



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Agrarie



**Curriculum Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente
Mediterraneo**

Ciclo XXIX

**Studio del ruolo dell'effettore fitoplasmatico SAP11 nelle interazioni
pianta-fitoplasma-vettore**

Dr. Gabriele Moro

Coordinatore del Corso Prof. Antonello Cannas

Referente di Curriculum Prof. Alberto Satta e Prof.ssa Lucia Maddau

Docente Guida Dott.ssa Vanda Assunta Prota

Anno Accademico 2015- 2016



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Agrarie



Curriculum Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo

Ciclo XXIX

Studio del ruolo dell'effettore fitoplasmatico SAP11 nelle interazioni pianta-fitoplasma-vettore

Dr. Gabriele Moro

| | |
|--------------------------------|---|
| <i>Coordinatore del Corso</i> | Prof. Antonello Cannas |
| <i>Referente di Curriculum</i> | Prof. Alberto Satta e Prof.ssa Lucia Maddau |
| <i>Docente Guida</i> | Dott.ssa Vanda Assunta Prota |

Anno Accademico 2015- 2016

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.
Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali
In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Anno Accademico 2015- 2016



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Agrarie



Curriculum Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo

Ciclo XXIX

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze Agrarie dell'Università degli Studi di Sassari, a.a. 2015/2016 - XXIX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio cofinanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

La tesi è stata prodotta, altresì, grazie al contributo della Fondazione di Sardegna.

Gabriele Moro presents its sincere thanks to the Sardinian Regional Government for the financial support of his PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective I.3, Line of Activity I.3.1.). Sincere thanks also to the Fondazione di Sardegna for the financial contribution.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Anno Accademico 2015- 2016

INDICE

| | |
|----|---|
| 1 | RIASSUNTO |
| 3 | INTRODUZIONE |
| 3 | Il ruolo dei fitoplasmi come agenti patogeni |
| 5 | Classificazione e diagnosi dei fitoplasmi |
| 11 | Metabolismo dei fitoplasmi |
| 12 | Il ciclo dei fitoplasmi |
| 15 | Gli insetti vettori |
| 16 | Le piante si difendono dai fitofagi mediante metaboliti secondari |
| 17 | Gli effetti dei fitoplasmi sulla biologia e sul comportamento degli insetti vettori |
| 20 | Relazioni tra fitoplasmi e insetti vettori nella diffusione delle fitoplasmosi |
| 22 | Gli effettori dei fitoplasmi |
| 29 | Obiettivi della tesi |
| 32 | MATERIALI E METODI GENERALI |
| 32 | Allevamento di <i>Macrostesles quadrilineatus</i> |
| 33 | Allevamento di <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| 33 | Campionamento ed estrazione di RNA |
| 36 | Retrotrascrizione e qPCR |

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Anno Accademico 2015- 2016

| | |
|----|---|
| 39 | CAPITOLO 1- GLI EFFETTI DI SAP11 SULLA FECONDITÀ DI <i>MACROSTELES QUADRILINEATUS</i> |
| 39 | Introduzione |
| 41 | Descrizione della prova |
| 44 | Risultati |
| 47 | CAPITOLO 2 – GLI EFFETTI DI SAP11 SUL SISTEMA ORMONALE DI <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> |
| 47 | Introduzione |
| 54 | Descrizione della prova |
| 60 | Risultati |
| 68 | Conclusioni |
| 70 | CAPITOLO 3 – ANALISI TRASCRITTOMICA DEGLI EFFETTI DI SAP11 SULLE RISPOSTE DI <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> CONTRO <i>MACROSTELES QUADRILINEATUS</i> . |
| 70 | Introduzione |
| 71 | Descrizione della prova |
| 74 | Risultati |
| 87 | Conclusioni |
| 90 | CONCLUSIONI |
| 92 | BIBLIOGRAFIA |

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Anno Accademico 2015- 2016

RIASSUNTO

Il fitoplasmi sono organismi monocellulari associati a malattie responsabili di notevoli perdite economiche in diverse colture agrarie e che si diffondono principalmente attraverso il materiale di propagazione infetto e gli insetti vettori. Questi ultimi, durante la loro attività trofica, acquisiscono il patogeno da piante infette per poi trasmetterlo, dopo un periodo di incubazione, ad altre piante sane. Questo processo è stato considerato per molto tempo di natura passiva tuttavia sempre più indizi suggeriscono che i fitoplasmi siano capaci di modularlo a proprio vantaggio, interagendo a livello intracellulare con la pianta ospite e regolandone negativamente i meccanismi di difesa contro gli insetti. Nella presente tesi viene riportato il lavoro svolto per individuare la natura di questa interazione e in particolare la componente spiegata dall' effettore SAP11, molecola proteica secreta nella pianta dai fitoplasmi durante il processo patogenetico e coinvolta nelle interazioni tra pianta e insetti. Gli studi condotti finora hanno infatti mostrato che SAP11 è in grado di manipolare il normale metabolismo dell'ospite, provocandone diverse anomalie nello sviluppo e contribuendo alla manifestazione della tipica sintomatologia associata alla presenza di fitoplasmi. Inoltre, SAP11 riduce la risposta di difesa attivata dalla pianta contro gli insetti vettori, consentendo a questi di deporre più uova e di

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

produrre più ninfe. In questo lavoro viene quindi dimostrato il ruolo di questo effettore nel processo patogenetico dei fitoplasmi e chiariti vari punti fondamentali di questa complessa interazione pianta-patogeno-insetto.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

INTRODUZIONE

Il ruolo dei fitoplasmi come agenti patogeni.

L'interesse per questi organismi da parte dei patologi vegetali è dovuto alla loro associazione a varie malattie che colpiscono le colture agrarie e ornamentali (McCoy *et al.* 1989; Liefting *et al.* 2004; Bertaccini *et al.* 2007; Hogenhout *et al.* 2008). Tra le più importanti si ricordano colture come patata, pomodoro, mais, carota, agrumi, erba medica, riso, drupacee, pomacee e vite. Il numero delle specie vegetali è tuttavia molto più grande ed include anche svariate specie spontanee che, sebbene non interessanti dal punto di vista produttivo, costituiscono una importante fonte di inoculo del parassita. Per via dell'ingiallimento fogliare che caratterizza molti degli ospiti infetti, le malattie associate a fitoplasmi sono spesso note come 'giallumi'. Questo non è tuttavia l'unico sintomo e le piante infette possono manifestare alterazioni dello sviluppo quali accrescimento stentato, modifiche delle strutture fiorali, sviluppo delle gemme secondarie, malformazioni e accartocciamento fogliare. Sebbene le piante rimangano infette per tutta la loro vita, l'esito dell'infezione può essere variabile. Un effetto frequente e che rappresenta l'aspetto più negativo per le colture agrarie, è la riduzione della produzione commerciale

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

ottenuta dalle piante infette. L'entità delle perdite dipende da diversi fattori e la produzione oscilla tra valori comparabili con quelli delle piante sane e la perdita completa del prodotto. Parte di questa variabilità è spiegata dal fenomeno del "recovery" (Schmid 1965). Si manifesta nelle specie a ciclo poliennale e consiste nella scomparsa dei sintomi della malattia in piante sintomatiche nelle stagioni precedenti (Osler *et al.* 1993; Musetti *et al.* 2004). Tale condizione può avere diversa durata e per alcuni fitoplasmosi può essere indotta attraverso trattamenti con auxine: a seguito del trattamento si verifica una remissione dei sintomi e una riduzione della concentrazione dei fitoplasmi nella pianta che in alcuni casi può risultare non rilevabile dai saggi molecolari usati comunemente per la diagnosi (Pertot *et al.* 1998, Curkovic-Perica *et al.* 2007).

