

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

XIX CICLO

Indirizzo Entomologia generale e applicata

TESI DI DOTTORATO

**PECULIARITÀ RIPRODUTTIVE E DI SVILUPPO IN ALCUNE SPECIE
DEL GENERE *ENCARSIA* FOERSTER (HYMENOPTERA APHELINIDAE)**

RELATORE:
PROF. : A. P. GARONNA

CORRELATORE:
DOTT. P. A. PEDATA

CANDIDATO:
DOTT. DONATO MANCINI

IL COORDINATORE DEL CORSO
PROF. ANTONIO VIOLANTE

Anno 2006

La presente tesi di dottorato è stata svolta sotto la guida del Prof. Antonio Pietro Garonna, componente del collegio dei docenti del dottorato in Agrobiologia e Agrochimica, indirizzo Entomologia generale e applicata, dell'Università degli studi di Napoli "Federico II".

INDICE

INTRODUZIONE	1
IL GENERE <i>ENCARSIA</i> FOERSTER.....	4
PECULIARITÀ BIOLOGICHE NEL GENERE <i>ENCARSIA</i>	6
Partenogenesi telitoca.....	6
Membrane extra-embrionali.....	8
SCOPODELLATESI.....	10
CENNI SISTEMATICI E MORFO-BIOLOGICI SULLE TRE	
SPECIE ESAMINATE.....	12
<i>E. pergandiella</i> Howard.....	12
<i>E. formosa</i> Gahan.....	12
<i>E. lutea</i> (Masi).....	13
MATERIALI E METODI.....	15
Produzione e raccolta dei campioni.....	15
Microscopia ottica: fissaggio e colorazione dei campioni.....	17
Microscopia a fluorescenza: fissaggio e colorazione dei campioni....	17
Microscopia elettronica.....	18
Analisi morfometrica dei teratociti.....	19
RISULTATI.....	20
Struttura degli ovari.....	20
Prime fasi dello sviluppo embrionale.....	21
<i>E.pergandiella</i>	21

<i>E. formosa</i>	23
<i>E. lutea</i>	25
Meccanismo citogenetico della partenogenesi in <i>E. formosa</i>	26
Membrane extra-embryonali e teratociti in <i>E. pergandiella</i> con accenni su <i>E. lutea</i>	29
<i>E. pergandiella</i>	29
<i>E. lutea</i>	31
DISCUSSIONE	33
Sviluppo embrionale in <i>E. pergandiella</i> , <i>E. formosa</i> ed <i>E. lutea</i>	33
Partenogenesi telitoca in <i>E. formosa</i>	36
Membrana extra-embryonale e teratociti in <i>E. pergandiella</i> ed <i>E.</i> <i>lutea</i>	38
CONCLUSIONI.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	44

INTRODUZIONE

Gli Imenotteri Afelinidi rappresentano il più importante gruppo di Calcidoidei impiegato nel controllo biologico di numerosi fitofagi dannosi in agricoltura.

Sono attualmente note circa un migliaio di specie, ripartite tra una cinquantina di generi, la cui classificazione è ancora in stato di flusso (Viggiani, 1988; 1997).

Gli Afelinidi sono ben distribuiti in tutto il mondo. Molte specie sono state introdotte in areali diversi da quelli di provenienza grazie ai succitati programmi di controllo biologico, ma anche ad altre attività umane.

Gli adulti appaiono come minuscole vespe che di rado superano il millimetro di lunghezza. Dal punto di vista morfologico sono piuttosto uniformi ed includono specie con biologie e modelli comportamentali assai variabili. Il dimorfismo sessuale in taluni casi è molto accentuato e, sostanzialmente, riguarda i caratteri primari e le antenne.

Molti Afelinidi parassitizzano sia gli stadi giovanili sia quelli immaginali di una grande varietà di Homoptera Sternorrhyncha (Aleyrodoidea, Coccoidea ed Aphidoidea) (Yasnosh, 1980; Viggiani, 1981). Alcuni di essi attaccano, anche, uova di Homoptera Auchenorrhyncha, Orthoptera e Lepidoptera (Viggiani, 1988). Gli adulti, alla stregua di altri Imenotteri parassitoidi, si alimentano di sostanze zuccherine di varia natura (melata, nettare, ecc.), ma quelli di alcune specie possono nutrirsi a spese degli ospiti infliggendo con l'ovipositore delle ferite di alimentazione (*host feeding*).

L'aspetto riproduttivo manifesta diverse peculiarità, sebbene si realizzi attraverso strutture, schemi e comportamenti, comuni anche in altri Imenotteri.

Negli Afelinidi, ed in genere negli Imenotteri, l'aplodiploidia è un meccanismo di determinazione del sesso piuttosto comune. Secondo tale meccanismo il processo di fertilizzazione è una decisione che compete alle femmine. Pertanto, le uova di una singola femmina potranno evolversi, facoltativamente, in uno dei due sessi.

Da uova fecondate si originano, quindi, femmine diploidi mentre i maschi, che ricevono solo i cromosomi materni, risultano aploidi e sviluppano partenogeneticamente.

L'arrenotocchia è il più diffuso tipo di partenogenesi negli Afelinidi, benchè la telitocchia, particolare tipo di partenogenesi in cui femmine non fertilizzate producono solo prole femminile diploide, sia piuttosto comune in alcuni generi.

Nella riproduzione partenogenetica la cellula uovo evolve in un nuovo organismo senza fertilizzazione, da ciò ne conseguono importanti alterazioni di natura citologica e genetica (Suomalainen, 1962). Nelle specie con partenogenesi arrenotoca la ricombinazione, generalmente, ha luogo all'inizio dello sviluppo delle femmine. Per molti aspetti genetici, quindi, tali specie ricordano quelle bisessuali zigogenetiche.

La conseguenza evolutiva dell'arrenotocchia è che i caratteri recessivi, se controllati da un singolo gene, si mostreranno, approssimativamente, in metà della prole maschile. Inoltre, nelle specie in cui i maschi sono aploidi non potrà esserci un serbatoio di geni recessivi nascosti, come negli eterozigoti delle popolazioni bisessuali, poiché i geni recessivi letali, o comunque sfavorevoli, saranno soggetti, nei maschi, all'effetto della selezione naturale (Zinna, 1961). Si arguisce, da quanto affermato, che nelle specie con maschi aploidi le femmine saranno più omozigoti che in quelle con maschi diploidi.

Nel gruppo si manifesta un fenomeno biologico unico tra gli Imenotteri: lo sviluppo sesso-differenziato o eteronomia (Walter, 1983; Quicke, 1997).

L'eteronomia è stata segnalata in numerose specie di diversi generi di Afelinidi e tra queste si ricordano quelle appartenenti ad *Encarsia*.

Negli Afelinidi eteronomi maschi e femmine conspecifici evolvono su differenti ospiti, talvolta, seguendo complessi schemi.

Le varie modalità di sviluppo esibite dai maschi eteronomi sono state delineate nei lavori di diversi autori (Zinna, 1961; Viggiani, 1981, 1997; Williams e Polaszek, 1996).

IL GENERE *ENCARSIA* FOERSTER

Le specie ascrivibili al genere *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae) espletano un ruolo determinante quali agenti di contenimento biotici di numerosi gruppi di Omotteri Sternorrinchi di notevole interesse agrario (Aleirodidi, Coccoidei ed in minor misura Afidoidei) (Evans *et al.*, 1995; Huang e Polaszek, 1998).

Nell'ambito della famiglia Aphelinidae *Encarsia* è il genere più rappresentato, potendo contare circa 300 entità (Polaszek *et al.*, 1999; Pedata e Polaszek, 2003).

Le specie italiane sono state riviste da Viggiani (1987) in un lavoro monografico, in cui è disponibile una chiave dicotomica per la loro identificazione.

Encarsia è un genere alquanto ostico dal punto di vista tassonomico. Benché siano numerosi i lavori che recentemente hanno contribuito all'identificazione di questi parassitoidi (Viggiani, 1985, 1987; Hayat, 1989, 1998; Polaszek *et al.* 1992, 1999; Evans e Polaszek, 1998; Huang e Polaszek, 1998), risulta ancora da chiarire lo status tassonomico di molte specie già impiegate in programmi di controllo biologico (Giorgini e Baldanza, 2004).

Attualmente si riconoscono 29 gruppi-specie nell'ambito del genere, ma solo alcuni di questi possono essere separati da caratteri morfologici discreti (Manzari *et al.*, 2002). Sebbene lo studio sistematico del gruppo si realizzi attraverso l'acquisizione di dati di varia natura, si assiste ad un crescente impiego delle tecniche molecolari. Nonostante l'elevato potere risolutivo di queste ultime, i cui risultati concordano con quelli dell'indagine morfologica solo per i principali gruppi-specie (Babcock *et al.*, 2001), ancora non si è riusciti a disegnare un quadro soddisfacente della filogenesi del gruppo.

Per tale motivo, alcune entità sono state diversamente inquadrare ed incluse in differenti gruppi-specie da vari autori (Viggiani e Mazzone, 1979; Heraty e Polaszek, 2000).

PECULIARITÀ BIOLOGICHE NEL GENERE *ENCARSIA*

Encarsia, alla stregua di altri generi della famiglia Afelinidae (Williams e Polaszek, 1996), manifesta una spiccata asimmetria sessuale nel relazionarsi con l'ospite.

Nelle specie biparentali, per esempio, le femmine sviluppano da uova deposte direttamente nell'ospite comportandosi, quindi, da endoparassitoidi primari (Hunter e Woolley, 2001). I maschi, invece, si sviluppano a spese di stadi immaturi della propria (Autoparassitismo) o di altre specie comportandosi da iperparassiti ectofagi o endofagi. Per tale motivo negli allevamenti di queste specie, al fine di ottenere progenie maschile, si offrono alle femmine vergini neanidi di Aleirodidi già parassitizzati e contenenti stadi avanzati dell'ospite primario.

Tra le tante caratteristiche biologiche condivise con la maggior parte degli Afelinidi, la telitochia e le membrane extra-embrionali suscitano particolare interesse. Nel primo caso ciò è dovuto al coinvolgimento di alcuni microrganismi endosimbionti, a trasmissione verticale, che sono in grado di manipolare il sesso degli ospiti per incrementare la loro capacità di trasmettersi da una generazione alla successiva. Nel secondo, invece, l'interesse è legato alla presenza di particolari cellule prodotte dalla dissociazione di alcuni tipi di membrane extra-embrionali, e dalla sporadicità con cui tale fenomeno si riscontra nell'ambito del genere *Encarsia* (Pedata *et al.* 2003).

Partenogenesi telitoca

La partenogenesi telitoca è una modalità riproduttiva alquanto diffusa in *Encarsia*.

Un caso singolare di partenogenesi, piuttosto comune tra gli Hymenoptera (Stouthamer, 1997), è quella indotta dal batterio simbionte *Wolbachia* (α -Proteobacteria). Tra i differenti microrganismi identificati

(Stouthamer, 1993; Zchori-Fein *et al.*, 2001) i batteri del genere *Wolbachia* appaiono essere i più comuni *parthenogenesis inducers* (PI) (Vavre *et al.*, 2004). Tuttavia, nel caso particolare di *Encarsia*, *Wolbachia* non è l'unico microrganismo in grado di indurre telitochia. Infatti, in un recente lavoro è stato descritto un nuovo batterio appartenente al gruppo dei Bacteroidetes (Zchori-Fein *et al.*, 2001), denominato *Cardinium*, coinvolto nella partenogenesi di sei delle sette popolazioni di *Encarsia* esaminate (Zchori-Fein *et al.*, 2004).

Wolbachia è un simbionte intracellulare obbligato, che infetta un gran numero di invertebrati. Benché sia ampiamente diffuso, ancora non se ne conoscono i limiti della distribuzione tra gli artropodi ed altri phyla (Werren, 1997).

Comunque, tra gli ospiti si annoverano acari, crostacei, nematodi ed insetti. Si stima, per difetto, che tra questi ultimi il 16% delle specie potrebbe esserne infetto (Stouthamer *et al.*, 1999; Dedeine *et al.*, 2001).

Wolbachia, alla stregua dei mitocondri, è trasmessa per via materna attraverso il citoplasma delle uova. È interessante notare che questo tipo di partenogenesi sembra essere ristretto a quelle specie con determinazione del sesso di tipo aplodiploide (Pannebakker *et al.*, 2004). Gli Imenotteri parassiti, in particolare, rappresentano un bersaglio d'elezione per l'endosimbionte.

Gli effetti fenotipici sortiti sull'ospite spaziano dall'induzione della partenogenesi telitoca, in certi gruppi di imenotteri aplodiplodi (Stouthamer, 1997), all'incompatibilità citoplasmatica (Rousset, 2000), fino alla femminizzazione di individui geneticamente di sesso maschile e "male-killing" (O'Neill *et al.*, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 2001).

In alcune specie, *E. formosa* per esempio, la telitochia, indotta dal microrganismo *Wolbachia*, è di tipo facoltativo e, pertanto, ancora reversibile in seguito a trattamenti con adeguate dosi di antibiotico (Stouthamer e Mak, 2002). Infatti, nutrendo le femmine con una dieta

costituita da miele e specifici antibiotici, dalle uova deposte uno o alcuni giorni dopo il trattamento, si ottiene la progenie maschile.

I maschi prodotti in questo modo, però, saranno incapaci di fertilizzare con successo le uova della linea femminile da cui essi originano (Zchori-Fein *et al.*, 1992; Rokas, 2000). In questo caso *Wolbachia*, provocando isolamento riproduttivo, potrebbe giocare un ruolo da *enhancer* nel processo di speciazione (Rokas, 2000).

Le specie telitiche manifestano uno sviluppo virginale dell'uovo per cui, non essendoci l'apporto del corredo cromosomico paterno, necessitano di uno o più meccanismi di ripristino della diploidia (Lamb e Willey, 1987) con conseguenze genetiche molto differenti.

La duplicazione gametica, un particolare tipo di meccanismo di ripristino post-meiotico, per esempio, conduce ad una completa omozigosità nel giro di una singola generazione (Beukeboom e Pijnacker, 2000).

Membrane extra-embryonali

Gli insetti parassitoidi esibiscono una grande varietà di strategie adattative che garantiscono un sorprendente livello di integrazione fisiologica col proprio ospite.

Gli embrioni di diversi Imenotteri parassitoidi, per esempio, si sviluppano all'interno di una membrana extra-embryonale (MEE) la cui diversa struttura ed origine è stata ampiamente discussa da Tremblay e Caltagirone (1973).

Tali membrane sono spesso, semplicisticamente, indicate col termine di serosa (Pennacchio *et al.*, 1994a), benché sia stata proposta una più circostanziata terminologia sulla scorta degli eventi citologici ed embrionali che presiedono alla loro formazione (Tremblay e Caltagirone, 1973; Quicke, 1997).

Alla schiusa dell'uovo la MEE si dissocia in particolari cellule denominate teratociti (Vinson, 1970; Vinson e Lewis, 1973; Strand *et al.*, 1985). Tali cellule vengono rilasciate nell'emolinfa dell'ospite, dove iniziano ad espletare una serie di ruoli che spaziano da quello trofico a quello immunosoppressivo e secretorio (Dahlman, 1990; Dahlman e Vinson, 1993).

I teratociti incrementano le proprie dimensioni ed il livello di ploidia senza dividersi (Vinson, 1970; Vinson e Iwantsch, 1980) ed il loro numero, specie specifico, può variare da un minimo di 8 (Tremblay e Calvert, 1972) ad oltre 900 (Zhang *et al.*, 1994).

Numerosi studi ultrastrutturali (Vinson, 1970; Vinson e Scott, 1974) evidenziano una superficie densamente ricoperta di microvilli e numerosi indizi di una intensa attività metabolica (Pennacchio, 1994b; Zhang *et al.*, 1994; De Buron e Beckage, 1997;).

I teratociti inibiscono la crescita e lo sviluppo dell'ospite alterandone il bilancio endocrino (Pennacchio, 1993) promuovendo, quindi, la sopravvivenza del parassitoide.

Durante il periodo in cui circolano nell'emolinfa, i teratociti esprimono delle specifiche proteine denominate TSP (*Teratocytes secretory proteins*) che alterano la fisiologia dell'ospite a favore delle esigenze trofiche e di sviluppo delle larve dell'endoparassita (Strand *et al.*, 1988; Dahlman e Hoy, 2002; Rana *et al.*, 2002).

SCOPO DELLA TESI

Il principale obiettivo della ricerca è stato quello di caratterizzare lo sviluppo embrionale, con particolare riferimento ai primi eventi citologici, di un gruppo di entomoparassiti di notevole interesse agrario.

Tali ricerche mirano, sostanzialmente, ad incrementare il livello di conoscenza su aspetti poco noti dello sviluppo di tre endoparassitoidi ascrivibili al genere *Encarsia*.

La necessità di un tale tipo di studi è emersa dal constatare, durante le ricerche bibliografiche, una sorprendente carenza di lavori di embriologia riguardanti questo gruppo di Afelinidi.

In pratica escludendo lo scritto di Silvestri (1915), fondamentale lavoro sulle prime fasi dello sviluppo embrionale di un gruppo eterogeneo di Calcidoidei, e qualche altro recente lavoro, di natura non prettamente embriologica (Blackburn *et al.*, 2002; Donnel and Hunter, 2002; Pedata *et al.* 2003), non è stato possibile riferirsi ad altre fonti bibliografiche.

La scarsità di studi effettuati è, probabilmente, imputabile alle esigue dimensioni delle uova e degli embrioni di *Encarsia*, che non ne consentono una agevole manipolazione.

Questa ricerca, portata a termine con l'ausilio di alcune moderne tecniche di microscopia, rappresenta un primo passo verso l'ideale continuazione del lavoro di cito-embriologia iniziato da Silvestri (1915).

Preliminari osservazioni di microscopia ottica, su un discreto numero di specie, hanno consentito di restringere il campo d'indagini a tre entità che esibivano interessanti caratteristiche embriologiche: *Encarsia formosa* Gahan, *Encarsia pergandiella* Howard ed *Encarsia lutea* (Masi).

Nel corso delle ricerche sono state indagate altre stimolanti peculiarità, intimamente connesse ai primi eventi dello sviluppo embrionale. La prima caratteristica concerne la partenogenesi telitoca in *E. formosa*, ed il particolare tipo di eventi citologici che si verificano durante il

ripristino della diploidia. L'esatto meccanismo è riportato solo per altri tre Imenotteri calcidoidei: *Trichogramma* spp. (Stouthamer e Kazmer, 1994), *Muscidifurax uniraptor* (Gottlieb *et al.*, 2002) e *Leptopilina clavipes* (Pannebakker *et al.*, 2004).

La seconda riguarda la presenza di membrane extra-embryonali e dei teratociti, prodotti dalla loro dissociazione. Tale fenomeno è attualmente documentato soltanto per altre due specie del genere *Encarsia* e più precisamente *E. berlesei* (Howard) ed *E. citrina* (Craw), entrambe parassitoidi endofagi di Diaspini (Pedata *et al.*, 2003). Per una delle specie oggetto d'indagine, *E. pergandiella*, Hunter (1991) ha riportato la presenza di una membrana cellularizzata riferendosi ad essa come ad un trophamnion, senza, tuttavia, approfondirne la natura e l'evoluzione.

Oltre che indagare su particolari aspetti dello sviluppo embrionale, al fine di colmare una significativa lacuna di conoscenze, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare nuovi tipi di caratteri tassonomici che, congiuntamente a quelli morfologici e molecolari, potessero contribuire alla delimitazione di gruppi naturali. Infatti, sebbene nuove specie vengano continuamente descritte ed inserite in programmi di controllo biologico, poca attenzione è stata posta alle relazioni di parentela tra le specie di *Encarsia* ed alla delimitazione di gruppi monofiletici (Babcock *et al.*, 2002).

In definitiva le specifiche informazioni acquisite, oltre a fornire materiale per studi causali in altre branche della biologia, possono essere sfruttate per una corretta interpretazione dei rapporti filogenetici nel gruppo in esame al fine di ottenere una solida classificazione.

CENNI SISTEMATICI E MORFO-BIOLOGICI SULLE TRE SPECIE ESAMINATE

Encarsia pergandiella Howard

Viggiani e Mazzone (1979) hanno collocato la specie nel gruppo *E. pergandiella*. In seguito è stata inserita da Hayat (1989, 1998) e Polaszek *et al.* (1992) nel gruppo *E. parvella*.

È tra le più piccole esistenti. Corpo giallastro con macchie castane sul torace. Antenne della femmina con formula 1 1 4 2. Ali anteriori amigdaliformi con lunga frangia.

E. pergandiella (Fig. 1) è un endoparassitoide coinobionte di stadi immaturi, talvolta anche N1, di numerosi aleirodidi. Le forme parassitizzate degli ospiti appaiono giallastre (colore della pupa).

La specie è biparentale a sviluppo eteronomo (Gerling, 1966). I maschi evolvono da iperparassiti, a carico della propria o di altre specie.

Le larve femminili, alla temperatura costante di 25°C, sviluppano in circa 14-15 giorni; quelle maschili, invece, completano lo sviluppo in 13-14 giorni.

L'*E. pergandiella* è ritenuta una specie di origine Neartica ed è stata introdotta in Italia per il controllo biologico della mosca bianca delle serre *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Viggiani e Mazzone, 1980; Mazzone e Viggiani, 1985).

Encarsia formosa Gahan

Appartiene al gruppo *E. luteola*.

Capo e torace nerastri, gastro giallo. Formula antennale 1 1 4 2 sia nel maschio sia nella femmina.

Encarsia formosa (Fig. 2) è un parassitoide endofago coinobionte di stadi giovanili di aleirodidi. La femmina può deporre anche nelle N1, ma lo sfarfallamento non avviene prima che l'ospite abbia raggiunto lo stadio di IV età. I pupari degli ospiti parassitizzati assumono una colorazione nerastra.

Essa si riproduce, generalmente, per partenogenesi telitoca. I maschi sono alquanto rari e sviluppano da parassitoidi primari sugli aleirodidi ospiti. Il ciclo biologico a temperatura costante di 25°C si aggira intorno ai 14 giorni.

Questa specie di origine Neartica ha rappresentato per lungo tempo un punto focale della ricerca nel controllo biologico della mosca bianca delle serre e, da vari decenni, viene allevata ed utilizzata in diversi paesi per il controllo di tale pernicioso aleirodide.

Encarsia lutea (Masi)

È stata posta da Viggiani (1979) nel gruppo *E. lutea*. Hayat (1989) ne ha riconfermato la collocazione.

Corpo fondamentalmente giallastro. Antenna femminile con formula 1 1 3 3.

Alla stregua delle altre due specie, *E. lutea* (Fig. 3) è un endoparassitoide coinobionte di stadi immaturi di vari aleirodidi.

È una specie biparentale a sviluppo eteronomo. I maschi si comportano da iperparassiti a spese della propria o di altre specie.

La durata del ciclo biologico, alla temperatura costante di 25°C, è all'incirca di 14 giorni.

La specie è cosmopolita e benché si ottenga da numerosi aleirodidi, *T. vaporariorum* compreso, l'ospite d'elezione risulta essere la *Bemisia tabaci* (Genn.) (Viggiani, 1987).



Fig. 1. *E. pergandiella* Howard.



Fig. 2. *E. formosa* Gahan.



Fig. 3. *E. lutea* (Masi).

3. MATERIALI E METODI

Allevamenti

La continua necessità di reperire materiale idoneo allo studio, ha reso necessario l'allestimento di un allevamento di *Trialeurodes vaporariorum* riprodotto su piantine di fagiolo cv. Borlotto nano e mantenuto in celle climatizzate alla temperatura di 25°C, U.R. 60-75% e fotoperiodo 12:12. Al fine di ottenere un'infestazione costituita da stadi omogenei, le piantine venivano esposte, in appositi isolatori, agli aleirodidi adulti per 3-4 giorni dopodiché, in seguito al loro allontanamento, trasferite in un'altra cella.

La linea femminile delle specie biparentali, *E. pergandiella* ed *E. lutea*, è stata ottenuta esponendo alle femmine dei parassitoidi neanidi avanzate (N3-N4) di *T. vaporariorum*; per l'ottenimento di quella maschile si è fatto ovideporre le femmine in pupari di *T. vaporariorum* già parassitizzati da *E. formosa* e contenenti stadi avanzati del parassitoide.

Per l'unica specie telitoca studiata, *E. formosa*, la procedura seguita è stata la stessa utilizzata per la produzione delle femmine biparentali.

Produzione e raccolta dei campioni

Per le osservazioni preliminari di microscopia ottica, al fine di ottenere stadi di sviluppo consecutivi a partire dall'uovo appena depresso, sono state allestite 5 arene di deposizione. In ciascuna di esse, costituita da una capsula Petri di 5 cm di diametro e riempita per metà di agar, è stato adagiato un disco ritagliato da una foglia di fagiolo infestata da neanidi (N3-N4) di *T. vaporariorum*. In tali arene venivano liberate una ventina di femmine dei parassitoidi e lasciate deporre, a temperatura ambiente, per

circa 15 minuti. Allontanate le femmine adulte, le arene venivano incubate in cella a 25°C e 75% UR.

L'intervallo di tempo trascorso, tra un gruppo di ovideposizioni ed il successivo, è stato di un'ora. I campionamenti sono iniziati a partire dalla quinta ed ultima capsula Petri (tempo 0) fino alla prima, in modo tale da coprire le prime quattro ore.

In seguito gli Aleirodidi parassitizzati sono stati rimossi dalle rispettive arene ad intervalli di quattro ore e, previa foratura del tegumento con microspilli entomologici, posti in fissativo di Kahle (6 parti di formalina : 15 parti di EtOH al 95% : 1 parte di acido acetico glaciale : 30 parti di acqua distillata) tutta la notte. L'indomani, seguendo la stessa procedura, sono stati raccolti, e posti in fissativo, altri campioni in modo da completare le prime 20 ore di sviluppo embrionale.

L'analisi dettagliata dei fondamentali eventi citologici caratterizzanti le tre specie studiate, avvenuta con l'ausilio di tecniche per la fluorescenza, ha richiesto l'allestimento di singole arene di deposizione simili a quelle impiegate per le preliminari osservazioni in microscopia ottica. Questa volta, però, i campioni sono stati prelevati ad intervalli di tempo più ravvicinati ed oscillanti tra i 3 ed 10 min. (raramente fino a 15 min.), dopodiché trasferiti in fissativo.

Al fine di poter seguire i vari eventi embriologici, che conducono alla formazione delle membrane extra-embriionali fino alla loro dissociazione in teratociti, sono state allestite arene di deposizione simili alle precedenti.

Per monitorare lo stadio di sviluppo dei parassitoidi, periodicamente i pupari degli aleirodidi venivano dissezionati in PBS (*Phosphate buffered saline*) e posti in fissativo allestendo, all'occorrenza, preparati microscopici temporanei o permanenti.

A tutto ciò seguivano le osservazioni e le microfotografie degli embrioni e dei teratociti.

Microscopia ottica: fissaggio e colorazione dei campioni.

Gli ovari sono stati dissezionati, da femmine adulte, con microspilli entomologici in soluzione Ringer (0,80 parti di Cloruro di sodio: 0,02 parti di Cloruro di calcio: 0,02 parti di Cloruro di potassio: 0,02 parti di Bicarbonato di sodio: 100 parti di acqua distillata) e fissati in formaldeide salina (9 parti di acqua dist.: 1 parte di formaldeide 40% : 0,09 parti di cloruro sodico) per 1-2 ore. Dopo un lavaggio in Ringer per 10 min., gli ovaroli sono stati colorati con carminio acetico, cui seguiva un ulteriore lavaggio in acqua acidulata (una parte di acqua dist. : 1 parte di acido acetico al 50%) per rimuovere l'eccesso di colorante.

