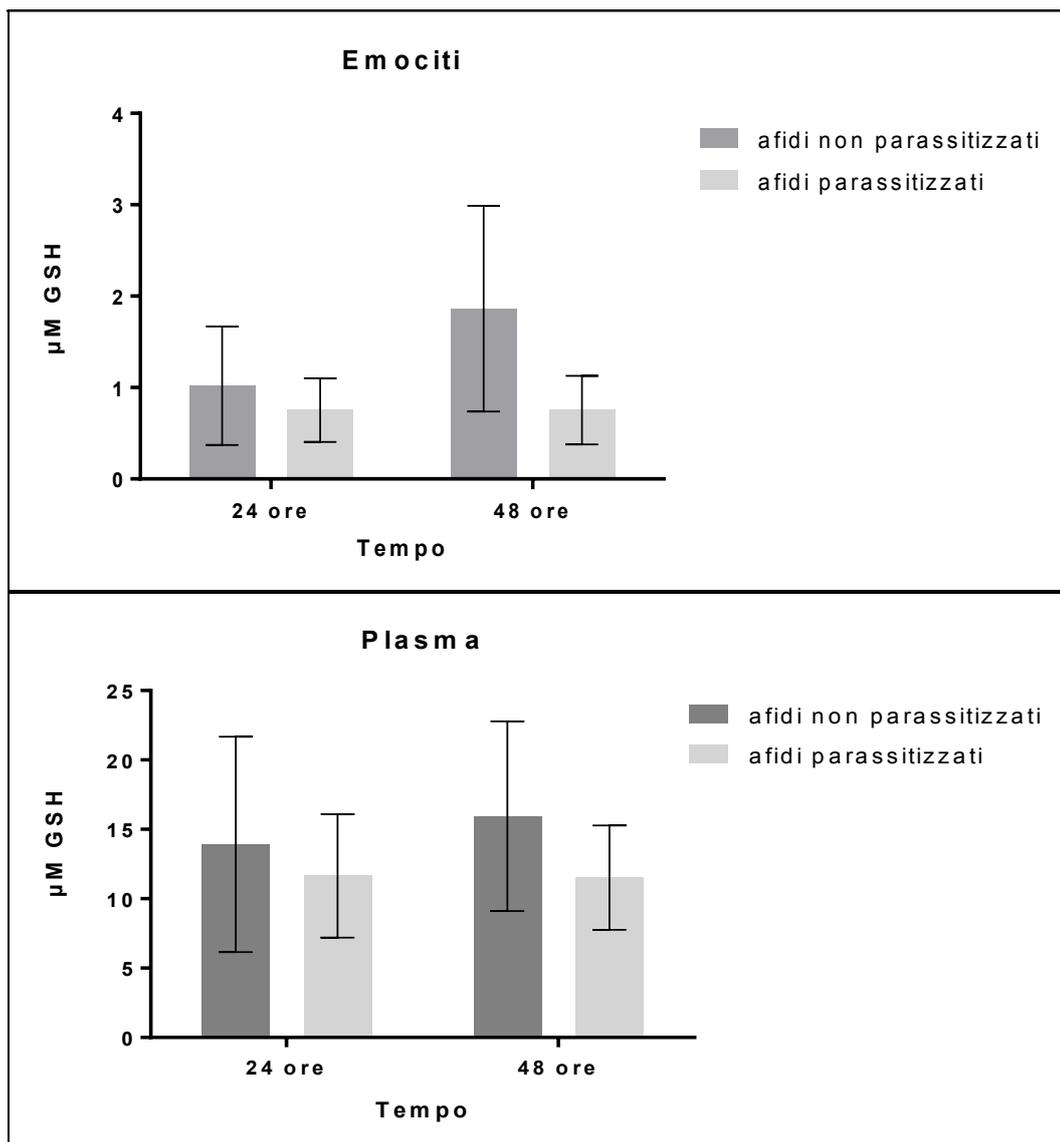


Figura 3.2. Concentrazione del GSH in emociti e plasma di afidi.

Questi risultati dimostrano un'alterazione del metabolismo del GSH a seguito della parassitizzazione e a carico degli organi bersaglio della componente attiva del veleno, la *Ae-γ-GT*. Dunque, la diminuzione di questo importante antiossidante idrofilico nelle cellule del germario potrebbe rappresentare il meccanismo d'azione tramite il quale la *Ae-γ-GT* contenuta nel veleno castra l'ospite.

3.2 Real time PCR su ghiandole del veleno e resto del corpo di femmine di *A. ervi*

Dal sequenziamento della cDNA library delle ghiandole velenifere di *A. ervi* (Colinet et al., 2014), oltre alla già nota *Ae- γ -GT1* (Falabella et al., 2007), è stata identificata una seconda proteina, denominata *Ae- γ -GT2*. L'allineamento delle due sequenze amminoacidiche evidenzia un'identità del 51% (Fig. 3.3).

Il livello trascrizionale delle due isoforme della *Ae- γ -GT*, valutato mediante qRT-PCR nelle ghiandole del veleno e nel resto del corpo di femmine di *A. ervi*, è costante dal momento in cui le femmine emergono dalla mummia fino a 48 ore dopo lo sfarfallamento (Fig. 3.4). Tutti i dati relativi ai diversi tempi sono stati quindi uniti e dall'analisi del livello di trascrizione del gene codificante per le due isoforme, si evince chiaramente che entrambe le molecole sono altamente espresse nelle ghiandole del veleno e, in misura molto minore, nel resto del corpo (Fig. 3.5 e Fig. 3.6).

```

Ae-γ-GT1      MFSKYILTTTVALVLLKYQCYSADP-SVSAQFKKSAVCAGANKCAEIGSSTLNNGGSAVD 59
Ae-γ-GT2      MITKFLLS-MIALIFLKYQCNCETPESVSRNFKKAAVCAGVDECAEIGLSILKKGTAVD 59
                *::*:*: *::*:***** . * *** :*:*:*****.:***** * *::*:*:**

Ae-γ-GT1      AAIATMICNNLVHPLHLAGYGGGFMTVYDRANKNVDFLNAREKAPGDISKAS----- 111
Ae-γ-GT2      SAIATMICNGLIHMHIAGYGGGFMTIYQSDTKKVSFLNAKEKSPKETSEYSYKQLPLDE 119
                :*****.*:* *:*:*****:*: .*:*.******:*:* : *:*

Ae-γ-GT1      KAGVNSIAVPGEIAGYGVAHKKYKLSWEKLFEPTEIELCESGYQISKALAKAIASSADTI 171
Ae-γ-GT2      KTGLR-IAVPGEIAGYAKAHEKFGKIPWSDLFQPTIDLCKKGFKITKTLHDALEKSQSDI 178
                *:*:. *****. *:*:*:*:.*.**:*:*:*:.*::*:*:* *:* . * . *

Ae-γ-GT1      KQDDTLTALY---TNGGALKKEGDTVNPGLKCDTLKTIASGGADFEYKGDASSIIGDL 227
Ae-γ-GT2      ENDETRELRFMDKETNSQSLKREGDLVKPTALCETLVTIASKGAGEFYNGTLAKTIVEDL 238
                :*:** *:* **.*:***:*:* *:* **:* ** *:*.* *:*:* *:*:* **

Ae-γ-GT1      SKKSSALTKDDLSSYTAKWASPLKTTLLNDLTLTYANAPGGGAPLALALNIIDEYG--N 284
Ae-γ-GT2      QSQSSII TEDDFSDYEAEWLEPLSIKLSNDLTLHTSSVPSSGGLLTLIMNILENFNFTP 298
                ..** :*:**:*.* *:* **.* * *****:*:.*.**.* *:* :*:**:*:. *

Ae-γ-GT1      DLVSSD-AALKLHRLSEIWKYSVAAKSKLGDPDVSS--LDELLKTITSDAYAKEIKSKIN 341
Ae-γ-GT2      SLNGTDNTSLTYHKIMESFKWSPQKYKLGDSKFSKKILDLLVNEFTSKDYAKSIKKIN 358
                .* :*: *:*.* *:* * :*:**.* *****.* ** *:: :*. **.***.***

Ae-γ-GT1      DKETSHEASHYGVVDVQDEGTAQVSIIDAGNAVSATSSLNGVFGSGVVESTGIILNS 401
Ae-γ-GT2      EKKTSNKESDYGGKESVEDQGTAQVSVIDSNGNAVSATSSINAPFGSGIVSKRTGLIFNN 418
                :*:**:* *.* **.* *:*:*****:*:*:*****:*.* *****:* *:*:*.*

Ae-γ-GT1      ALSDFSP-----KSKANEIAPNKRPLSSMAPSIIVDSNDNVKLVIGATGGAKIT 450
Ae-γ-GT2      AMDGFWTPVTGPTGGEETQDGNRIDAQKPLSMLPTIITDSNGDVKVVIGGTGGTKII 478
                *:.** . . . .*. * .*:***** *:*.***.*:***:***.***:*

Ae-γ-GT1      TAVSSVLARYLWSKQGLKEAVDAPRLHQEIFPMELSYEESSDVITQLKEVYKHNTVEMKG 510
Ae-γ-GT2      TSVSFVLARYLWMGEDMKTAIADRIHYQDIIMRVGAEKMDVVQNLKRKYGHRVLLKE 538
                *:* ***** :.* *:* *:* : : *:. *:* :**.* * *..* :*

Ae-γ-GT1      ITSAICALSREGDSILGVADGRRGGSVQGSN- 541
Ae-γ-GT2      PHSAICLSKENGVIINGVADGRRGGNVAGIDE 570
                *****:*:. * *****.* * :

```

Figura 3.3. Allineamento delle sequenze amminoacidiche delle due *Ae-γ-GT* eseguito con un programma tipo ClustalW2 Multiple Sequence Alignments.

