

Il ruolo del veleno di *Leptomastix dactylopii* nella regolazione dell'ospite

L. Riviello¹, P. Falabella¹, T. Colella^{1*}, D. Battaglia¹, M. Moracci², A.P. Garonna³, F. Pennacchio³, A. Tranfaglia¹

¹Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università della Basilicata, 85100 Potenza

²Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR, 80131 Napoli

³Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria "Filippo Silvestri", Università degli Studi di Napoli "Federico II", 80055 Portici

Riassunto

È stato condotto uno studio con lo scopo di valutare il ruolo del veleno di *Leptomastix dactylopii* (Howard) nella regolazione dell'ospite *Planococcus citri* Risso.

Le femmine parassitizzate dell'ospite mostrano, nella maggior parte dei casi, una quasi completa inibizione dell'ovideposizione. La parassitizzazione determina un forte decremento del numero delle uova presenti in femmine adulte 24 ore dopo l'ovideposizione da parte di *L. dactylopii*, che diventa ancora più marcato a 48 ore, mentre l'ovideposizione in neanidi di III età blocca completamente la produzione di uova.

L'iniezione di veleno nelle femmine adulte ha determinato un effetto simile alla parassitizzazione, inducendo, rispetto ai controlli, una riduzione del numero delle uova prodotte.

Il profilo elettroforetico delle proteine del veleno copre un ampio intervallo di massa molecolare, compreso fra 200 e 15 kDa, ed è caratterizzato dalla presenza particolarmente abbondante di tre proteine di 27, 105 e 140 kDa. Da una prima indagine mirante a valutare l'eventuale esistenza di attività enzimatiche (proteasi, α -glucosidasi, ialuronidasi) nel veleno di *L. dactylopii* è emersa la presenza di una leggera attività serin-proteasica.

Introduzione

La recente revisione europea in materia di agrofarmaci, le pressanti esigenze agro-ambientali e il problema dell'accumulo di diversi residui indesiderati nelle derrate stanno portando a rapidi cambiamenti del panorama della difesa fitosanitaria in agricoltura. Proprio in questo ambito e in queste mutate condizioni gli agrofarmaci di origine microbiologica, di estrazione vegetale o altre tecnologie alternative (in una parola "biopesticidi") stanno assumendo un ruolo sempre più importante, oltre ad incrementare per numero e qualità dei prodotti disponibili.

Parte importante di un approccio più cosciente a queste problematiche è in particolare la ricerca di nuovi principi attivi possibilmente caratterizzati da alta specificità d'azione, alta biodegradabilità, lenta induzione di resistenza da parte degli insetti bersaglio. Questi vantaggi sono stati individuati come

elementi caratterizzanti di molte molecole di origine biologica, definite nel complesso bioinsetticidi (Weinzierl, 2000).

Lo studio dei meccanismi fisiologici e molecolari che sono alla base delle associazioni antagonistiche ospite-parassitoide fornisce l'opportunità molto interessante, e quasi del tutto inesplorata, di isolare geni e molecole con potenzialità insetticida.

Gli insetti parassitoidi appartenenti all'ordine degli Imenotteri mostrano sofisticate strategie di regolazione dell'ospite. Nei parassitoidi endofagi la soppressione della risposta immunitaria è associata ad un certo numero di alterazioni neuro-endocrine, della crescita e della riproduzione (Pennacchio & Strand, 2006). Per molte categorie di parassitoidi, le secrezioni che la femmina inietta al momento dell'ovideposizione giocano un ruolo chiave nell'induzione della maggior parte delle alterazioni osservate negli ospiti parassitizzati. In tutti i casi, queste secrezioni includono il veleno e il fluido ovarico, mentre in altri gruppi a tali secrezioni si sommano alcuni virus simbiotici della famiglia Polydnviridae (Webb BA., et al.2005).

Leptomastix dactylopii Howard (Hymenoptera: Encyrtidae) è un parassitoide solitario endofago, appartenente alla Superfamiglia Chalcidoidea, che attacca la Cocciniglia Cotonosa degli Agrumi, *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae), una specie polifaga diffusa in tutte le regioni zoogeografiche (Williams & Watson, 1988). Questo pseudococcide è un fitofago del genere *Citrus* e di molte colture agrarie ed ornamentali in molti Paesi dal clima temperato e tropicale (Blumberg *et al.*, 1995); in alcuni casi può rappresentare una specie chiave nell'ampio gruppo dell'entomofauna nociva che popola gli agrumeti.