Infine, l'esito di una fitoplasmosi può essere perfino la morte anticipata della pianta (Jones 2001). Anche in questo caso la variabilità è notevole e non sono rari i casi in cui la vita delle piante infette ha durata simile a quella delle piante sane.

Classificazione e diagnosi dei fitoplasmi

I fitoplasmi, individuati per la prima volta attraverso osservazioni al microscopio elettronico di tessuti provenienti da piante sintomatiche, furono inizialmente descritti come organismi simili a micoplasmi (Doi *et al.* 1967). Sono procarioti appartenenti alla classe *Mollicutes* (Razin *et al.* 1998) e derivati presumibilmente da batteri Gram positivi (Fig. I.1-a). Hanno habitat intracellulare e si localizzano nelle cellule floematiche della pianta ospite (Fig. I.1-b). Il movimento all'interno della pianta avviene attraverso i plasmodesmi, strutture tipiche delle cellule vegetali, che mettono in comunicazione cellule vicine attraverso la parete cellulare.

Hanno un cromosoma di piccole dimensioni (530-1350 kbp) (Marcone *et al.* 1999) e con un basso contenuto in G-C (Muto e Osawa, 1987). Le dimensioni sono variabili tra i 100 e i 1000 nanometri, sono privi di parete cellulare e riescono ad assumere differenti forme (pleomorfismo), fenomeno che favorisce il loro passaggio attraverso i plasmodesmi.

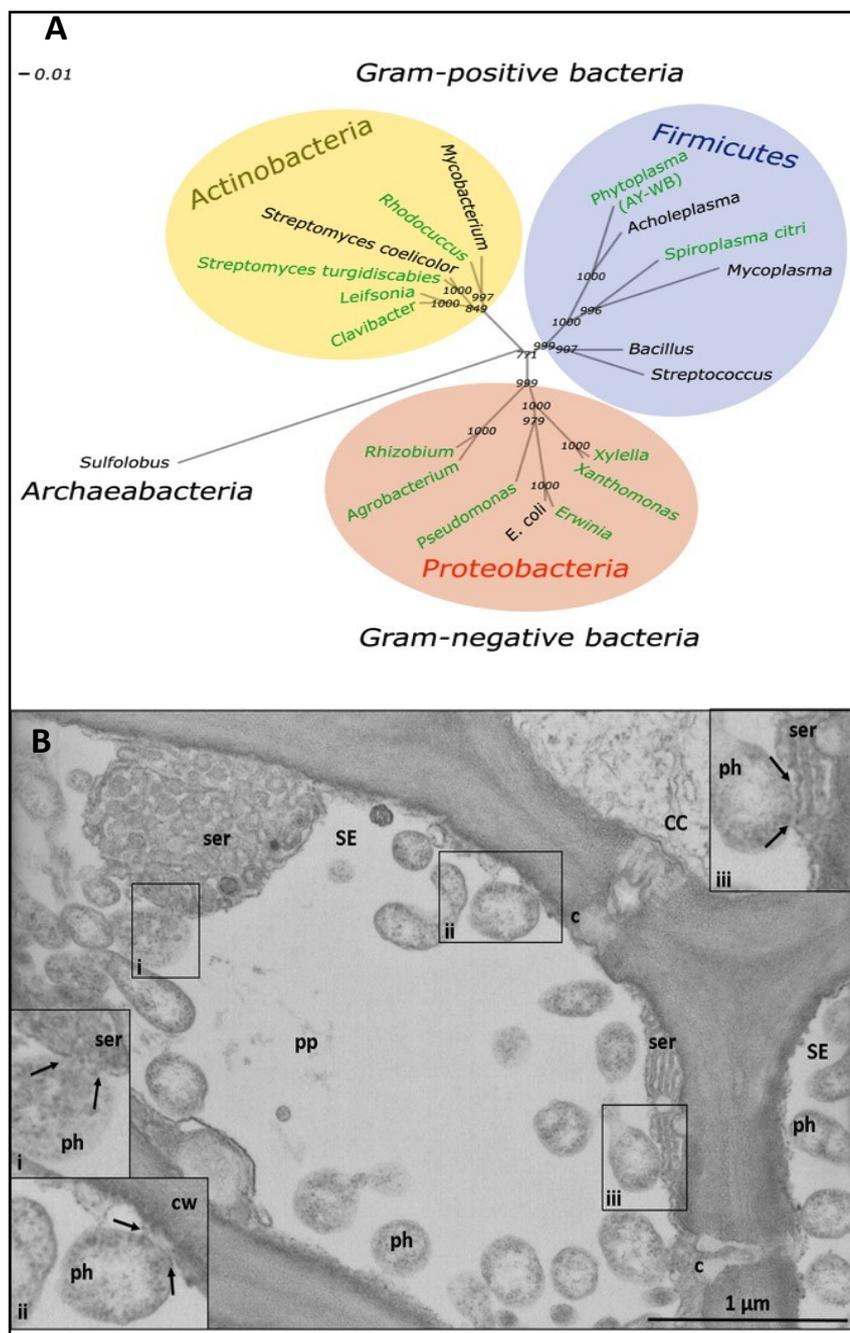


Fig. 1.1- a) Albero filogenetico del fitoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ basato sul gene ribosomico 16S (Orlovskis *et al.* 2015). b) Microfotografia di fitoplasmi all’interno di elementi cribrosi infetti. I riquadri mostrano l’adesione dei fitoplasmi ai diversi componenti degli elementi cribrosi (frece nere). c: callosio, CC: cellule compagne; cw: parete cellulare;

ph: fitoplasma; pp: proteine floematiche; SE: elemento cribroso; ser: reticolo endoplasmatico (Pagliari e Musetti, 2016).

In quanto parassiti obbligati, i fitoplasmi possono sopravvivere solo all'interno dei loro ospiti e per un lungo periodo la loro identificazione è avvenuta solo sulla base dei sintomi mostrati dalle piante infette. La difficoltà nella coltivazione in substrati artificiali ha limitato l'attività di ricerca su questi organismi e attualmente il loro studio si basa su tecniche molecolari. Recentemente tuttavia queste difficoltà sono state superate ed è ora infatti possibile coltivare *in vitro* questi microrganismi (Contaldo *et al.* 2012; 2016), aprendo la strada a nuove linee di ricerca e dando la possibilità di studiare i fitoplasmi al di fuori dei loro ospiti (Fig. I.3).

La diagnosi viene condotta attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando i “primers” generici P1/P7 (Deng e Hiruki, 1991; Schneider *et al.* 1995) che amplificano il gene 16S, la regione spaziatrice ad esso adiacente e la porzione iniziale del gene 23S (Fig. I.2). L'utilizzo dei ‘primers’ generici P1/P7 consente di individuare la presenza di fitoplasmi nel tessuto analizzato ma la discriminazione dei diversi fitoplasmi richiede ulteriori analisi che vanno ad individuare le differenze presenti all'interno della sequenza amplificata da questi “primers”.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

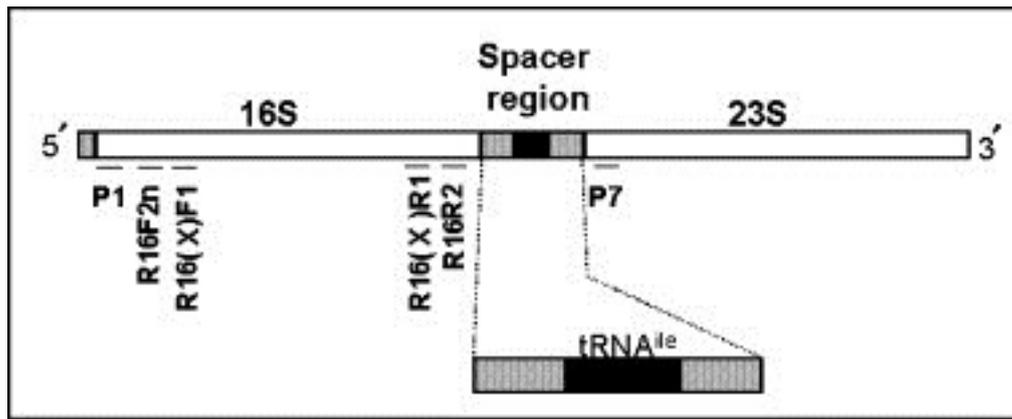


Fig. I.2- Il gene ribosomico 16S e la regione spaziatrice tra questo e il gene ribosomico 23S vengono amplificati con la coppia di “primers” P1/P7. Le coppie di “primers” R16F2n/R16R2 e R16(X)F1/R16(X)R1 amplificano invece una regione interna alla precedente e sono utilizzati nella “nested” PCR.