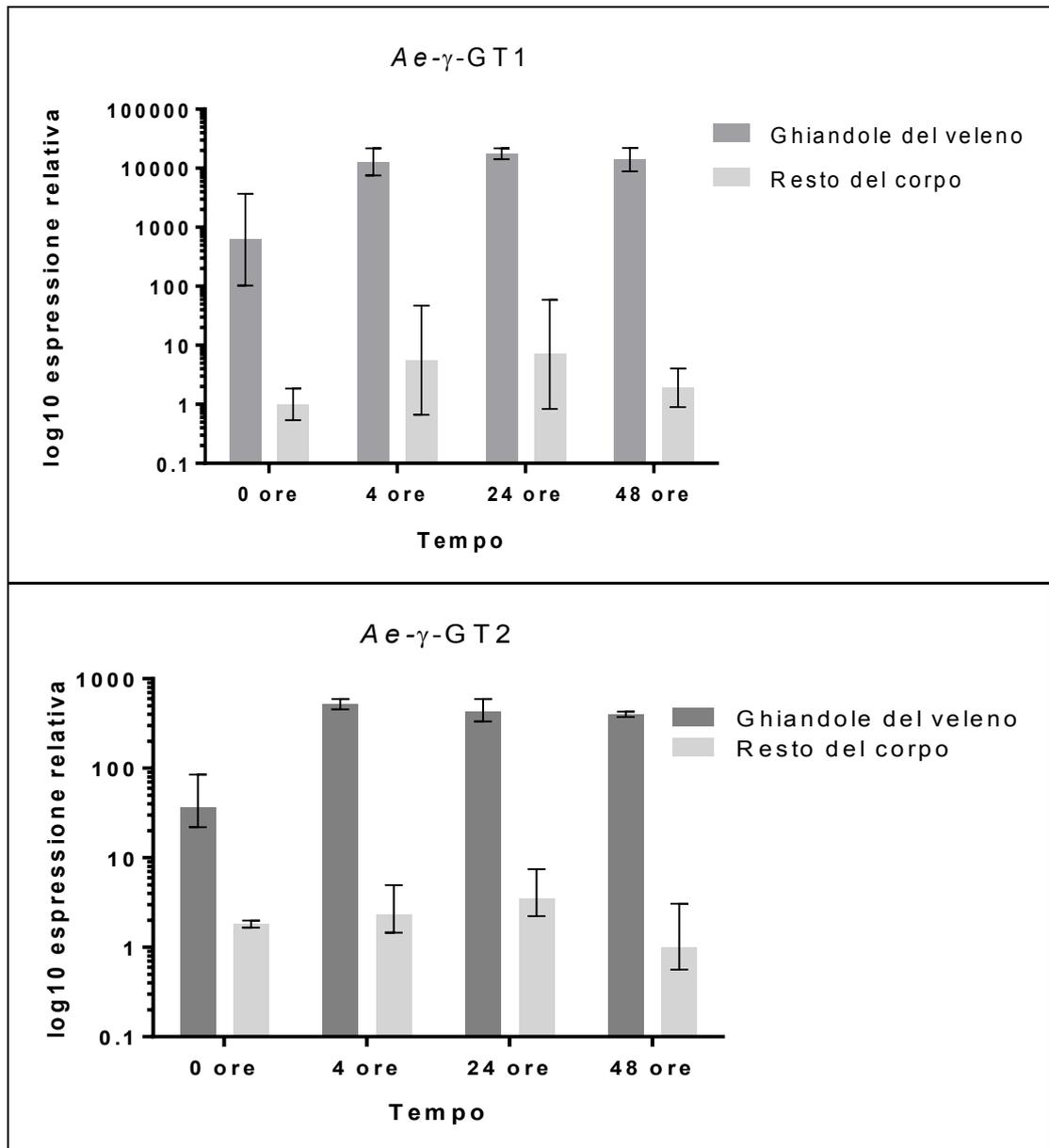


Figura 3.4. Espressione relativa della *Ae-γ-GT1* e della *Ae-γ-GT2* in diversi tessuti delle femmine del parassitoide a diversi tempi dallo sfarfallamento.

Questi risultati non sono inattesi in quanto dal momento in cui le femmine di *A. ervi* escono dalla mummia sono attive nella parassitizzazione (Quicke, 1997) e dunque devono disporre del necessario corredo di fattori di virulenza da iniettare nell'ospite insieme alle uova. Le femmine di *A. ervi*, come la maggior parte degli endoparassitoidi, all'atto dell'ovideposizione iniettano fluidi ovarici e

veleno, ossia la secrezione prodotta dalle ghiandole del veleno (Colinet et al., 2013; Quicke, 1997).

Considerato che la *Ae-γ-GT* è tra le componenti principali del veleno di *A. ervi* (Colinet et al., 2014; Falabella et al., 2007) l'abbondanza dei trascritti per le due isoforme *Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2* nelle ghiandole del veleno rispetto ad altri distretti corporei di questo parassitoide ne conferma l'elevata specificità tissutale di espressione.

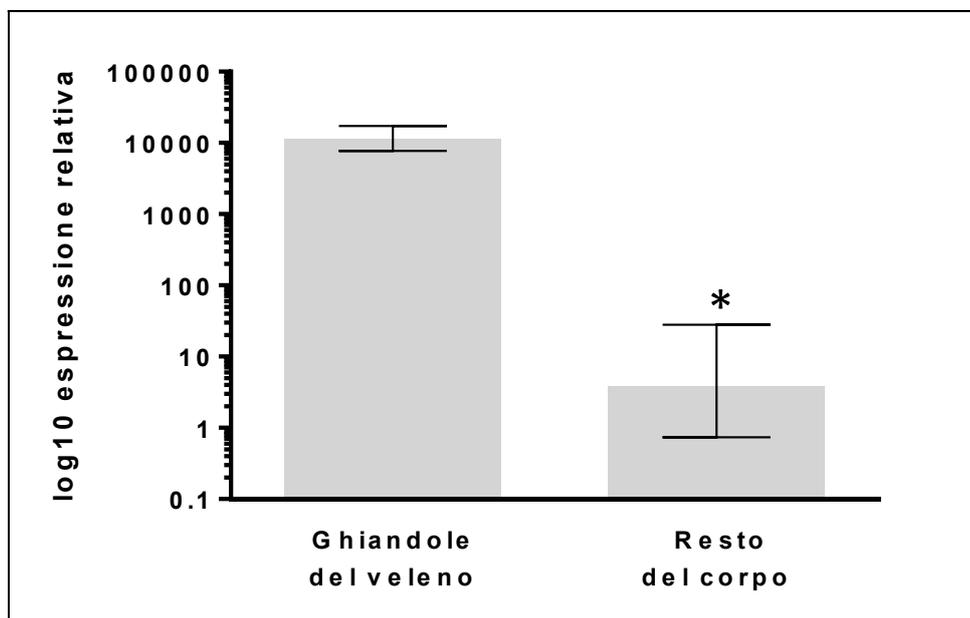


Figura 3.5. Espressione relativa della *Ae-γ-GT1* nelle ghiandole del veleno e nel resto del corpo del parassitoide (* $P < 0,01$, test del *t* di Student).

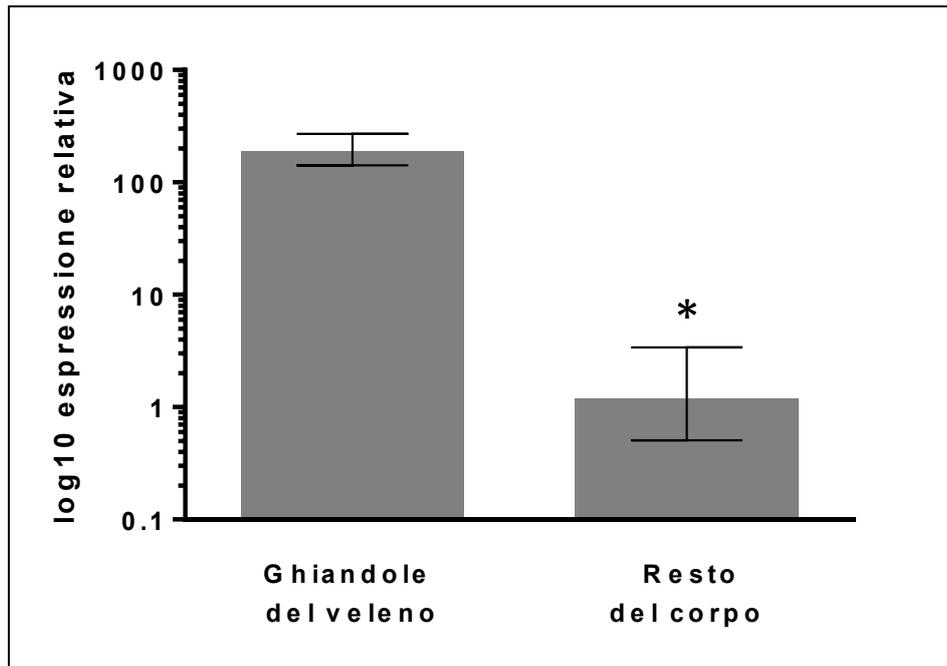


Figura 3.6. Espressione relativa della *Ae-γ-GT2* nelle ghiandole del veleno e nel resto del corpo del parassitoide (* $P < 0,05$, test del *t* di Student).

Unendo i risultati dei diversi tempi, è stato inoltre possibile confrontare il livello trascrizionale di entrambe le isoforme (Fig. 3.7). Il livello trascrizionale per la *Ae-γ-GT2* è molto maggiore rispetto alla *Ae-γ-GT1*, dato, quest'ultimo, in disaccordo con quanto recentemente pubblicato (Colinet et al., 2014) in merito all'identificazione delle principali componenti proteiche del veleno di *A. erivi*. E' comunque plausibile che l'abbondanza di un'isoforma rispetto all'altra possa variare a seconda della popolazione del parassitoide e dunque che nella popolazione in allevamento nel laboratorio dove è stata svolta la sperimentazione il rapporto tra le quantità dei trascritti delle due isoforme sia invertito rispetto a quello riscontrato da Colinet e colleghi su altri ceppi.

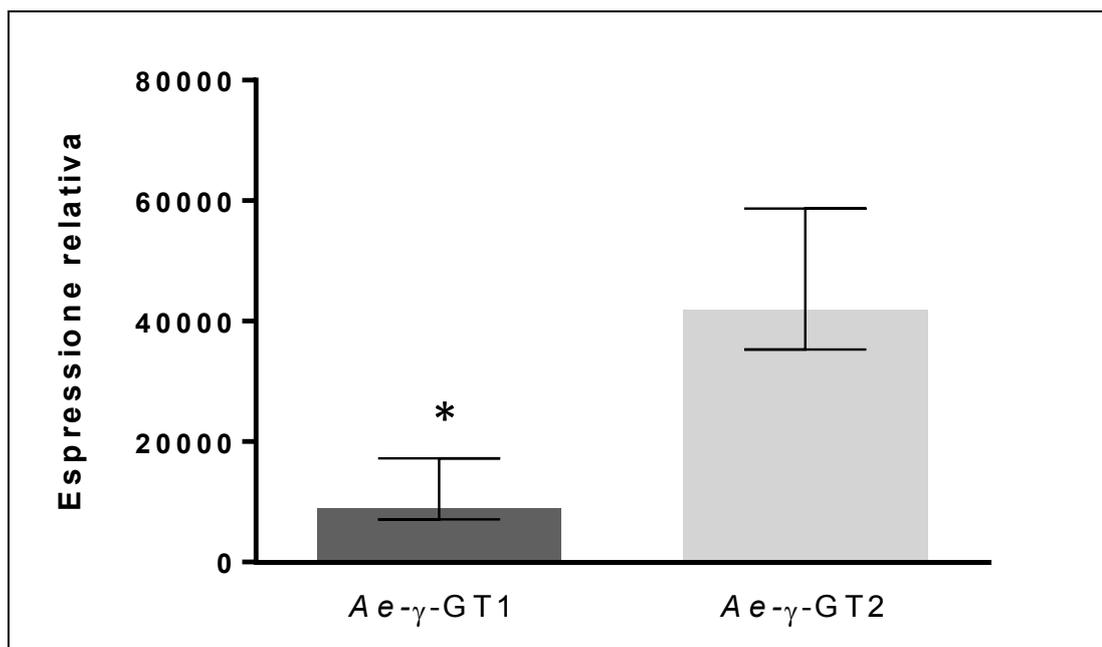


Figura 3.7. Espressione relativa delle *Ae-γ-GT* nelle ghiandole del veleno del parassitoide (* $P < 0,05$, test di U-Mann Whitney).