Per l'allestimento di vetrini temporanei, i campioni sono stati montati su di un vetrino, aggiungendo ad una goccia di soluzione Ringer una goccia di glicerina, ed osservati e fotografati con il sistema Leica Imaging Workstation Q5501W.

Per la dissezione, la colorazione, l'osservazione degli embrioni e le rispettive microfotografie, sono state seguite le stesse modalità adottate per gli ovari.

Microscopia a fluorescenza: fissaggio e colorazione dei campioni.

Gli adulti dei parassitoidi, le neanidi e le pupe parassitizzate di *T. vaporariorum* sono stati dissezionati in PBS.

I vari trasferimenti, da un solvente all'altro, dei campioni prelevati sono stati eseguiti con microcapillari (Microcaps, Sigma) dotati di punte con diametro tra i 60 ed i 200 μ ottenuti con il PC-10 Micropipette Puller (Narishige).

Per l'osservazione dei nuclei, questi venivano fissati in formalina al 10% in tampone fosfato (Sigma) ed ivi lasciati, in una camera umida, per tutta la notte. Il giorno successivo seguivano due o tre lavaggi in PBS, di 3

minuti ciascuno, e un ulteriore passaggio in metanolo puro a -20°C per 5 minuti. Dopo un ulteriore singolo lavaggio in PBS i nuclei sono stati colorati incubandoli, per 5-6 minuti, in Hoechst 33258 (Sigma) $1\mu\text{g/ml}$ a 4°C . Per il Dapi e lo Ioduro di propidio sono state adottate analoghe procedure e concentrazioni. I campioni, in seguito, sono stati di nuovo lavati in PBS e, quindi, montati su di un vetrino portaoggetti con una goccia di glicerolo al 90% contenente n-propil-gallato al 2.5% (Giloh e Sedat, 1982).

In alcuni casi i campioni sono stati fissati con paraformaldeide/PBS al 4% per 2-3 ore a temperatura ambiente. La successiva permeabilizzazione avveniva con 2-3 lavaggi, di 3-5 minuti ciascuno, in PBS/Triton X-100 allo 0,3 %.

Per l'evidenziazione dell'F-actina gli ovari, dissezionati da femmine adulte di parassitoidi, ed i teratociti, sono stati fissati con paraformaldeide/PBS al 4%, per 3-4 ore a temperatura ambiente e permeabilizzati in PBS/Triton allo 0,3%, con 2 lavaggi di 5 minuti ciascuno. Successivamente i campioni sono stati incubati con Rodamina-Falloidina (Sigma) $1\mu\text{g/ml}$ per 20 minuti a 4°C in camera umida. Infine, la colorazione dei nuclei è avvenuta aggiungendo, alla precedente soluzione, Hoechst 33258 (Sigma) $1\mu\text{g/ml}$ per 5 minuti a 4°C .

Per le osservazioni in fluorescenza si è adoperato il microscopio Zeiss Axiophot 2 equipaggiato con filtri per la rodamina, fluoresceina ed UV. Le microfotografie sono state scattate con la camera digitale dedicata Zeiss AxioCam HRC.

Microscopia elettronica

Per l'indagine ultrastrutturale dei teratociti al SEM, questi sono stati fissati in formalina al 10% in tampone fosfato (Sigma) per 24 h e, dopo 2

lavaggi in PBS per 5 minuti, sottoposti a disidratazione in una serie di passaggi in alcoli a gradazione crescente fino ad alcol assoluto. In seguito il materiale è stato sottoposto al procedimento del *Critical Point Dryer* in un Balzer Union CPD-010, rivestito di uno strato d'oro in un metallizzatore Balzer Union SCD 030, ed infine osservato con uno Zeiss EVO 40.

Analisi morfometrica dei teratociti in E. pergandiella

Per tale indagine sono state dissezionate, in PBS, 10 pupari parassitizzati di *T. vaporariorum* al giorno, a partire dal quarto giorno dalla parassitizzazione (schiusa dell'uovo) fino al settimo giorno.

Rapidamente il materiale veniva sottoposto ad osservazione con lo Zeiss Axiophot 2 e fotografato con la camera digitale dedicata Zeiss AxioCam HRC.

In seguito sono state effettuate le misure interattive dei teratociti adoperando il software Axiovision ver. 4.1 (Zeiss). Di ogni teratocita è stato misurato il diametro, e solo nei casi di cellule con elevato grado di asimmetria si rilevavano il diametro maggiore e quello minore per ricavarne il diametro medio.

A distanza di un mese è stata eseguita una replica del campionamento precedente osservando le medesime procedure.

4. RISULTATI

Struttura degli ovari

Le tre specie esibiscono degli ovari tipicamente meroistici politrofici (Fig. 4). Le cellule nutrici, molto voluminose (Fig. 5), sovrastano gli oogoni a vari stadi di maturazione i quali risultano, in apparenza, completamente circondati dalle cellule follicolari (Fig. 6).

È interessante sottolineare, che quest'ultima caratteristica non è riscontrabile in ovari politrofici tipici come quelli della *Drosophila melanogaster* o dell'*Apis mellifera* (Fig. 7).

In *E. formosa* si osservano 4 ovaroli per lato (Fig. 8a) e dal basso numero di uova mature se ne deduce la sinovigenia (Quicke, 1997). Alla sommità dell'oocita pronto alla deposizione, con l'ausilio della fluorescenza, si è individuato una sorta di *ring canal* (Counce e Waddington, 1972; Robinson *et al.*, 1994) sul cui significato necessitano ulteriori indagini (Fig. 8b).

In *E. pergandiella* si evidenziano due ovari di tre ovaroli ciascuno (Fig. 9), per il resto la struttura, e le strategie di maturazione, ricalcano quella di *E. formosa* (Fig. 10).

Benchè morfologicamente simili ai precedenti, gli ovaroli di *E. lutea* esibiscono un carico di uova mature lievemente superiore alle altre due specie. Alla base degli oociti, in via di maturazione, si notano un paio di caratteristiche protrusioni a forma di uncino (Fig. 11).

Encarsia pergandiella

Uovo. Alecítico (Donnell, 2004), oloblastico a segmentazione totale. L'uovo appena deposto si presenta ellittico ed alquanto affusolato (Fig. 12), con dimensioni pari a $74,1 \mu \pm 4,48 \times 18,5 \pm 1,06$ (n=12). Dopo una decina di minuti dall'ovideposizione, dato il carattere idropico dell'uovo, si assiste ad un graduale aumento di volume (Fig. 13) ed è per tale motivo che in passato l'uovo veniva descritto come "limoniforme".

Di seguito si riportano gli intervalli di tempo esaminati.

0-I^a ora

Durante la prima ora si verifica una sequenza di eventi citologici piuttosto comuni in una specie biparentale, tranne che, al termine delle divisioni di maturazione dell'uovo, si osservano due globuli polari (GP) anziché i soliti tre.

La penetrazione dello spermio (Fig. 14) coincide, pressappoco, con il prosieguo della prima divisione di maturazione dell'uovo (Fig. 15), in seguito alle quale viene espulso un GP (Fig. 16).

Il gamete maschile, divenuto ormai pronucleo, appare rotondeggiante, espanso e dal contenuto denso; il pronucleo femminile, lievemente più voluminoso, assume lo stesso aspetto di quello maschile. Il GP si trova in fase compatta (Fig. 17a). A questo punto i due pronuclei, situati pressappoco al centro dell'uovo, sono quasi a contatto. Poco dopo i pronuclei, avvicinatisi ulteriormente, si presentano meno densi, mentre il GP è divenuto più voluminoso e si trova in una fase cellulare tipo S-G2 (Fig. 17b).

I^a-II^a ora

Intorno alle 2 h inizia la fusione dei pronuclei maschile e femminile (Fig. 18), apparentemente, senza espulsione di un altro globulo polare. Lo

zigote neoformato presto si avvia alla prima divisione di segmentazione, (Fig. 19) che prelude alla formazione dei primi due nuclei dell'embrione. Nel contempo si scinde anche il GP esibendo una poderosa metafase (Fig. 20). Al termine delle divisioni si osservano 2 GP e 2 nuclei embrionali (Fig. 21).

II^a-III^a ora

I nuclei embrionali raddoppiano (Fig. 22a) divenendo 4. I due voluminosi GP assumono una collocazione topologica, in prossimità di uno dei nuclei polari, che manterranno per diverse ore e che servirà da riferimento per seguire la posizione di altri nuclei (Fig. 22b).

III^a-IV^a ora

Durante questo intervallo si passa da 4 a 8 nuclei (Fig. 23). Due di tali nuclei si disporranno agli antipodi dell'embrione in via di formazione (Fig. 24 a) mentre i GP, sempre molto luminosi e dal contenuto denso, conservano la stessa posizione. Da questo momento in poi due nuclei polari si divideranno con una certa asincronia rispetto agli altri sei nuclei centrali (Fig. 24 b).

IV^a-V^a ora

In questa fase si manifesta una chiara compartimentazione dell'embrione, in cui è già possibile distinguere diversi territori. Un ulteriore raddoppio dei nuclei centrali porta il numero totale a 14 ed i GP, a tratti dall'aspetto quasi profasico, incrementano drasticamente le loro dimensioni divenendo piuttosto asimmetrici (Fig. 25). Come precedentemente accennato, grazie alla loro stabile localizzazione, i GP consentono di riconoscere e seguire, nel tempo, le posizioni di altri nuclei.

V^a-VI^a ora

Si osserva una disposizione dei nuclei, e dei competenti territori più definita (Fig. 26). Durante questo intervallo il nucleo polare adiacente i GP, sempre voluminosi, asimmetrici ed a tratti di aspetto rarefatto, appare ingrandito e quasi prometafasico mentre il nucleo al polo opposto si è già

diviso. Al centro vi sono 10 nuclei, da cui originerà l'embrione, ed in prossimità dei GP se ne osservano altri due, per un totale di 15 nuclei (Fig. 27).

VI^a-VII^a ora

Nell'ultimo intervallo di tempo osservato risultano una ventina di nuclei centrali, 4 nuclei ad un polo e 2 all'altro, con i GP che, apparentemente, iniziano a dividersi (Fig. 28). Molto vicini ai GP si trovano 2-4 nuclei che originano da uno dei 6 centrali (Fig. 24 a).

E. formosa

Uovo. Anidropico, tipicamente centrolecitico, meroblastico a segmentazione superficiale (Fig. 29). Appena deposto, alla stregua di quello ovarico, appare ellittico voluminoso e, comunque, dimensionalmente superiore a quello delle altre due specie esaminate. Dimensioni: $120,2 \mu \pm 6,44 \mu \times 40,5 \mu \pm 1,97 \mu$ (n=12).

0-II^a ora

Gli eventi citologici caratterizzanti le prime 2 h non si discostano da quanto, normalmente, ci si aspetterebbe da una specie biparentale (Fig. 30). Infatti, al termine di tale periodo troviamo 3 globuli polari, prodotti dalle due divisioni di maturazione dell'uovo, ed un nucleo centrale aploide sul cui destino si approfondirà, dettagliatamente, nel paragrafo concernente il ripristino della diploidia (Fig. 31).

III^a-IV^a ora

I primi due nuclei dell'embrione appaiono tra le 3 e le 4 h (Fig. 32a). Nel frattempo i tre GP subiscono dei processi, probabili endoreplicazioni, che conferiscono loro l'aspetto di un coacervo di frammenti condensati una volta ed una massa compatta, la successiva (Fig. 32 a, b).

IV^a-VI^a ora

In seguito a ripetute divisioni, si assiste al raddoppio dei nuclei fino ad un totale di 16. Allo stadio di 8 nuclei uno di questi si porta ad un polo

distaccandosi dal resto. Tale nucleo duplicherà indipendentemente dagli altri da cui si differenzierà, anche, per caratteristiche morfo-dimensionali (Fig. 33 a-d).

Ormai i GP, rifacendoci a quanto precedentemente affermato, assumono le forme più svariate che nulla hanno a che vedere con i tre GP che apparivano chiaramente durante la fase iniziale.

VII^a ora

Intorno alle 7 h si arriva ad un totale di circa una trentina di nuclei più i due polociti (Fig. 34). In seguito al loro raddoppio si perviene a circa 60 nuclei a cui si aggiungono i 4 polociti, ormai nettamente separati dalla linea embrionale. Questi ultimi rappresentano le cellule capostipiti della linea germinale (Fig. 35).

In *E. formosa*, analogamente a *Drosophila melanogaster* ed *Apis mellifera*, l'embriogenesi inizia con ripetute divisioni dello zigote non accompagnate da divisioni cellulari. Il risultato è un sincizio, ricco di tuorlo, contenente una popolazione di energidi singolarmente circondati da citoplasma libero dal tuorlo.

Dopo un certo numero di divisioni, intorno alle 16-20h dall'ovideposizione, la maggior parte degli energidi migra alla periferia dell'uovo per formare un blastoderma prima sinciziale, poi cellularizzato. In questa fase è possibile osservare chiaramente le cellule polari, ed il monostrato di cellule colonnari che circondano il tuorlo residuo nel quale si scorgono dei vitellofagi (Fig. 36 a-d).

Qualche ora dopo, in posizione ventrale, inizia il graduale ispessimento del blastoderma che prelude alla formazione della stria germinativa (Fig. 37a). Le due estremità, di quest'ultima, sembrano allungarsi progressivamente fino ad arrivare ai poli, superati i quali, continuano a distendersi finché non giungono a fronteggiarsi dorsalmente (Fig. 37b).

E. formosa, come riportato da Donnel e Hunter (2002), apparentemente non differenzia alcuna membrana-extraembrionale.

4.2.3. *E. lutea*

Uovo. Oligolecitico (Fig. 38), meroblastico a segmentazione superficiale. Nonostante manifesti un tipo di sviluppo simile a quello di *E. formosa*, l'uovo risulta idropico come in *E. pergandiella*. Dimensioni: $88,2 \mu \pm 4,2 \mu \times 23,7 \pm 1,97$.

0-I^a ora

Analogamente all'*E. pergandiella*, la prima ora è caratterizzata dalla penetrazione dello spermio e dal prosieguo della I divisione di maturazione dell'uovo (Fig. 39).

I^a-II^a ora

Durante la seconda ora si osservano l'espulsione del primo globulo polare (Fig. 40) e la formazione dell'occita secondario. Lo spermio perde la coda e diviene, gradualmente, sferico. Al termine della II divisione di maturazione i pronuclei maschile e femminile sono molto vicini ed i GP, come di norma, sono in numero di tre (Fig. 41 a, b).

II^a-III^a ora

Gli unici eventi degni di nota, tra le 2 e le 3 ore, sono la fusione dei due pronuclei e le continue variazioni di forma cui sono soggetti i tre GP (Fig. 42).

III^a-IV^a ora

Lo zigote va incontro alla prima divisione di segmentazione in seguito alla quale, si formano i primi due nuclei embrionali (Fig. 43 a-c).

IV^a-VI^a ora

In seguito a due consecutivi eventi di duplicazione si perviene ad uno stadio a 8 nuclei. I GP, apparentemente riuniti in un corpo unico denso e luminoso, a tratti appaiono formare un groviglio di cromosomi (Fig. 44, a-c).

VI^a-VII^a ora

Nell'ultimo intervallo di tempo analizzato, si arrivano a contare, nell'embrione, fino ad una trentina di nuclei. Due di questi ultimi, più voluminosi degli altri, appaiono confinati in una regione apicale dell'uovo distinta da quella occupata dai restanti nuclei (Fig. 45, a-d).

Meccanismo citogenetico della partenogenesi in Encarsia formosa.

Dall'analisi citogenetica portata a termine è emerso che la Duplicazione Gametica è il meccanismo che conduce al ripristino della diploidia in *E. formosa* (Fig. 46). Di seguito si riportano i dettagli citologici.

Tralasciando le prime due ore, precedentemente descritte, gli eventi citologici cruciali, che conducono al ripristino della diploidia, si verificano tra la seconda e la quarta ora.

La fase iniziale è caratterizzata dalla presenza di un nucleo aploide di aspetto interfase, risultato delle due divisioni di maturazione dell'uovo, il quale, verso la fine della seconda ora, entra in profase proseguendo fino all'anafase. In questo frangente i cromosomi assumevano inusuali conformazioni complicando l'interpretazione delle immagini in fluorescenza (Fig. 47, a-c).

L'anafase, che di fatto appartiene alla prima divisione di segmentazione, non viene portata a termine ma si assiste al ricongiungimento dei due gruppi di cromosomi che danno vita ad un cosiddetto nucleo di restituzione diploide (Fig. 47, d). Verso la fine della terza ora il nucleo di restituzione, che occupa una posizione alquanto

centrale, subisce una normale divisione mitotica che porta alla formazione dei primi due nuclei di segmentazione (Fig. 48, a-c).

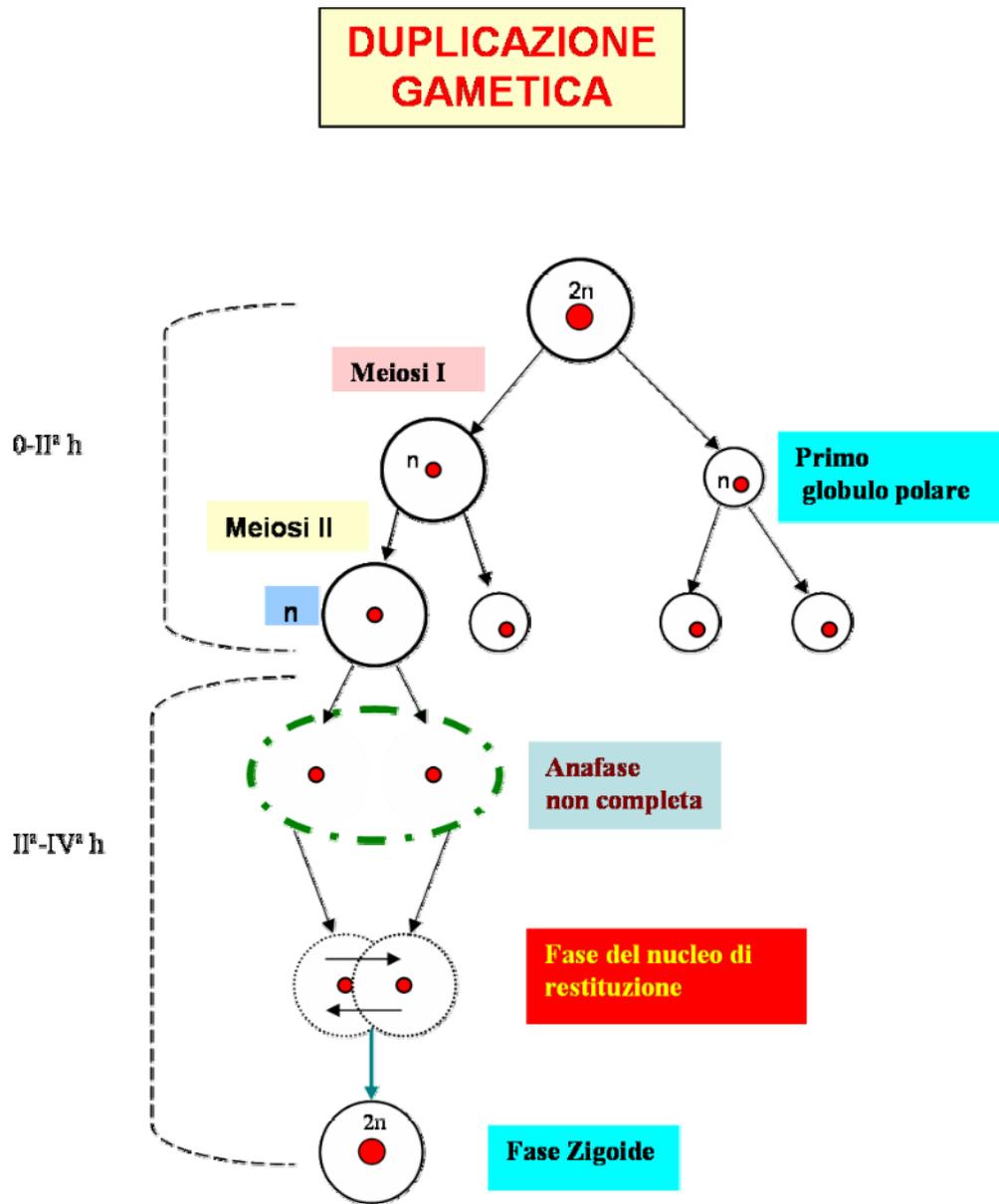


Fig. 46. *E. formosa*. Meccanismo di ripristino della diploidia, sequenza degli eventi citologici

MEMBRANE EXTRA-EMBRIONALI E TERATOCITI IN *ENCARSIA*
PERGANDIELLA CON ACCENNI SU *ENCARSIA LUTEA*

Encarsia pergandiella

Come accennato in precedenza, intorno alle 4 h nell'embrione precoce di *E. pergandiella*, si delinea una sorta di compartimentazione che consente di distinguere una serie di regioni nettamente separate le une dalle altre.

In questa fase si osservano 4 gruppi di nuclei, piuttosto asincroni nel dividersi, che esibiscono differenze morfologiche e dimensionali. I globuli polari (GP), infatti, si presentano voluminosi e tendenti all'asimmetria, mentre i nuclei localizzati ai 2 poli sono sferici e più grandi di quelli centrali.

A partire dalle 7 h si notano 4 grandi GP associati ad un gruppetto di 4-6 piccoli nuclei che, probabilmente, derivano da uno dei 6 nuclei centrali della linea embrionale ed i nuclei ai poli che sono, rispettivamente, in numero di 2 e 4 (Fig. 49).

Intorno alle 9-10 h l'embrione appare come una blastula cava ed occupa circa la metà del volume totale dell'uovo (Fig. 50).

È interessante notare come, dopo le 10 h, i blastomeri embrionali siano circoscritti da una netta impalcatura citoscheletrica a differenza degli altri nuclei che sembrano flottare in una sorta di matrice che si colora in rosso con la Rodamina-Falloidina (Fig. 51, a-b).

Successivamente, l'allungamento dell'embrione in via di sviluppo fa sì che i GP, e gli altri nuclei gravitanti intorno ad esso, vengano progressivamente spinti verso il corion assumendo una forma appiattita. Tale aspetto è meglio evidente intorno alle 17-20 h quando l'embrione, ormai, occupa la maggior parte del volume a disposizione (Fig. 52).

A 50 h circa l'embrione, in fase avanzata di sviluppo, è chiaramente circondato dalla membrana extra-embryonale (MEE) (Fig. 53) la quale intorno alle 80 h, si riduce ad uno strato sottile ed elastico (Fig. 54).

La schiusa delle uova avviene a circa 90 ore dall'ovideposizione (Fig. 55). Le larve di I età sono ancora parzialmente avvolte dalle membrane extra-embryonali di cui si libereranno con delle contrazioni. Alcuni minuti dopo le MEE si dissociano consentendo ai teratociti di flottare liberi nell'emolinfa dell'ospite (Fig. 56).

Il primo giorno la forma è piuttosto sferica ed alcuni di essi raggiungono considerevoli dimensioni. Queste oscillano da 21,6 μ a 113,8 μ ed il loro numero medio è $10,1 \pm 3,82$ (n= 20).

L'osservazione in fluorescenza dei teratociti di maggiori dimensioni, ha rivelato la presenza, in alcuni di essi, di diversi grandi nuclei, fino a sei, estremamente asimmetrici e di aspetto frastagliato (Fig. 57).

Nel corso della prima giornata le osservazioni in vivo delle larve di I età, in una goccia di fisiologica rabboccata ogni 10 min., non hanno evidenziato teratofagia (Fig. 58).

Il giorno successivo si è riscontrato un incremento numerico dei teratociti con dimensioni inferiori ai 60 μ . accompagnato dalla graduale diminuzione dei teratociti di dimensioni superiori. Molti di essi emettono alcune protrusioni assumendo forme aberranti (Fig.59) determinando, pertanto, un incremento del livello di asimmetria. Indagando più attentamente su alcuni teratociti asimmetrici, si è osservata la confluenza di uno dei nuclei del corpo principale nella "gemma" in via di formazione (Fig.60, a-b). Inoltre, sulla superficie iniziavano a comparire numerosi *blebs* (Burton and Beckage, 1997), sintomo dell'incipiente degenerazione dei teratociti (Fig. 61). Osservazioni al SEM hanno evidenziato, in alcuni casi, quelli che sembravano dei microvilli superficiali in via di appiattimento (Fig. 62, a). Nella maggior parte dei teratociti, però, si è osservata una superficie

alquanto irregolare su cui era difficile scorgere traccia dei microvilli (Fig. 62, b)

Il terzo, ed ultimo giorno, dall'emolinfa dell'ospite scompaiono, o si presentano in avanzato stadio di degenerazione, i teratociti di grandi dimensioni lasciando il posto a numerosi teratociti piuttosto piccoli, uniformi e sferici. Intanto, compaiono *blebs* anche sulla superficie dei teratociti intorno ai 10-20 μ . di diametro. La larva è, ormai, una III età in via di maturazione.

Il quarto giorno il pupario dell'ospite è completamente svuotato e risulta interamente occupato da una larva di terza età matura.

Ripartendo il numero medio di teratociti per classe dimensionale, si è ottenuto un grafico in cui si evidenzia la distribuzione del numero medio di teratociti nelle varie classi di frequenza, per ognuno dei tre giorni in cui essi sono presenti nell'emolinfa dell'ospite.

Dall'analisi del grafico si evince la progressiva diminuzione, giornaliera, delle dimensioni dei teratociti. Infatti, già dal secondo giorno si osserva un drastico incremento dei teratociti intorno ai 10-20 μ e la graduale scomparsa di quelli appartenenti alle classi superiori. Il terzo ed ultimo giorno si constata un unico picco corrispondente alla classe dimensionale di 20-25 μ e la quasi scomparsa dei teratociti dai 70 μ in su (Fig. 63).

Encarsia lutea

Durante l'ultimo intervallo di tempo esaminato, 6-7 h, è stato accennato ai due nuclei localizzati ad uno dei poli dell'embrione (Fig. 45, c). Sono necessarie ulteriori indagini per stabilire, con certezza, se da tali nuclei origineranno cellule della linea germinale, oppure se essi siano implicati nella genesi di una membrana extra-embrionale. Comunque, intorno alle 20 ore è stato osservato una sorta di cappuccio di cellule che

sormonta l'embrione, ormai allo stadio di blastoderma cellularizzato (Fig. 64).

A circa 90 h, come in *E. pergandiella*, l'embrione è in stadio avanzato di sviluppo e la MEE appare come un sottile velo elastico che lo avvolge completamente (Fig. 65).

Alla schiusa dell'uovo la larva di I età si libera della MEE (Fig. 66) che appare costituita da circa una trentina di teratociti di taglia omogenea (Fig. 67).

DISCUSSIONE

Sviluppo embrionale in E. pergandiella, E. formosa ed E. lutea

Nell'ampio spettro di adattamenti biologici esibiti dagli Imenotteri, il parassitismo è sicuramente tra i più intriganti dal punto di vista evolutivo ed applicativo. È interessante sottolineare che, approssimativamente, il 75% degli Imenotteri conduce parte della sua esistenza da parassitoide ectofago o endofago (Whitfield, 2003).