Questa discriminazione può essere ottenuta per alcuni fitoplasmi attraverso la “nested” PCR, tecnica che prevede una seconda PCR utilizzando come template il frammento ottenuto dai P1/P7 e ‘primers’ che amplificano sequenze interne.

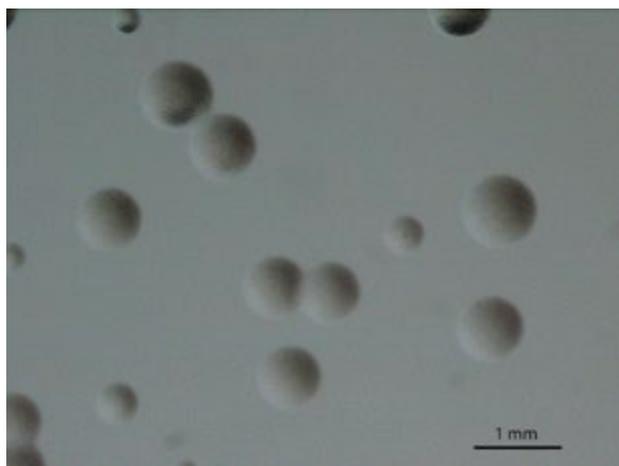


Fig. I.3- Colonie di fitoplasmi su substrato artificiale, ottenute da materiale infetto da fitoplasmi appartenenti al gruppo dello “stolbur” (Contaldo *et al.* 2012).

Nei casi in cui la “nested” PCR non sia sufficiente a distinguere i fitoplasmi individuati, è possibile ricorrere alla tecnica RFLP sul gene ribosomico 16S (Lee *et al.* 1998; Franova 2011) e sul 23S (seppur meno conservato del precedente). Inoltre può essere utilizzato il DNA Barcoding che, usando un frammento del gene che codifica per il fattore di allungamento Tu, permette l’identificazione dei fitoplasmi e la distinzione tra di essi (Makarova *et al.* 2012). Infine, altri frammenti di acido nucleico quali la sequenza della regione spaziatrice tra i geni 16S e 23S, i geni *secA*, *secY* e *vmp*, oppure anche le proteine ribosomiche, vengono utilizzati come ulteriori strumenti di

identificazione e discriminazione dei fitoplasmi (Lee *et al.* 2006; Hodgetts *et al.* 2008; Cimerman *et al.* 2009; Pacifico *et al.* 2009).

La classificazione di questi microrganismi è ancora provvisoria per la mancanza di caratteristiche fenotipiche note ed utilizza il concetto di 'Candidatus' proposto per le specie che mancano della descrizione di caratteristiche fenotipiche. La definizione di nuova specie 'Candidatus Phytoplasma' prevede che la sequenza del gene 16S rRNA abbia una similarità inferiore al 97.5% rispetto alle specie precedentemente identificate. In alcuni casi tuttavia può essere accettata anche una percentuale superiore. È il caso in cui la nuova specie si distingue per la diversa gamma di ospiti e/o di diversi insetti vettori (IRPCM 2004; Bertaccini 2007).

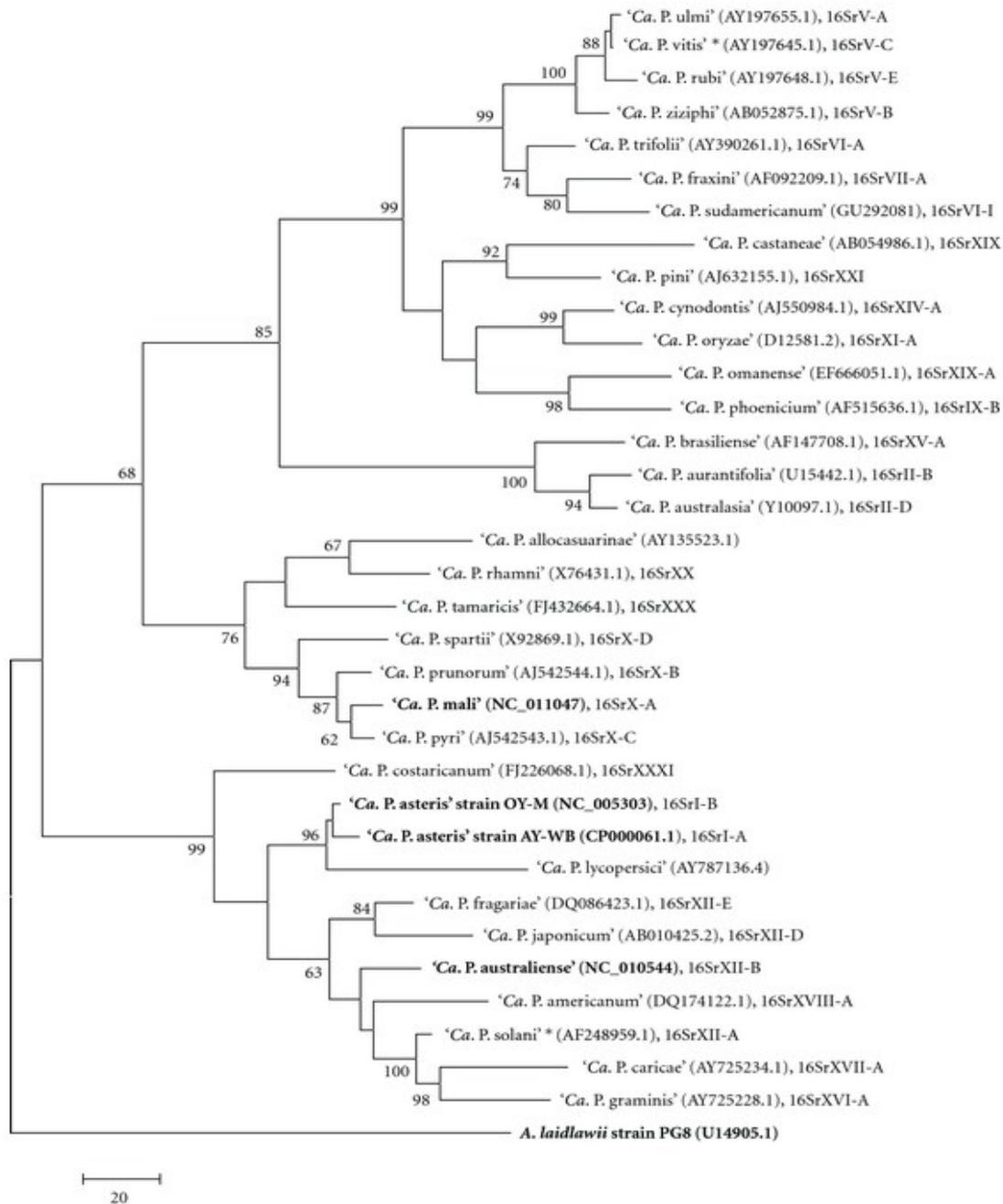


Fig. I.4- Albero filogenetico costruito attraverso “parsimony analysis” del gene 16S rDNA. *A. laidlawii* è stato utilizzato come specie di riferimento e i 4 fitoplasmi evidenziati in grassetto individuano quelli che sono stati completamente sequenziati (Kube *et al.* 2012).