3.3 Real time PCR su ghiandole del veleno di *A. ervi* in presenza o assenza dell'ospite

Il livello trascrizionale delle due isoforme di *Ae-γ-GT* nelle femmine del parassitoide messe o meno a contatto di afidi, e quindi messe in condizione di ovideporre o meno, è stato valutato mediante Real time PCR.

Mentre la trascrizione della *Ae-γ-GT1* non aumenta nel tempo in risposta all'attività di ovideposizione, dopo 48 ore si assiste ad un aumento della trascrizione della *Ae-γ-GT2* (Fig. 3.8).

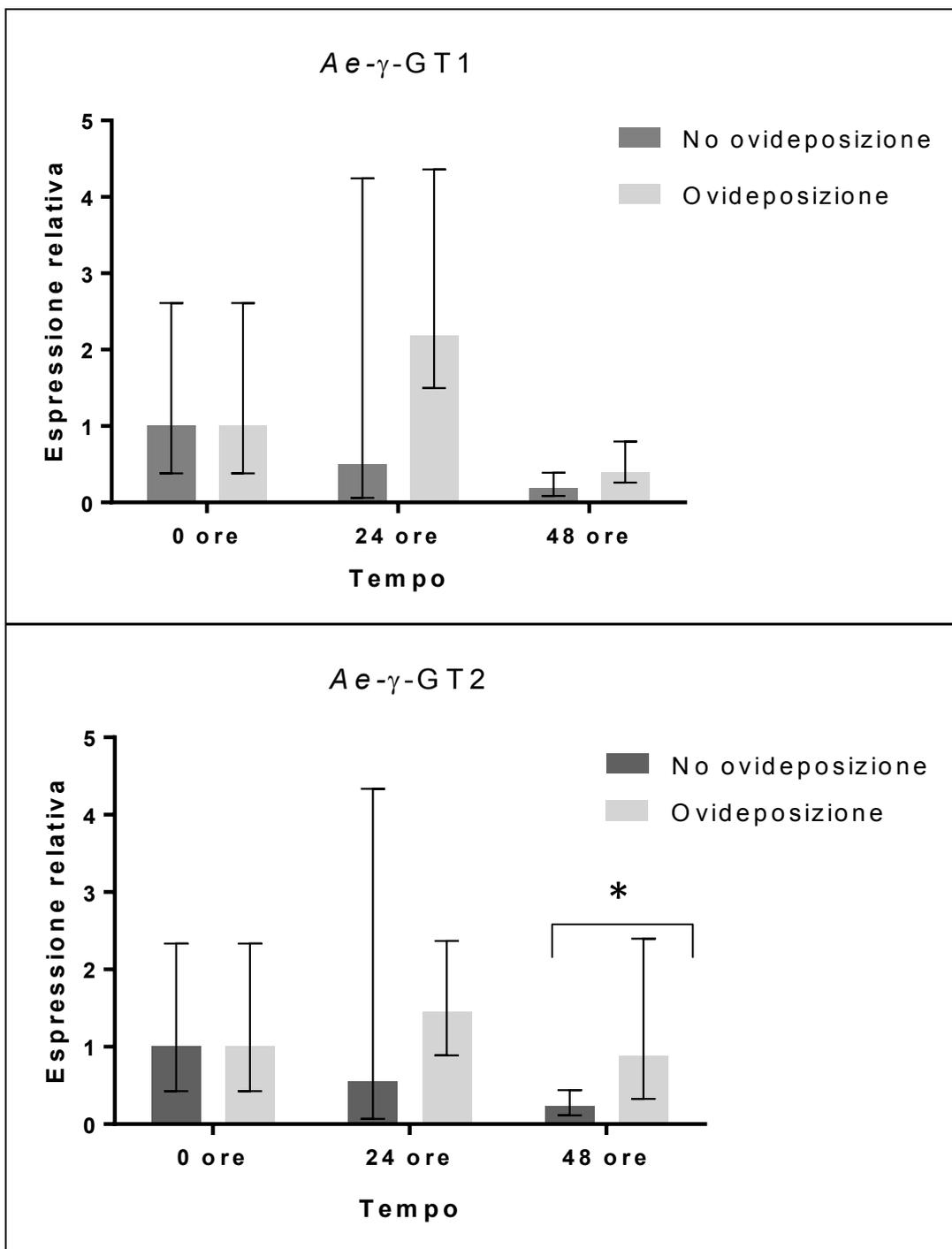


Figura 3.8. Espressione relativa nel tempo di *Ae- γ -GT1* e *Ae- γ -GT2* nelle ghiandole del veleno ed effetto della presenza dell'ospite (* $P < 0,05$, test del t di Student).

Questo risultato potrebbe derivare dal fatto che nelle femmine l'isoforma più rappresentata nel veleno è la *Ae-γ-GT2* (Fig. 3.7) e quindi più soggetta a modulazione positiva nel caso di intensa attività di parassitizzazione.

3.4 Produzione di dsRNA *Ae-γ-GT1* e dsRNA *Ae-γ-GT2*

Per studiare *in vivo* il ruolo delle *Ae-γ-GT* nella regolazione della fisiologia degli afidi parassitizzati, si è deciso di silenziare il gene che le codifica nelle femmine di *A. ervi* utilizzando la tecnica dell'RNA interference (RNAi). Il silenziamento tramite RNAi avviene tramite la degradazione di mRNA bersaglio mediato da un meccanismo molecolare complesso innescato dalla presenza di molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) ad esso complementare (paragrafo 1.8).

Per silenziare le *Ae-γ-GT* sono stati disegnati e prodotti due frammenti di dsRNA complementari ad una porzione delle sequenze nucleotidiche delle due isoforme di *Ae-γ-GT*.

Per produrre il template necessario alla trascrizione *in vitro* per la produzione del dsRNA sono state effettuate due diverse reazioni di PCR. La prima reazione ha amplificato la sequenza bersaglio codificante la variante allelica da interferire (amplificato esterno). I frammenti ottenuti hanno le lunghezze attese: 567 pb per la *Ae-γ-GT1* e 936 pb per la *Ae-γ-GT2* (Fig. 3.9).

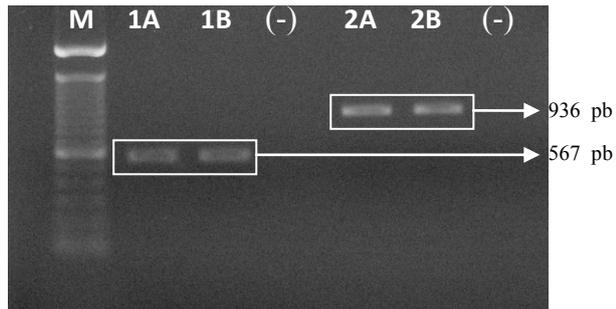


Figura 3.9. Amplificato esterno della *Ae-γ-GT1* (1A, 1B) e della *Ae-γ-GT2* (2A, 2B); marker (M); controllo negativo (-).

L'amplificato esterno è stato utilizzato come template nella reazione di PCR con primer T7 ottenendo frammenti di 430 pb per *Ae-γ-GT1* e 447 pb per *Ae-γ-GT2* (amplificati T7) (Fig. 3.10).

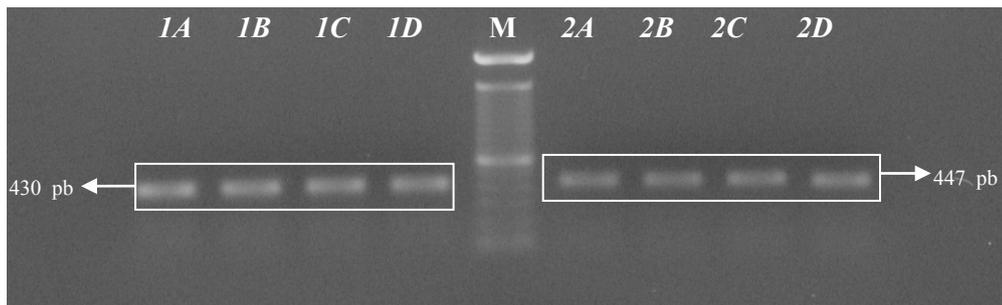


Figura 3.10. Amplificato T7 della *Ae-γ-GT1* (1A, 1B, 1C, 1D) e della *Ae-γ-GT2* (2A, 2B, 2C, 2D); marker (M).

La trascrizione *in vitro* è stata effettuata utilizzando gli amplificati mostrati in figura 3.8 ottenendo frammenti di 500 pb per il controllo positivo, 430 pb per la *Ae-γ-GT1* e 447 pb per la *Ae-γ-GT2* (Fig. 3.11).

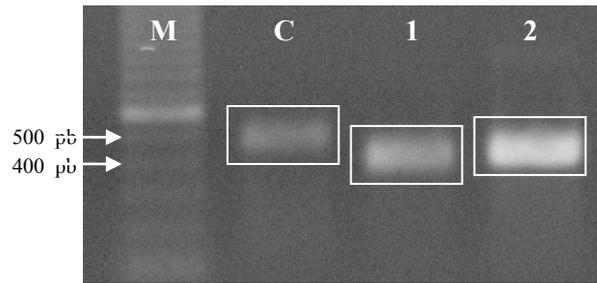


Figura 3.11. Molecole di dsRNA. Controllo (C); *Ae- γ -GT1* (1); *Ae- γ -GT2* (2); marker (M).

3.5 Esperimenti di silenziamento della γ -GT1

Gli esperimenti di RNAi condotti ad oggi sugli insetti hanno evidenziato una grande variabilità di risposta, soprattutto in relazione ai protocolli usati per la delivery (Scott et al., 2013; Yu et al., 2013). Nonostante il moltiplicarsi di studi non è stato, infatti, ancora possibile stabilire con esattezza un protocollo univoco ed efficace per la somministrazione delle molecole di dsRNA che consenta il silenziamento.

In letteratura sono quattro i lavori in cui è stato descritto il silenziamento tramite RNAi di geni in adulti di parassitoidi (Burke et al., 2013; Colinet et al., 2014; Li et al., 2012; Lynch and Desplan 2006).

In questi studi il dsRNA è stato iniettato nella cavità emocelica di larve o pupe del parassitoide ed il silenziamento è stato osservato nell'adulto. Per questa ragione si è deciso di utilizzare come primo approccio per la somministrazione del dsRNA, l'iniezione intraemocelica nelle pupe di *A. ervi*.