I parassitoidi, per fronteggiare le difese immunitarie del loro ospite, mettono in atto un'ampia gamma di strategie per alterarne la fisiologia e lo sviluppo, in modo da massimizzare il loro personale successo di sopravvivenza (Blackburn *et al.* 2002; Pennacchio e Strand, 2006).

Pur condividendo lo stesso stile di vita, *E. pergandiella*, *E. formosa* ed *E. lutea*, esibiscono diversi livelli di adattamenti all'endoparassitismo.

Nonostante le tre specie siano sottoposte alle stesse pressioni selettive, generate dall'ambiente fisiologico dell'ospite, producono uova che manifestano strategie nutrizionali e di sviluppo piuttosto diverse.

Le condizioni ambientali, infatti, possono sortire una certa influenza sui processi di sviluppo (Grbic, 2000), anche se divergenti modalità embriogenetiche non necessariamente preludono a divergenze morfologiche negli adulti (Grbic e Strand, 1998).

E. pergandiella ed *E. formosa*, in particolare, potrebbero essere assimilate agli estremi di un ipotetico *range* di variabilità, equidistanti dai quali si colloca *E. lutea*.

I tre endoparassiti sono caratterizzati dal possedere tipici ovari meroistici politrofici che, nel corso dell'evoluzione, devono aver sviluppato specifici adattamenti che consentono, alle diverse specie, la produzione di uova con o senza vitello. A conferma di ciò si sottolinea la presenza del gene della vitellogenina in *E. formosa* e la sua mancata individuazione in *E. pergandiella* (Donnell, 2004).

E. formosa produce uova anidropiche e centrolecittiche che vanno incontro ad una segmentazione meroblastica.

Quest'ultimo è un processo che coinvolge soltanto gli strati superficiali dell'uovo dove, in genere, è confinato un sottile velo di citoplasma libero dal tuorlo (Counce and Waddington, 1972). Si perviene, infine, ad un blastoderma cellularizzato attraverso uno stadio sinciziale (Gilbert, 2005).

Quanto testé descritto è molto simile a quello che avviene nel modello paradigmatico *Drosophila melanogaster* (Peel *et al.*, 2005) in cui le prime fasi dello sviluppo embrionale sono, approssimativamente, scandite dagli stessi eventi citologici osservati in *E. formosa*.

È quindi lecito ipotizzare, considerando le forti analogie citologiche tra le due specie, che in *E. formosa*, per stabilire le coordinate degli assi antero- posteriori e dorso-ventrali nell'embrione in via di sviluppo, si realizzino cascate di eventi molecolari (Alberts *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2004) simili a quelle riscontrabili in *Drosophila melanogaster*.

Inoltre, *E. formosa* esibisce un'embriogenesi di tipo *long germ band* (Sander, 1997), un apomorfia condivisa dalla maggior parte degli olometaboli superiori (Davis and Patel, 2002; Grbic, 2003). Ciò significa che in *E. formosa* tutti i segmenti sono specificati, quasi simultaneamente, durante lo stadio di blastoderma cellularizzato in fase pre-gastrulativa.

Nel caso degli Imenotteri, le ipotesi più attuali (Grbic, 1998; Grbic and Strand, 2000) propendono ad inquadrare l'uovo di tipo *E. formosa*, e le modalità di sviluppo ad esso associate, quale condizione plesiomorfica rispetto alle più evolute uova idropiche a segmentazione totale reputate novità evolutive (Grbic, 2003).

Uova simili a quelle di *E. formosa*, infatti, si riscontrano negli Orussidae, un gruppo di ectoparassiti di larve di coleotteri xilofagi considerati *sister group* degli Apocrita, e precursori degli attuali Parassitica

(Goulet e Huber, 1993; Whitfield, 1998, 2003; Dowton e Austin, 2001)
(Fig.).

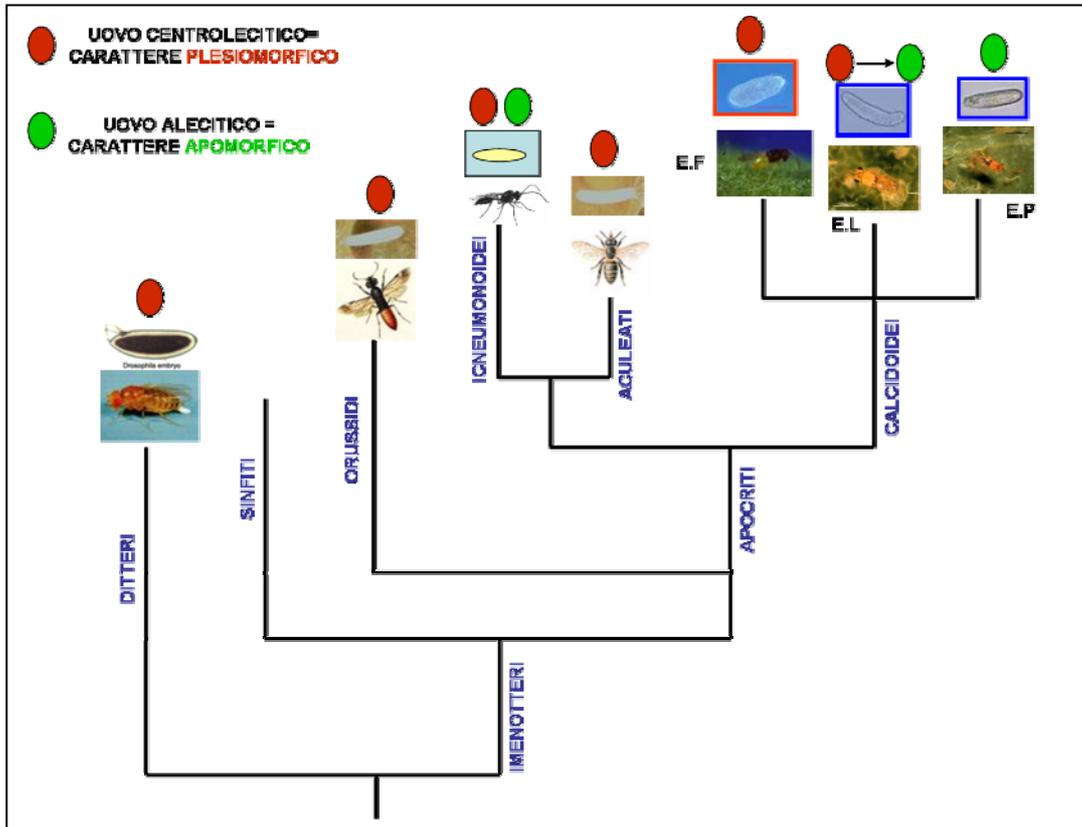


Fig. Albero filogenetico semplificato degli Imenotteri.

Restringendo la visuale al genere *Encarsia*, al fine di stabilire la polarità dei vari tipi di uova, si è considerato quale *sister group* il genere *Coccophagus* Westwood. Osservazioni preliminari sull'uovo di *Coccophagus matsuyamensis* Ishihara, *Coccophagus lycimnia* (Walker) e *Coccophagus gossypariae* Gahan suggeriscono la conferma del trend evolutivo precedentemente accennato.

In *E. pergandiella* l'uovo alecítico va incontro ad una segmentazione oloblastica o totale, facilitata anche dalla completa assenza di tuorlo. Ad

alcuni minuti dalla deposizione, data la natura idropica dell'uovo, si assiste ad un rigonfiamento causato dall'assunzione di fluidi dall'ospite.

L'embriogenesi iniziale è caratterizzata da una compartimentazione precoce dell'uovo in cui, già nelle prime fasi di segmentazione, è possibile individuare specifici territori associati a gruppi di blastomeri che seguiranno destini diversi. Simili eventi li ritroviamo in alcune specie di Braconidi Afidiini (Tremblay e Calvert, 1971), con i quali *E. pergandiella* condivide numerose analogie.

I blastomeri centrali formeranno l'embrione, mentre i grandi ed asimmetrici globuli polari (GP) saranno reclutati, insieme ai rimanenti nuclei di origine zigotica, a formare un vero e proprio trophamnion (Tremblay e Caltagirone, 1973).

Per quanto riguarda il tipo di embriogenesi, date le peculiari modalità con cui essa avviene, le immagini analizzate non hanno fornito indizi espliciti circa la sua natura. Comunque, considerate le dimensioni iniziali e l'allungamento graduale dell'embrione verso uno dei poli dell'uovo, è possibile ipotizzare un meccanismo embriogenetico di tipo *short germ band* (Fig. 68).

Nelle specie *short germ band* si formano, in fase gastrulativa, dapprima alcuni segmenti corporei anteriori; i segmenti caudali si realizzeranno a partire da una zona proliferativa posteriore del germe embrionale.

Partenogenesi telitoca in E. formosa.

Wolbachia è il "parassita riproduttivo" meglio conosciuto e più indagato (Zchori-Fein, 2001). In *E. formosa* esso è in grado di indurre telitochia causando il raddoppio del complemento cromosomico in un putativo uovo maschile aploide. In seguito a ciò, l'uovo svilupperà come femminile diploide.

In base alle attuali conoscenze, *E. formosa* è l'unica specie ad essere infettata dal batterio (Zchori-Fein, 2001). Pur essendo nota da tempo tale associazione, il meccanismo con cui veniva ristabilito il normale assetto diploide era stato soltanto ipotizzato.

In genere il ripristino della diploidia, nelle specie infette da *Wolbachia*, avviene attraverso la duplicazione gametica come riportato per i tre calcidoidei in cui il fenomeno è noto (Stouthamer e Kazmer, 1994; Gottlieb *et al.*; 2002; Pannebakker *et al.*, 2004).

A queste tre specie, sulla scorta delle ricerche effettuate, si aggiunge *E. formosa*.

La duplicazione gametica, o *pronucleus duplication* (Lamb e Willey, 1987), è un meccanismo citologico di tipo post-meiotico in cui il livello di ploidia viene restaurato per fusione dei primi due nuclei di segmentazione.

Nel caso dei tre calcidoidei in cui si manifesta tale fenomeno, questo meccanismo si realizza attraverso diversi eventi citologici. In *E. formosa*, analogamente ai modelli *Trichogramma* (Stouthamer e Kazmer, 1994) e *Leptopilina* (Pannebakker *et al.*, 2004), il raddoppio del complemento cromosomico avviene per inibizione della segregazione all'anafase della prima divisione di segmentazione. Successivamente i due gruppi di cromosomi, anziché allontanarsi come in telofase, si riavvicinano e si fondono dando luogo ad un nucleo di restituzione, diploide, che subirà una normale divisione mitotica producendo, infine, i primi due nuclei di segmentazione. In *Muscidifurax uniraptor*, invece, la prima divisione mitotica si verifica normalmente. Il ripristino della diploidia avviene durante la seconda profase (Gottlieb, 2002).

La comprensione dei meccanismi citologici che consentono il recupero della diploidia in specie telitocche, incrementano il bagaglio di conoscenze necessario ad un proficuo impiego di *Wolbachia* nel controllo biologico di diverse specie che interferiscono con le attività umane.

Alcuni parassitoidi vengono allevati in modo massale e, quindi, resi commercialmente disponibili quali agenti di controllo di numerosi fitofagi dannosi. Il successo di un siffatto “trattamento biologico” è direttamente proporzionale al numero di parassiti lanciati, che a sua volta dipende dalla capacità di allevare grandi quantità dell’entomofago. Dato che soltanto le femmine sortiscono un impatto negativo sulle popolazioni del fitofago, un sistema genetico in grado di massimizzare la produzione di prole femminile dovrebbe poter dimezzare i costi di un programma di allevamento massale (O’Neill, 1997) e, di conseguenza, del programma di controllo biologico.

Un modo per incrementare la produttività dei nemici naturali (Stouthamer, 1993) consisterebbe, quindi, nello sfruttare la capacità di *Wolbachia* di manipolare il sesso degli ospiti. In altre parole la telitochia potrebbe essere, sperimentalmente, indotta in alcuni Imenotteri di potenziale interesse commerciale per trasferimento non solo verticale, ma anche orizzontale di *Wolbachia* (Huigens *et al.*, 2004).

Membrana extra-embrionale e teratociti in E. pergandiella ed E. lutea

La membrana extra-embrionale è un ulteriore adattamento all’endoparassitismo, che consente ad *E. pergandiella* un livello di integrazione fisiologica con l’ospite più intimo.

Al momento della schiusa la larva neonata è ancora avvolta dal trophamnion che, dopo un breve intervallo di tempo, si dissocia in teratociti.

Alcuni di essi appaiono piuttosto voluminosi e plurinucleati, in accordo alla poliploidia riportata in letteratura (Strand e Wong, 1991; Zhang *et al.*, 1994). I nuclei, che in alcuni teratociti possono occupare l’intero volume della cellula, sono caratterizzati da una marcata asimmetria che gli conferisce un aspetto ben lungi dal somigliare ad un tipico nucleo

eucariotico. I dati bibliografici, concernenti le varie specie per le quali è nota la presenza di queste particolari cellule, concordano nel confermare l'assenza di divisioni nei teratociti (Dahlman, 1990; Zhang *et al.*, 1994).

Le osservazioni su *E. pergandiella* non confutano questi dati, ma neppure li confermano appieno. Infatti, durante l'intervallo di tempo tra la prima e la seconda età, sulla superficie dei teratociti si formano delle protrusioni all'interno delle quali si sono osservati scivolare dei nuclei.

Questa anomala "scissione" dei teratociti potrebbe spiegare il notevole incremento numerico e la rispettiva riduzione di diametro, constatati nelle fasi successive del loro ciclo vitale. Nel caso specifico di *E. pergandiella* necessitano ulteriori indagini ultrastrutturali, sulla natura della membrana esterna dei teratociti.

Il terzo giorno dalla schiusa dell'uovo, la popolazione di teratociti si è uniformata intorno ai 20-30 μ di diametro, ed alcuni dei più piccoli diventano quasi irriconoscibili per la presenza di numerosi *blebs*.

Secondo Dahlman (1990, 1991) nei parassitoidi in cui si assiste ad una diminuzione del numero dei teratociti, in funzione dell'età della larva, questi ultimi assolverebbero a funzioni trofiche. La stabilità numerica, invece, indicherebbe la continuazione delle attività regolative sull'ospite. La mancata constatazione di manifesta teratofagia da parte della larva di *E. pergandiella*, non consente, in questo specifico caso, di avallare la prima ipotesi, mentre sarebbero necessarie ulteriori indagini biochimiche per confermare la seconda.

Tuttavia, come precedentemente accennato, l'ipotesi che scaturisce dalle osservazioni propende per una sorta di "frammentazione" successiva dei teratociti che, combinata a fisiologici processi degenerativi, porterebbe alla loro graduale scomparsa.

Rispetto a quanto discusso finora, *E. lutea* rappresenta una sorta di mosaico poiché, pur esibendo un uovo mesolecitico a segmentazione superficiale simile a quello di *E. formosa*, possiede altre peculiari

caratteristiche che l'accomunano ad *E. pergandiella*, quali l'uovo idropico e la differenziazione di una membrana extra-embrionale.

Quest'ultima, però, deriva da un cappuccio di cellule che sormonta l'embrione e probabilmente, sulla scorta delle attuali osservazioni, inquadrabile come serosa (Tremblay and Caltagirone, 1973). Alla schiusa dell'uovo la larva risulta circondata da una membrana extra-embrionale, che in seguito dissocierà in una trentina di teratociti di taglia omogenea e più piccoli che in *E. pergandiella*.

Per quanto concerne i teratociti ci si trova a cospetto di un fenomeno biologico, in larga parte, osservato e studiato nell'ambito degli Icnemonoidei. Comunque i risultati conseguiti lasciano intravedere in *Encarsia*, un gruppo con altrettante potenzialità. Affrontati i necessari approfondimenti ultrastrutturali, la coltura in vitro dei teratociti e l'individuazione di eventuali molecole secrete rappresenterebbero gli obiettivi immediati. Infine sono previste delle prove di microiniezione di teratociti nell'ospite, al fine di valutare la capacità di influenzarne la fisiologia in assenza della larva del parassitoide.

CONCLUSIONI

L'eterogeneità delle strategie di sviluppo iniziale riscontrate nelle tre specie esaminate, suggeriscono diverse ipotesi utili a giustificare gli adattamenti osservati. È sorprendente constatare come tre endoparassitoidi congenerici possano rispondere alle stesse pressioni ambientali, con una tale gamma di adattamenti. In altri termini, è complicato valutare quanto peso si possa attribuire all'ambiente, nel favorire nuove risposte adattative, rispetto al retaggio ancestrale di una specie.

E. formosa depone un tipo di uovo le cui caratteristiche, congiunte alle modalità embriogenetiche, sono simili a quelle di un ectoparassita. Quest'ultimo, producendo un uovo robusto e dotato delle sostanze nutritive utili all'embrione in via di sviluppo, non necessita di stringere con l'ospite particolari vincoli fisiologici. In antitesi una specie come *E. pergandiella*, che produce uova minute e prive di tuorlo, manifesta una serie di specifici adattamenti all'endoparassitismo, che rapidamente gli consentono di interfacciarsi fisiologicamente all'ospite.

In disaccordo alle più attuali ed intriganti vedute, “ *As reviewed above, endoparasitic and ectoparasitic Hymenoptera show how life history transition influences the evolution of early developmental programs in insects* (Grbic, 2000) ”, ci troviamo dinanzi a delle entità strettamente imparentate, condividenti medesimi stile di vita e tipo di ambiente, che rappresentano una sorta di *puzzle* evolutivo.

Simili adattamenti si riscontrano anche negli Aphidiinae, un gruppo di Braconidi specifici endoparassiti di afidi (Tremblay, 1966; Tremblay and Calvert, 1971).

Questo dato, insieme a quelli relativi ad altri gruppi di parassitoidi, corrobora l'ipotesi di un'origine multipla dell'endoparassitismo nell'ambito degli Imenotteri. Comunque, non è da escludere che l'endoparassitismo

possa essersi sviluppato, in forma pre-adattativa (Ridley, 2006), in un ancestore comune alla linea evolutiva dei Parasitica.

Più che l'ambiente, quindi, il retaggio ancestrale di ciascuna specie, o un equilibrato connubio tra i due, potrebbe aver giocato un fondamentale ruolo nello spingere le diverse specie verso determinate strategie adattative.

Con parole più immediate, ad un certo punto della storia evolutiva dei Parasitica potrebbe essere comparso un individuo con particolari pre-adattamenti da cui originarono linee evolutive che, a livello individuale o di gruppo, hanno impiegato tali caratteristiche in modo specifico e contestuale.

Quindi una specie, forte del proprio retaggio ancestrale, si potrebbe insediare in un nuovo ambiente sfruttando al meglio i propri specifici adattamenti ed, eventualmente, affinando i preesistenti o sviluppandone altri.

Nonostante la sorprendente varietà di modelli di sviluppo riscontrati nei tre endoparassitoidi esaminati è, tuttavia, possibile formulare un'ipotesi che tenga conto di tutti i dati acquisiti.

E. formosa, e le altre specie di coccophagini in cui si evidenziano le stesse modalità riproduttive, condividerebbero un recente antenato ectoparassita di cui riterrebbero alcune caratteristiche dell'uovo e le principali strategie embriogenetiche. In tale contesto *E. lutea*, con il suo uovo mesolecitico a segmentazione superficiale e la membrana extra-embriionale che dissocia in teratociti, potrebbe fungere da collegamento tra le precedenti specie e quelle con un tipo di sviluppo più evoluto. Tra queste ultime si annovera *E. pergandiella* che manifesta, a partire dall'uovo alecitico, la segmentazione totale e la presenza di un trophamnion, una serie di apomorfie considerate da alcuni autori un percorso evolutivo verso la poliembrionia (Grbic e Strand, 2003).

Le indagini portate a termine dischiudono nuove prospettive di ricerca nell'ambito del genere *Encarsia*.

Dai dati ottenuti (Tab. 1), relativamente agli stadi iniziali di sviluppo, emerge una solida caratterizzazione embriologica dei tre endoparassitoidi esaminati. Le diverse tipologie di uova e di strategie embrionali, ad esse associate, possono fornire interessanti spunti tassonomici da impiegare, soprattutto, a livello di gruppi specie.

Considerata la buona informatività dei dati embriologici ricavati, se ne propone il loro impiego, in combinazione con quelli morfologici e molecolari, in ambito sistematico e filogenetico.

Pertanto, il passo successivo prevede l'estensione delle indagini ad altre specie di *Encarsia*, al fine di testare l'affidabilità dei dati embriologici acquisiti e la loro robustezza nel sostenere ipotesi di monofilia nell'ambito della filogenesi del gruppo.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS. B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. – 2004 –
Biologia molecolare della cellula. Zanichelli: 1680 pp.
- BABCOCK, C. S., HERATY, J. M., DE BARRO, P. J., DRIVER, F., SCHMIDT, S. – 2001 –
Preliminary phylogeny of *Encarsia* Förster (Hymenoptera: Aphelinidae) based on
morphology and 28 S rDNA. *Molecular Pylogenetics and Evolution* 18 (2): 306-
323.
- BEUKEBOOM, L. W., PIJNACKER, L. P. - 2000 – Automictic parthenogenesis in the
parasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae) revisited. *Genome*
43: 939-944.
- BLACKBURN, M. B., GELMAN, D. B., HU, J.S. – 2002 – Co-development of *Encarsia*
Formosa (Hymenoptera: Aphelinidae) and the green house whitefly, *Trialeurodes*
vaporariorum (Homoptera: Aleyrodidae): a histological examination. *Arch. Insect*
Biochem. Physiol. 51: 13-26.
- CARROL, S. B., GREINER, J. K., WEATHERBEE, S. D. – 2004 – Dal DNA alla diversità.
Evoluzione molecolare del progetto corporeo animale. Zanichelli: 240 pp.
- COUNCE, S. J., WADDINGTON, C. H. – 1972 – *Developmental System: Insects*. Vol I.
Academic press, London: 304 pp.
- DAHLMAN, D. L. – 1990 – Evaluation of teratocyte functions: an overview. *Arch. Insect*
Biochem. Physiol. 13: 159-166.
- DAHLMAN, D. L. -1991 – Teratocytes and host/parasitoid interactions. *Biological*
Control 1: 118-126.
- DAHLMAN, D. L., VINSON, S. B. – 1993 – Teratocytes: developmental and biochemical
characteristics. In: Beckage, N.E., Thompson, S. N., Federici, B. A. (Eds.),
Parasites and Pathogens of Insects, vol. I: Parasites. Academic Press, New York,
pp. 145-165.

- DAHLMAN, D. L., HOY, H. – 2002 – Extended in vitro culture of *Microplitis croceipes* teratocytes and secretion of TSP 14 protein. *Journal of Insect Physiology* 48: 401-409.
- DAVIS, G. K., PATEL, N. H. – 2002 – Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 669-699.
- DE BURON, I., BECKAGE, N. E. – 1997 – Developmental changes in teratocytes of the Braconid wasp *Cotesia congregata* in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* Vol. 43 (10): 915-930.
- DEDEINE, F., VAVRE, F., FLEURY, F., LOPPIN, B., HOCHBERG, M. E., BOULÉTREAU, M. – 2001 – Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *PNAS* 98 (11): 6247-6252.
- DONNEL, D. M. – 2004 – Vitellogenin of the parasitoid wasp, *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae): gene organization and differential use by members of the genus. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 951-961.
- DONNEL, D. M., HUNTER, M. S. – 2002 – Developmental rates of two congeneric parasitoids, *Encarsia formosa* and *E. pergandiella* (Hymenoptera: Aphelinidae), utilizing different egg provisioning strategies. *Journal of Insect Physiology* 48: 487-493.
- DOWTON, M., AUSTIN, A. D. – 2001 – Simultaneous analysis of 16S, 28S, COI and morphology in the Hymenoptera: Apocrita – evolutionary transitions among parasitic wasps. *Biological Journal of the Linnean Society* 74: 87-111.
- EVANS, G. A., POLASZEK, A., BENNETT, F. D. – 1995 – The taxonomy of the *Encarsia flavoscutellum* species-group (Hymenoptera: Aphelinidae) parasitoids of Hormaphididae (Homoptera: Aphidoidea). *Oriental Insects* 29: 33-45.
- EVANS, G. A., POLASZEK, A. – 1998 – The *Encarsia cubensis* species-group (Hymenoptera: Aphelinidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 100: 222-233.
- GERLING, D. – 1966 – Studies with whitefly parasites of southern California I. *Encarsia Pergandiella* Howard (Hymenoptera: Aphelinidae). *Can. Entom.* 98 (7): 707-724.

- GILBERT, S. F. – 2005 – *Biologia dello sviluppo*. Zanichelli: 800 pp.
- GILOH, H., SEDAT, J. W. – 1982 – Fluorescence microscopy: Reduced photobleaching of rhodamine and fluoresceine protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217: 1252-1255.
- GIORGINI, M., BALDANZA, F. – 2003 – Species status of two populations of *Encarsia sophia* (Girault & Dodd) (Hymenoptera: Aphelinidae) native to different geographic areas. *Biological control* 30: 25-35.
- GOTTLIEB, Y., ZCHORI-FEIN, E., WERREN, J. H., KARR, T. L. – 2002 – Diploidy restoration in Wolbachia-infected *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. of Invertebr. Pathol.* 81: 166-174.
- GOULET, H., HUBER, J. T. – 1993 – *Hymenoptera of the world : an identification guide to families*. Research Branch Agricultural, Canada, Publ. 1894/E: 667 pp.
- GRBIC, M. – 2000- “Alien” wasps and evolution of development. *Bioessays* 22 (10): 920-932.
- GRBIC, M. – 2003 – Polyembryony in parasitic wasps: evolution of a novel mode of development. *Int. J. Dev. Biol.* 47: 633-642
- GRBIC, M., STRAND, M. R. – 1998 – Shifts in the life history of parasitic wasps correlate with pronounced alterations in early development. *Developmental Biology* 95: 1097-1101.
- HAYAT, M. – 1989 – A revision of the species of *Encarsia* Foerster (Hymenoptera: Aphelinidae) from India and the adjacent countries. *Oriental Insects* 23: 1-131.
- HAYAT, M. – 1998 – Aphelinidae of India (Hymenoptera: Chalcidoidea): a taxonomic revision. *Memoirs on Entomology, International* 13: 416 pp.
- HERATY, J. M., POLASZEK, A. – 2000 – Morphometric analysis and descriptions of selected species in the *Encarsia strenua* group (Hymenoptera: Aphelinidae). *Journal of Hymenoptera Research* 9: 142-169.
- HUANG, J., POLASZEK, A. – 1998 – A revision of the Chinese species of *Encarsia* Foerster (Hymenoptera: Aphelinidae): parasitoids of white flies, scale insects and

- aphids (Hemiptera: Aleyrodidae, Diaspididae, Aphidoidea). Journal of Natural History 32: 1825-1966.
- HUIGENS, M. E., ALMEIDA, R. P., BOONS, P. A. H., LUCK, R. F., STOUTHAMER, R. – 2004
Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-
inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. Proc. R. Soc. Lond. B 271: 509-
515.
- HUNTER, M. S. – 1991 – Sex ratio in an autoparasitoid *Encarsia Pergandiella* Howard
(Hymenoptera: Aphelinidae). Ph.D. dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.
- HUNTER, M. S., WOOLLEY, J. B. – 2001 – Evolution and behavioral ecology of
heteronomous Aphelinid parasitoids. Annu. Rev. Entomol. 46: 251-290.
- LAMB, R. Y., WILLEY, R. B. – 1987 – Cytological mechanisms of thelytokous
parthenogenesis in insects. Genome 29: 367-369.
- MANZARI, S., POLASZEK, A., BELSHAW, R., QUICKE, D. L. J. – 2002 – Morphometric
and molecular analysis of the *Encarsia inaron* species-group (Hymenoptera:
Aphelinidae), parasitoids of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). Bull. Entomol.
Res. 92: 165-175.
- MAZZONE, P., VIGGIANI, G. – 1985 – Nuovi dati sull'*Encarsia pergandiella* (Howard)
(Hym.: Aphelinidae), parassita esotico introdotto in Italia contro il *Trialeurodes*
Vaporariorum (Westw.) (Hom.: Aleyrodidae). Atti XXIV Congr. Naz. It. Ent.
Palermo, Erice, Bagheria: 855-859.
- O'NEILL, S. L., HOFMANN, A. A., WERREN, J. H. – 1997 – Influential passenger:
inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University press,
New York: 214 pp.
- PANNEBAKKER, B. A., PJNACKER, L. P., ZWAAN, B. J., BEUKEBOOM, L. W. – 2004 –
Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes*
(Hymenoptera: Figitidae). Genome 47: 299-303.
- PEDATA, P. A., POLASZEK, A. – 2003 – A revision of the *Encarsia longifasciata* species
group (Hymenoptera: Aphelinidae). Systematic Entomology 28: 361-374.