Metabolismo dei fitoplasmi

La sopravvivenza dei fitoplasmi in natura è possibile solo all'interno di un ospite da cui poter assumere la maggior parte delle sostanze nutritive necessarie (Firrao *et al.* 2007). Questo è dovuto alle loro limitate capacità metaboliche, risultato della mancanza di numerosi geni presenti invece in organismi simili e che consentono di metabolizzare sostanze presenti nell'ambiente in cui vivono (Weisburg *et al.* 1989; Oshima *et al.* 2004; Bai *et al.* 2006). Tutti i *Mollicutes* hanno generalmente limitate capacità metaboliche e devono quindi trovare nei loro ospiti le sostanze di cui necessitano. I fitoplasmi sembrano essere anche più limitati rispetto agli altri ordini (Oshima *et al.* 2004): non hanno geni codificanti per il complesso delle ATP sintetasi e mancano di svariati geni coinvolti nella riparazione del DNA (Oshima *et al.* 2004; Bai *et al.* 2006), fenomeni li costringono ad utilizzare ATP prodotto dall'ospite. Analizzando le sequenze complete del genoma di alcuni fitoplasmi, si può trovare conferma della mancanza degli elementi necessari per la sintesi di ATP e varie fasi della glicolisi. La fonte energetica prevalente, per spiroplasmi e micoplasmi, è data dagli zuccheri glucosio e fruttosio mentre i fitoplasmi utilizzano in particolare maltosio, saccarosio e trealosio (Bai *et al.* 2006; Razin, 2007), quest'ultimo prevalente nell'emolinfa degli insetti.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Il ciclo dei fitoplasmi

I fitoplasmi sono capaci di invadere e replicarsi in ospiti appartenenti a due regni diversi, piante (*Plantae*) e insetti (*Animalia*), coinvolgendoli simultaneamente nel processo di diffusione delle malattie ad essi associate (Fig. I.5). Questo ciclo, sebbene non l'unico, è relativamente inusuale tra i procarioti. Tra gli esempi più noti si ricordano *Spiroplasma citri*, *Xylella fastidiosa* e 'Candidatus Liberibacter solanacearum' (Redak *et al.* 2004; Liefting *et al.* 2009; Breton *et al.* 2010). La maggior parte dei fitoplasmi presenta una trasmissione di tipo circolativo e questo implica che vengano inoculati nella pianta attraverso la saliva durante l'attività trofica (Hogenhout *et al.* 2008). La prima fase implica l'acquisizione del patogeno da parte dell'insetto: si realizza attraverso l'attività trofica di questo su piante infette, specificatamente a livello del floema. Una volta acquisiti, i fitoplasmi sono capaci di invadere le cellule dell'insetto, replicandosi prima nelle cellule epiteliali dell'intestino e poi abbandonandole, attraverso un meccanismo simile all'esocitosi oppure a seguito di lisi cellulare, e spostarsi quindi nell'emolinfa (Christensen *et al.* 2004). Da qui i fitoplasmi possono muoversi e localizzarsi nelle ghiandole salivari sotto forma di aggregati (Nakashima and Hayashi 1995; Ammar e Hogenhout 2006).

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

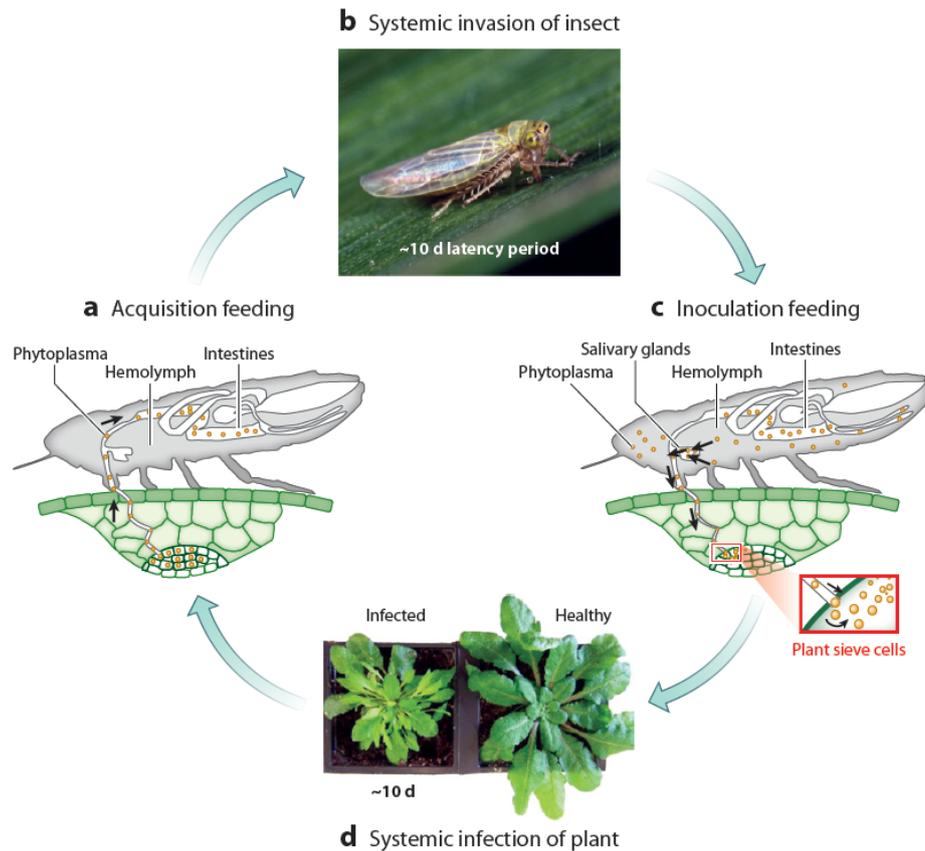


Fig. I.5- Nella fase iniziale l’insetto acquisisce il fitoplasma da una pianta infetta (a) e viene a sua volta infettato durante un periodo di latenza dipendente dalle specie coinvolte (b). Quando il patogeno raggiunge le ghiandole salivari, l’insetto diventa infettivo (c) e capace quindi di completare il ciclo trasmettendo il fitoplasma a piante sane(d) (Sugio *et al.* 2011a).

La capacità dei fitoplasmi di infettare le ghiandole salivari diventa quindi fondamentale in quanto la saliva risulterà il mezzo di contatto tra l’insetto e il floema durante i successivi interventi trofici. Attraverso questi ultimi, attuati su piante sane, si verifica la trasmissione, l’ultima fase del ciclo, che va a

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell’ effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

completare il processo di diffusione del patogeno da un ospite infetto ad uno sano. La diffusione dei fitoplasmi può coinvolgere anche piante appartenenti a specie diverse e può dipendere sia dal ciclo dell'insetto, a seconda che si svolga su una o più specie di piante, ma anche da interventi trofici casuali in cui il vettore va ad alimentarsi accidentalmente su un ospite che solitamente non gli è gradito. È questo il caso del legno nero della vite, il cui vettore, *Hyalesthes obsoletus*, svolge il suo ciclo su specie erbacee o arbustive dalle quali acquisisce il fitoplasma 'Candidatus P. solani' e su queste solitamente lo completa. Tuttavia, attraverso punture di nutrizione occasionali, il patogeno può essere trasmesso a piante di vite e consentire quindi il passaggio ad un nuovo ospite diverso da quello primario (Lessio *et al.* 2007; Sharon *et al.* 2005; Maixner 1994; Sforza *et al.* 1998).