I primi esperimenti di RNAi sono stati condotti con il dsRNA diretto contro l'mRNA codificante la *Ae- γ -GT1*.

3.5.1 Livello trascrizionale dell'isoforma *Ae-γ-GT1* a seguito della somministrazione intraemocelica del dsRNA in pupe di *A. ervi*

La somministrazione di dsRNA attraverso microiniezioni nella pupa di *A. ervi* ha causato una alta mortalità del parassitoide (Tab. 3.1).

	Pupe di <i>A. ervi</i> trattate	Percentuale di sopravvivenza	Femmine di <i>A. ervi</i> emerse
dsRNA-Controllo	30	13%	3
dsRNA- <i>Ae-γ-GT1</i>	30	17%	3

Tabella 3.1. Percentuale di sopravvivenza del parassitoide dopo somministrazione di dsRNA attraverso microiniezioni nella pupa di *A. ervi* e numero di femmine emerse su cui è stato valutato il silenziamento.

Il livello trascrizionale dell'allele *Ae-γ-GT1* nelle ghiandole del veleno in seguito a somministrazione intraemocelica di dsRNA è stato valutato mediante reazioni di qPCR. Analizzando i risultati ottenuti, non si evidenzia una differenza significativa nel livello trascrizionale della variante allelica (Fig. 3.12).

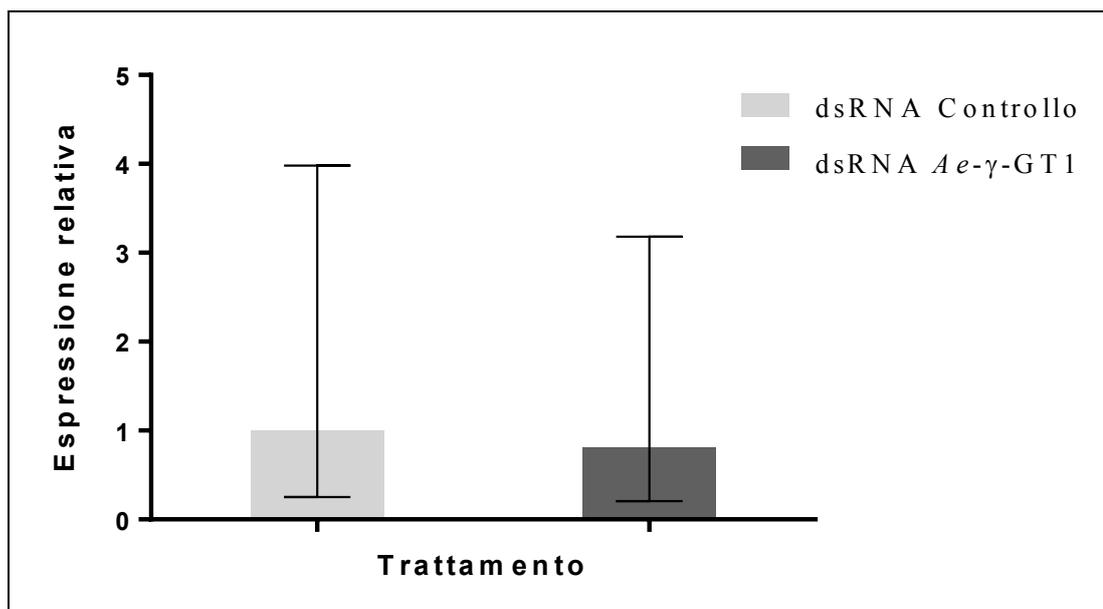


Figura 3.12. Espressione relativa della *Ae-gamma-GT1* nelle ghiandole del veleno di *A. ervi* a seguito di microiniezioni di dsRNA nella pupa del parassitoide.

3.5.2 Livello trascrizionale dell'isoforma *Ae-gamma-GT1* a seguito della somministrazione orale del dsRNA alle larve di *A. ervi*

Non avendo ottenuto il silenziamento desiderato con l'iniezione emocelica del dsRNA nel parassitoide, si è voluto tentare di silenziare la *Ae-gamma-GT1* attraverso la somministrazione orale del dsRNA alle larve del parassitoide. In alcuni casi, infatti, l'ingestione e il successivo processamento delle molecole di dsRNA si sono dimostrati critici per il successo del silenziamento (Di Lelio et al., 2014; Scott et al., 2013).

Per fare ciò, in un primo esperimento, le molecole del dsRNA sono state iniettate nell'emocele dell'afide parassitizzato. La larva del parassitoide, nutrendosi dell'emolinfa e dei tessuti dell'ospite, dovrebbe ingerire anche il dsRNA. In un secondo esperimento il

dsRNA è stato somministrato all'afide parassitizzato tramite dieta artificiale, in quanto a seguito dell'ingestione potrebbe essere trasportato attraverso l'epitelio intestinale nell'emolinfa e quindi essere disponibile per l'ingestione da parte della larva del parassitoide.

Contrariamente a quanto osservato per l'iniezione intraemocelica nelle pupe del parassitoide, le due diverse procedure di somministrazione di dsRNA agli afidi ospiti hanno causato una bassa mortalità del parassitoide (sopravvivenza superiore al 60%) (Tab. 3.2 e Tab. 3.3).

	Ospiti parassitizzati iniettati	Percentuale di <i>A. ervi</i> sfarfallati regolarmente	Femmine di <i>A. ervi</i> emerse
dsRNA-Controllo	39	67%	16
dsRNA-<i>Ae-γ-GT1</i>	44	68%	13

Tabella 3.2. Percentuale di sopravvivenza del parassitoide dopo somministrazione di dsRNA attraverso microiniezioni negli afidi ospiti e numero di femmine emerse su cui è stato valutato il silenziamento.

	Num. larve <i>A. ervi</i> L3 trattate	Percentuale Sopravvivenza <i>A. ervi</i>	Femmine di <i>A. ervi</i> emerse
dsRNA-Controllo	33	61%	8
dsRNA-<i>Ae-γ-GT1</i>	44	68%	13

Tabella 3.3. Percentuale di sopravvivenza del parassitoide dopo somministrazione di dsRNA attraverso l'alimentazione degli afidi ospiti e numero di femmine emerse su cui è stato valutato il silenziamento.

Il livello trascrizionale dell' allele *Ae-γ-GT1* nelle ghiandole del veleno in seguito a somministrazione di dsRNA è stato valutato mediante reazioni di qPCR. Analizzando i risultati ottenuti con le due modalità diverse di somministrazione del dsRNA nell'afide ospite, non si evidenzia una differenza significativa nel livello trascrizionale del allele (Fig. 3.13 e 3.14).

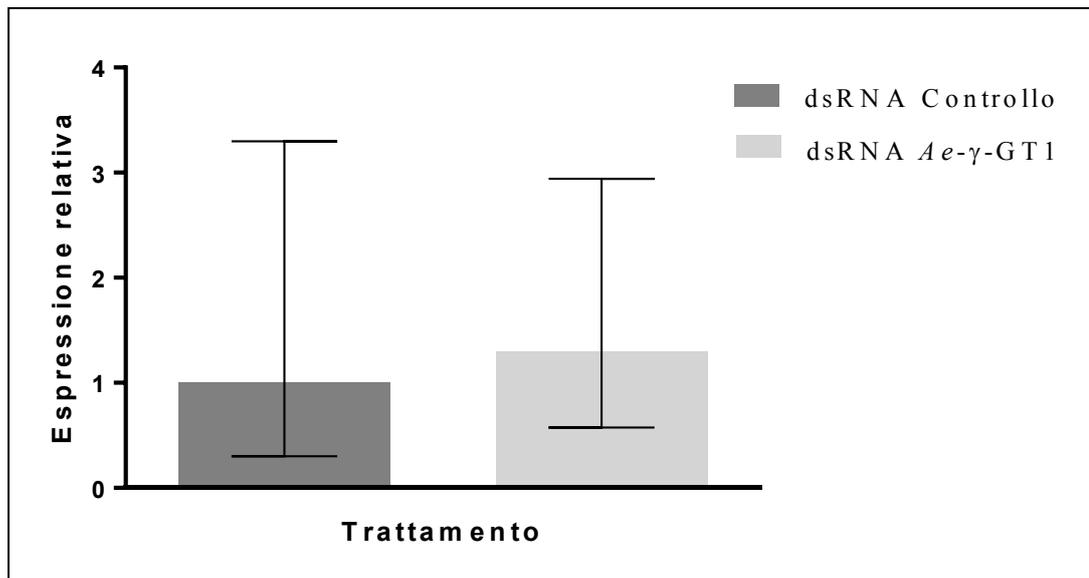


Figura 3.13. Espressione relativa della *Ae-γ-GT1* nelle ghiandole del veleno di *A. ervi* a seguito di microiniezioni di dsRNA negli afidi ospiti.

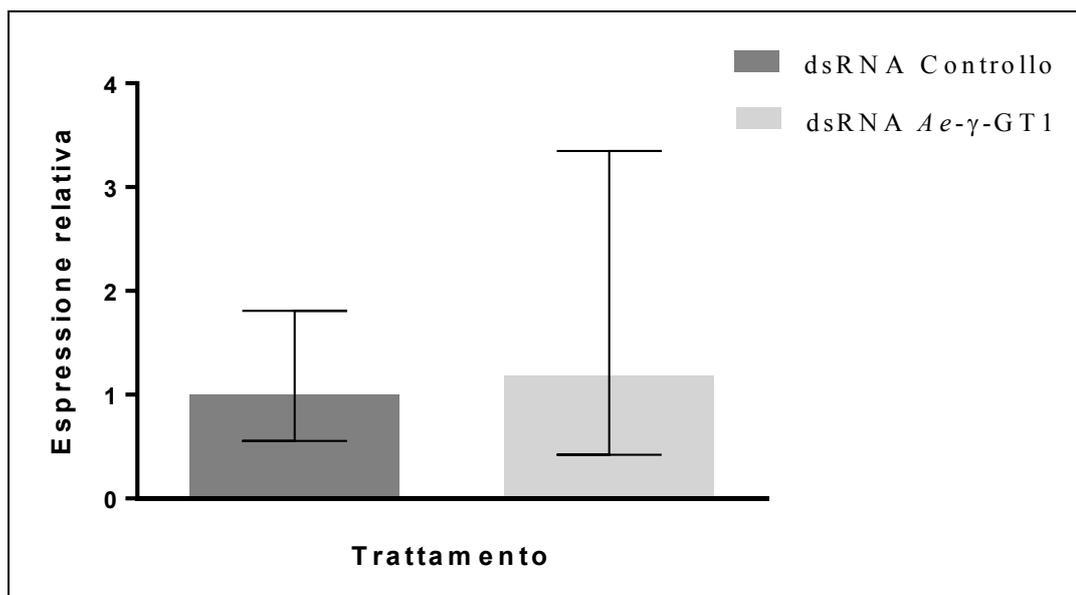


Figura 3.14. Espressione relativa della *Ae-gamma-GT1* nelle ghiandole del veleno di *A. ervi* a seguito di somministrazione di dsRNA per alimentazione degli afidi ospiti.