Al momento della ovideposizione, insieme all'uovo, il parassitoide inietta un veleno che rappresenta uno dei fattori di regolazione materna per evadere la risposta immunitaria dell'ospite.

Materiali e metodi

Allevamento degli insetti

Entrambe le specie sono state allevate nell'Insettario della Regione Basilicata ubicato presso l'Azienda Agricola Sperimentale Dimostrativa "Pantanello" di Metaponto (MT).

Leptomastix dactylopii è stato mantenuto su *Planococcus citri* allevato a sua volta su germogli eziolati di patate, cv *Desirée*, o su zucca, cv *Butternut*, in ambiente controllato (T: 24±1°C; R.H. 60%).

Raccolta delle ghiandole del veleno ed estrazione del veleno

La raccolta è stata effettuata utilizzando femmine di *Leptomastix dactylopii* di diverse età.

In una goccia di soluzione fisiologica di *Pringle*, con l'ausilio di pinzette da dissezione, è stato prelevato tutto l'apparato riproduttivo delle femmine precedentemente anestetizzate in ghiaccio. La ghiandola acida ed il serbatoio di ciascuna femmina sono stati separati dalle ovaie impiegando aghi da dissezione e trasferite in una goccia di soluzione fisiologica di

Pringle. Le ghiandole ed i relativi serbatoi sono stati aperti impiegando aghi da dissezione per consentire la fuoriuscita del veleno. Con una pipetta è stato raccolto il veleno diluito nella soluzione fisiologica e trasferito in un tubo Eppendorf da 1,5ml. Il campione è stato centrifugato a 5000 giri a 4°C per 5 minuti per eliminare gli eventuali frammenti di tessuto; il supernatante è stato poi trasferito in un tubo pulito e utilizzato immediatamente per iniezioni in cocciniglie.

Biosaggi per valutare l'attività del veleno

Sono state effettuate prove di parassitizzazione ed iniezioni di veleno o soluzione fisiologica di *Pringle* (controllo) in cocciniglie sane di IV età al fine di valutare l'attività del veleno di *L.dactylopii*.

Le parassitizzazioni sono state effettuate mediante esposizione di ciascuna delle cocciniglie all' attacco del parassitoide.

Le iniezioni sono state effettuate iniettando il veleno o la soluzione fisiologica, all'ascella del secondo paio di zampe con l'ausilio di micro capillari di vetro con punta affilata al calore. Il volume di veleno o di soluzione fisiologica iniettata in ciascuna cocciniglia è stato di 0,1µl. Il microcapillare è stato riempito per capillarità a partire da una dose misurata con pipetta Gilson. L'iniezione è stata effettuata con l'ausilio di una pompa elettrica regolata da un potenziometro. (Sicce, Italia, mod. A12/P).

Dopo 24 e 48 ore dalla parassitizzazione, o dalle iniezioni, è stato prelevato l'intero apparato riproduttore di *P. citri* e sono state contate le uova presenti nell'ovisacco.

Valutazione dell'attività enzimatica del veleno

In collaborazione con il Consiglio Nazionale delle Ricerche, Institute of Protein Biochemistry di Napoli, è stata saggiata l'attività enzimatica del veleno raccolto in due appositi tamponi: Tris HCl pH 7,5 % 50mM e tampone fosfato pH 6,8 50mM.

SDS-PAGE delle proteine del veleno

Il veleno raccolto da femmine di *L. dactylopii* seguendo la procedura descritta precedentemente, è stato analizzato mediante elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE) (Laemli, 1970). Il campione era costituito da 25 femmine equivalenti diluite in 10µl di soluzione fisiologica di *Pringle*. Prima di caricare le proteine, al campione è stato aggiunto il tampone di Laemli 4x fino ad una concentrazione finale di 1x. Il campione è stato bollito per 5 minuti a caricato. La corsa elettroforetica è stata condotta a 150 V nello stacking gel e a 100 V nel running gel in un tampone di corsa costituito da Tris 0.025 M, Glicina 0,192M, SDS 0,1%.

Lo stacking gel è stato separato dal running gel; quest'ultimo è stato posto in una capsula Petri ed immerso in Comassie Brilliant Blue per incubare in agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Il gel è stato poi decolorato immergendolo in una soluzione decolorante (destaining solution) e lasciato ad incubare in agitazione a temperatura ambiente fino a completa

decolorazione. Infine, il gel è stato essiccato usando un gel dryer (BIO-RAD Model 583).