Gli insetti vettori

Sono note ad ora circa un centinaio di specie per le quali è stato dimostrato il ruolo di vettore di fitoplasmi (Wilson e Weintraub 2007; Bressan *et al.* 2009; Weintraub e Beanland 2006; Alene *et al.* 2011). Appartengono all'ordine degli Hemiptera del quale è particolarmente rappresentata la famiglia Cicadellidae seguita dalle famiglie Cixiidae, Delphacidae, Derbidae, Cercopidae e Flatidae della superfamiglia Fulgoroidea. Anche due generi della famiglia Psyllidae comprendono specie in grado di trasmettere importanti fitoplasmi dei fruttiferi (Weintraub e Beanland, 2006; Alma 2008). Sono insetti emitaboli e richiedono fino a 5 stadi giovanili prima di passare a quello di adulto. Accertare il ruolo di vettore per una data specie può rivelarsi piuttosto complesso, specialmente quando l'insetto vive su colture arboree che vanno in riposo invernale. Queste richiedono un lungo periodo per mostrare i sintomi e ciò implica che l'insetto vettore potrebbe non essere più presente, rendendo difficile la correlazione tra vettore e malattia. Inoltre, svariate specie sono capaci soltanto di acquisire il patogeno da piante infette ma non di trasmetterlo a nuove piante. I saggi diagnostici su queste specie non danno pertanto una risposta definitiva poiché la presenza del fitoplasma all'interno del corpo dell'insetto non costituisce una prova della sua trasmissibilità. Sono necessarie pertanto delle prove specifiche

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

in cui si saggia, per una data specie di insetto, sia la capacità di acquisire che quella di trasmettere ad uno specifico ospite vegetale e solo dopo risultato positivo un insetto può essere definito vettore di uno o più fitoplasmi.

Le piante si difendono dai fitofagi mediante metaboliti secondari

La risposta della pianta contro gli attacchi da insetti fitofagi prevede l'attivazione di diverse vie metaboliche al fine ostacolarne l'attività. Tra le risposte precoci vi sono quelle regolate dall'acido jasmonico (JA), ormone vegetale attivato a seguito di vari stress e che attiva una serie di difese mirate e specifiche per lo stress in corso (Diezel *et al.* 2011). L'attività di tale ormone a seguito di attacchi delle cicaline è tuttavia minore rispetto ad altri insetti (Maffei *et al.* 2007; Kessler *et al.* 2004). La spiegazione sta nel danno relativamente limitato che viene prodotto dagli stiletto durante le punture di nutrizione, contariamente a quanto avviene per gli insetti masticatori che con la loro attività più intensa portano ad un danno maggiore. Questa azione poco invasiva è comparabile alla penetrazione delle ife fungine e pertanto tali insetti vengono inizialmente riconosciuti dalla pianta come funghi biotrofici con conseguente attivazione di difese che coinvolgono l'attività di altri ormoni oltre a JA quali l'acido salicilico (SA) ed etilene (ET) (Hogenhout *et al.* 2008).

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

L'accumulo di tali ormoni può infine innescare la produzione di metaboliti secondari di difesa contro i fitofagi, sebbene le modalità e i relativi rapporti non siano ben chiari. Aspetto fondamentale è la specifica interazione pianta-insetto che va a determinare una reazione di compatibilità o incompatibilità a seconda dei casi: gli afidi, su molte piante, non inducono la sintesi di alti livelli dei suddetti ormoni, tuttavia alcune specie riescono ad attivare una precoce sintesi di JA che innesca la produzione di metaboliti secondari ad azione diretta di difesa oppure quella di composti volatili ad azione di richiamo verso i predatori naturali (Girling *et al.* 2008).

Gli effetti dei fitoplasmi sulla biologia e sul comportamento degli insetti vettori

Una volta all'interno dell'insetto i fitoplasmi devono sopravvivere a specifiche condizioni chimico-fisiche quali pH, enzimi digestivi, potenziale redox e movimenti peristaltici. Molti batteri che invadono il tratto intestinale innescano una risposta di difesa immunitaria da parte dell'insetto attraverso il riconoscimento da parte dell'ospite di specifici peptidoglucani batterici, portando alla sintesi di peptidi ad azione antimicrobica quali cecropina o diptericina. Molti batteri fitopatogeni secernono effettori proteici capaci di

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

ostacolare tale difesa (Vallet-Gely *et al.* 2008) e favorire quindi la loro proliferazione all'interno dell'insetto.

I fitoplasmi non producono peptidoglucani (Sugio *et al.* 2011), con la immediata conseguenza di non innescare alcuna risposta da parte dell'insetto (Vallet-Gely *et al.* 2008). Tuttavia producono altre proteine quali CSP (“cold shock protein”) e il fattore di allungamento Tu (EF-Tu) che innescano una risposta di difesa in alcune specie vegetali appartenenti alle *Brassicaceae* e *Solanaceae* (Sugio *et al.* 2011). Viene inoltre riportata una risposta al EF-Tu su *Drosophila spp.* (Hofweber *et al.* 2005). Il motivo per cui i fitoplasmi non innescano alcuna risposta nell'insetto non è ancora chiaro. Tra le spiegazioni possibili vengono proposte la mancanza di opportuni elicitivi e il fatto che le cellule epiteliali, nelle quali i fitoplasmi si moltiplicano, sono poco efficienti nell'attivare le risposte di difesa dell'insetto.

La prima fase dell'infezione prevede l'adesione dei fitoplasmi alle cellule epiteliali dell'intestino anteriore che vengono quindi invase mediante processi di endocitosi e diacitosi (Hogenhout *et al.* 2008; Galetto 2011). Qui i fitoplasmi si replicano prima di passare all'emolinfa attraversando le cellule muscolari. Non è noto se in queste fasi si verifica una risposta di difesa. Si sa che *Spiroplasma citri* aderisce alle cellule epiteliali attraverso proteine che ne

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

facilitano il processo e mediante successiva endocitosi (Kwon *et al.* 1998). Questo meccanismo viene indicato tra quelli probabilmente usati anche dai fitoplasmi: il fitoplasma della flavescenza dorata della vite aderisce ad estratti di nitrocellulosa di molti insetti e il fitoplasma del giallume della cipolla risulta associato ad un complesso di actina e miosina (catene pesante e leggera) degli insetti attraverso la proteina Amp (Suzuki *et al.* 2006).

Il costo energetico per queste vie di difesa potrebbe essere consistente per l'insetto quando la concentrazione del patogeno è elevata. Finora la risposta dell'insetto alla presenza di fitoplasmi non è stata pienamente studiata tuttavia, Bosco *et al.*, hanno osservato che una elevata concentrazione all'interno dell'insetto è correlata con una maggiore efficienza nella trasmissione del fitoplasma (Bosco *et al.* 2007) mentre *Spiroplasma citri* porta ad una minore sopravvivenza e fecondità del suo vettore *Circulifer tenellus*. La risposta degli insetti all'infezione da fitoplasmi è pertanto molto specifica e varia a seconda della combinazione fitoplasma-insetto che viene considerata.