I primi esperimenti di silenziamento della *Ae-gamma-GT1*, indipendentemente dalla modalità di somministrazione delle molecole di dsRNA, hanno avuto esito negativo. Nelle sperimentazioni che seguiranno verranno utilizzati gli stessi protocolli variando la quantità di dsRNA somministrata ed eventualmente aumentando il numero di somministrazioni. Un aspetto particolarmente interessante che verrà valutato è l'eventuale degradazione del dsRNA somministrato, sia nell'emocele della pupa del parassitoide, sia nell'emocele che nel lume intestinale dell'afide. La degradazione del dsRNA potrebbe infatti essere il fattore limitante per il successo del silenziamento (Christiaens et al., 2014).

3.6 Produzione delle proteine ricombinanti *Ae- γ -GT1* e *Ae- γ -GT2*

Per la produzione delle proteine ricombinanti *Ae- γ -GT1* e *Ae- γ -GT2* è stato scelto un sistema di espressione che utilizza i baculovirus come vettori (Baculovirus expression vector system, BEVS) (Contreras-Gómez et al., 2013; Sokolenko et al., 2012). I BEVS prevedono la crescita di cellule di insetto e l'infezione da parte di baculovirus trasformati con il gene per la proteina di interesse. I baculovirus (paragrafo 1.7) non sono patogeni per mammiferi e piante (Ignoffo et al., 1975) e sono vettori molto versatili: hanno una grande capacità di clonaggio (38 kb) che consente di esprimere anche più proteine ricombinanti allo stesso tempo e, utilizzando promotori estremamente efficienti, consentono rese di espressione molto alte (Contreras-Gómez et al., 2013). Un aspetto inoltre fondamentale dei BEVS è che garantiscono molto più che ogni altro sistema di produzione che le proteine ricombinanti conservino l'attività biologica delle forme native (Contreras-Gómez et al., 2013).

Nel caso specifico delle *Ae- γ -GT* la scelta di questo sistema di espressione è ancora più opportuna in quanto la produzione di proteine di insetto in cellule di insetto riduce al minimo, se non evita completamente, variazioni negli assetti conformazionali, nei processi di oligomerizzazione e nelle modifiche post-traduzionali rispetto alle *Ae- γ -GT* native.

Per l'espressione delle proteine ricombinanti sono stati clonati i cDNA delle due *Ae- γ -GT* nel vettore di espressione pACEBac1 utilizzando la tecnica di clonaggio RF-cloning.

3.6.1 Produzione del long template

I prodotti della prima amplificazione dell'RF-cloning (PCR Long Template) sono stati caricati su gel d'agarosio. Oltre ai campioni e ai controlli negativi sono stati caricati 2 μ L di un marker costituito da frammenti di DNA a lunghezza nota per permettere il riconoscimento di una banda di dimensioni di circa 1763 pb per l'amplificato *Ae- γ -GT1* e di circa 1850 pb per l'amplificato *Ae- γ -GT2* (Fig. 3.15).

Le bande d'interesse sono state recuperate dal gel e l'amplificato è stato purificato.

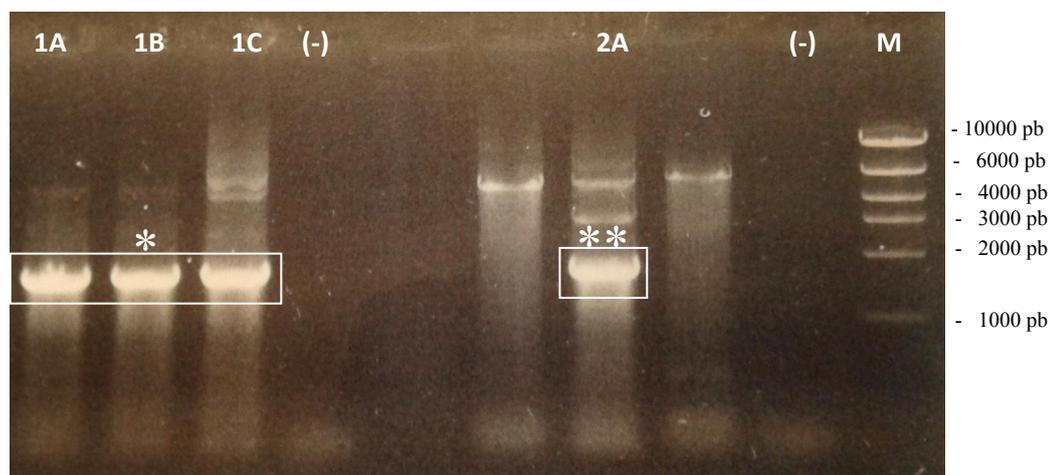


Figura 3.15. PCR Long Template. *Ae- γ -GT1* (1A, 1B, 1C); *Ae- γ -GT2* (2A); marker (M); controllo negativo (-). Lunghezza amplificato *Ae- γ -GT1*:1763 pb (*); *Ae- γ -GT2*: 1850 pb (**).

3.6.2 Clonaggio del cDNA nel vettore di espressione pACEBac1

Gli amplificati *Ae- γ -GT1* e *Ae- γ -GT2* sono stati inseriti nel vettore pACEBac1 utilizzando la tecnica di clonaggio RF-cloning e la successiva trasformazione in cellule batteriche rese chimicamente competenti.

Il DNA plasmidico purificato dalle colture batteriche è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Confrontando la lunghezza dei prodotti ottenuti con un marker è stato possibile accertare la presenza di cloni positivi, in cui i frammenti amplificati (*Ae-γ-GT1* e *Ae-γ-GT2*) erano inseriti nel vettore. I cloni positivi avevano una dimensione attesa di circa 5000 pb.

Osservando il gel sono stati identificati diversi cloni positivi: 4 per *Ae-γ-GT1* (1A, 1B, 1C, 1D) e 2 per *Ae-γ-GT2* (2A, 2B) (Fig. 3.16).

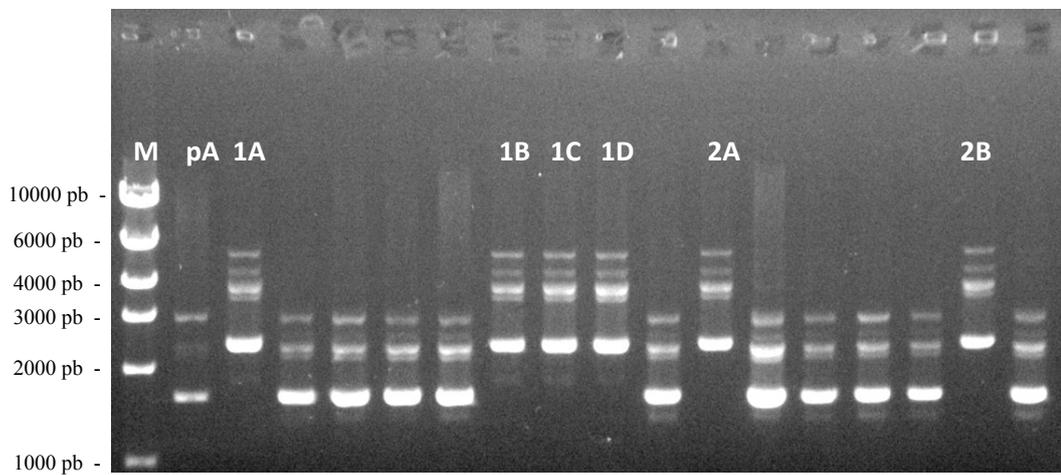


Figura 3.16. DNA plasmidico purificato. Cloni positivi *Ae-γ-GT1* (1A, 1B, 1C, 1D); cloni *Ae-γ-GT2* (2A, 2B); marker (M); vettore plasmidico pACEBac1 (pA).

I cloni positivi sono stati digeriti con l'enzima di restrizione BamH1; i cloni *Ae-γ-GT2* mostrano un solo frammento dopo la digestione in quanto l'enzima taglia una sola volta pACEBac1; invece nei cloni *Ae-γ-GT1* enzima taglia, oltre che nel vettore, anche nell'inserto producendo così due frammenti.

I campioni sono stati caricati su gel d'agarosio e sottoposti a corsa elettroforetica in presenza di un marker e così è stato possibile identificare le bande di dimensioni attese: 3000 pb (pACEBac1) +

2000 pb (inserto) nei cloni *Ae-γ-GT1* e 5000 pb (pACEBac1 + inserto) nei cloni *Ae-γ-GT2* (Fig. 3.17).

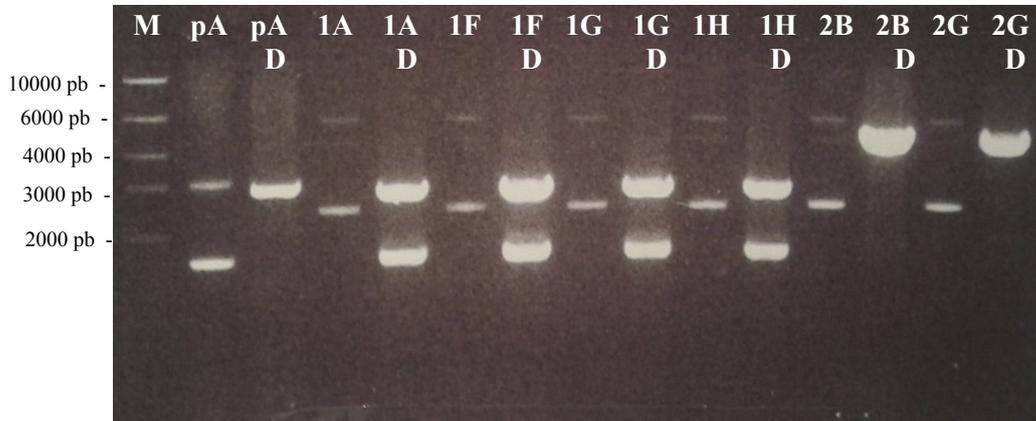


Figura 3.17. Digestione con BamH1. Cloni non digeriti (1A, 1F, 1G, 1H, 2B, 2G); cloni digeriti (D); marker (M); vettore plasmidico pACEBac1 (pA).

3.6.3 Produzione di bacmidi ricombinanti

I cloni pACEBac1-*Ae-γ-GT1* e pACEBac1-*Ae-γ-GT2* sono stati utilizzati per trasformazione delle cellule competenti DH10Bac, ottenendo i bacmidi ricombinanti.

Successivamente sono stati caricati su gel d'agarosio e sottoposti ad elettroforesi per controllare che non siano degradati (Fig. 3.18).