- PEDATA, P. A., GARONNA, A. P., ZABATTA, A., ZEPPA, P., ROMANI, R., 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.
- PEEL, A. D., CHIPMAN, A. D., AKAM, M. – 2005 – Arthropod segmentation: beyond the *Drosophila* paradigm. *Nature* 6: 905-916.
- PENNACCHIO, F., VINSON, S. B., TREMBLAY, E.- 1993 – Growth and development of *Cardiochiles Nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) larvae and their synchronization with some changes of the hemolymph composition of their host, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 24: 65-77.
- PENNACCHIO, F., VINSON, S. B., TREMBLAY, E. – 1994a – Morphology and ultrastructure of the serosal cells (Teratocytes) in *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae) embryos. *Int. J. Morphol. Embryol.* 23 (2): 93-104.
- PENNACCHIO, F., VINSON, S. B., TREMBLAY, E., OSTUNI, A. – 1994b – Alteration of ecdysone metabolism in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera, Noctuidae) larvae induced by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera, Braconidae) teratocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 383-394.
- PENNACCHIO, F., STRAND, M. – 2006 - Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 233-258.
- POLASZEK, A., EVANS, G. A., BENNETT, F. D. – 1992 – *Encarsia* parasitoids of *Bemisia tabaci* (Hymenoptera: Aphelinidae, Homoptera: Aleyrodidae): a preliminary guide to identification. *Bulletin of Entomological Research* 82: 375-392.
- POLASZEK, A., ABD-RABOU, S. HUANG, J. – 1999 – The Egyptian species of *Encarsia* (Hymenoptera: Aphelinidae): a preliminary review. *Zoologische Mededelingen, Leiden* 73: 131-163.
- QUICKE, D. L. J. – 1997 – *Parasitic Wasps*. Chapman & Hall, London: 470 pp.
- RANA, R. L., DAHLMAN, D. L., WEBB, B. A. – 2002 – Expression and characterization of a novel teratocyte protein of the Braconid, *Microplitis croceipes* (Cresson). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1507-1516.

- RIDLEY, M. – 2006 – Evoluzione. Mac Graw-Hill: 701 pp.
- Robinson, D. N., Cant, K., Cooley, L. – 1994 – Morphogenesis of *Drosophila* ovarian ring canals. *Development* 120: 2015-2025.
- ROKAS, A. 2000. *Wolbachia* as a speciation agent. *Trends Ecol. Evol.* 15: 44-45.
- SANDER, K. – 1997 – Pattern formation in insect embryogenesis: the evolution of concepts and mechanisms. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 25: 349-367.
- SILVESTRI, F. - 1915 – Struttura dell'ovo e prime fasi di sviluppo di alcuni Imenotteri parassiti. *Boll. Lab. Zool. Gen. Agr. Portici* 10: 66-88.
- STEVENS, L., GIORDANO, R. AND FIALHO, R.F. 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32: 519–545.
- STONER, A., BUTLER, G. D. – 1965 – *Encarsia lutea* as an egg parasite of bollworm and cabbage looper in Arizona cotton. *J. Econ. Entomol.* 58: 1148-1150.
- STOUTHAMER, R. - 1993 – The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga* 38: 3-6.
- STOUTHAMER, R. – 1997 – *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In *Influential passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod reproduction* (S. L. O'Neill, A. A. Hoffman and J. H. Werren, Eds.). Oxford Univ. Press, New York: 102-124.
- STOUTHAMER, R., KAZMER, D. – 1994 – Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity* 73: 317-327.
- STOUTHAMER, R., BREEUWER, J. A. J., HURST, G. D. D. – 1999 – *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 71-102.
- STOUTHAMER, R., MAK, F. – 2002 – Influence of antibiotics on the offspring production of the *Wolbachia*-infected parthenogenetic parasitoid *Encarsia Formosa*. *Journal Invertebrate Pathology* 80: 41-45.

- STRAND, M. R., QUARLES, J. M., MEOLA, S. M., VINSON, S. B. – 1985 – Cultivation of teratocytes of the egg parasitoid, *Telenomus Heliothidis* (Hymenoptera : Scelionidae). *In vitro Cell. Dev. Biol.* 21: 361-367.
- STRAND, M. R., VINSON, S. B., NETTLES, W. C., XIE, Z. M. – 1988 – In vitro culture of egg parasitoid, *Telenomus heliothidis*: the role of teratocytes and medium consumption in development. *Entomol. Exp. Appl.* 46: 71-78.
- STRAND, M. R., WONG, E. A. – 1991 – The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. *J. Insect Physiol.* 37: 503-515.
- SUOMALAINEN, E. – 1962 – Significance of parthenogenesis in the evolution of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 7: 349-366.
- TREMBLAY, E. – 1966 – Ricerche sugli Imenotteri parassiti II. Osservazioni sull'origine e sul destino dell'involucro embrionale degli Aphidiini (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) e considerazioni sul significato generale delle membrane embrionali. *Boll. Lab. Ent. Agr. Portici* 24: 119-166.
- TREMBLAY, E. – 1999 – Entomologia applicata. I generalità e mezzi di controllo. Liguori, Napoli: 269 pp.
- TREMBLAY, E., CALVERT, D. – 1971 – Embryosystematics in the Aphidiines (Hymenoptera: Braconidae). *Boll. Lab. Entomol. Agr. Portici* 29: 223-249.
- TREMBLAY, E., CALVERT, D. – 1972 – New cases of polar nuclei utilization in insects. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 8: 495-498.
- TREMBLAY, E., CALTAGIRONE L. E. – 1973 – Fate of polar bodies in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 18: 421-444.
- VAVRE, F., DE JONG, J. H., STOUTHAMER, R. – 2004 – Cytogenetics mechanisms and genetic consequences of thelytoky in the wasp *Trichogramma cacoeciae*. *Heredity* 93: 592-596.
- VIGGIANI, G., - 1981 – Gli Imenotteri Afelinidi e la lotta biologica. *Atti Acc. Naz. It. Ent. Rend.* 28 e 29: 3-33.

- VIGGIANI, G. – 1985 – Additional notes and illustrations on some species of aphelinids described by A. A. Girault and A. P. Dodd in the genera *Coccophagus* Westw., *Encarsia* Foerst. and *Prospaltella* Ashm. (Hym.: Chalcidoidea). Boll. Lab. Ent. Agr. “Filippo Silvestri”, Portici 42: 233-255.
- VIGGIANI, G., - 1987 – Le specie italiane del genere *Encarsia* Foerster (Hymenoptera: Aphelinidae). Boll. Lab. Ent. agr. Filippo Silvestri 44: 121-179.
- VIGGIANI, G., - 1988 – Advances in taxonomy and biology of the Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Advances in Parasitic Hymenoptera Research: 79-84.
- VIGGIANI, G., - 1997 – Lotta biologica ed integrata nelle difesa fitosanitaria. Parte I Lotta Biologica. Liguori, Napoli: 517 pp.
- VIGGIANI, G., MAZZONE, P. – 1979 – Contributi alla conoscenza morfo-biologica delle specie del complesso *Encarsia* Foerster – *Prospaltella* Ashmead (Hym. Aphelinidae). 1. Un commento sull’attuale stato, con proposte sinonimiche e descrizione di *Encarsia silvestrii* n. sp., parassita di *Bemisia citricicola* Gom. Men. (Hom. Aleyrodidae). Boll. Lab. Ent. Agr. Portici 36: 42-50.
- VIGGIANI, G., MAZZONE, P. – 1980 – Sull’introduzione in Italia di *Encarsia pergandiella* Howard (Hymenoptera: Aphelinidae), parassita di *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) (Homoptera: Aleyrodidae). Boll. Lab. Ent. Agr. Portici 37: 39-43.
- VINSON, S. B. – 1970 – Development and possible function of teratocytes in host parasite association. J. Invertbr. Pathol. 16: 93-101.
- VINSON, S. B. LEWIS, W. J. – 1973 – Teratocytes : growth and numbers in the hemocoel of *Heliothis virescens* attacked by *Microplitis croceipes*. J. Invertbr. Pathol. 22: 351-355.
- VINSON, S. B. SCOTT, J. R. – 1974 – Ultrastructure of teratocytes of *Cardiochiles nigriceps* Viereck. Int. J. Insect Morphol. Embryol. 3: 293-304.
- VINSON, S. B., IWANTSCH, G. F. – 1980 – Host regulation by insect parasitoids. Quart. Rev. Biol. 55: 143-165.

- WALTER, G. H. – 1983 – Differences in host relationships between male and female
etronomous parasitoids (Aphelinidae: Chalcidoidea): a review of host location,
oviposition and pre-imaginal physiology and morphology. J. Ent. Soc. Sth. Afr.
46 (2): 261-282.
- WERREN, J. H. – 1997 – Biology of *Wolbachia*. Annu. Rev. Entomol. 42: 587-609.
- WHITFIELD, J.B. – 1998 – Phylogeny and evolution of host-parasitoid interaction in
Hymenoptera. Annual Review of Entomology 43: 129-151.
- WHITFIELD, J.B., 2003 – Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in
Hymenoptera. Advances in Parasitology 54: 69-99.
- WILLIAMS, T., POLASZEK, A. – 1996 – A re-examination of host relations in the
Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Biological Journal of the Linnean
Society 57: 35-45.
- YASNOSH, V. A. -1980 – Food specialization in the family Aphelinidae (Hymenoptera,
Chalcidoidea). Entomological review 58: 61-70.
- ZHANG, D., DAHLMAN, D. L., JÄRLFORS, U.E., SOUTHGATE, H. H., WILEY, S. P. – 1994
– Ultrastructure of *Microplitis croceipes* (Cresson) (Braconidae: Hymenoptera)
teratocytes. Int. J. Insect Morphol. Embryol. 23: 173-187.
- ZCHORI-FEIN, E., ROUSH, R. T., HUNTER, M. S. – 1992 – Male production by antibiotic
treatment in *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), in asexual species.
Experientia 48: 173-178.
- ZCHORI-FEIN, E., GOTTLIEB, Y., KELLY, S. E., BROWN, J.K., WILSON, J. M., KARR, T. L.,
HUNTER, M. S. – 2001 – A newly discovered bacterium associated with
parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 98: 12555-12560.
- ZCHORI-FEIN, E., PERLMAN, S. J. – 2004 – Distribution of the bacterial symbiont
Cardinium in arthropods. Molecular Ecology 13: 2009-2016.
- ZINNA, G. – 1961 – Ricerche sugli insetti entomofagi. II. Specializzazione negli
Aphelinidae: Studio morfologico, etologico e fisiologico del *Coccophagus*

bivittatus Compere, nuovo parassita del *Coccus hesperidum* L. per l'Italia. Boll. Lab. Ent. Agr. Portici 19: 301-358.

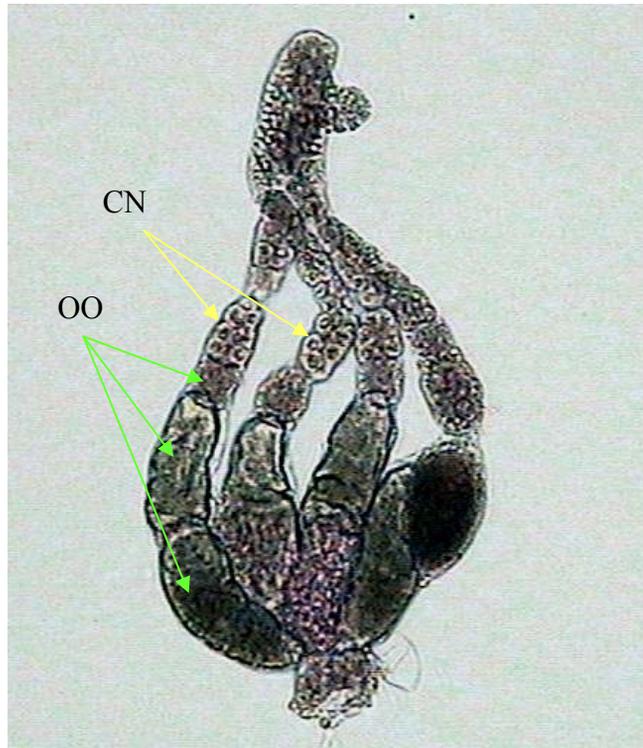


Fig. 4. *E. formosa*. Ovario di tipo meroistico politrofico.
 CN= cellule nutrici; OO= oociti a varie fasi di maturazione.

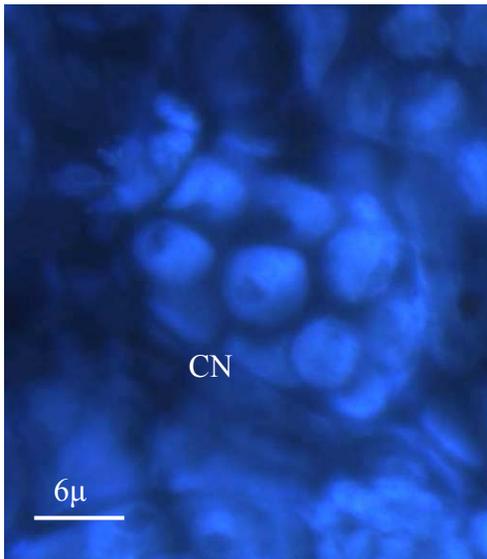


Fig. 5. *E. formosa*. Particolare di un ovario. Gruppo di cellule nutrici (CN). Nuclei colorati con Dapi.

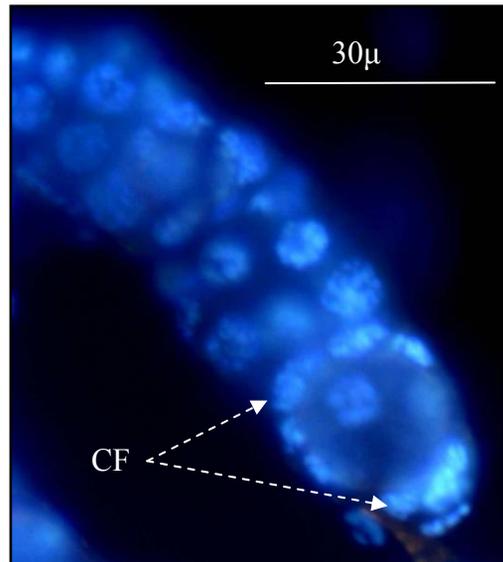


Fig. 6. *E. pergandiella*. Particolare di un ovario. Oocita in via di maturazione circondato da cellule follicolari. Nuclei evidenziati con Hoechst 33258.

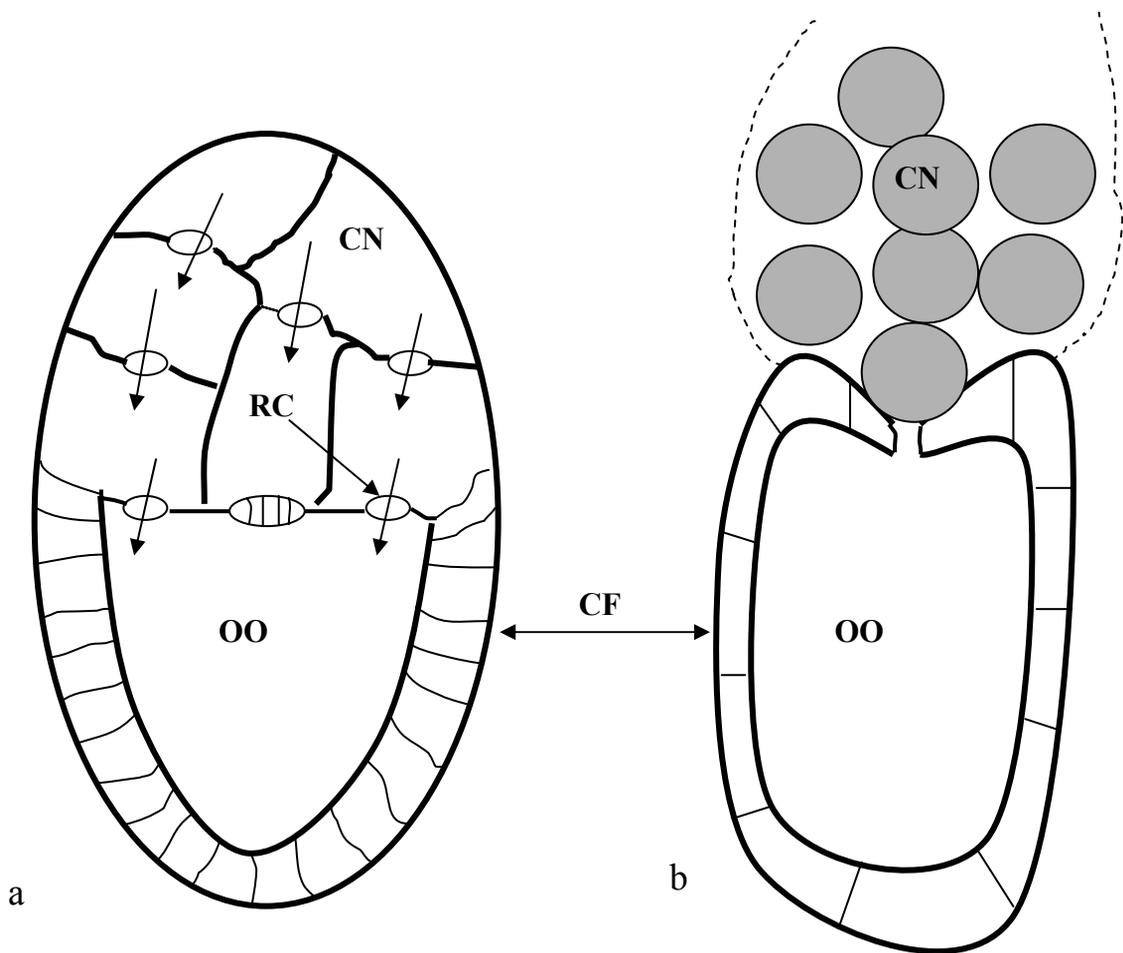


Fig. 7. Disegni schematici di follicoli ovarici. a. *Drosophila melanogaster*. b. *Encarsia sp.* **a.** In *Drosophila* alcune cellule nutrici sono a diretto contatto con l'oocita. **b.** In *Encarsia* le cellule follicolari circondano, quasi, completamente l'oocita

RC= ring canals; CF= cellule follicolari; CN= cellule nutrici; OO= oocita.

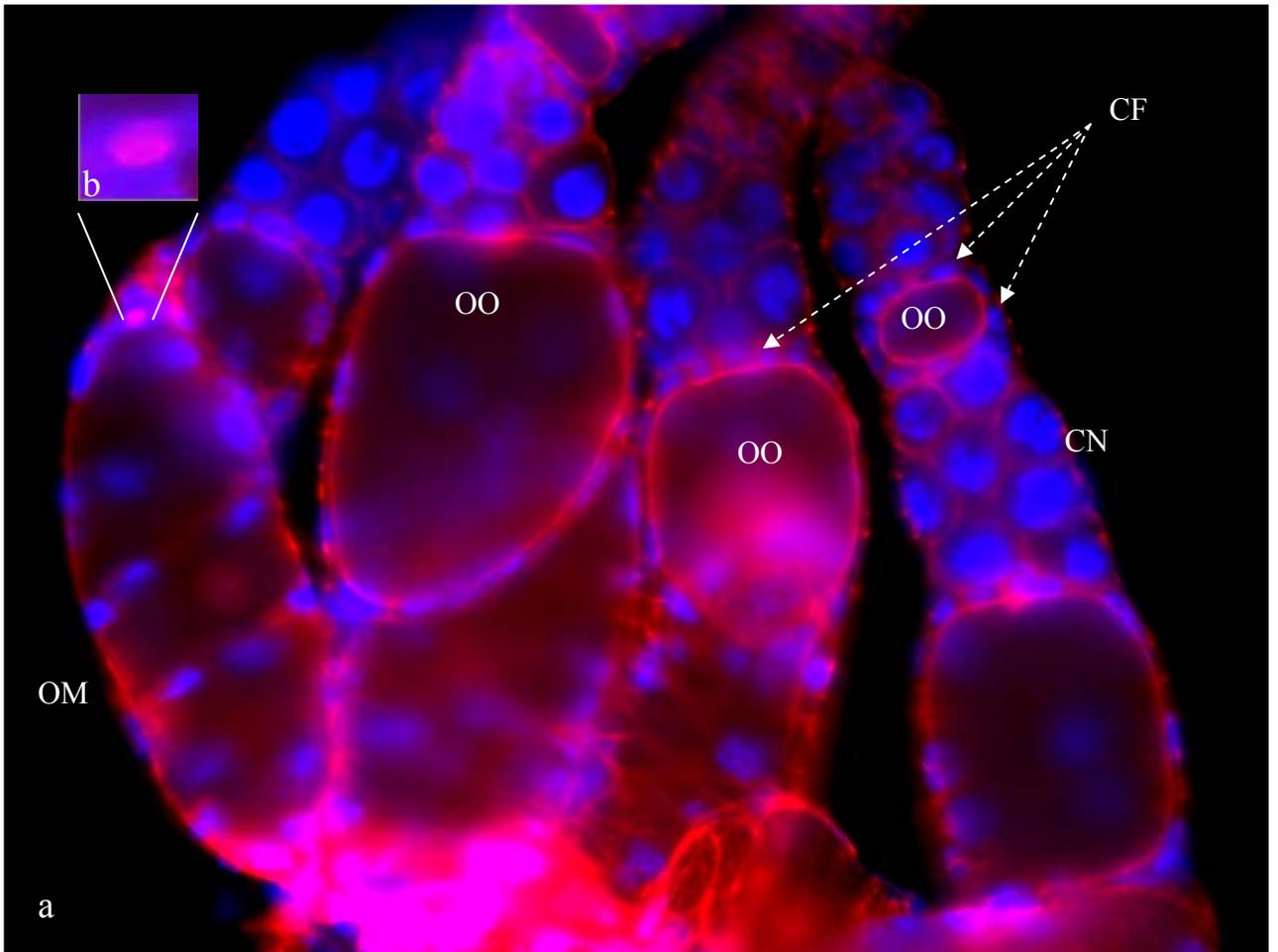


Fig. 8. *E. formosa*. Gruppo di ovariole. **a.** Oociti (OO) sormontati da cellule nutritive (CN) e circondati da cellule follicolari (CF). Oocita maturo (OM). **b.** Ingrandimento della struttura annulare simile ai *ring canals* di *Drosophila melanogaster*. Nuclei evidenziati con DAPI, Actina-F con Rodamina-Falloidina.



Fig. 9. *E. pergandiella*. Ovario.

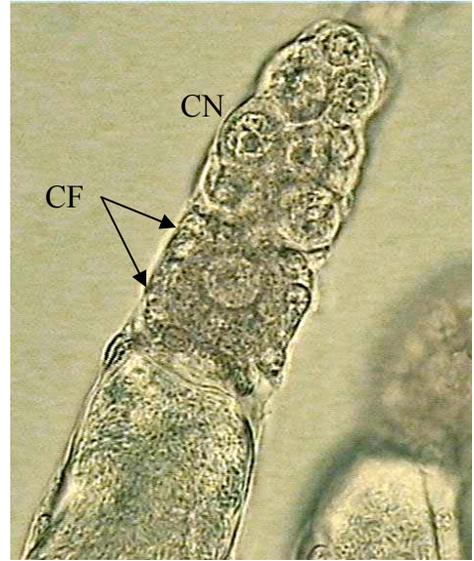


Fig. 10. *E. pergandiella*. Particolare di un ovario. CF= Cellule follicolari. CN= cellule nutritive.

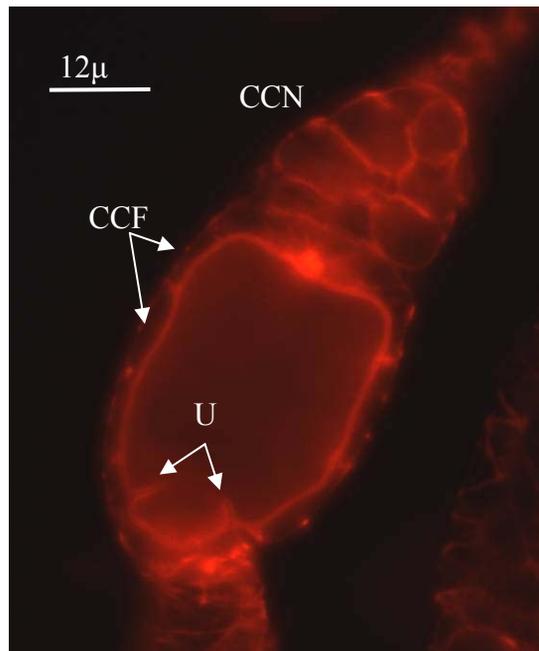


Fig. 11. *E. lutea*. Particolare di un follicolo ovarico. U= uncini; CCF= cellule follicolari citoscheletro; CCN= cellule nutritive citoscheletro. F-actina evidenziata con Rodamina-Falloidina.

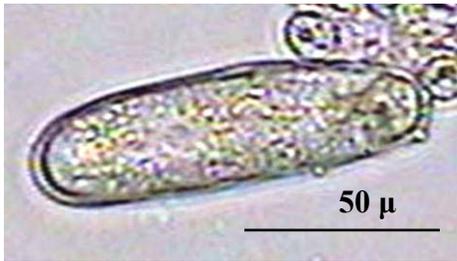


Fig. 12. *E. pergandiella*. Uovo appena depresso.

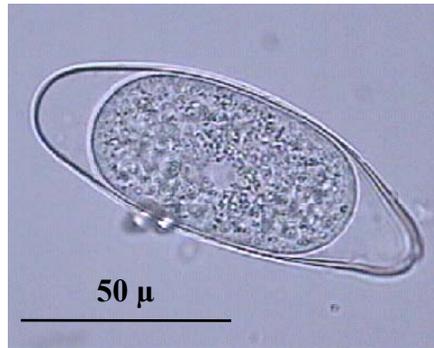


Fig. 13. *E. pergandiella*. Uovo depresso da circa 20 min.