Oltre alla biologia, i fitoplasmi condizionano anche il comportamento degli insetti che vanno ad infettare. Alcuni vettori mostrano tassi di sopravvivenza maggiori e producono una progenie più numerosa, come nel caso del vettore

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Macrosteles quadrilineatus quando infettato da AY-WB (Peterson 1973; Beanland *et al.* 2000) mentre *Scaphoideus titanus* infettato con il fitoplasma della flavescenza dorata mostra un comportamento opposto (Bertin *et al.* 2007). Queste differenze possono essere conseguenti ad una diversa durata della co-evoluzione tra insetto e fitoplasma e una associazione più lunga potrebbe portare a maggiori vantaggi per il vettore (Purcell 1988; Nault 1989). Per esempio, queste interazioni potrebbero condurre a risposte di difesa minime o addirittura assenti e il fitoplasma si comporterebbe come un simbionte facoltativo.

Vista l'importanza del ruolo svolto dagli insetti nel ciclo dei fitoplasmi, questi microrganismi potrebbero aver sviluppato meccanismi mirati ad attrarre i propri vettori e favorirne le attività con il fine ultimo di aumentare le possibilità di diffusione del patogeno.

Relazioni tra fitoplasmi e insetti vettori nella diffusione delle fitoplasmosi

I fitoplasmi responsabili dell' "aster yellows" (AYPs) sono capaci di infettare oltre 80 specie di piante tra monocotiledoni e dicotiledoni (Hogenhout *et al.* 2008) e il loro principale vettore in USA e Canada è *M. quadrilineatus*,

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

insetto polifago (Wilson e Weintraub 2007) capace di migrare per lunghe distanze per via della sua capacità di sfruttare le correnti d'aria. Gli spostamenti dell'insetto dipendono tuttavia dalle condizioni climatiche e possono avere esiti del tutto imprevedibili. L'età degli insetti inoltre è un fattore molto importante nella efficienza di trasmissione degli AYPs (Murrall *et al.* 1996). Palermo *et al.* hanno mostrato come *M. quadripunctulatus* e *Euscelidus variegatus* possono perdere l'infettività in alcuni periodi del loro ciclo e che l'efficienza di acquisizione di AYP diminuisce con l'età (Palermo *et al.* 2001). Il comportamento degli insetti incide anche sulla dispersione e la probabilità di acquisizione. Il movimento migratorio degli insetti tra le colture è dipendente da specie vegetale, tempi di senescenza della pianta, sesso dell'insetto e il momento della giornata (Maixner e Langer 2006; Todd *et al.* 1991; Beanland *et al.* 1999).

AYPs sono inoltre capaci di incidere sul numero di individui nella popolazione e, indirettamente, sulla dispersione e percentuale di individui infettivi. Anche l'insetto *Dalbulus maidis* mostra un comportamento alterato dall'interazione con il fitoplasma e in particolare si nota che femmine infette dal fitoplasma del "maize bushy stunt" (MBS) depongono più uova rispetto alle femmine sane (Madden *et al.* 1984). I fitoplasmi sono noti per secernere proteine che

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell'effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum "Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo" – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

probabilmente modulano il metabolismo del loro ospite a vantaggio della propria replicazione (Bai *et al.* 2006; 2009; Hogenhout *et al.* 2008; Hoshi *et al.* 2009).

Ad oggi cinque fitoplasmi sono stati completamente sequenziati; fitoplasma del giallume della cipolla (OY-M; ‘*Ca. P. asteris*’) (Oshima *et al.* 2004), fitoplasma del giallume dell’astro causante scopazzi (AY-WB; ‘*Ca. P. asteris*’) (Bai *et al.* 2006), giallume della vite australiano (AUSGY; ‘*Ca. P. australiensè*’) (Tran-Nguyen *et al.* 2008), giallume letale della fragola (SLY; ‘*Ca. P. australiensè*’) (Andersen *et al.* 2013) e il fitoplasma degli scopazzi del melo (AP; ‘*Ca. P. mali*’) (Kube *et al.* 2008).

Su quattro di questi è stata verificata la presenza di sequenze codificanti per proteine con potenziale azione di effettori. In OY-M ci sono 45 potenziali effettori sul cromosoma, 41 in AUSGY, 13 in AP, e 49 in AY-WB (Bai *et al.* 2006; 2009; Kube *et al.* 2008; Oshima *et al.* 2004; Tran-Nguyen *et al.* 2008). Questi potenziali effettori sono indicati come capaci di indurre cambiamenti nel metabolismo di insetti e piante, con il fine di favorire la sopravvivenza, la replicazione e la dispersione del patogeno.

Gli effettori dei fitoplasmi

La manipolazione delle normali funzioni fisiologiche della pianta ospite è uno degli obiettivi primari dei patogeni e viene ottenuta con modalità diverse. *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas spp.* sono capaci di sopprimere le reazioni di difesa e di attivare la sintesi di composti che favoriscono la moltiplicazione batterica (Xiang *et al.* 2008; Gohre *et al.* 2008) mentre è stato dimostrato recentemente come *P. syringae* secerna effettori capaci di favorire la creazione di un ambiente umido nell'apoplasto, condizione essenziale per la moltiplicazione delle cellule batteriche (Xiu-Fang Xin *et al.* 2016), in un meccanismo complesso che oltre a coinvolgere la pianta richiede la presenza di specifiche condizioni di umidità atmosferica.

Per il fitoplasma AY-WB sono state identificate 56 proteine con potenziale ruolo di effettori (Sugio *et al.* 2011). La loro identificazione è avvenuta a seguito del sequenziamento dell'intero genoma del fitoplasma e della ricerca su questo di geni codificanti proteine con potenziale ruolo di effettori. Queste vengono individuate sulla base della presenza di specifici peptidi situati nella porzione N-terminale e che hanno funzione di segnale (Bai *et al.* 2009).

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

SAP11 è uno degli effettori secreti dai fitoplasmi durante il processo infettivo ed è responsabile di alcuni dei sintomi che si riscontrano nelle piante infette. Viene attualmente studiato su diversi fitoplasmi quali AY-WB (uno dei ceppi coinvolti nel giallume dell'astro), MBS (nanismo del mais) o su AP (scopazzi del melo), tuttavia le informazioni maggiori sono relative a SAP11 del fitoplasma AY-WB. L'utilizzo di piante di *Arabidopsis thaliana* transgeniche sovraesprimenti SAP11 ha permesso di studiare gli effetti specifici di questo effettore isolandolo dalle altre componenti del metabolismo fitoplasmatico.

Le piante transgeniche SAP11aywb mostrano una sintomatologia simile a quella prodotta da molte fitoplasmosi (Fig. I.6). Le foglie si presentano fortemente deformate, con arricciamento e ispessimento della lamina fogliare e con dimensioni ridotte della stessa.

I frutti risultano anch'essi deformati, con superficie rugosa e tendenza ad assumere una forma ricurva contrariamente alla superficie liscia e forma lineare dell'ecotipo col0 di *Arabidopsis*, usato come controllo non transgenico. Come conseguenza di una fioritura ritardata la loro produzione risulta inoltre posticipata.