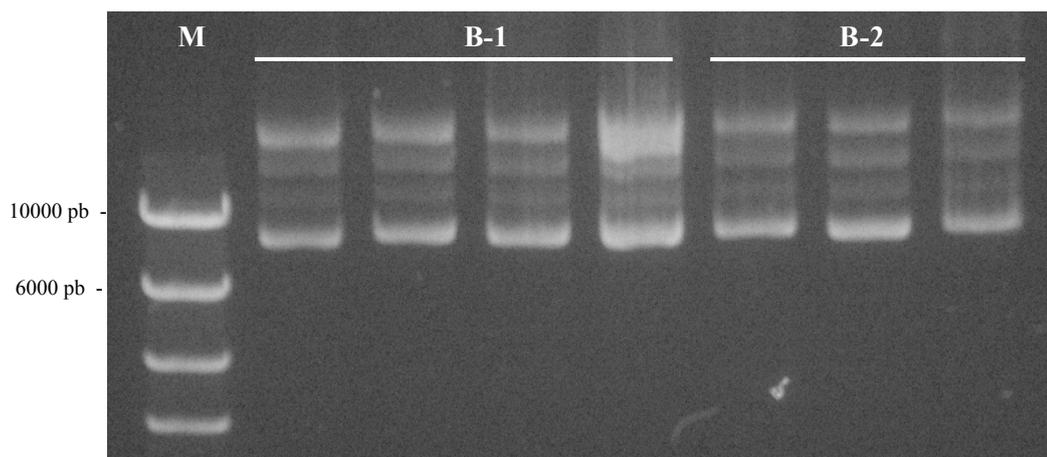


Figura 3.18. Bacmidi ricombinanti. Bacmidi-*Ae-γ*-GT1 (B-1); bacmidi-*Ae-γ*-GT2 (B-2); marker (M).

I Bacmidi così purificati, sono stati sequenziati con i primer riportati nella tabella 2.6 per verificare la sequenza nucleotidica degli inserti (*Ae-γ*-GT1 e *Ae-γ*-GT2), che è risultata essere completa e priva di mutazioni.

La concentrazione dei campioni è stata verificata allo spettrofotometro (260 nm).

3.6.4 Valutazione dell'espressione delle proteine ricombinanti nella produzione su piccola scala

Dopo aver infettato le cellule di insetto (Sf9) utilizzando baculovirus ricombinanti è stata valutata l'effettiva produzione delle proteine ricombinanti *Ae-γ*-GT1 e *Ae-γ*-GT2.

A tale scopo, sono stati effettuati esperimenti di Western blot sugli estratti proteici delle cellule Sf9 e del loro mezzo di coltura (Fig. 3.19).

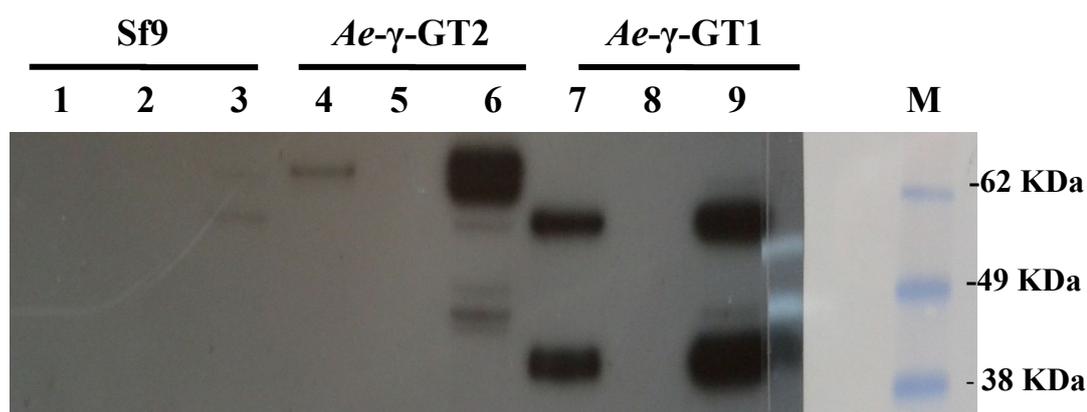


Figura 3.19. Western blot su cellule Sf9 lisate, infettate con il baculovirus-*Ae-γ-GT1* (9) o con il baculovirus-*Ae-γ-GT2* (6); cellule Sf9 non infettate (3); mezzo coltura cellulare (2)(5)(6); mezzo coltura cellulare dializzato e concentrato (1)(4)(7); marker di massa molecolare (M).

Nel lisato cellulare si riscontra la presenza delle due proteine ricombinanti (lane 6 e 9 in fig. 3.19), si evidenziano in particolare due bande, una per la proteina nativa (57 kDa per l' *Ae-γ-GT1* e 62 kDa per l'*Ae-γ-GT2* come ricavato dalle sequenze amminoacidi che codificate dai cDNA delle due isoforme) e l'altra per la subunità maggiore (36 kDa per l'*Ae-γ-GT1*) che presenta il tag FLAG riconosciuto dall'anticorpo primario. Le γ -GT infatti, e così le due isoforme in *A. ervi*, sono eterodimeri le cui subunità sono associate in forma non covalente e vengono separate tramite processamento post-traduzionale autocatalitico (Castellano e Merlino 2012). La subunità più grande ha dimensioni comprese tra i 38 e i 72 kDa mentre quella più piccola tra i 20 e i 66 kDa, a seconda della diversa glicosilazione nei diversi organismi. Nelle condizioni sperimentali utilizzate il processamento avviene in forma limitata nel caso della *Ae-γ-GT2* (lane 4 e 6 in fig. 3.19).

I risultati dell'Western blot mostrano inoltre le due proteine ricombinanti sono soprattutto contenute nelle cellule e solo una

piccola parte è rilasciata nel mezzo di coltura, dove è possibile evidenziarla soltanto in seguito a concentrazione del mezzo (line 4 e 7 in fig. 3.19). Le proteine presenti nel mezzo potrebbero essere state escrete dalle cellule ma anche rilasciate dalle stesse in seguito alla loro morte.

3.7 Produzione delle proteine ricombinanti su larga scala

Il dosaggio dell'attività γ -GTasica nel lisato delle cellule esprimenti le due isoforme di *Ae*- γ -GT è stato effettuato seguendo il protocollo utilizzato per la misura dell'attività enzimatica del veleno estratto da femmine di *A. ervi* e dell'enzima purificato per HPLC (Falabella et al., 2007). Nei campioni dei lisati non si è osservato alcun aumento di assorbanza e dunque non è presente attività enzimatica apprezzabile nelle condizioni sperimentali utilizzate.

Questo dato supporterebbe l'ipotesi che le *Ae*- γ -GT non siano coinvolte nella sindrome da parassitizzazione per la loro attività enzimatica, bensì piuttosto per l'alterazione del ciclo del GSH, limitando la disponibilità di substrato per la γ -GT presente nei tessuti dell'ospite.

3.8 Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato chiarito che il maggior sito di espressione delle *Ae*- γ -GT sono le ghiandole del veleno e che queste

proteine potrebbero avere un ruolo nella diminuzione di concentrazione di GSH nei tessuti dell'ospite, che è stata osservata negli ovari a seguito della parassitizzazione da parte di *A. ervi*.

La diminuzione di GSH è un fattore estremamente critico in quanto la sua ossidazione protegge la cellula dal danno causato dai radicali liberi. Per questa ragione è probabile un effetto diretto dell'abbassamento del suo titolo sull'apoptosi, degenerazione a cui vanno incontro le cellule degli ovari dell'ospite in seguito alla parassitizzazione.

Il lavoro sperimentale svolto ha inoltre portato alla produzione di due *Ae-γ-GT* ricombinanti e dei dsRNA in grado di silenziare i geni *in vivo* che saranno fondamentali per una completa caratterizzazione funzionale delle γ -GT nel veleno del parassitoide *A. ervi*. Tale caratterizzazione potrà consentire di comprendere la specificità di azione di queste molecole sui tessuti riproduttivi, che non sembrano assolutamente influenzare altri tipi cellulari. Ciò sarà particolarmente rilevante per valutare la selettività di azione di queste potenziali molecole bioinsetticide, anche in vista di un loro possibile utilizzo per lo sviluppo di nuove strategie di controllo degli insetti dannosi.

BIBLIOGRAFIA

- Alberghini, S., Filippini, R., Marchetti, E., Dindo, M.L., Shevelev, A.B., Battisti, A. et al. (2005). Construction of a *Pseudomonas* sp. derivative carrying the cry9Aa gene from *Bacillus thuringiensis* and a proposal for new standard criteria to assess entomocidal properties of bacteria. *Research in Microbiology* 156, 690-699.
- Alberghini, S., Filippini, R., Shevelev, A.B., Squartini, A. and Battisti, A. (2006). Extended plant protection by an epiphytic *Pseudomonas* sp. Derivative carrying the cry9Aa gene from *Bacillus thuringiensis galleriae* against the pine processionary moth *Thaumetopoea pityocampa*. *Biocontrol Science and Technology* 16, 709-715.
- Aquilano, K., Baldelli, S. and Ciriolo, M.R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology* 5, art. 196.
- Asgari, S. (2006). Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 61, 146-156.
- Asgari, S. and Rivers, D.B. (2011). Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annual Review of Entomology* 56, 313-335.
- Asgari, S., Zhang, G., Zareie, R. and Schmidt, O. (2003). A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 33, 1017-1024.

- Bale, J.S., van Lenteren, J.C. and Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society, Serie B Biological science* 363, 761-776.
- Battaglia, D., Poppy, G., Powell, W., Romano, A., Tranfaglia, A. and Pennacchio, F. (2000). Physical and chemical cues influencing the oviposition behaviour of *Aphidius ervi*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 94, 219-227.
- Beck, M. and Strand, M.R. (2005). Glc1.8 from *Microplitis demolitor* bracovirus induces a loss of adhesion and phagocytosis in insect high five and S2 cells. *Journal of Virology* 79, 1861-1870.
- Beckage, N.E. (1998). Modulation of immune responses to parasitoids by polydnviruses. *Parasitology* 116 Suppl, S57-64.
- Beckage, N.E. and Gelman, D.B. (2004). Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *The Annual Review of Entomology* 49, 299-330.
- Bell, H.A., Kirkbride-Smith, A.E., Marris, G.C. and Edwards, J.P. (2004). Teratocytes of the solitary endoparasitoid *Meteorus gyrator* (Hymenoptera: Braconidae): morphology, numbers and possible functions. *Physiological Entomology* 29, 335-343.
- Bradleigh Vinson, S., Malva, C., Varricchio, P., Sordetti, R., Falabella, P. and Pennacchio, F. (1998). Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Physiology* 44, 845-857.