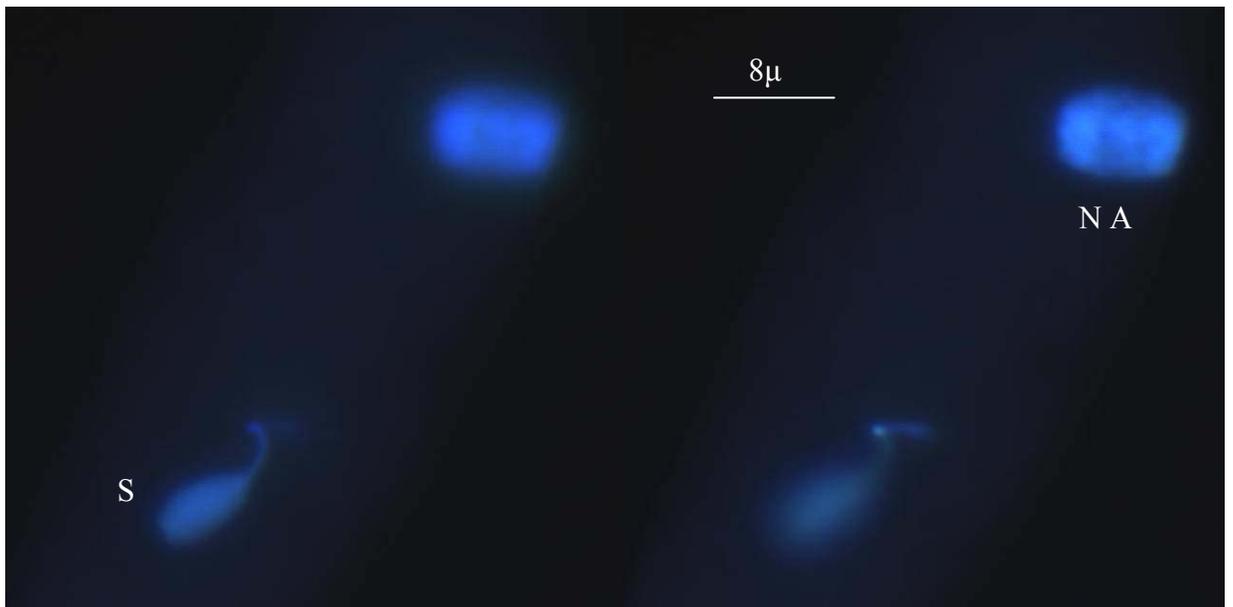


Fig. 14. *E. pergandiella*. Oocita in anafase iniziale. Nuclei colorati con Hoechst 33258. S= spermio; NA= nucleo dell'oocita in anafase.

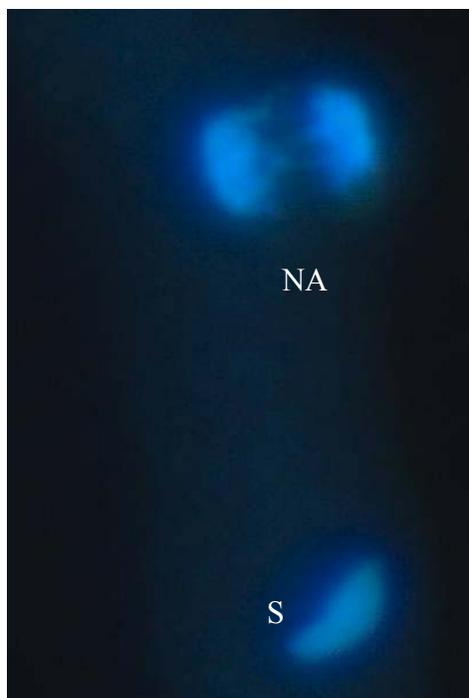


Fig. 15. *E. pergandiella*. Oocita in anafase terminale. Nuclei colorati con Dapi.
S= testa dello spermio; NA= nucleo in anafase

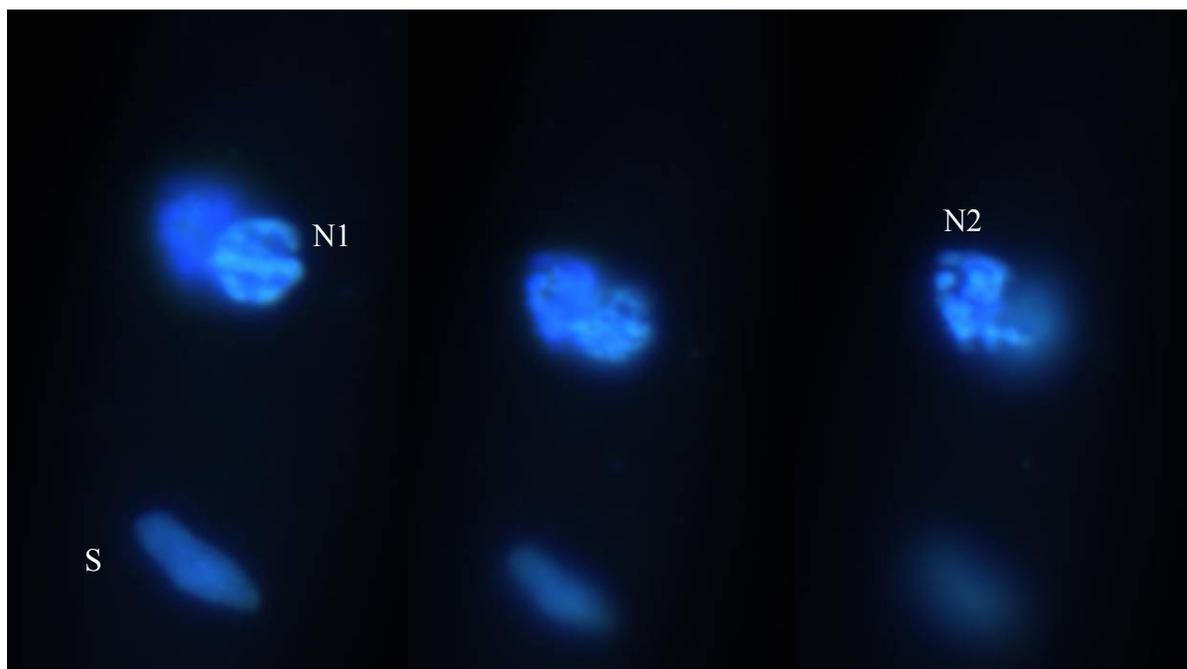


Fig. 16. *Encarsia pergandiella*. Sequenza di piani focali diversi di uno stesso uovo. Fase di espulsione del globulo polare. Anafase terminale – Telofase. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

S= testa dello spermio; N= nuclei in formazione.

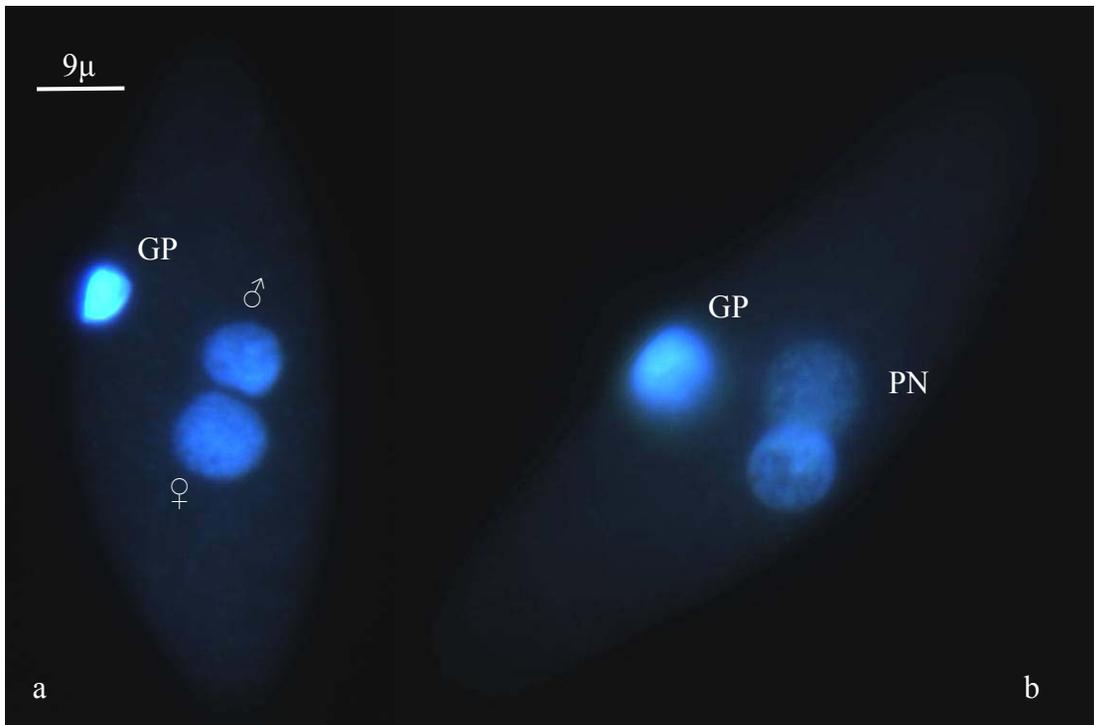


Fig. 17. *E. pergandiella*. a. Pronuclei in avvicinamento e globulo polare in fase compatta. b. Successivamente i nuclei decondensano e si avvicinano ulteriormente; il globulo polare aumenta, considerevolmente, di volume. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

♀= pronucleo femminile; ♂= pronucleo maschile; GP= globulo polare; PN= pronuclei.

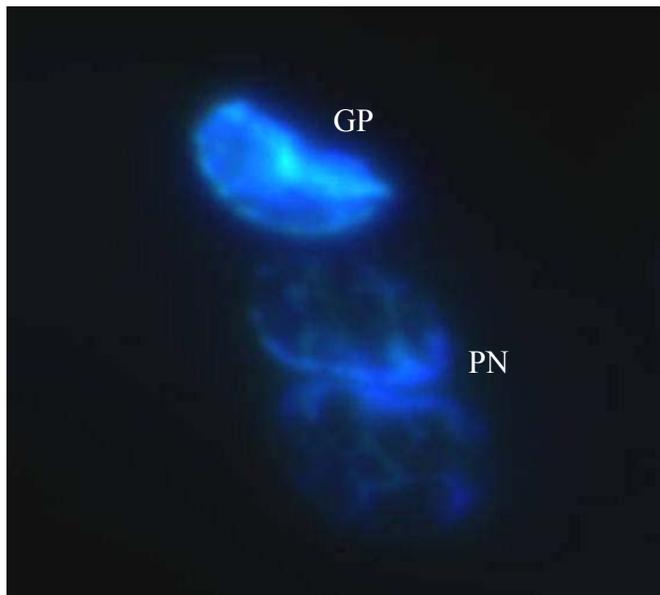


Fig.18. *E. pergandiella*. Pronuclei in via di fusione. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

GP= globulo polare; PN= pronuclei.

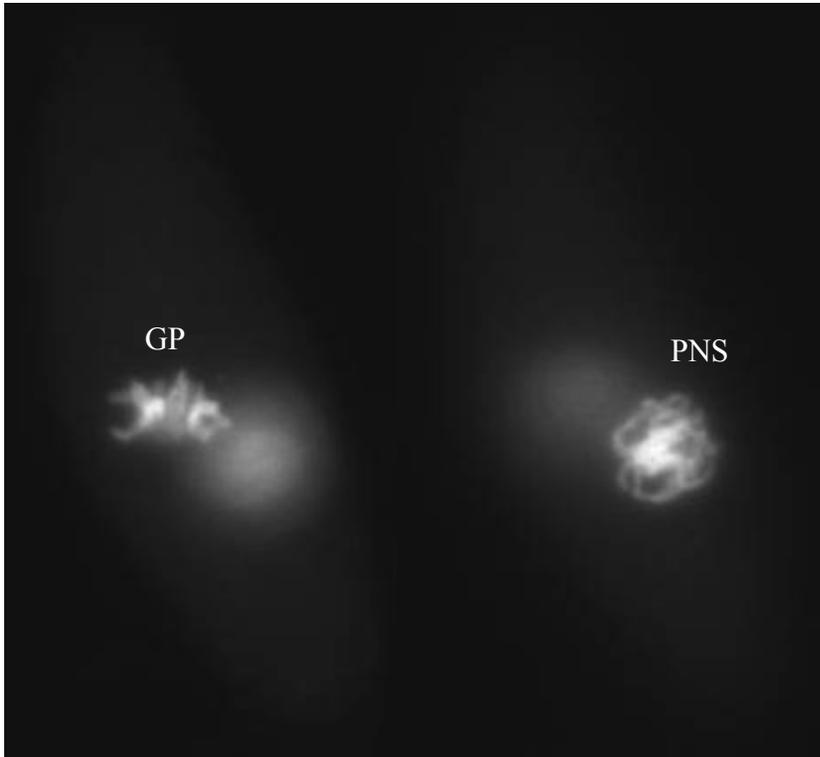


Fig. 19. *E. pergandiella*. Sequenza di piani focali diversi di uno stesso uovo. Globulo polare (GP) in prometafase, primo nucleo di segmentazione (PNS) in profase. Nuclei evidenziati con Hoechst 33258.

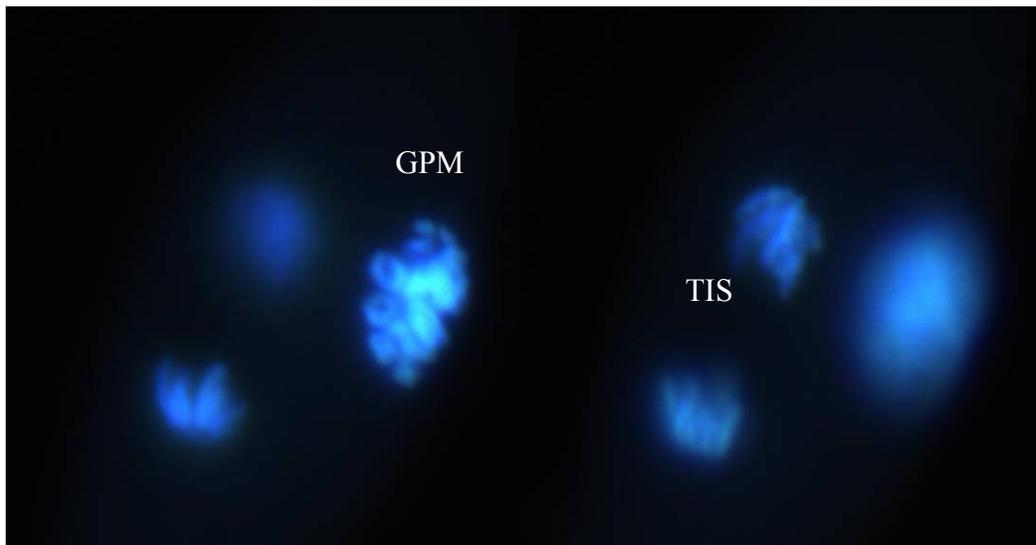


Fig. 20. *E. pergandiella*. Sequenza di immagini di piani focali diversi di uno stesso uovo. Telofase della prima divisione di segmentazione (TIS). Globulo polare in metafase (GPM). DNA evidenziato con Hoechst 33258.

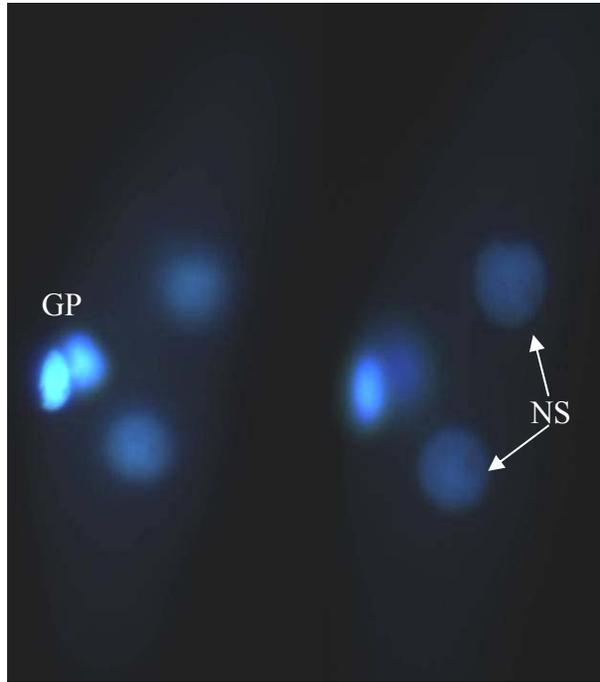


Fig. 21. *E. pergandiella*. Sequenza di piani focali diversi di uno stesso embrione. Primi due nuclei di segmentazione (NS) con i due globuli polari (GP). Nuclei colorati con Hoechst 33258.

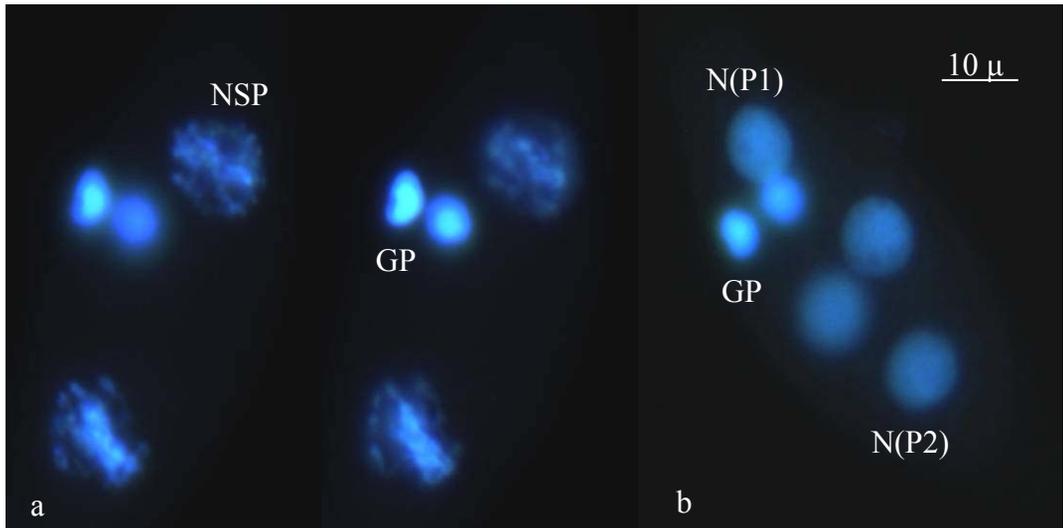


Fig.22. *E. pergandiella*. **a.** Sequenza di piani focali diversi di uno stesso embrione. Primi 2 nuclei di segmentazione in prometafase (NSP) e globuli polari (GP). **b.** Stadio a 4 nuclei. I due nuclei polari (NP1-NP2), analogamente ai globuli polari (GP), manterranno la medesima posizione per molte divisioni. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

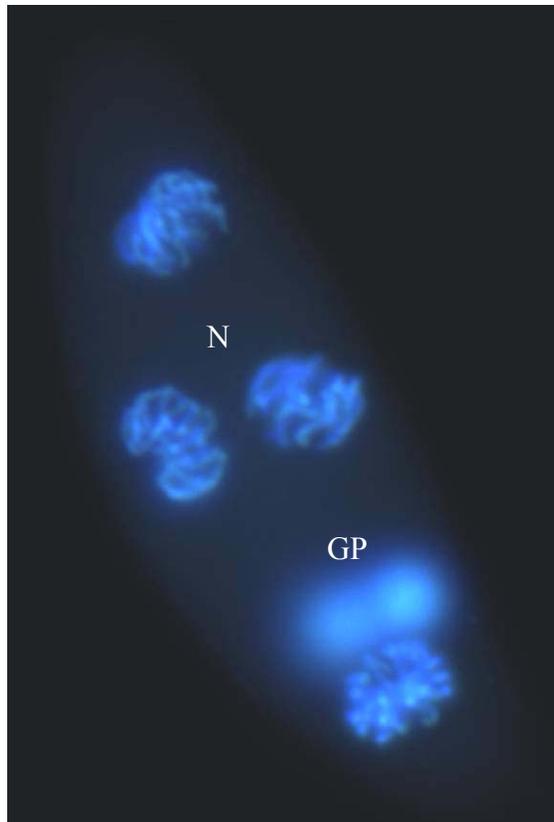


Fig. 23. *E. pergandiella*. Nuclei in prometafase (N) e globuli polari (GP) (fuori fuoco). Nuclei colorati con Hoechst 33258.

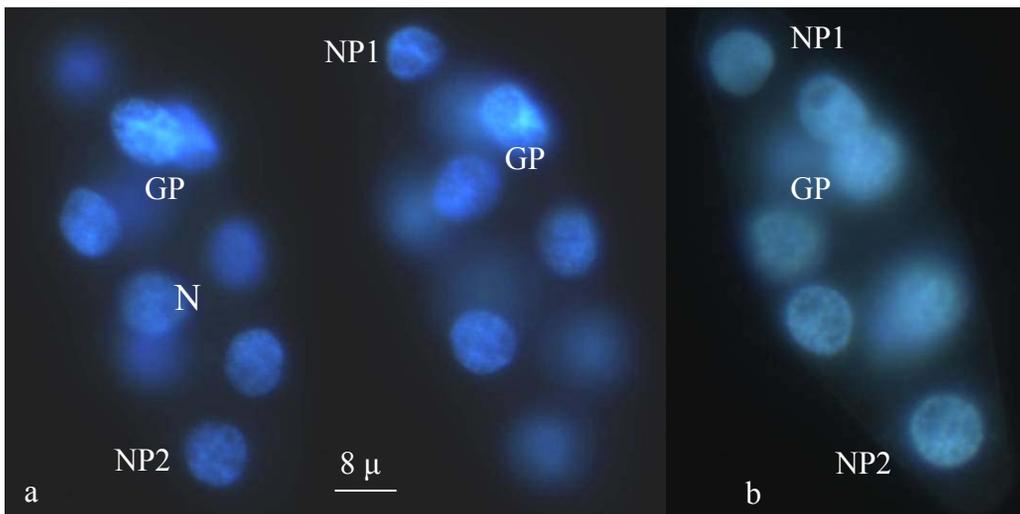


Fig. 24. *E. pergandiella*. **a.** Sequenza di piani focali diversi di uno stesso embrione. Stadio a 8 nuclei. I due nuclei localizzati ai rispettivi poli (NP1-NP2) esibiscono un diverso grado di condensazione. I globuli polari, adiacenti ad NP1, appaiono più intensamente colorati e tendenti all'asimmetria. I nuclei (N) da cui originerà l'embrione sono localizzati al centro. **b.** Nuclei quasi profasici tranne NP1, che appare ancora in fase S-G2. Immagini in fluorescenza ottenute con Hoechst 33258.

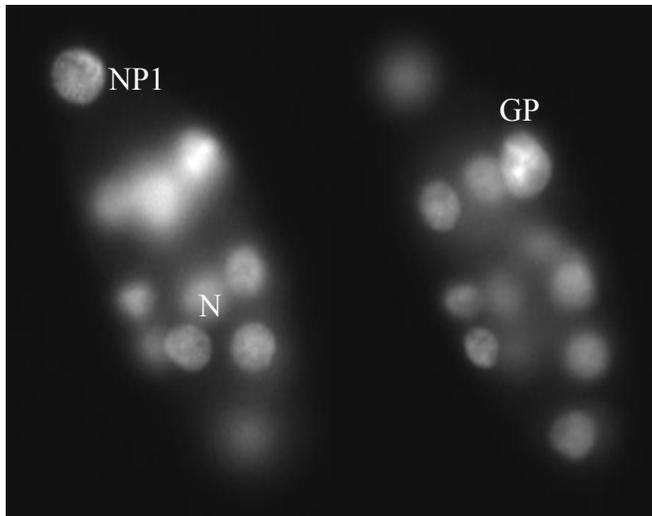


Fig. 25. *E. pergandiella*. Sequenza di piani focali diversi di uno stesso embrione. Stadio a 14 nuclei. Il nucleo (NP1) vicino i globuli polari (GP) assume un aspetto quasi profasico. I nuclei embrionali (N) occupano una posizione centrale.



Fig. 26. *E. pergandiella*. Foto al microscopio ottico. Compartimentazione dell'embrione. Colorazione con carminio acetico

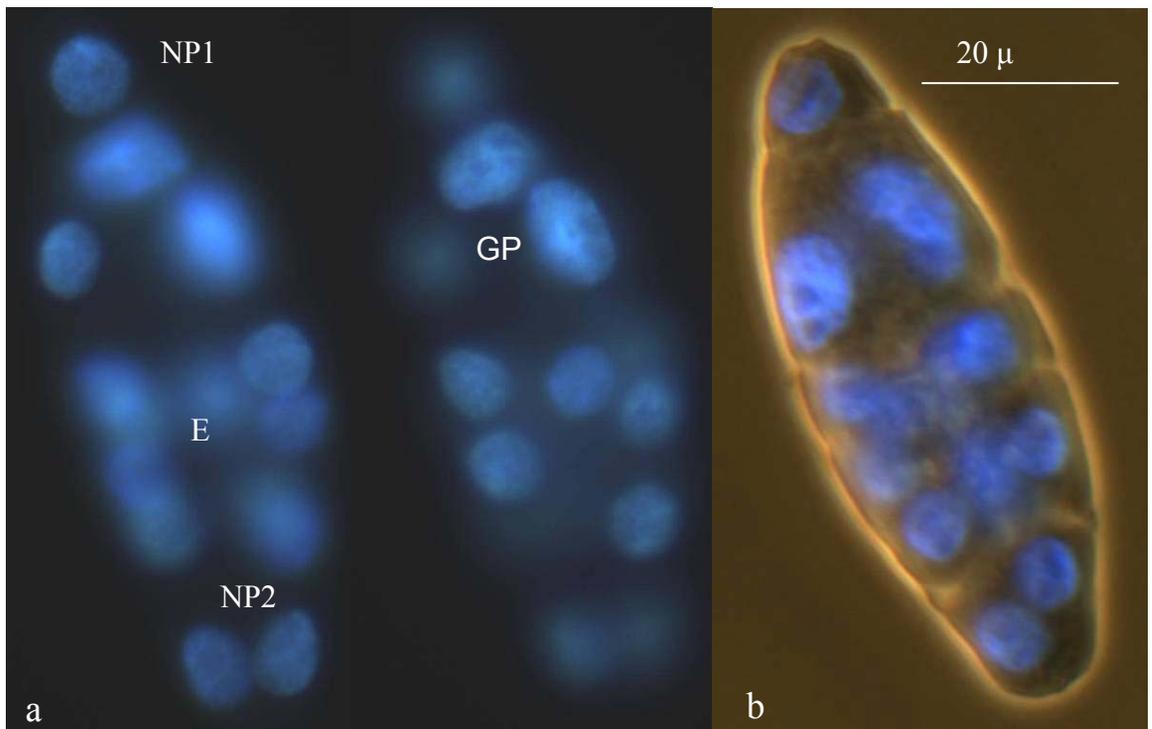


Fig. 27. *E. pergandiella*. **a.** Sequenza di piani focali diversi di uno stesso embrione. Stadio a 15 nuclei. In questa fase l'embrione (E) consta di 10 nuclei. Un nucleo polare si è già diviso (NP2) l'altro (NP1), invece, è in una fase cellulare tipo G2. I globuli polari (GP) tendono a divenire più voluminosi ed asimmetrici. **b.** Embrione nello stadio a 15 nuclei ottenuto con tecnica mista fluorescenza-contrasto di fase. Nuclei evidenziati con Hoechst 33258.