Infine, il fenomeno della dominanza apicale subisce delle interferenze: le piante transgeniche SAP11aywb determinano una maggiore produzione di germogli

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

rispetto a col0, mostrando un aspetto cespuglioso e una taglia ridotta. Le piante transgeniche SAP11mbsp (ottenute utilizzando il gene SAP11 del fitoplasma MBS) mostrano invece una sintomatologia diversa. Le foglie mostrano minime differenze rispetto a col0 mentre l'affastellamento risulta decisamente più marcato: il numero di germogli prodotti è maggiore di quello prodotto da SAP11aywb conferendo alle piante un aspetto molto più cespuglioso. Le differenze nei sintomi suggeriscono che le caratteristiche di SAP11 varino in funzione del fitoplasma da cui proviene e pertanto anche l'interazione dell'effettore con la pianta produca effetti diversi. Questo aspetto è stato confermato da esperimenti mirati ad individuare i bersagli di SAP11 (Pecher *et al.* dati non pubblicati) nella pianta ospite, evidenziando che la famiglia di fattori di trascrizione TCP (cinnamato-teosinte branched1, cycloidea, proliferating cell factors 1 and 2) responsabile di regolare diverse fasi dello sviluppo nelle piante, rappresenta uno dei bersagli dell'attività di SAP11. È suddivisa nei gruppi 1 e 2 (Fig. I.7) e quest'ultimo in particolare rappresenta un bersaglio di SAP11: l'effettore si lega e destabilizza le TCPs del gruppo 2, con conseguente perdita delle loro funzioni.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari



Fig. I.6- Confronto fenotipico tra la linea di riferimento col0 e 3 linee transgeniche ottenute da trasformazioni indipendenti (4,5,7). La presenza del transgene SAP11_{aywb} porta a lamine fogliari arricciate e di dimensioni ridotte (A, B) e ad aspetto cespuglioso della pianta (C). Le silique si presentano con una spinta rugosità della superficie e una forma arcuata risultante dall' anomalo sviluppo dei tessuti (D). Le differenze nella gravità dei sintomi sono spiegabili da una diversa espressione di SAP11 nelle 3 linee transgeniche (E). (Sugio *et al.* 2011)

Il gruppo 2 è ulteriormente suddiviso in due sotto gruppi, le CIN-TCP e le CYC/TB1-TCP e mentre SAP11_{aywb} interagisce con entrambe, l'attività di SAP11_{mbsp} coinvolge solamente le CYC-TB1-TCP. Questo diverso bersaglio è reputato essere la causa principale nella differenza dei fenotipi delle 2 diverse

linee transgeniche SAP11aywb e SAP11mbsp (Fig. I.8), così come dimostrato attraverso l'utilizzo delle linee transgeniche miR319a x 3TCP e brc1 x brc2 capaci di destabilizzare solo le CIN-TCP nel primo caso e solo le CYC-TB1-TCP nel secondo.

La linea miR319a x 3TCP è una linea transgenica di *A. thaliana* in cui vengono sovraespressi i geni codificanti miR319a, un micro RNA con funzione di sopprimere 5 delle 8 CIN-TCPs, e un micro RNA artificiale che va ad sopprimere le rimanenti 3. In questa linea quindi si crea la condizione in cui la sintesi di tutte le CIN-TCP viene soppressa. La linea brc1 x brc2 invece è un mutante in cui i geni codificanti per TCP12 e TCP18, due delle tre CYC/TB1-TCP, vengono inattivati attraverso la tecnica del knockout genico e pertanto le piante di questa linea mostrano una totale assenza delle suddette TCPs. Confrontando i sintomi (Fig. 8) si può vedere che l'arricciamento e lo sviluppo ridotto della lamina fogliare sono presenti sia nella linea miRNA319 x 3 TCP che in SAP11aywb, suggerendo che questa componente dello sviluppo sia regolata dalle CIN-TCP e che queste siano uno dei bersagli di SAP11aywb.

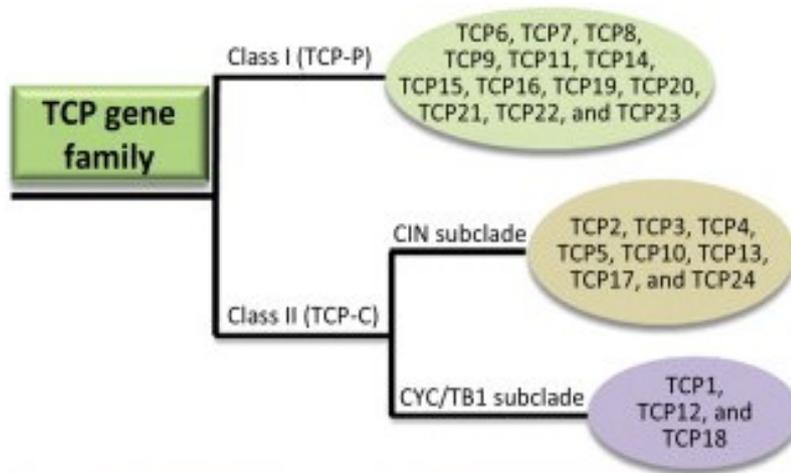


Fig. I.7- Suddivisione delle TCPs in *A. thaliana* (Lopez *et al.* 2015).

L'affastellamento è invece marcato nelle linee *brc1 x brc2* e *SAP11mbsp* in particolare, e in misura minore, nella linea *SAP11aywb*, indicando che le *CYC/TB1-TCP* siano invece responsabili di questa anomalia dello sviluppo e che rappresentino un bersaglio per *SAP11mbsp*.

Inoltre, poichè la linea *SAP11aywb* mostra sia i sintomi di *miRNA319 x 3TCP* che di *brc1 x brc2* si conclude che *SAP11aywb* sia in grado di destabilizzare le TCPs di entrambi i sottogruppi del gruppo 2.

Questo confronto fornisce quindi un'evidenza del fatto che le TCPs siano uno dei bersagli di SAP11, probabilmente il principale, anche se non sono da escludere altre modalità di azione di questo effettore.

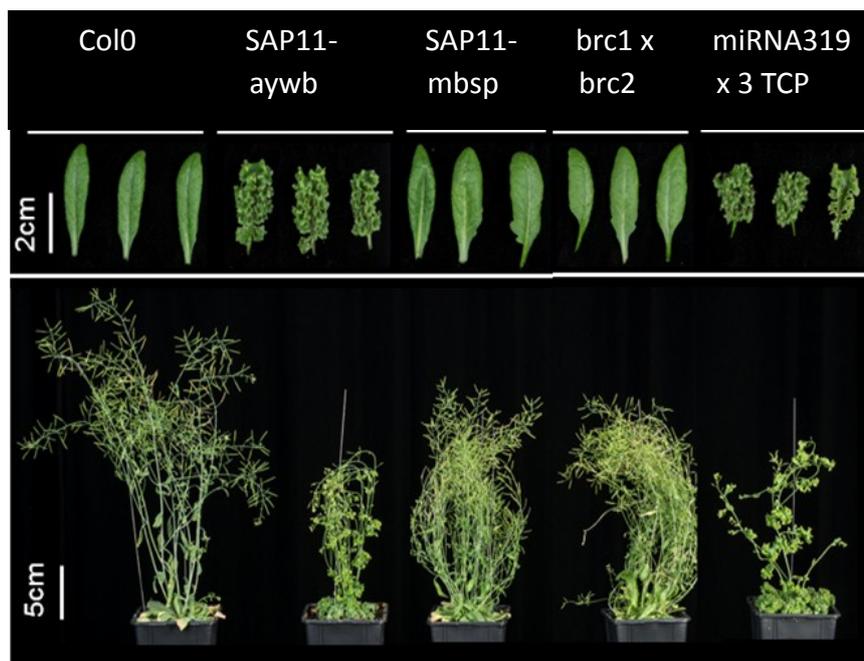


Fig. 1.8- La figura pone a confronto il fenotipo ottenuto nelle diverse linee transgeniche comparate con l'ecotipo col0 non transgenico (Pecher *et al.* dati non pubblicati).

Obiettivi della tesi

Con questo lavoro si è voluto studiare il processo di diffusione dei fitoplasmi mediato da insetti vettori nel caso specifico di AY-WB e del suo insetto vettore *M. quadrilineatus* e con specifico riferimento alla componente del processo che può essere spiegata da SAP11. Le basi scientifiche possono essere riassunte da due esperimenti chiave.