- Brookes, G. and Barfoot, P. (2005). GM crops: the global economic and environmental impact: the first nine years 1996-2004. AgBioForum.
- Burke, G.R., Thomas, S.A., Eum, J.H. and Strand, M.R. (2013). Mutualistic polydnavirusesshare essential replication gene functions with pathogenic ancestors. PLOS pathogens. 9, e1003348.
- Caccia, S., Grimaldi, A., Casartelli, M., Falabella, P., de Eguileor, M., Pennacchio, F. and Giordana, B. (2012). Functional analysis of a fatty acid binding protein produced by *Aphidius ervi* teratocytes. Journal of Insect Physiology 58, 621-627.
- Casida, J.E. and Quistad, G.B. (1998). Golden age of insecticide research: past, present or future? Annual Review of Entomology 43, 1-16.
- Castellano, I. and Merlino, A. (2012). γ -Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications. Cellular and Molecular Life Sciences 69, 3381-3394.
- Choi, J.Y., Kwon, S.J., Roh, J.Y., Yang, T.J., Yoon, S.H., Kim, H. et al. (2009). Sequence and gene organization of 24 circles from the *Cotesia plutellae* bracovirus genome. Archives of Virology 154, 1313-1327.
- Choi, J.Y., Whitten, M.M.A., Cho, M.Y., Lee, K.Y., Kim, M.S., Ratcliffe, N.A. et al. (2002). Calreticulin enriched as an early-stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae. Developmental and Comparative Immunology 26, 335-343.

- Christiaens, O., Swevers, L. and Smagghe, G. (2014). dsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53, 307-314.
- Christiansen-Weniger, P. and Hardie, J. (2000). The influence of parasitism on wing development in male and female pea aphids. *Journal of Insect Physiology* 46, 861-867.
- Colinet, D., Anselme, C., Deleury, E., Mancini, D., Poulain, J., Azéma-Dossat, C. et al. (2014). Identification of the main venom protein components of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp of the aphid model *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Genomics* 15, 342.
- Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezen, J.M. and Poirié, M. (2009). A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina bouvardi* targets the *Drosophila* pheno-oxidase cascade. *Developmental and Comparative Immunology* 33, 681-689.
- Colinet, D., Mathé-Hubert, H., Allemand, R., Gatti, J.L., Poirié, M. (2013). Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps: from a phylogenetic to a population approach. *Journal of Insect Physiology* 59, 205-212.
- Colinet, D., Schmitz, A., Depoix, D., Crochard, D. and Poirié, M. (2007). Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens. *PLOS Pathogens* 3, 203.
- Contreras-Gómez, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E. and Chisti, Y. (2013). Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology Progress* 30(1), 1-18.
- Dahlman, D.L. and Vinson, S.B. (1993). Teratocytes: Developmental and Biochemical Characteristics. In: *Parasites and Pathogens of*

- Insects. Edited by Beckage, N.E., Thompson, S.A. and Federici, B.A. San Diego: Academic Press, chapter 7, pp 145-165.
- De Bach, P (1964). Biological control of insect pests and weeds. New York: Reinhold Publishing Corporation.
- de Eguileor, M., Grimaldi, A., Tettamanti, G., Valvassori, R., Leonardi, M.G., Giordana, B., Tremblay, E., M.C., Digilio and Pennacchio, F. (2001). Larval anatomy and structure of absorbing epithelia in the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). *Arthropod Structure and Development* 30, 27-37.
- Dent, D.R. (1995). Integrated Pest Management. London: Chapman and Hall.
- Di Lelio, I., Varricchio, P., Di Prisco, G., Marinelli, A., Lasco, V., Caccia, S., Casartelli, M., Giordana, B., Rao, R., Gigliotti, S. and Pennacchio, F. (2014). Functional analysis of an immune gene of *Spodoptera littoralis* by RNAi. *Journal of Insect Physiology* 64, 90-97.
- Digilio, M.C. and Pennacchio, F. (1989). Analisi quantitative di alcuni parametri biologici caratterizzanti una popolazione italiana di *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Bolletino del laboratorio di entomologia agraria* 46, 59-74
- Digilio, M.C., Isidoro, N., Tremblay, E. and Pennacchio, F. (2000). Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *Journal of Insect Physiology* 46, 1041-1050.
- Dominici, S., Paolicchi, A., Corti, A., Maellaro, E. and Pompella, A. (2005). Prooxidant Reactions Promoted by Soluble and Cell-Bound [gamma]-Glutamyltransferase Activity. In: *Methods in*

- Enzymology. Edited by Sies, H. and Packer, L.. St Louis: Academic Press, vol 401, pp 484-501.
- Dupas, S., Dubuffet, A., Carton, Y. and Poirie, M. (2009). Local, geographic and phylogenetic scales of coevolution in *Drosophila*-parasitoid interactions. *Advances in Parasitology* 70, 281-295.
- Dupas, S., Turnbull, M.W. and Webb, B.A. (2003). Diversifying selection in a parasitoid's symbiotic virus among genes involved in inhibiting host immunity. *Immunogenetics* 55, 351–361.
- Er, A., Uçkan, F., Rivers, D.B., Ergin, E. and Sak, O. (2010). Effects of parasitization and envenomation by the endoparasitic wasp *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on hemocyte numbers, morphology, and viability of its host *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) and toward an embryonic cell line from *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America* 103, 273-282.
- Falabella, P., Perugino, G., Caccialupi, P., Riviello, L., Varricchio, P., Tranfaglia, A., Rossi, M., Malva, C., Graziani, F., Moracci, M. and Pennacchio, F. (2005). A novel fatty acid binding protein produced by teratocytes of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. *Insect Molecular Biology* 14, 195-205.
- Falabella, P., Riviello, L., Caccialupi, P., Rossodivita, T., Teresa Valente, M., Luisa De Stradis, M., Tranfaglia, A., Varricchio, P., Gigliotti, S., Graziani, F. et al. (2007). A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 453-465.

- Falabella, P., Riviello, L., De Stradis, M.L., Stigliano, C., Varricchio, P., Grimaldi, A., De Eguileor, M., Graziani, F., Gigliotti, S. and Pennacchio, F. (2009). *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 801-813.
- Falabella, P., Tremblay, E. and Pennacchio, F. (2000). Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 97, 1-9.
- Fang, Q., Wang, F, Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R., Chen, X-x et al. (2011) Venom of Parasitoid, *Pteromalus puparum*, Suppresses Host, *Pieris rapae*, Immune Promotion by Decreasing Host C-Type Lectin Gene Expression. *PLOS ONE* 6 (10), e26888.
- Fath-Goodin, A., Gill, T.A., Martin, S.B. and Webb, B.A. (2006). Effect of *Campoletis sonorensis* cys motif proteins on *Heliothis virescens* larval development. *Journal of Insect Physiology* 52, 576-585.
- Gatti, E., Durant, A.J., Gibbard, P.L. and Oppenheimer, C. (2011). Youngest Toba tuff in the Son Valley, India: a weak and discontinuous stratigraphic marker. *Quaternary Science Reviews* 30, 3925-3935
- Gilchrist, G.W. (1996). A Quantitative Genetic Analysis of Thermal Sensitivity in the Locomotor Performance Curve of *Aphidius ervi*. *Evolution* 50, 1560-1572.
- Giordana, B., Milani, A., Grimaldi, A., Farneti, R., Casartelli, M., Ambrosecchio, M.R., Digilio, M.C., Leonardi, M.G., de Eguileor, M. and Pennacchio, F. (2003). Absorption of sugars

- and aminoacids by the epidermis of *Aphidius ervi* larvae. Journal of Insect Physiology 49, 1115-1124.
- Godfray, H.J.C. (1994). Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology. Princeton: Princeton University Press.
- Gonzalez, D., White, W., Hall, J. and Dickson, R.C. (1978). Geographical distribution of Aphidiidae (Hym.) imported to California for biological control of *Acyrtosiphon kondoi* and *Acyrtosiphon pisum* (Hom.: Aphididae). Entomophaga 23, 239-248.
- Grimaldi, A., Caccia, S., Congiu, T., Ferrarese, R., Tettamanti, G., Rivas-Pena, M., Perletti, G., Valvassori, R., Giordana, B., Falabella, P. et al. (2006). Structure and function of the extraembryonic membrane persisting around the larvae of the parasitoid *Toxoneuron nigriceps*. Journal of Insect Physiology 52, 870-880.
- Guerrieri, E., Pennacchio, F. and Tremblay, E. (1993). Flight behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) in response to plant and host volatiles. European Journal of Entomology 90, 415-415.
- Guerrieri, E., Pennacchio, F. and Tremblay, E. (1997). Effect of Adult Experience on in-Flight Orientation to Plant and Plant-Host Complex Volatiles in *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera, Braconidae). Biological Control 10, 159-165.
- Hardie, J. (1987). Neurosecretory and endocrine systems. Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control (Minks, AK and Harrewijn, AP, Eds) 2, 139-151.

- He, X.Z. and Wang, Q. (2006). Host age preference in *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *New Zealand Plant Protection* 59, 195.
- He, X.Z. and Wang, Q. (2008). Reproductive strategies of *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera: Aphidiidae). *Biological Control* 45, 281-287.
- He, X.Z., Wang, Q. and Teulon, D.A.J. (2004). Emergence, sexual maturation and oviposition of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *New Zealand Plant Protection* 57, 214.
- He, X.Z., Wang, Q. and Teulon, D.A.J. (2005). The effect of parasitism by *Aphidius ervi* on development and reproduction of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *New Zealand Plant Protection* 58, 202.
- Ignoffo, C.M. (1975). Evaluation of *in vivo* specificity of insect viruses. In: *Baculovirus for Insect Pest Control*: Edited by Summers, M.D., Engler, R., Falcon. L.A., Vail, P.V. Washington: Safety Considerations, ASM, pp 52-57.
- Inceoglu, A.B., Kamita, S.G. and Hammock, B.D. (2006). Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Advances in Virus Research* 68, 323-360.
- Johnson, B. (1965). Premature Breakdown of the Prothoracic Glands in Parasitized Aphids. *Nature* 206, 958-959.
- Kaeslin, M., Reinhard, M., Bühler, D., Roth, T., Pfister-Wilhelm, R. and Lanzrein, B. (2010). Venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* is a complex mixture and has multiple biological effects. *Journal of Insect Physiology* 56, 686-694.
- Kamita, S.G., Kang, K.-D., Hammock, B.D. and Inceoglu, A.B., (2005). Genetically modified baculoviruses for pest insect

- control. In: Comprehensive Molecular Insect Science. Edited by Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S. San Diego: Elsevier, chapter 6, pp 271-322.
- King, B.H. (1989). Host-size-dependent sex ratios among parasitoid wasps: does host growth matter? *Oecologia* 78, 420-426.
- Kring, T.J. and Kring, J.B. (1988). Aphid fecundity, reproductive longevity, and parasite development in the *Schizaphis graminum* (Rondani) (Homoptera: Aphididae)–*Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) system. *The Canadian Entomologist* 120, 1079-1083.
- Kroemer, J.A. and Webb, B.A. (2004). Polydnavirus Genes And Genomes: Emerging Gene Families and New Insights into Polydnavirus Replication. *Annual Review of Entomology* 49, 431-456.
- Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J-M et al. (2005). A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)–*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 93-103.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25, 697-743.
- Li, K.M., Ren, L.Y., Zhang, Y.J., Wu, K.M. and Guo, Y.Y. (2012). Knockdown of *Microplitis mediator* odorant receptor involved in the sensitive detection of two chemicals. *Journal of Chemical Ecology* 38, 287-294.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.