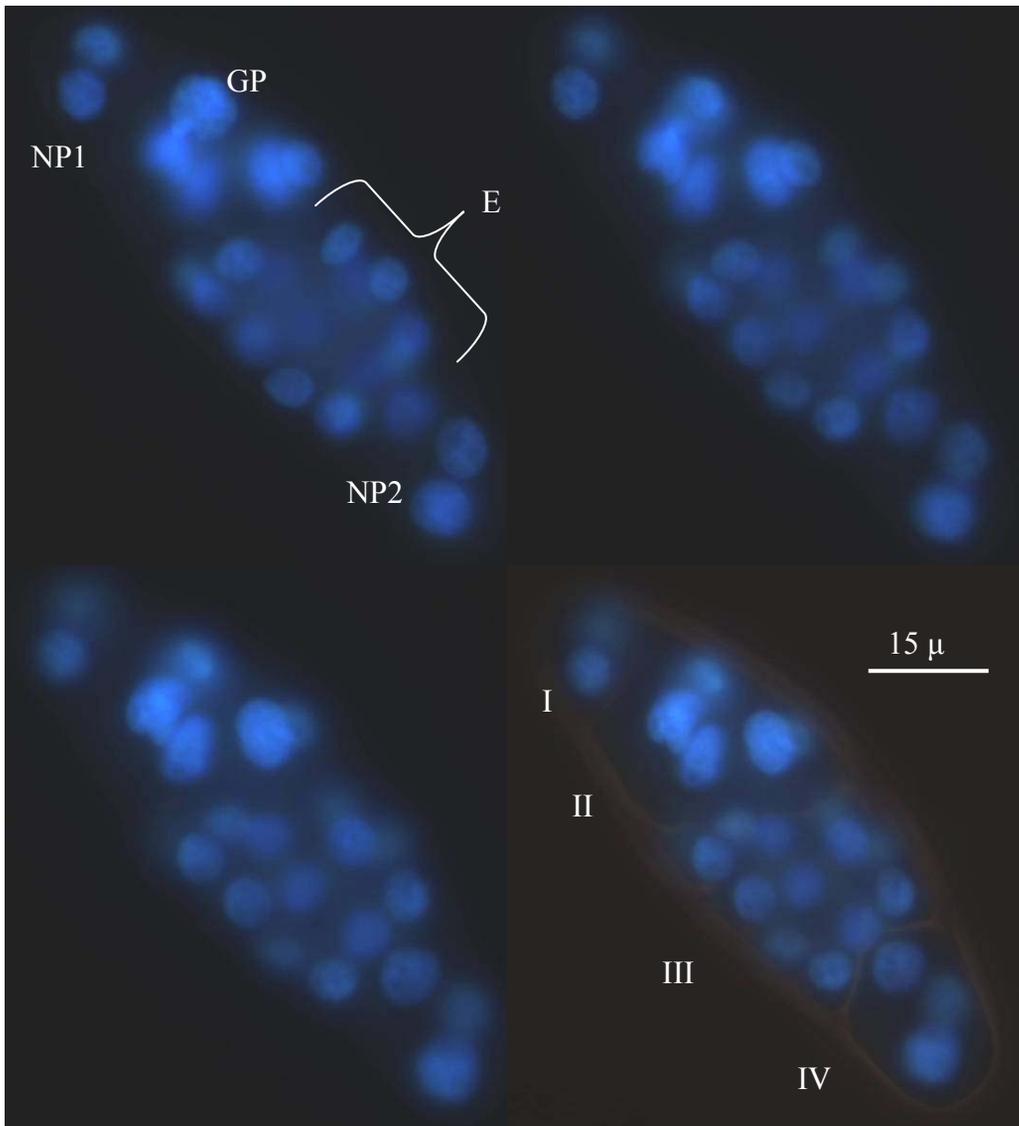


Fig. 28. *E. pergandiella*. Sequenza di piani focali diversi di uno stesso embrione. I nuclei polari (NP1-NP2) sono duplicati. L'embrione centrale (E) consta di un ventina di nuclei ed i globuli polari (GP) sono anch'essi duplicati. Nell'ultima immagine, ottenuta con una tecnica mista fluorescenza-contrasto di fase, si evidenziano chiaramente i 4 territori (I – IV) in cui è suddiviso l'uovo. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

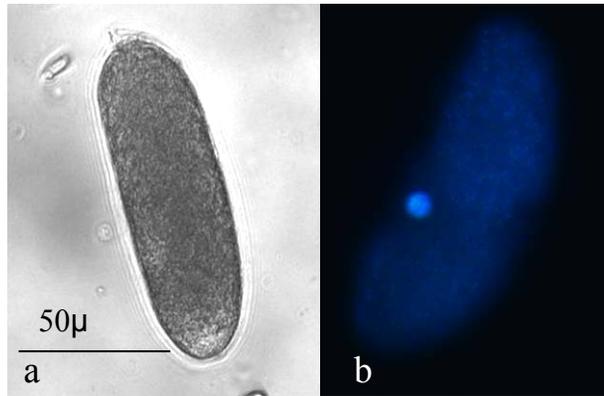


Fig. 29. *E. formosa*. a. Uovo appena deposto, foto al contrasto di fase. b. Uovo in analogo stadio del precedente colorato con DAPI.



Fig. 30. *E. formosa*. Sequenza di immagini illustranti la prima divisione di maturazione dell'uovo, fino alla divisione del primo globulo polare.

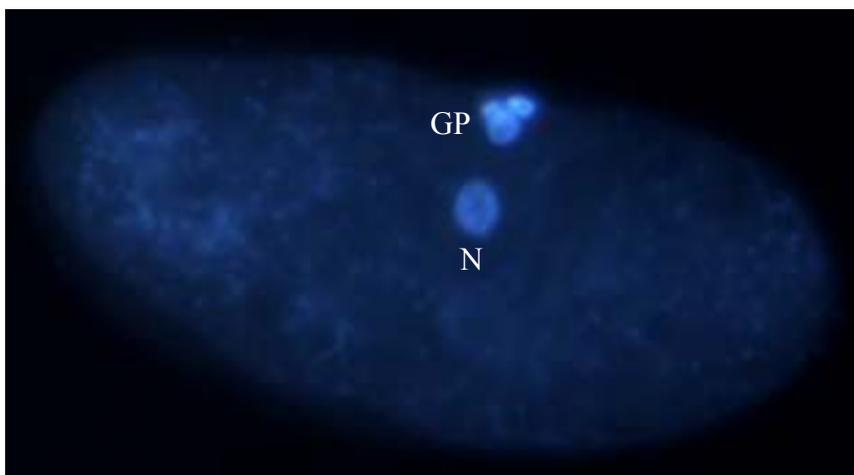


Fig. 31. *E. formosa*. Oocita maturo con i tre globuli polari (GP) ed il nucleo aploide (N).

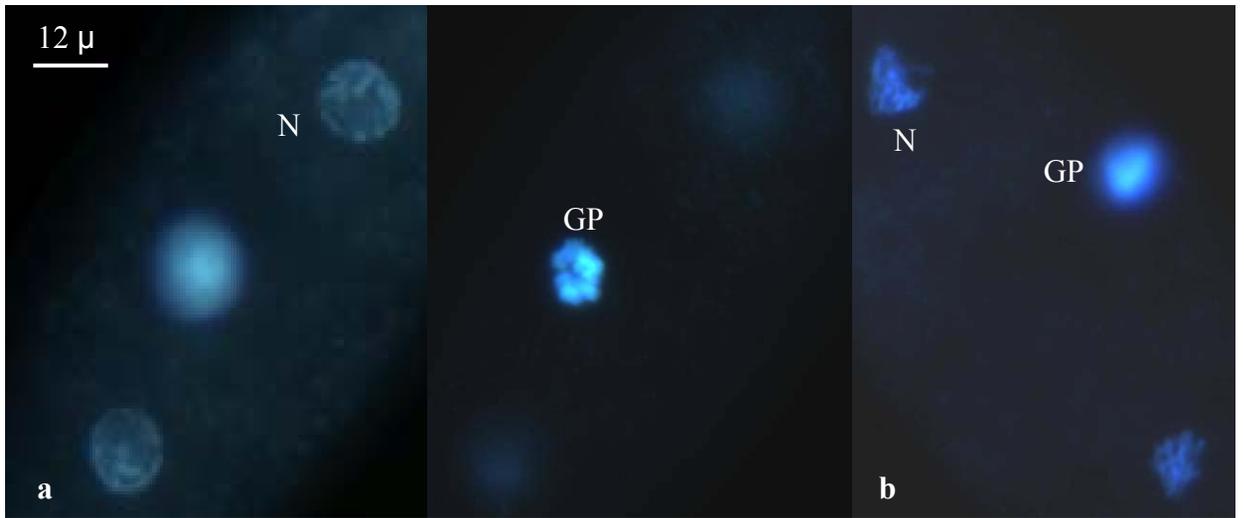


Fig. 32. *E. formosa*. **a**. Sequenza di piani focali diversi di uno stesso embrione. Primi due nuclei di segmentazione (N). I Globuli polari (GP) assumono la forma di un coacervo di frammenti. **b**. Primi due nuclei di segmentazione (N) in pro-metafase. Globuli polari in fase compatta. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

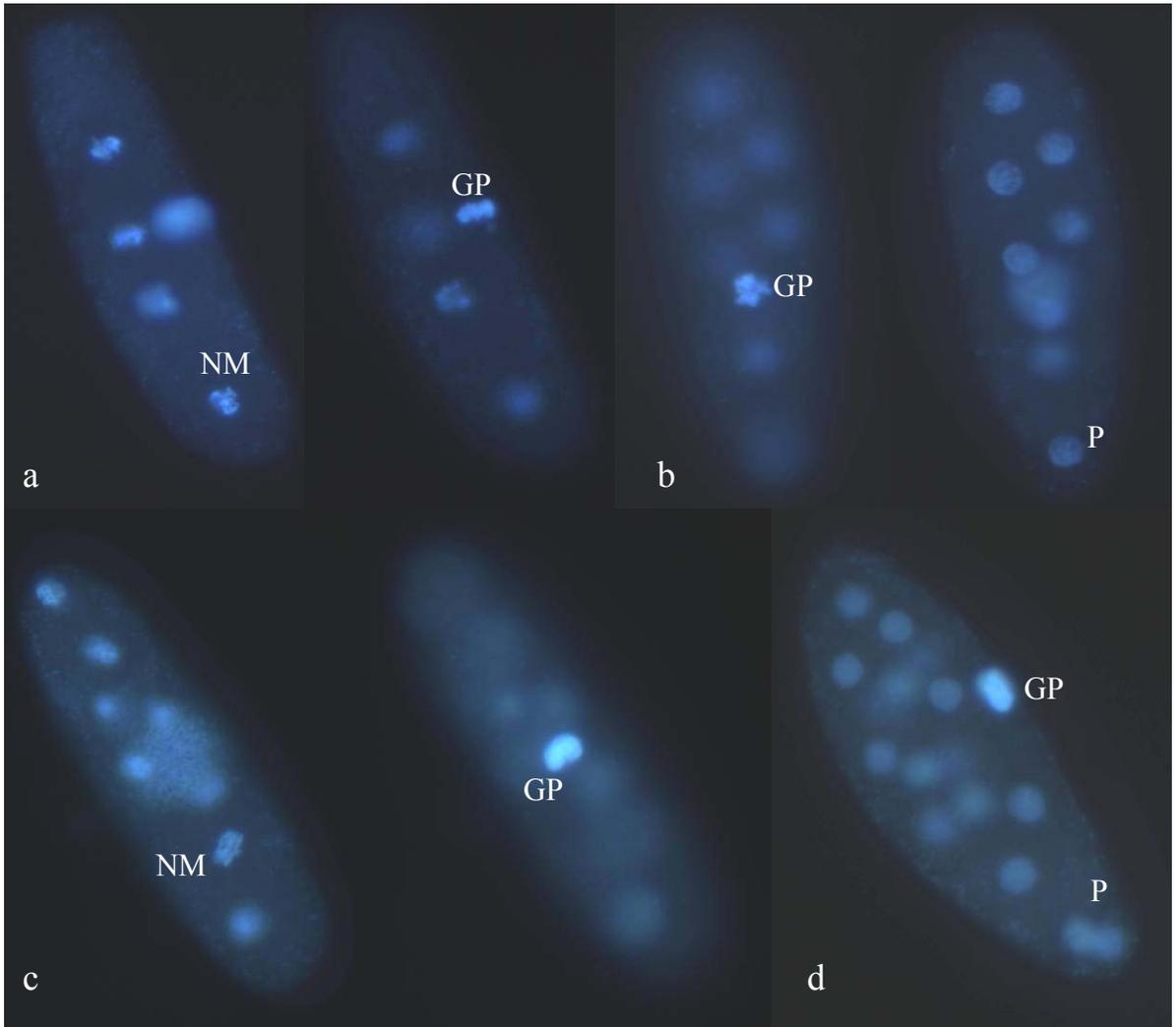


Fig. 33. *E. formosa*. Sequenza degli eventi citologici che conducono allo stadio a 16 nuclei. **a.** Stadio a 4 nuclei. Nuclei in metafase (NM) e globuli polari (GP). **b.** Stadio a 8 nuclei. Globuli polari di aspetto irregolare; ad un polo si nota il polocita (P), cellula precursore della linea germinale. **c.** Nuclei in metafase (NM); globuli polari asimmetrici ma di aspetto compatto. **d.** Stadio a 16 nuclei; i polociti sono raddoppiati. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

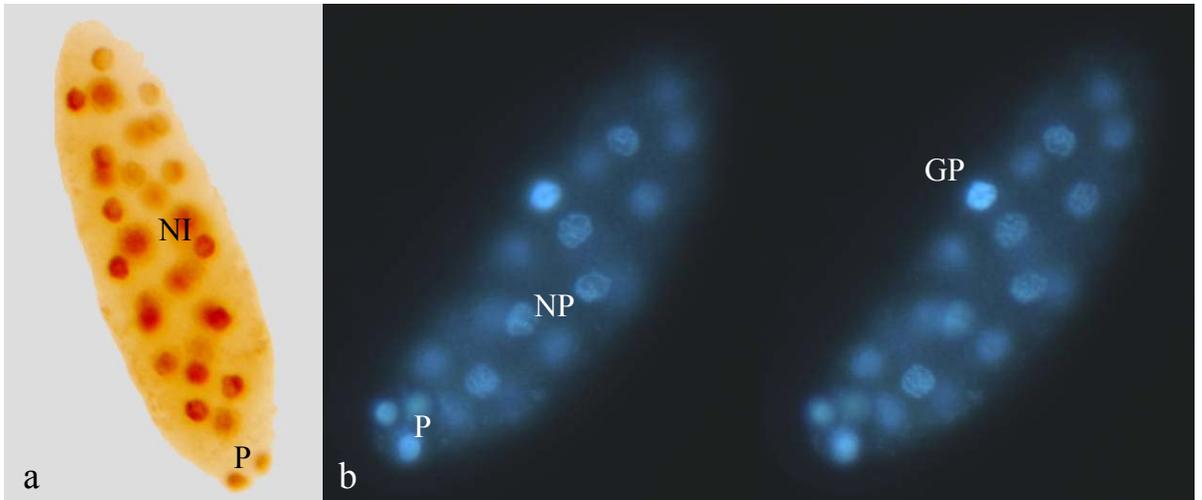


Fig. 34. *E. formosa*. **a.** Stadio a 30 nuclei. Nuclei interfasicci (NI). Immagine elaborata con Photoshop (Adobe) per una migliore definizione dei nuclei ai fini del loro conteggio. **b.** Stadio simile al precedente ma i nuclei (NP) sono in fase G2-profase. Globuli polari (GP) in fase piuttosto compatta.

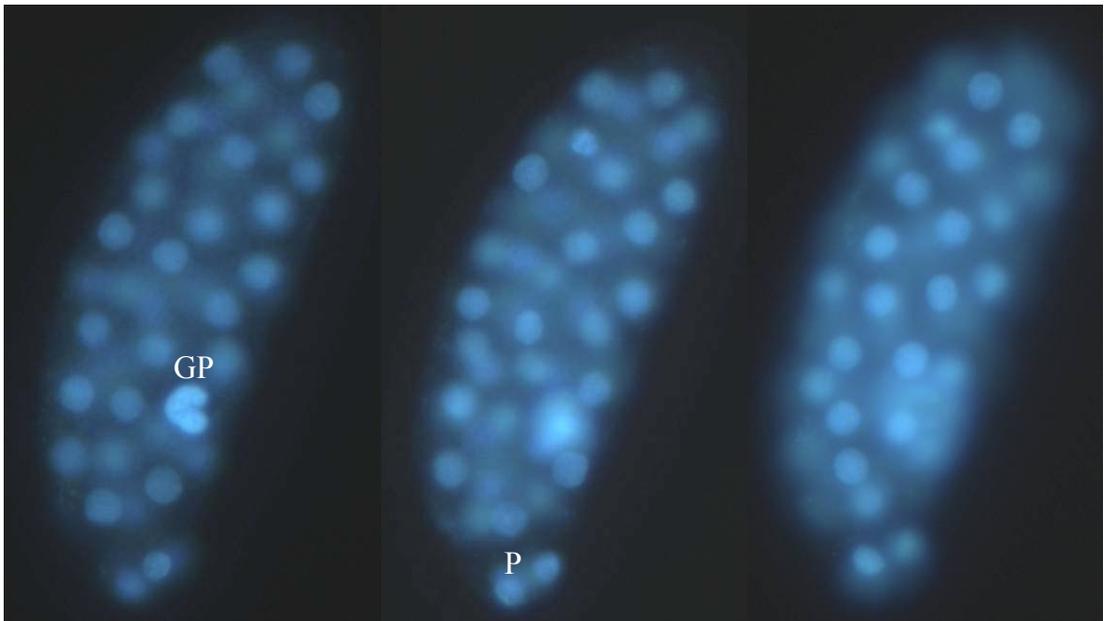


Fig. 35. *E. formosa*. Sequenza di piani focali differenti di uno stesso embrione. Stadio a 60 nuclei. I polociti (P) sono raddoppiati divenendo 4, i globuli polari (GP) si evidenziano ancora per la loro maggiore luminosità e compattezza.

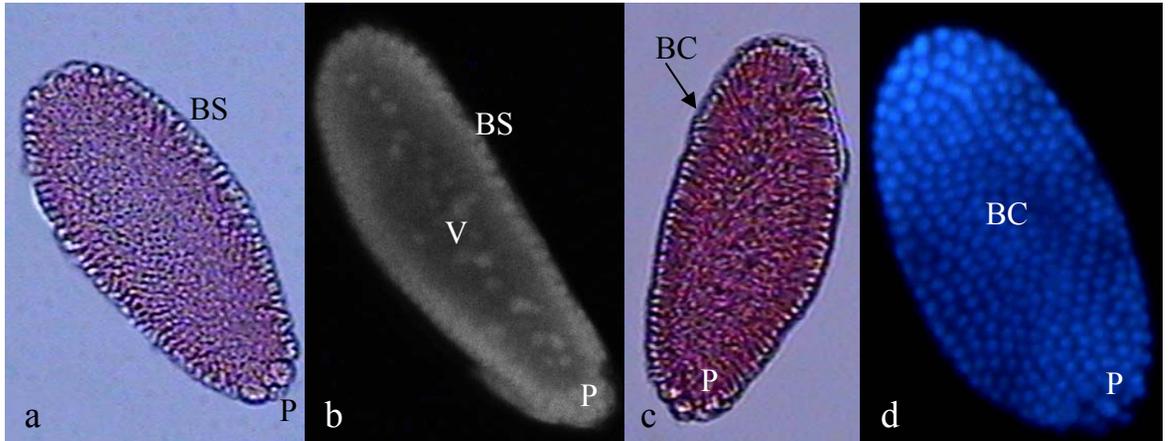


Fig. 36. Sequenza di immagini che illustra l'evoluzione del blastoderma da sinciziale a cellularizzato. **a-b.** Blastoderma sinciziale (BS), polociti (P), vitellofagi (V). Embrioni colorati rispettivamente con Carminio Acetico e Ioduro di Propidio. **c-d.** Blastoderma cellularizzato (BC) e polociti. Embrioni colorati rispettivamente con Carminio Acetico e DAPI.

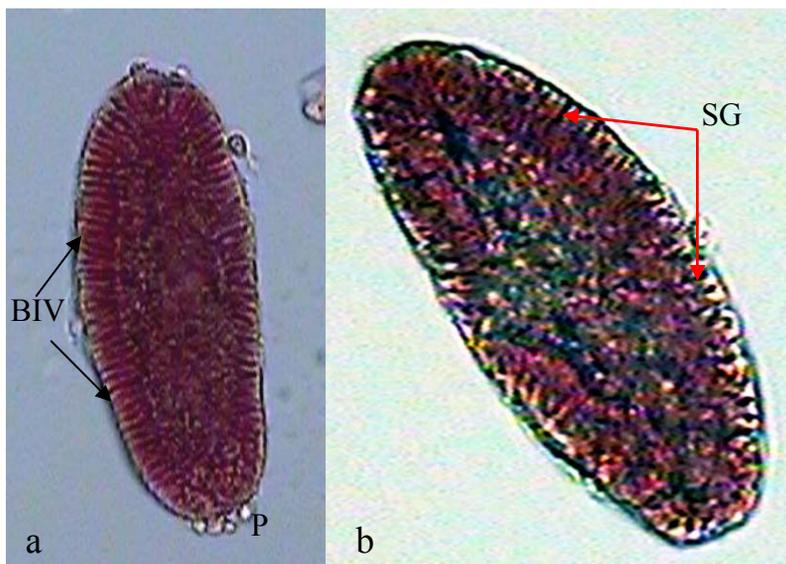


Fig. 37. Formazione della stria germinativa. **a.** Il blastoderma, costituito da cellule colonnari, appare più ispessito ventralmente (BIV). Polociti (P) ancora ben visibili. **b.** L'immagine mostra una stria germinativa (SG) molto allungata, tipica di un insetto con una strategia embrionale *long germ band*. Embrioni colorati con Carminio Acetico.

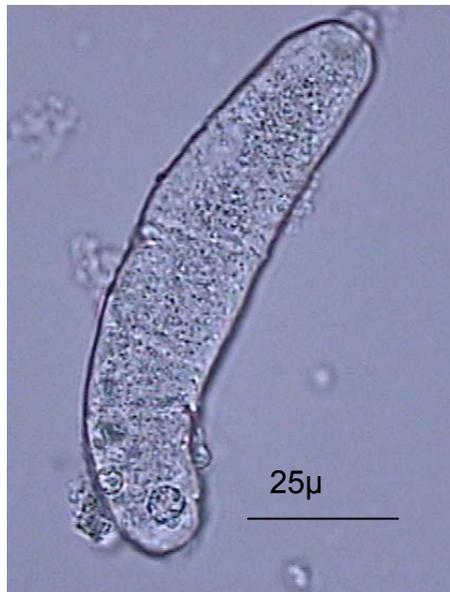


Fig. 38. *E. lutea*. Uovo appena deposto.

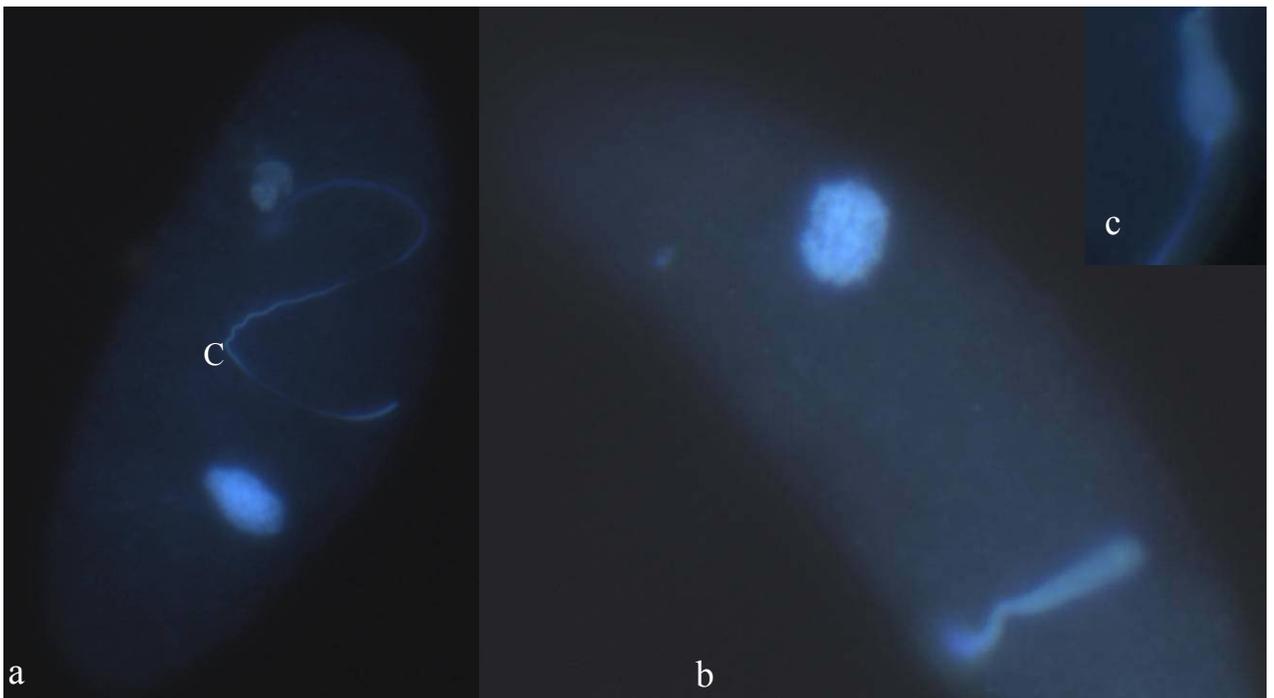


Fig. 39. *E. lutea*. **a.** Penetrazione della testa dello spermio nell'uovo. **b.** Nell'immagine si intravede la coda (C) dello spermio, mentre il nucleo dell'oocita è in meta-anafase. **c.** Particolare della testa dello spermatozoo.

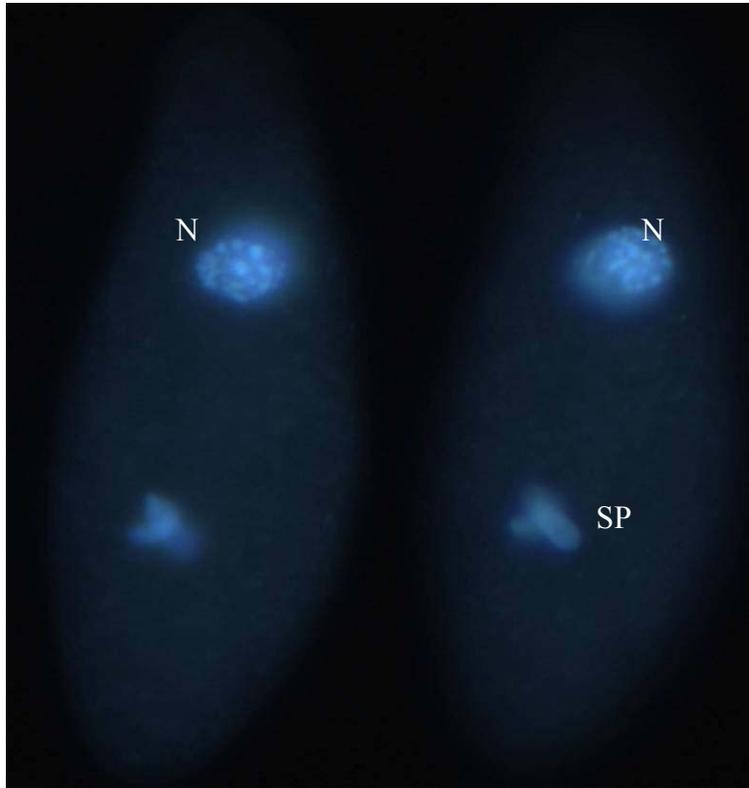


Fig. 40. *E. lutea*. Sequenza di piani focali differenti di uno stesso uovo. Telofase della I divisione di maturazione dell'uovo che prelude alla formazione del I globulo polare. Dna evidenziato con Hoechst 33258.
N= Nuclei in formazione; SP= testa dello spermio.