Risultati e Discussione

Le femmine parassitizzate dell'ospite mostrano, nella maggior parte dei casi, una quasi completa inibizione dell'ovideposizione, che risulta più marcata nel caso di parassitizzazione su stadi di sviluppo più precoci. La parassitizzazione determina un forte decremento del numero delle uova presenti in femmine adulte 24 ore dopo l'ovideposizione da parte di *L. dactylopii*, che diventa ancora più marcato a 48 ore.

L'iniezione di veleno nelle femmine adulte ha determinato un effetto simile alla parassitizzazione, inducendo, rispetto ai controlli, una riduzione del numero delle uova.

Il profilo elettroforetico delle proteine del veleno copre un ampio intervallo di massa molecolare, compreso fra 200 e 15 kDa, ed è caratterizzato dalla presenza particolarmente abbondante di tre proteine, di 75, 105 e 140 kDa (Fig.1).

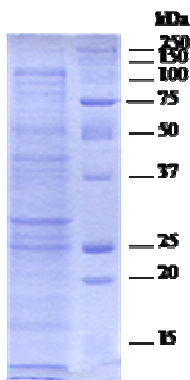


Figura 1. Analisi SDS-PAGE del veleno di *Leptomastix dactylopii*

Da una prima indagine mirante a valutare l'eventuale esistenza di attività enzimatiche (proteasi, α -glucosidasi, ialuronidasi) nel veleno di *L. dactylopii* è emersa la presenza di una leggera attività serin-proteasica.

Da quanto osservato si evince dunque che il veleno di *L. dactylopii* è responsabile della castrazione dell'ospite.

La riduzione della capacità riproduttiva è evidente prima della schiusa dell'uovo del parassitoide. Pertanto, i fattori di regolazione coinvolti sono di probabile origine materna ed iniettati al momento dell'ovideposizione. Questa alterazione parassitaria è comune in sistemi ospite-parassitoide in cui lo sviluppo di quest'ultimo può avvenire a carico di ospiti adulti impegnati nell'attività riproduttiva, come descritto anche per il parassitoide di afidi *Aphidius ervi* (Digilio *et al.*, 2000; Falabella *et al.* 2007). La

castrazione parassitaria è, quindi, una strategia per ridirezionare l'energia metabolica destinata alla riproduzione a favore della progenie del parassitoide.

Riferimenti bibliografici

Blumberg, D., Klein M., Mendel Z., **1995**. Response by encapsulation of four mealybug species (Homoptera: Pseudococcidae) to parasitization by *Anagyrus pseudococci*, *Phytoparasitica*, 23: 157-163.

Digilio, M.C., Isidoro N., Tremblay E., Pennacchio F., **2000**. Host castration by *Aphidius ervi* venom protein. *Journal of Insect Physiology*. 46:1041-1050.

Falabella P., Riviello L., Caccialupi P., Rossodivita T., Valente M.T., De Stradis M.L., Tranfaglia A., Varricchio P., Gigliotti S., Graziani F., Malva C., Pennacchio F., **2007**. Il veleno di *Aphidius ervi* contiene una γ -glutamyl transpeptidasi che induce apoptosi negli ovari di afidi parassitizzati *Atti del XXI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, Campobasso, 11-16 Giugno 2007: 381.

Laemli U.K., **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Williams, D.J., Watson W. G., **1988**. The Scale Insects of the Tropical and South Pacific Region, part 2. *The Mealybugs (Pseudococcidae)*. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, U.K. 260pp.

Riviello L., Falabella P., Colella T., Battaglia D., Moracci M. Garonna A.P., Pennacchio F., Tranfaglia A., **2007**. Il ruolo del veleno di *Leptomastix dactylopii* nella regolazione dell'ospite. *Atti del XXI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, Campobasso, 11-16 Giugno 2007: 386.

Pennacchio F, Strand MR. **2006**. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*. 51:233-258.

Webb BA, Strand MR. **2005**. The biology and genomics of polydnnaviruses. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Ed LI Gilbert, K Iatrou, SS Gill, San Diego: Elsevier. 6: 323-60.

Weinzierl R.A. **2000**. Botanical insecticides, soaps and oils. *Biological and Biotechnological Control of Insect Pests*. Ed. Rechcigl J.E & Rechcigl, Lewis Publishers. pp. 101-121.