- Lynch, J.A. and Desplan, C. (2006). A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nature Protocols* 1, 486-494.
- Mackauer, M. and Campbell, A. (1972). The establishment of 3 exotic aphid parasites (Hymenoptera: Aphidiidae) in British Columbia. *Journal of the Entomological Society of British Columbia* 69, 54-58.
- Mackauer, M. (1983). Quantitative assessment of *Aphidius Smithi* (Hymenoptera: Aphidiidae): Fecundity, intrinsic rate of increase, and functional response. *The Canadian Entomologist* 115, 399-415.
- Maiti, I.B., Dey, N., Pattanaik, S., Dahlman, D.L., Rana, R.L. and Webb, B.A. (2003). Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*) *Plant Biotechnology Journal* 1, 209-219.
- Malva, C., Varricchio, P., Falabella, P., La Scaleia, R., Graziani, F. and Pennacchio, F. (2004). Physiological and molecular interaction in the host-parasitoid system *Heliothis virescens*-*Toxoneuron nigriceps*: current status and future perspectives. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 177-183.
- Masi, A., Ghisi, R. and Ferretti, M. (2002). Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. *Journal of Plant Physiology*. 159, 499-507.
- Matranga, C., and Zamore, P.D. (2007). Primer: Small Silencing RNAs *Current Biology* 17, R789-93.

- Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods in Enzymology* 251, 3-7.
- Oerke, E.C. and Dehne, H.W. (2004). Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* 23, 275-285.
- Paolicchi, A., Dominici, S., Pieri, L., Maellaro, E. and Pompella, A. (2002). Glutathione catabolism as a signaling mechanism. *Biochemical Pharmacology* 64, 1027-1035.
- Pedata, P.A., Garonna, A.P., Zabatta, A., Zeppa, P., Romani, R. and Isidoro, N. (2003). Development and morphology of teratocytes in *Encarsia berlesei* and *Encarsia citrina*: first record for Chalcidoidea. *Journal of Insect Physiology* 49, 1063-1071.
- Pennacchio, F. (2010). Le biotecnologie: le molecole, le cellule, gli organismi. *Accademia Nazionale dei Lincei* 123, 1-59.
- Pennacchio, F. and Digilio, M.C. (1990). Morphology and development of larval instars of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Bollettino Del Laboratorio Di Entomologia Agraria Filippo Silvestri* 46, 163-174.
- Pennacchio, F. and Mancini, D. (2012). Aphid Parasitoid Venom and its Role in Host Regulation. In: *Parasitoid Viruses*. Edited by Beckage, N.E. and Drezen, J-M. San Diego: Academic Press, chapter 20, pp 247-254.
- Pennacchio, F. and Strand, M.R. (2006). Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 51, 233-258.
- Pennacchio, F., Digilio, M.C. and Tremblay, E. (2005). Biochemical and metabolic alterations in *Acyrtosiphon pisum* parasitized by

- Aphidius ervi*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 30, 351-367.
- Pennacchio, F., Vinson, S.B. and Tremblay, E. (1994). Morphology and ultrastructure of the serosal cells (teratocytes) in *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) embryos. International Journal of Insect Morphology and Embryology 23, 93-104.
- Poirié, M., Carton, Y. and Dubuffet, A. (2009). Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. Comptes Rendus Biologies 332 (2-3), 311-320.
- Polaszek, A. (1986). The effects of two species of hymenopterous parasitoid on the reproductive system of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Entomologia Experimentalis Et Applicata 40, 285-292.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V. and Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochemical Pharmacology 66, 1499-1503.
- Powell, W., Pennacchio, F., Poppy, G. and Tremblay, E. (1998). Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). Biological Control 11, 104-112.
- Quicke, D.L.J., Van Achterberg, K. and Godfray, H.C.J. (1997). Comparative morphology of the venom gland and reservoir in opiine and alysiine braconid wasps (Insecta, Hymenoptera, Braconidae). Zoologica Scripta 26, 23-50.
- Richards, E.H., Edwards, J.P. (2002). Larvae of the ectoparasitic wasp, *Eulophus pennicornis*, release factors which adversely

- affect hemocytes of their host, *Lacanobia oleracea*. *Journal of Invertebrate Pathology* 48, 845-855.
- Rivers, D.B. and Brogan, A. (2008). Venom glands from the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) produce a calreticulin-like protein that functions in developmental arrest and cell death in the flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). In: *Insect Physiology*. Edited by Maes, R.P. New York: Nova Science Publishers, pp 256-278.
- Rivers, D.B., Dani, M.P. and Richards, E.H. (2009). The mode of action of venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumonidae) involves Ca₂-dependent cell death pathways. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 71, 173-190.
- Rivers, D.B., Ruggiero, L. and Hayes, M. (2002). The ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) differentially affects cells mediating the immune response of its flesh fly host, *Sarcophaga bullata* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Insect Physiology* 48, 1053-1064.
- Schepers, E.J., Dahlman, D.L. and Zhang, D. (1998). Microplitis croceipes teratocytes: in vitro culture and biological activity of teratocyte secreted protein. *Journal of Insect Physiology* 44, 767-777.
- Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfried, B.D., Hunter, W.B., Smagghe, G, Zhu, K.Y. and Douglas, A.E. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology* 59, 1212-1221.

- Sequeira, R. and Mackauer, M. (1992). Nutritional ecology of an insect Host-Parasitoid association: The Pea Aphid-*Aphidius ervi* system. *Ecology* 73, 183-189.
- Shaw, M.R. and Huddleston, T. (1991) Classification and biology of braconid wasps. Royal Entomological Society.
- Sokolenko, S., George, S., Wagner, A., Tuladhar, A., Andrich, J. M. S. and Aucoin, M.G. (2012). Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks. *Biotechnology Advances* 30 (3), 766-81.
- Sary, P. (1962). Hymenopterous parasites of the pea aphid *Acyrtosiphon onobrychis* (Boyer) in Czechoslovakia. I. Bionomics and ecology of *Aphidius ervi* Haliday. *Folia Zoologica Brno* 11, 265-278.
- Stoltz, D.B., Guzo, D., Belland, E.R., Lucarotti, C.J. and MacKinnon, E.A. (1988). Venom promotes uncoating *in vitro* and persistence *in vivo* of a braconid polydnavirus. *Journal of General Virology* 69, 903-907.
- Strand, M.R. (2008). The insect cellular immune response. *The Insect Science* 15, 1-14.
- Strand, M.R. (2010). Polydnaviruses. In: *Insect Virology*. Edited by Asgari, S. and Johnson, K.N. Norwich: Caister Academic Press, pp 216-241.
- Strand, M.R. (2012). Polydnavirus gene expression profiling: what we know now. In: *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens*. Edited by Beckage, N.E. and Drezen, J-M. San Diego: Academic Press, pp 139-147.
- Strand, M.R. and Burke, G.R. (2012). Polydnaviruses as symbionts and gene delivery systems. *PLOS Pathogens* 8, e1002757.

- Strand, M.R. and Pech, L.L. (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology* 40, 31-56.
- Strand, M.R. and Wong, E.A. (1991). The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* 37, 503-515.
- Tanaka, T. and Wago, H. (1990). Ultrastructural and functional maturation of teratocytes of *Apanteles kariyai*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 13, 187-197.
- Toenniessen, G.H., O'Toole, J.C. and DeVries, J. (2003). Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 191-198.
- Tremblay, E. (2005). *Entomologia applicata*. Napoli: Liguori Editore.
- Tremblay, E., Pennacchio, F. and Digilio, M.C. (1998). Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Insect Physiology* 44, 779-784.
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R. and Peleg, Y. (2010). Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology* 172(1), 34-44.
- Vacek, M., Reynaets, A., Hofte, H., Jansens, S., Beukeleer, M.D., Dean, C. et al. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.
- van den Ent, F. and Lowe, J. (2006). RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 67, 67-74.

- van Rij, R.P. and Berezikov, E. (2009). Small RNAs and the control of transposons and viruses in *Drosophila*. *Trends in Microbiology* 17, 163-71.
- Viggiani, G. (1977). *Lotta biologica ed integrata*. Napoli: Liguori Editore.
- Viggiani, G. (1994). *Lotta biologica e integrata nella difesa fitosanitaria*. Napoli: Liguori Editore.
- Vinson, S.B., Pennacchio, F. and Consoli, F.L. (2001). The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective. *Endocrine interactions of insect parasites and pathogens*. Oxford: BIOS Science Publisher, pp 187-206.
- Washburn, J.O., Haas-Stapleton, E.J., Tan, F.F., Beckage, N.E. and Volkman, L.E. (2000). Co-infection of manduca sexta larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Insect Physiology* 46(2), 179-190.
- Weaver, R.J., Marris, G.C., Bell, H.A. and Edwards, J.P. (2001). Identity and mode of action of the host endocrine disrupters from the venom of parasitoid wasps. In: *Endocrine interactions of insect parasites and pathogens*. Edited by Edwards, J.P., Weaver, R.J. Oxford: BIOS Science Publisher, pp 33-85.
- Webb, B.A. and Strand, M.R. (2005). The biology and genomics of polydnaviruses. In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Edited by Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S. San Diego: Elsevier, pp 323-360.
- Webb, B.A., Strand, M.R., Dickey, S.E., Beck, M.H., Hilgarth, R.S., Barney, W.E., Kadash, K., Kroemer, J.A., Lindstrom, K.G.,

- Rattanadechakul, W. et al. (2006). Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. *Virology* 347, 160-174.
- Whetstone, P.A. and Hammock, B.D. (2007). Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control. *Toxicon* 49, 576-596.
- Whitfield, J.B. (2003). Phylogenetic Insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera. In: *Advances in Parasitology*. Edited by Littlewood, T. London: Academic Press, pp 69-100.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell biology* 11, 228-234.
- Wu, M.L., Ye, G.Y., Zhu, J.Y., Chen, X.X. and Hu, C. (2008). Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 186-191.
- Ye, G.Y., Zhu, J.Y., Zhang, Z., Fang, Q., Cai, J. and Hu, C. (2007). Venom from the endoparasitoid *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) adversely affects host hemocytes: differential toxicity and microstructural and ultrastructural changes in plasmatocytes and granular cells. In: *Recent Advances in the Biochemistry, Toxicity, and Mode of Action of Parasitic Wasp Venoms*. Edited by Rivers, D. and Yolder, J. Kerala: Research Signpost, pp 115-127.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J.M., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H. and Smagghe, G. (2013). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science* 20, 4-14.

- Zhang, D., Dahlman, D.L. and Järlfors, U.E. (1997). Effects of *Microplitis croceipes* teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation. *Journal of Insect Physiology* 43, 577-585.
- Zhang, G., Schmidt, O. and Asgari, S. (2006). A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 756-64.
- Zhu, J.Y., Fang, Q., Wang, L., Hu, C., Ye, G.Y. (2010). Proteomic analysis of the venom from the endoparasitoid *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 75, 28-44.