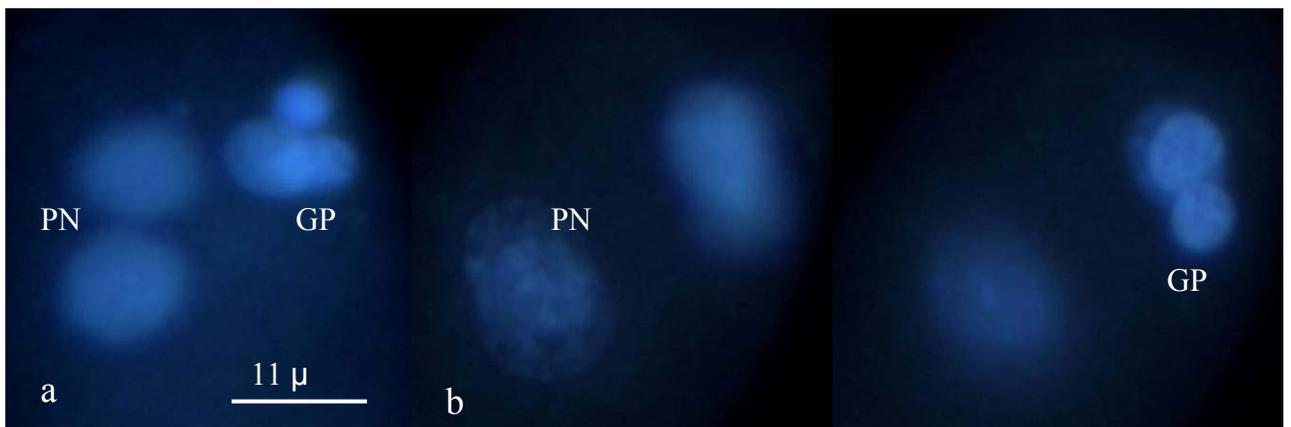


Fig. 41. *E. lutea*. **a.** Pronuclei maschile e femminile in fase di avvicinamento e i tre globuli polari (GP). **b.** Sequenza di piani focali differenti di uno stesso uovo. Pronuclei (PN) nella fase decondensata che precede la fusione. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

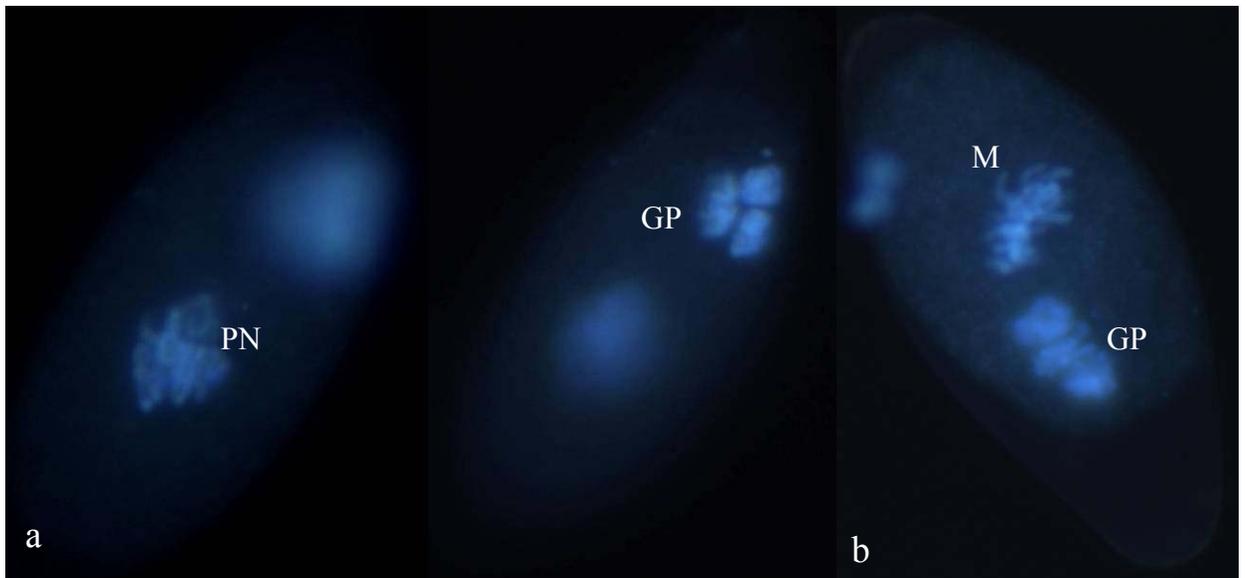


Fig. 42. *E. lutea*. **a**. Sequenza di piani focali differenti di uno stesso uovo. In posizione centrale si osserva la fusione dei pronuclei (PN). I globuli polari (GP) appaiono piuttosto frammentati ed asimmetrici. **b**. Metafase della I divisione di segmentazione. I globuli polari (GP) si presentano come tre elementi piuttosto decondensati.

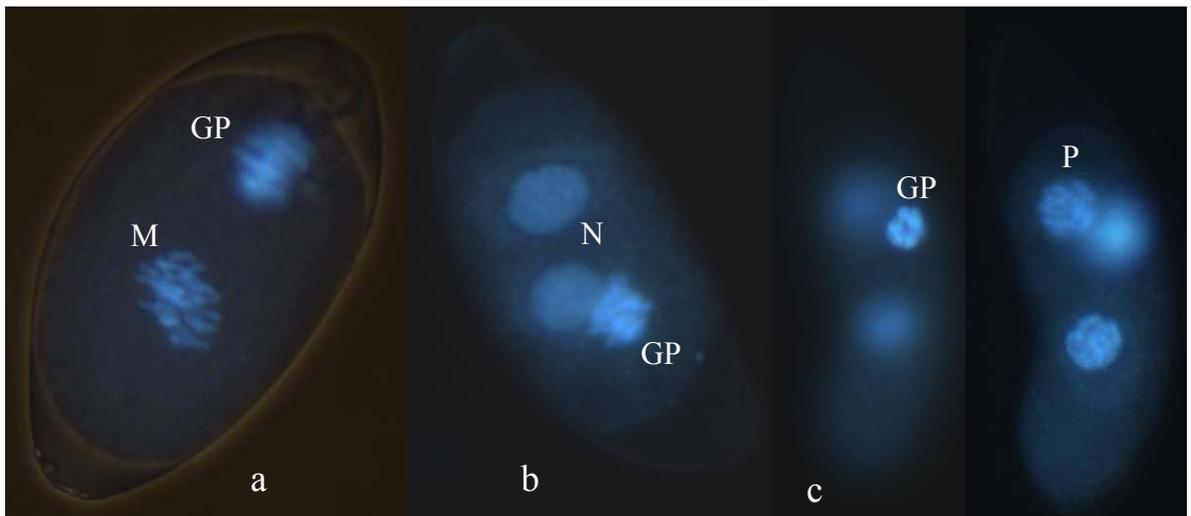


Fig. 43. *E. lutea*. **a**. Metafase del primo nucleo di segmentazione (M). Su un piano diverso si notano i globuli polari di aspetto quasi metafasico (GP). **b**. Primi due nuclei di segmentazione (N). I globuli polari appaiono come un groviglio di cromosomi. **c**. Primi due nuclei di segmentazione in profase (P); i globuli polari formano una insieme compatto di frammenti.

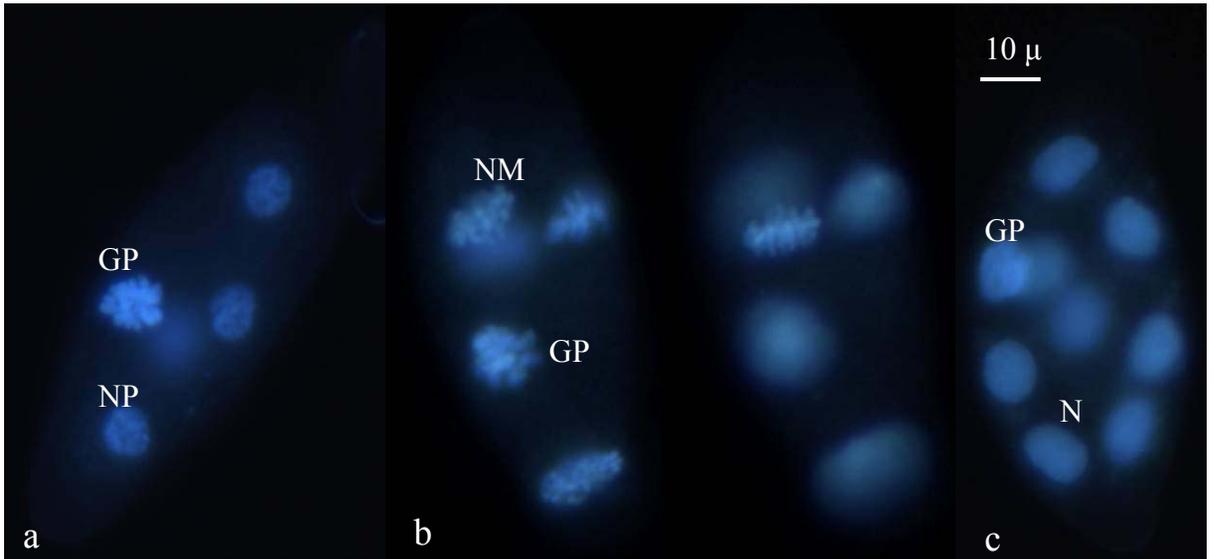


Fig. 44. *E. lutea*. Sequenza degli eventi citologici che conducono allo stadio ad 8 nuclei. **a.** Stadio a 4 nuclei. I globuli polari (GP) appaiono come un groviglio di cromosomi; nuclei embrionali di aspetto quasi profasico (NP). **b.** Nuclei in metafase (NM). I globuli polari conservano ancora l'aspetto di un coacervo di cromosomi. **c.** Stadio a 8 nuclei. I globuli polari formano un ammasso piuttosto compatto, i nuclei (N), alquanto voluminosi e densi, sono in una fase cellulare tipo S.

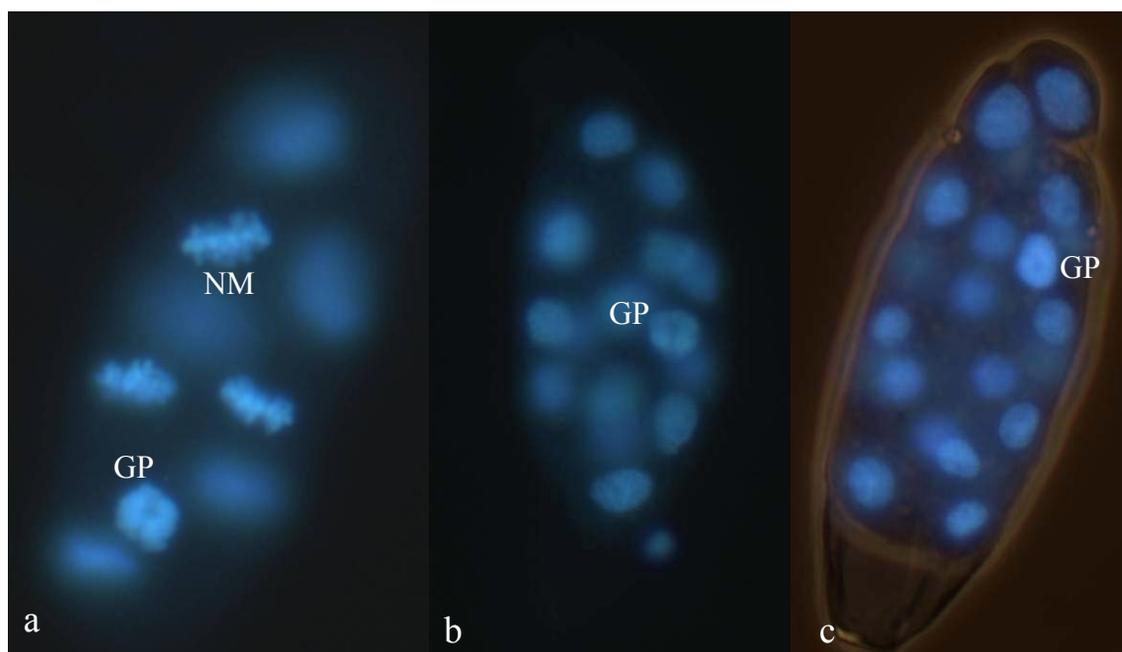


Fig. 45. *E. lutea*. Sequenza di immagini illustranti la transizione da 8 a 30 nuclei. **a.** Stadio a 8 nuclei. I globuli polari (GP) appaiono formati da un insieme di frammenti; nuclei embrionali in metafase (NM). **b.** Stadio a 16 nuclei. Globuli polari come nella precedente immagine. **c.** Stadio a 30 nuclei. In posizione apicale si notano due nuclei, piuttosto isolati, di dimensioni superiori agli altri. L'aspetto dei globuli polari ricalca quello evidenziato negli stadi precedenti. Immagine ottenuta con tecnica mista fluorescenza e contrasto di fase.

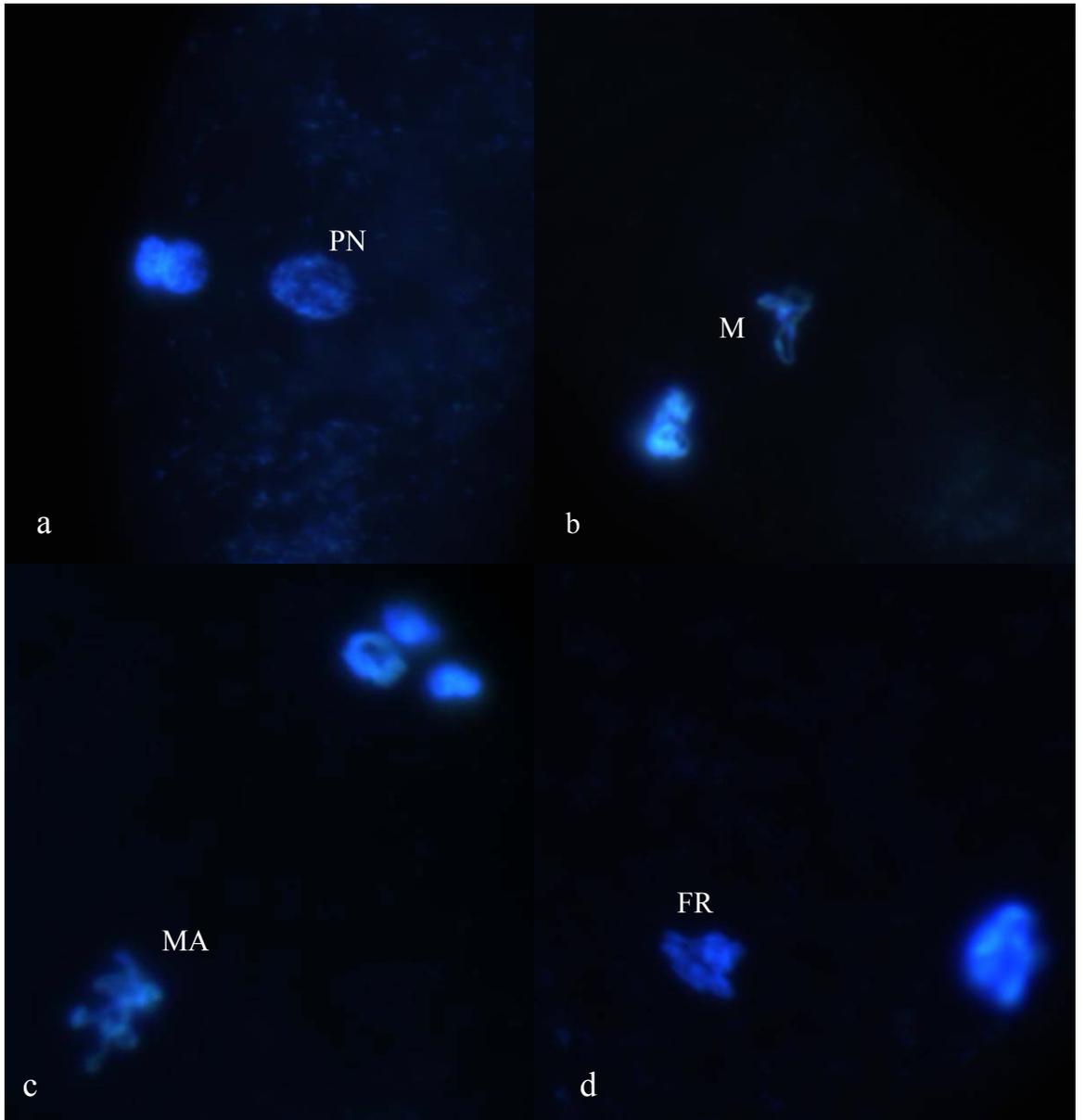


Fig. 47. *E. formosa*. Sequenza degli eventi citologici che conduce al ripristino della diploidia. **a**. Primo nucleo di segmentazione quasi profasico (PN). **b**. Nucleo dell'oocita che assume una inusuale configurazione metafasica (MN). **c**. Nucleo dell'oocita in una sorta di meta-anafase (MA). **d**. Inizio della fase del nucleo di restituzione (FR).

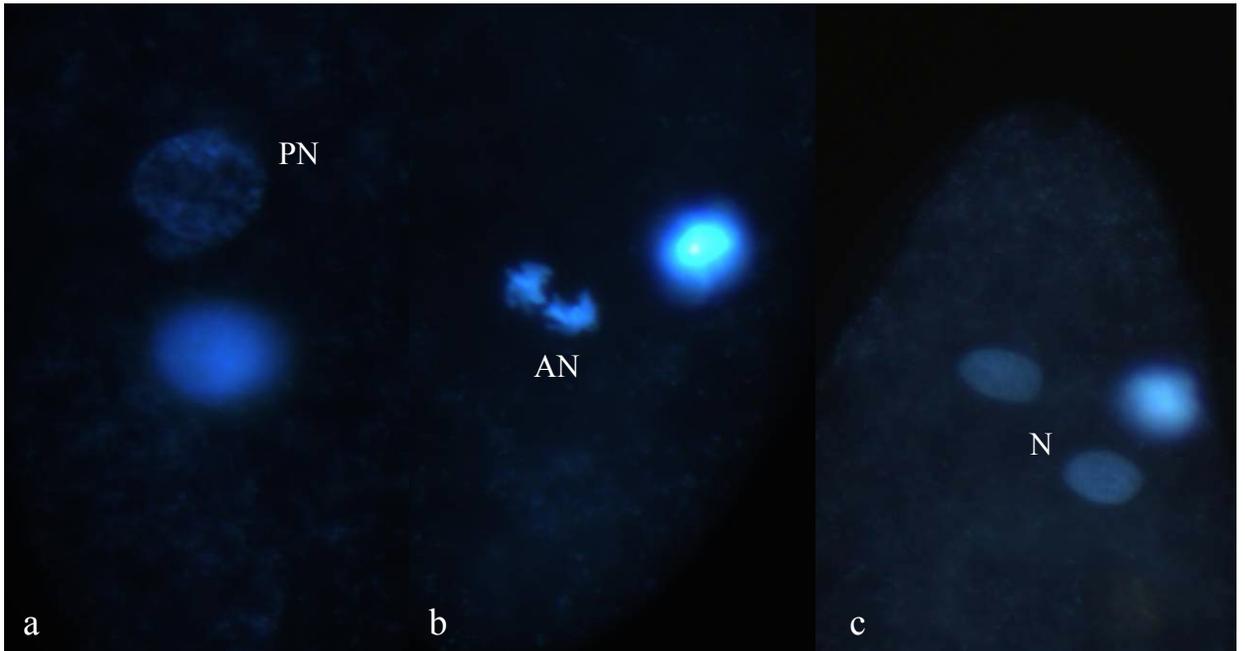


Fig. 48. *E. formosa*. Sequenza degli eventi citologici nella seconda divisione di segmentazione. **a.** Nucleo di restituzione in profase (PN). **b.** Anafase (AN) del nucleo di restituzione. **c.** Primi due nuclei di segmentazione (N). DNA evidenziato con Hoechst 33258.

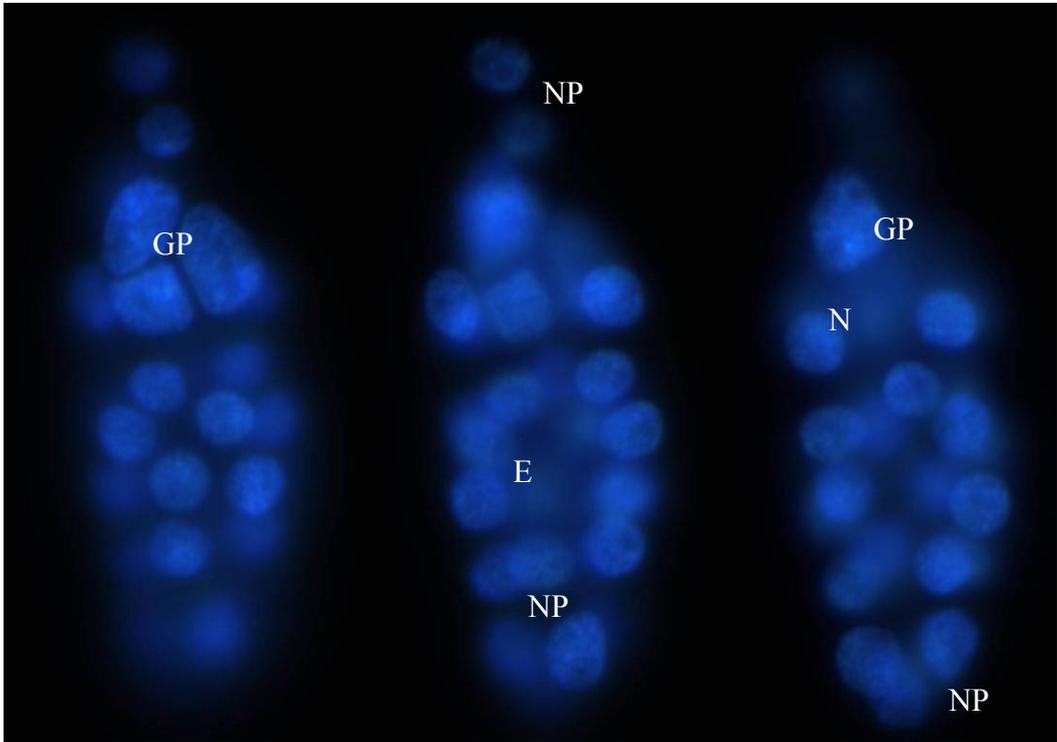


Fig. 49. *E. pergandiella*. Sequenza di piani focali differenti dello stesso uovo. L'embrione occupa una posizione centrale (E), i globuli polari, voluminosi ed asimmetrici, sono diventati 4 (GP). Ai due poli si osservano, rispettivamente, due e 4 nuclei (NP). Nei pressi dei globuli polari si riscontrano altri 4 nuclei (N) che contribuiranno, insieme ai globuli ed ai nuclei polari, alla formazione della membrana extra-embryonale. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

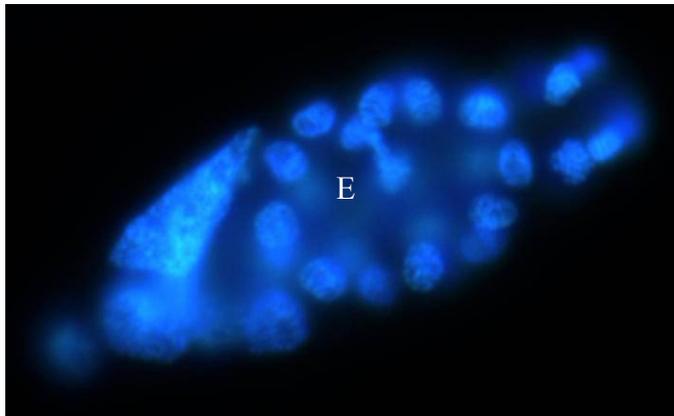


Fig. 50. *E. pergandiella*. L'embrione (E), in posizione centrale, si presenta come una blastula cava.

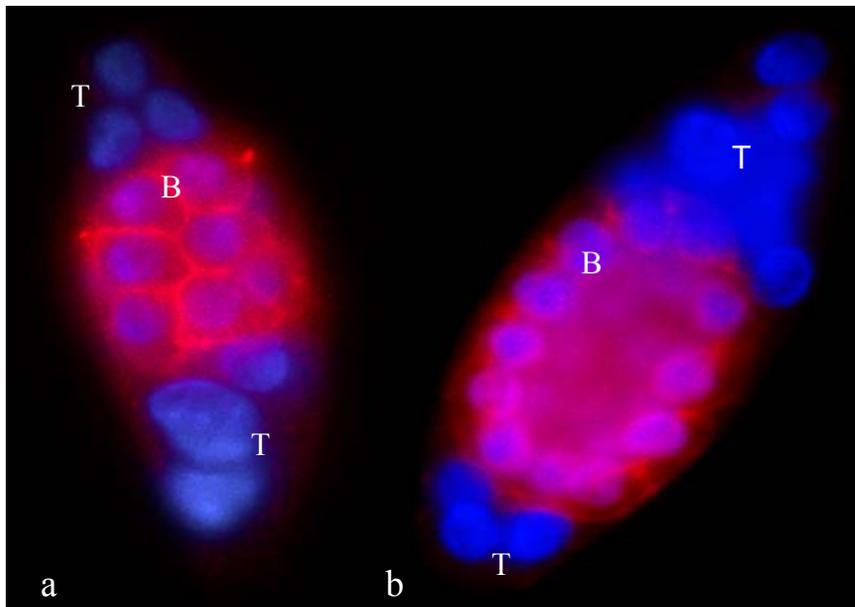


Fig. 51. *E. pergandiella*. **a.** I blastomeri embrionali (B), in posizione centrale, risultano, singolarmente, circondati da una impalcatura citoscheletrica. I teratociti (T) sembrano fluttare in una sorta di matrice citoscheletrica non organizzata. **b.** Situazione analoga alla precedente, ma l'embrione è in uno stato più avanzato di sviluppo. Nuclei ed Actina-F evidenziati, rispettivamente, con Hoechst 33258 e Falloidina rodaminata.

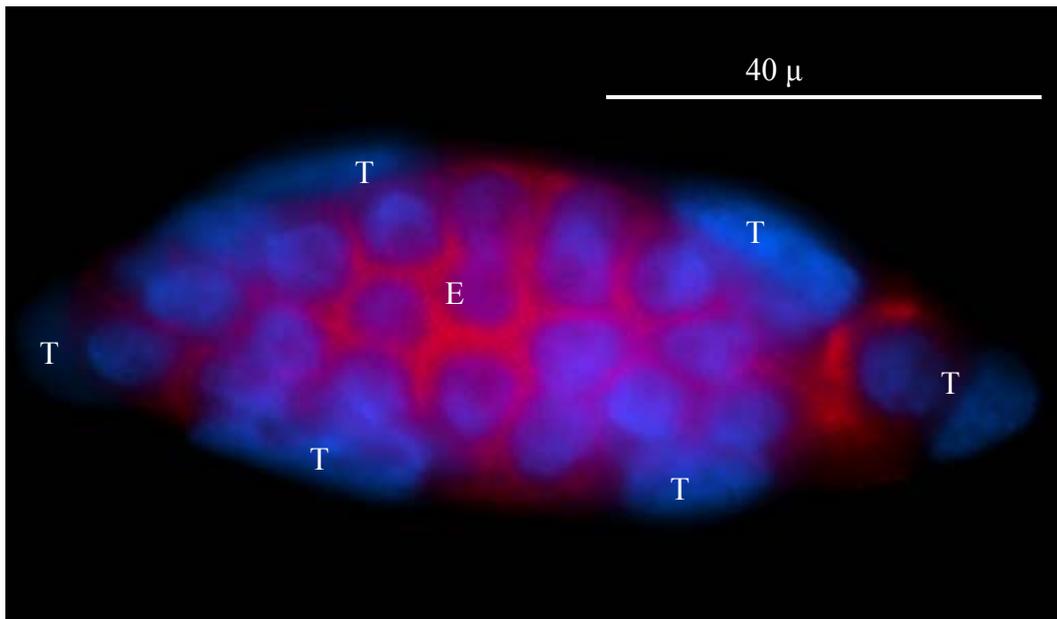


Fig. 52. *E. pergandiella*. Embrione (E) in stadio avanzato di sviluppo circondato dai teratociti (T), alcuni dei quali appaiono piuttosto appiattiti.



Fig. 53. *E. pergandiella*. A 50 h circa l'embrione risulta palesemente circondato da una membrana extra-embryonale in cui si scorgono i teratociti (T) di forma sferica.



Fig. 54. *E. pergandiella*. Embrione (E) circondato dalla membrana-extraembrionale (MEE) ridotta, ormai, ad un sottile strato elastico.

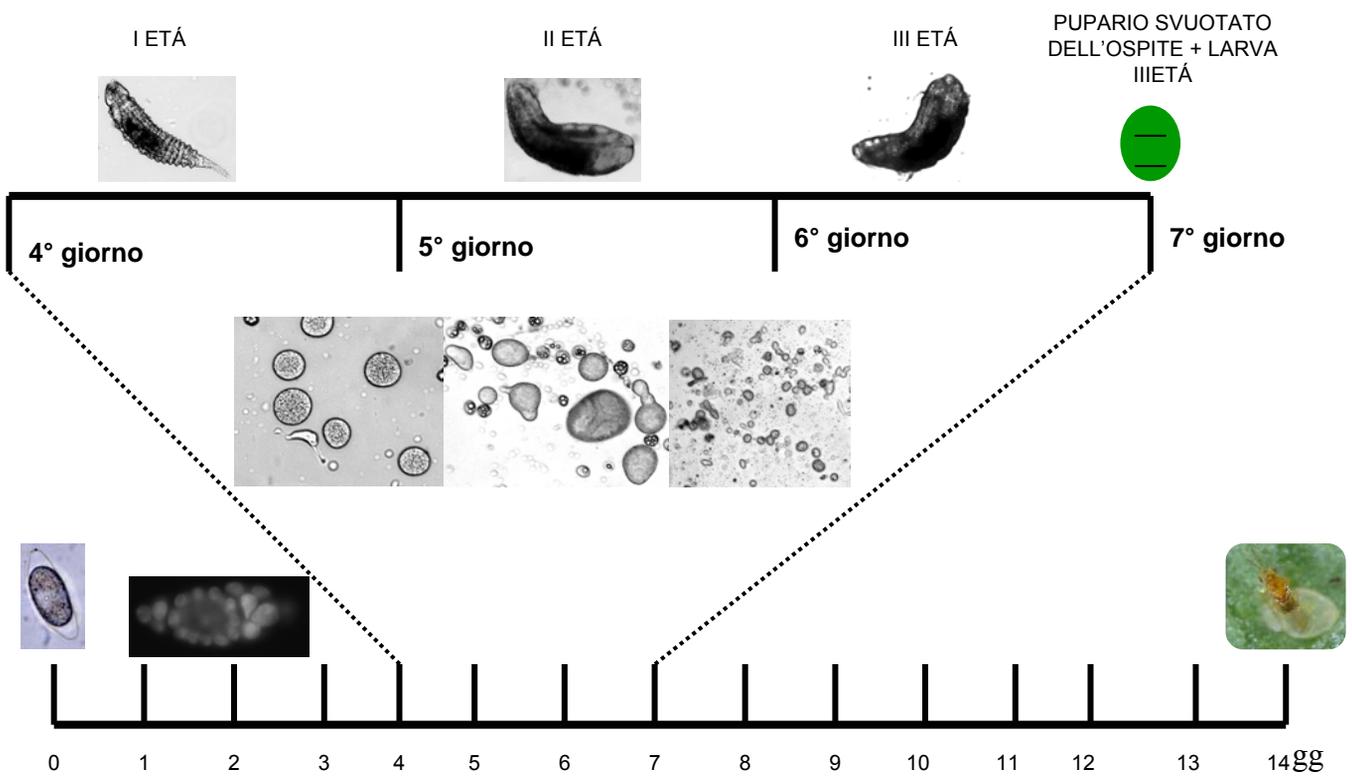


Fig. 55. *E. pergandiella*. Ciclo di sviluppo dei teratociti.

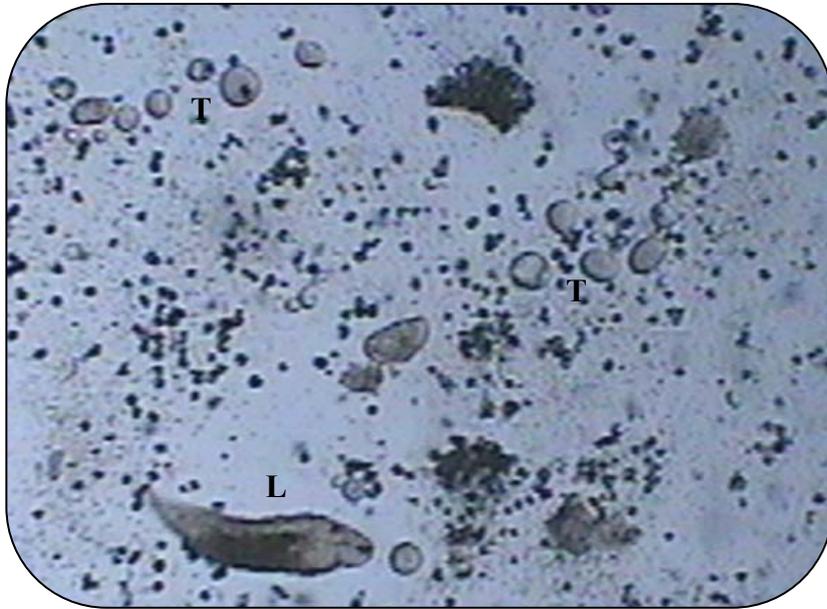


Fig. 56. *E. pergandiella*. Larva di I età (L) circondata da teratociti che flottano liberi nell'emolinfa dell'ospite.

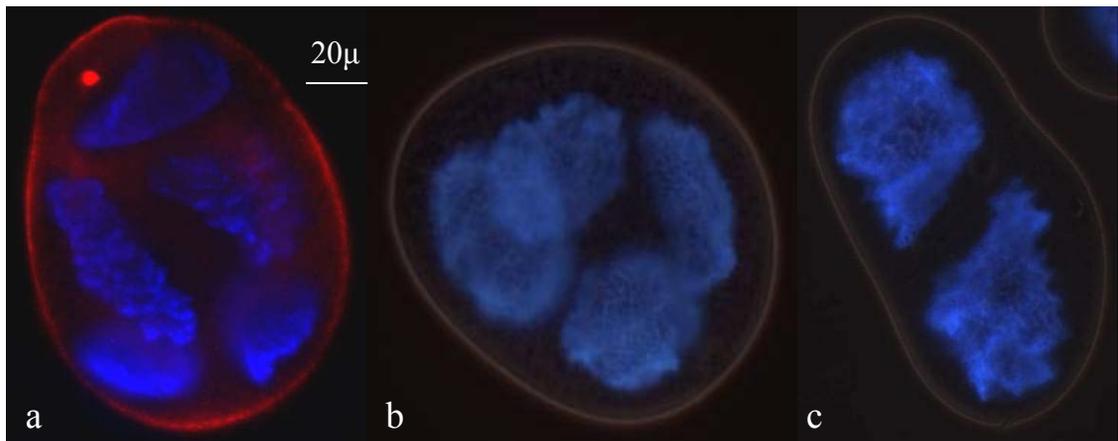


Fig. 57. *E. pergandiella*. **a.** Teratocita con 6 nuclei (N) di aspetto irregolare. Nuclei e Citoscheletro colorati, rispettivamente, con DAPI e Rodamina-Falloidina. **b-c.** Teratociti con 4 e 2 nuclei. Tecnica mista fluorescenza e contrasto di fase. Nuclei evidenziati con Hoechst 33258.



Fig. 58. *E. pergandiella*. Larva di I età colta nell'atto di nutrirsi del tessuto adiposo dell'ospite.



Fig. 59. *E. pergandiella*. Teratociti asimmetrici raccolti il secondo giorno dalla schiusa dell'uovo.

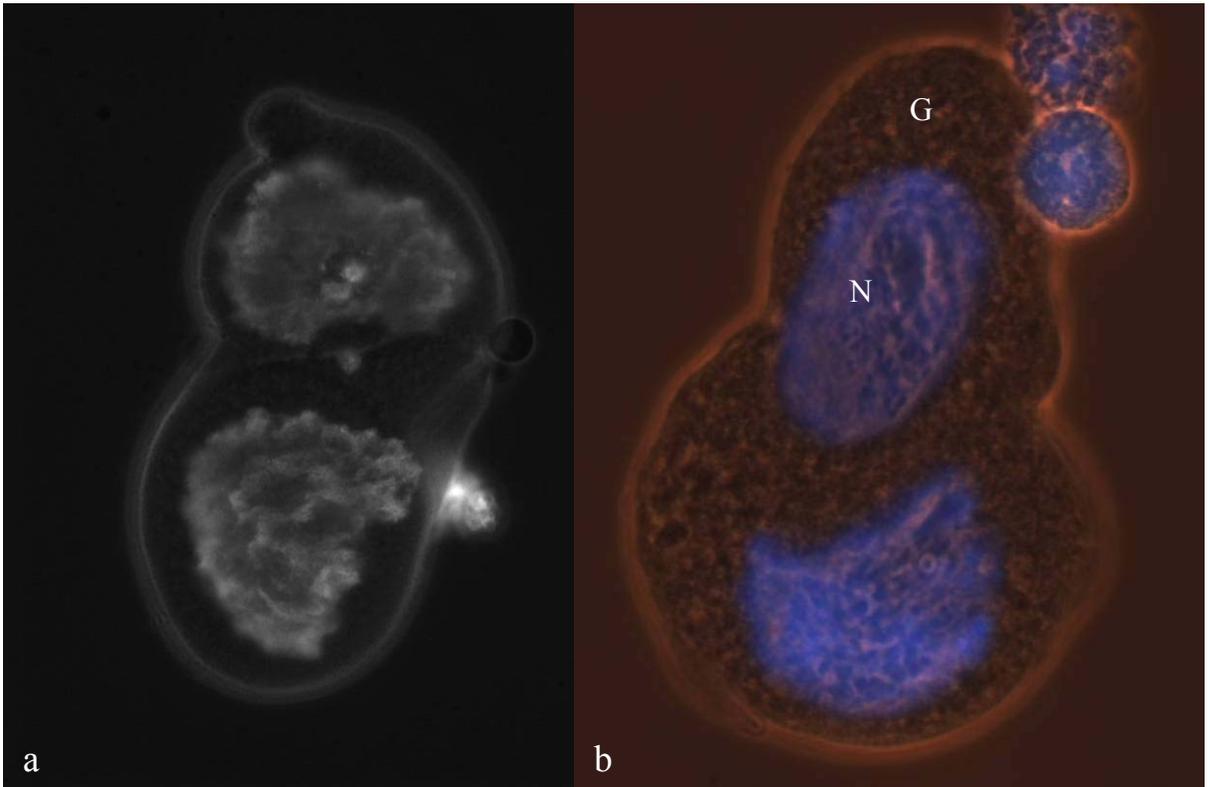


Fig. 60. *E. pergandiella*. **a.** Teratocita binucleato in fase di “scissione”. **b.** Confluenza di un nucleo (N) nella gemma (G) in via di formazione in un teratocita. Tecnica mista fluorescenza-contrasto di fase. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

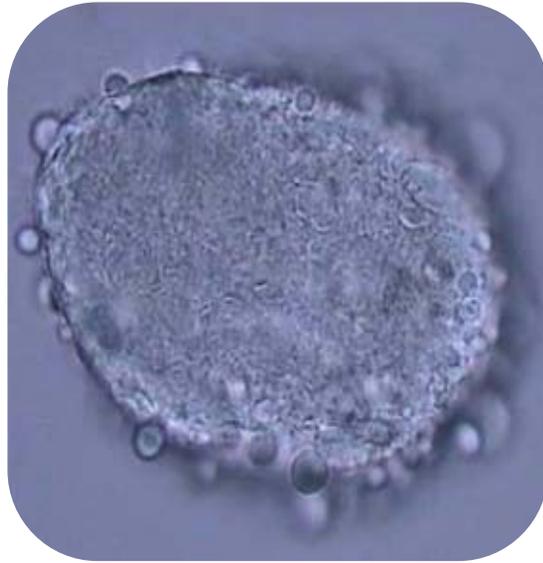


Fig. 61. *E. pergandiella*. Blebs in formazione sulla superficie di un teratocita al secondo giorno. Foto al microscopio ottico.

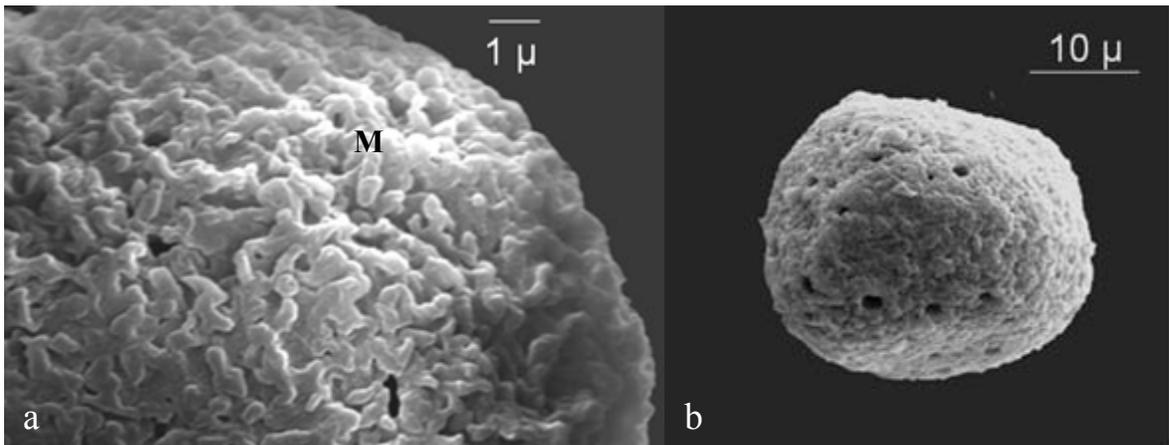


Fig. 62. *E. pergandiella*. **a.** Particolare della superficie di un teratocita con microvilli (M) appiattiti. **b.** Teratocita in cui non si distinguono i microvilli superficiali. Immagini al SEM.

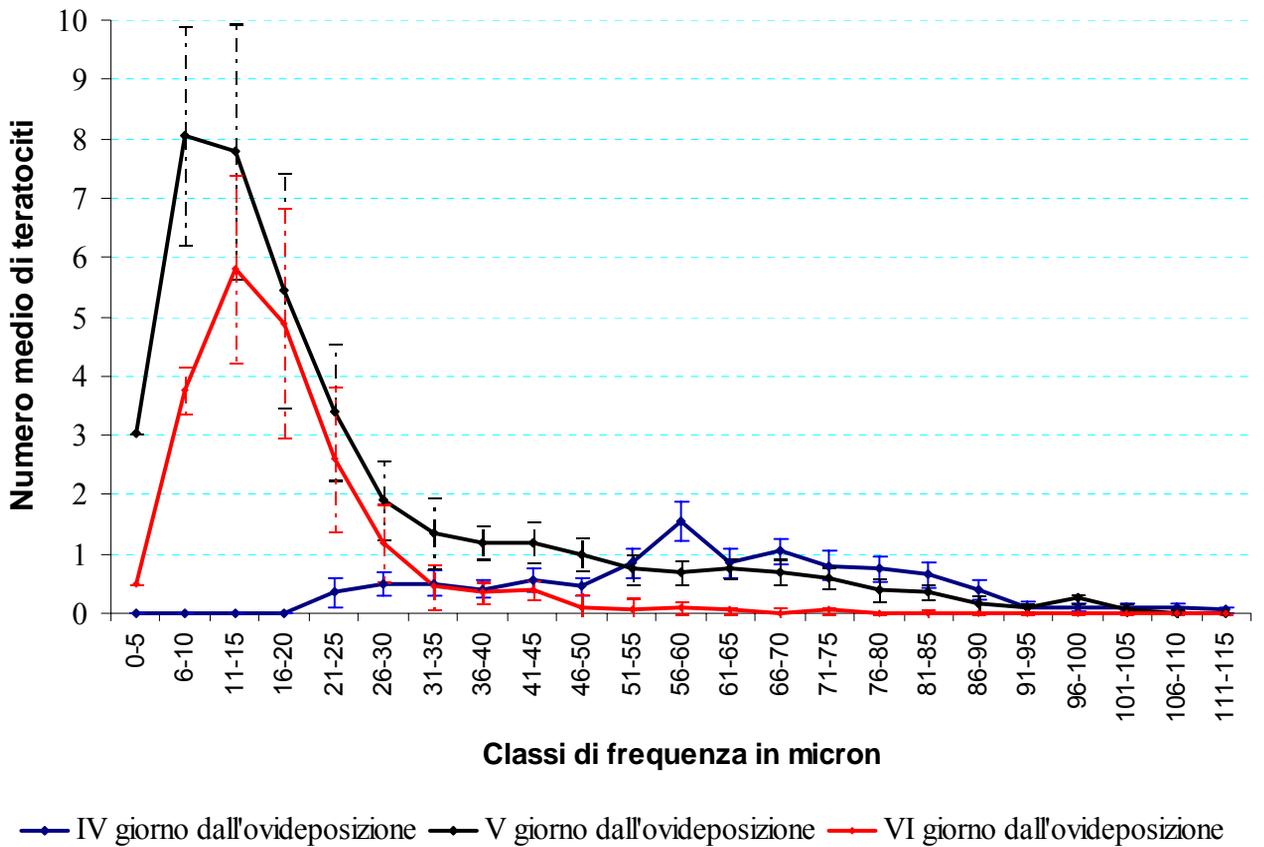


Fig. 63. *E. pergandiella*. Distribuzione del numero medio di teratociti nelle varie classi dimensionali per ognuno dei tre giorni in cui è stato eseguito il campionamento.

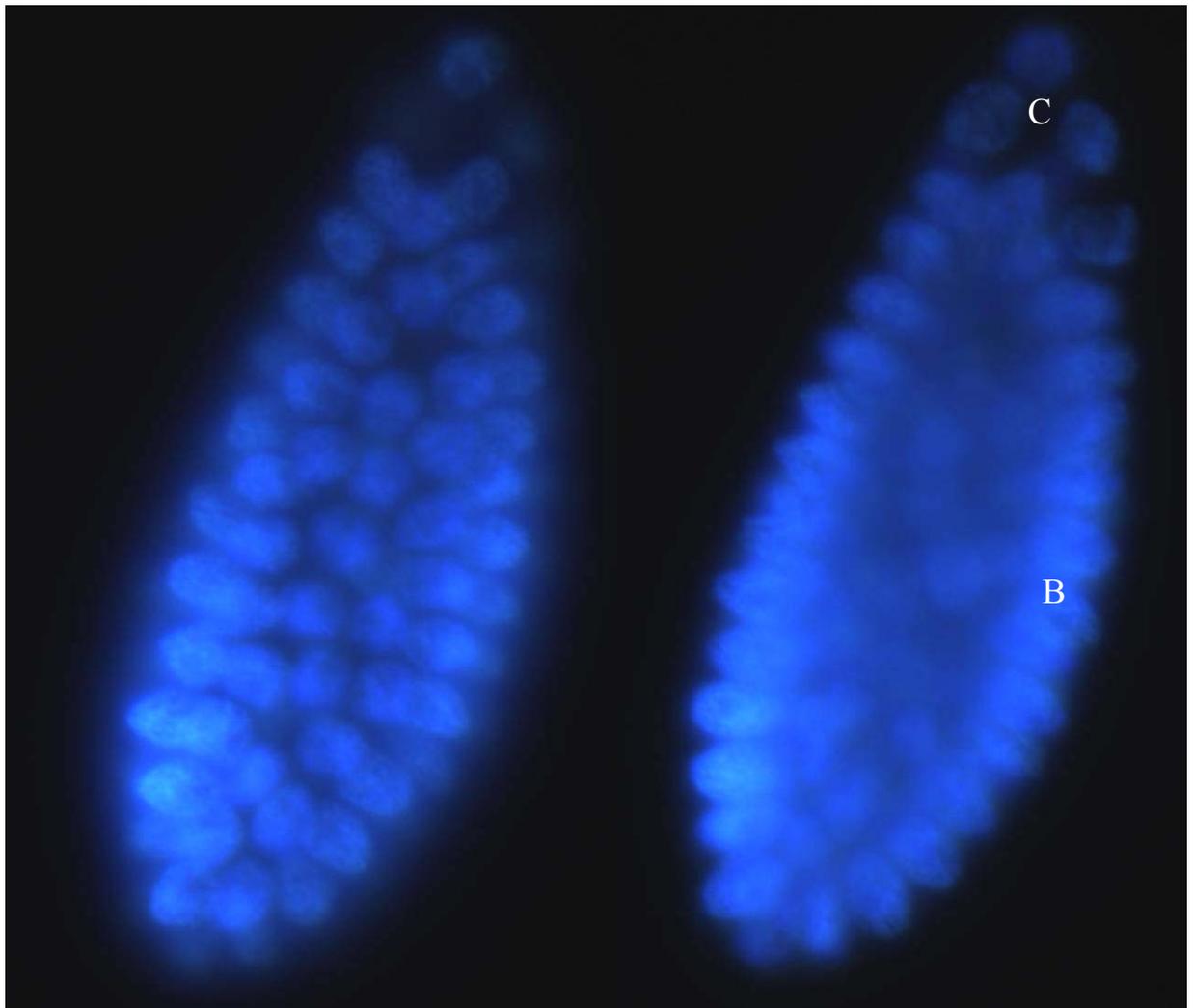


Fig. 64. *E. lutea*. Embrione allo stadio di blastoderma (B). Ad uno dei poli si osserva il cappuccio di cellule(C) da cui, probabilmente, originerà la membrana extra-embryonale.

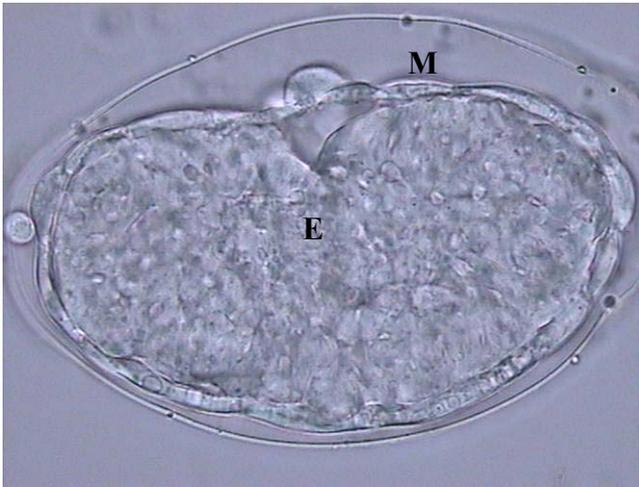


Fig. 65. *E. lutea*. Embrione in avanzato stadio di sviluppo circondato dalla membrana extra-embryonale.



Fig. 66. *E. lutea*. Larva neonata ancora avvolta nella membrana extra-embryonale in cui si scorgono, chiaramente, i teratociti.



Fig. Fig. 67. *E. lutea*. Membrana extra-embryonale indissociata.

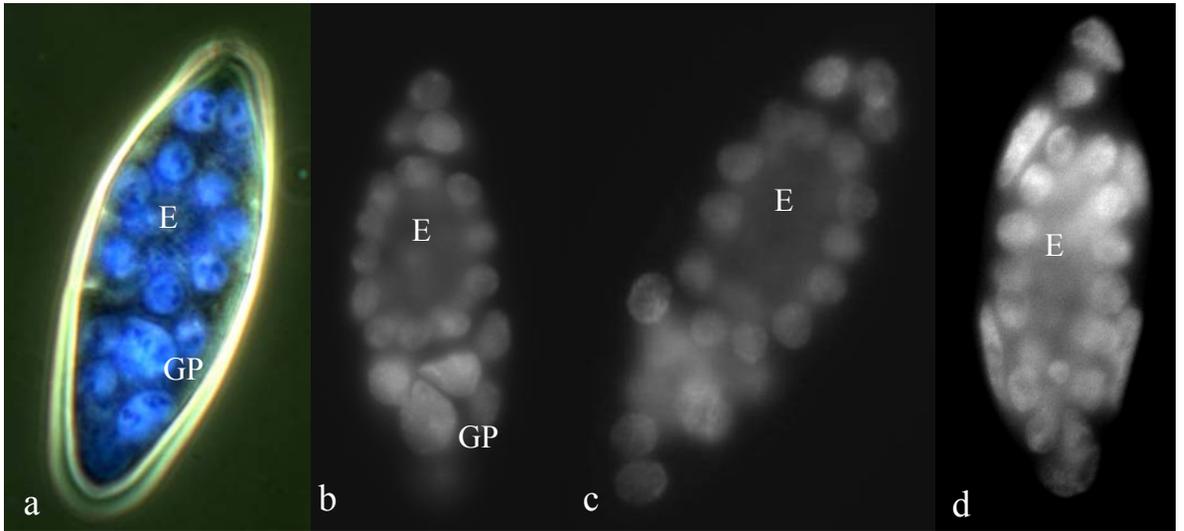


Fig. 68. *E. pergandiella*. Sebbene non si dispongano di dati molecolari, dalle immagini acquisite si riscontra un progressivo allungamento dell'embrione (E), ciò potrebbe far propendere per uno sviluppo embrionale di tipo *short germ band*. In **b**, **c** l'embrione appare come una blastula cava. **d**. Embrione in fase pre-gastrulativa. Nuclei colorati con Hoechst 33258.

GP= globuli polari;

	<i>E. pergandiella</i>	<i>E. formosa</i>	<i>E. lutea</i>
Uovo centrolecitico			
Uovo oligolecitico			
Uovo alecitico			
Uovo anidropico			
Uovo idropico			
Segmentazione totale			
Segmentazione superficiale			
Membrana extra-embryonale			
Teratociti			

Tab. 1. Quadro sinottico delle diverse strategie di sviluppo embrionale riscontrate nelle specie indagate. *E. pergandiella* ed *E. lutea* pur condividendo lo stesso carattere, presenza della membrana extra-embryonale, si differenziano per la diversa natura della stesso (trophamnion nell'una e, probabile, serosa nell'altra).