Il primo dimostra che *M. quadrilineatus* produce una progenie più numerosa quando si alimenta su piante infette dal fitoplasma AY-WB (Sugio *et al.* 2011). L'interpretazione di questo risultato è stata che il fitoplasma manipola il metabolismo della pianta al fine di ridurre le risposte contro l'insetto vettore. Questo produrrà un numero maggiore di insetti che, alimentandosi su tessuti infetti, favoriranno quindi la diffusione del patogeno.

Nel secondo viene dimostrato che il risultato precedente può essere ripetuto utilizzando piante transgeniche sovraespressanti SAP11aywb (Sugio *et al.* 2011). Questo dice in sostanza che la migliore "performance" riproduttiva osservata in *M. quadrilineatus* nelle piante infette, può essere spiegata almeno in parte dall'attività dell'effettore SAP11aywb (Fig. 9).

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Al fine di studiare questo effettore separatamente dagli altri prodotti del metabolismo fitoplasmatico, verranno utilizzate piante transgeniche di *A. thaliana* sovraesprimenti SAP11. Le linee transgeniche utilizzate nelle prove saranno le già citate SAP11aywb, SAP11mbsp, miRNA319 x 3TCPs, brc1 x brc2 e infine col0 come controllo non transgenico. Considerate le evidenze sperimentali riguardo l'interazione tra *M. quadrilineatus*, AY-WB e SAP11aywb (Sugio *et al.* 2011), verranno studiati i meccanismi che regolano queste interazioni andando a verificare due ipotesi principali:

- 1- La maggiore “performance” riproduttiva osservata su *M. quadrilineatus* quando si alimenta su piante infette da AY-WB e su piante transgeniche sovraesprimenti SAP11aywb può essere spiegata dalla regolazione negativa dei meccanismi di difesa della pianta contro l'insetto operata da SAP11.
- 2- L'interazione tra SAP11 e la pianta ospite si realizza attraverso il coinvolgimento dei fattori di trascrizione TCP.

Le due ipotesi saranno verificate contemporaneamente in due esperimenti diversi che evidenzieranno il ruolo di SAP11 nel regolare negativamente le difese della pianta attivate contro gli insetti e come tale regolazione trovi spiegazione anche nell'interazione tra SAP11 e le CIN-TCPs.

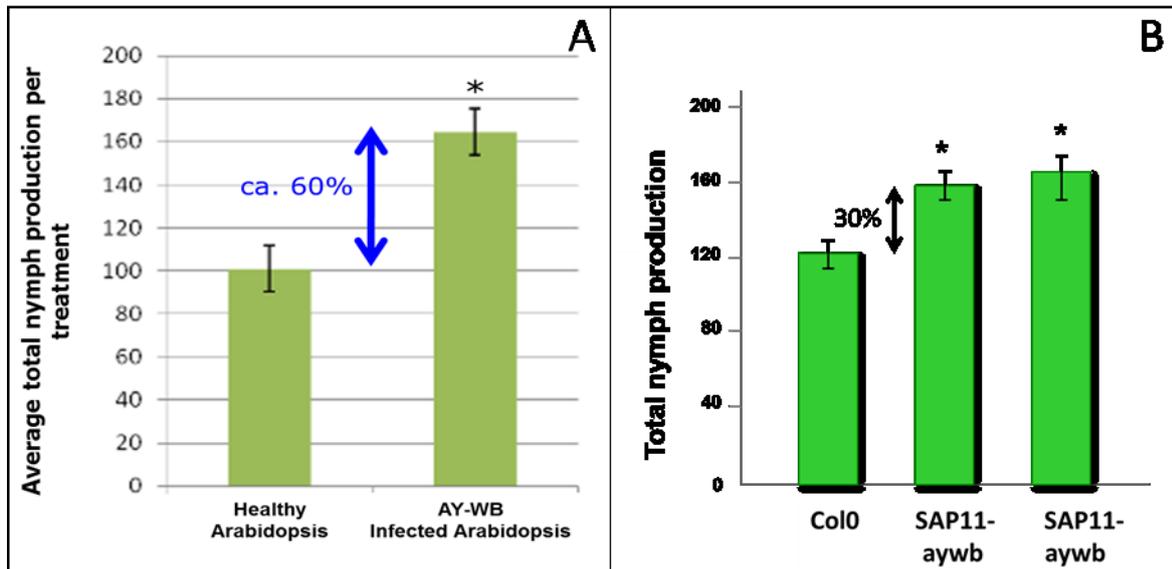


Fig. 9- *M. quadrilineatus* produce un maggior numero di ninfe su piante di *A. thaliana* quando queste sono infette da AY-WB (A) oppure quando quando sovraesprimono il gene SAP11 aywb (*P<0.05). (Sugio *et al.* 2011)

MATERIALI E METODI GENERALI

Allevamento di *Macrosteles quadrilineatus*

Trattandosi di una specie vettrice di patogeni il suo allevamento va condotto sotto stretto controllo e in ambienti di crescita specifici in cui temperatura, umidità e illuminazione vengono regolati artificialmente.

L' insetto viene allevato in gabbie di materiale plastico trasparente, con apposite aperture protette da rete antinsetto per consentire il ricambio gassoso e al cui interno vengono allevate anche le piante necessarie come risorsa alimentare. Il fotoperiodo è stato regolato per avere 16 ore di luce e 8 di buio mentre la temperatura oscilla tra i 20 e 26 °C. Le gabbie sono inoltre provviste di una ventola da utilizzare per il controllo dell'umidità e di un ingresso, non accessibile agli insetti, per l'irrigazione delle piante. Trattandosi di una specie polifaga è possibile utilizzare diverse piante come fonte alimentare e nel caso specifico quella scelta è stata *Avena sativa* L.

A partire da una popolazione iniziale di 50 adulti è possibile ottenere circa 1000 insetti in 4-6 settimane. Le nuove popolazioni vengono ottenute prelevando 50

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

adulti dalle popolazioni precedenti e trasferendoli in una nuova gabbia contenente substrato alimentare fresco. Dopo 8 settimane ciascuna gabbia viene comunque eliminata e gli insetti trasferiti in nuove: questo permette principalmente di ridurre lo sviluppo di malattie a carico delle piante e di mantenere sotto controllo l'aspetto sanitario dell'intera camera di crescita.

Allevamento di *Arabidopsis thaliana*

Sia l'ecotipo Columbia-0 (col0), che le varie linee transgeniche utilizzate nel presente lavoro provengono da studi precedenti riguardanti SAP11 (Sugio *et al.* 2011; Pecher *et al.* dati non pubblicati). La semina, per tutte le linee, viene fatta a spaglio su piccoli vasetti utilizzando semi vernalizzati (esponendoli alla temperatura di 4 °C per una durata di 4 giorni). La vernalizzazione non è strettamente necessaria per lo sviluppo del seme ma permette di ottenere una emergenza più uniforme. I vasetti vengono quindi mantenuti in camere di crescita con fotoperiodo di 10 ore e temperatura costante di 20 °C e in tali condizioni le piante vengono fatte crescere per 2 settimane. Singole piantine vengono quindi trapiantate allo stadio di plantula e mantenute nelle condizioni precedenti al fine di ritardare la fioritura e avere uno sviluppo uniforme.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Campionamento ed estrazione di RNA totale da materiale vegetale.

I campioni provenienti dalle piante saggiate vengono prelevati, posti in provette da 2 ml e immediatamente immersi in azoto liquido. Il rapido congelamento che ne consegue ha lo scopo di impedire sia la degradazione degli acidi nucleici che eventuali reazioni di risposta allo stress del campionamento. Infine, i campioni vengono conservati a -80 °C prima di essere processati. La triturazione del campione avviene tramite agitatore meccanico e richiede la presenza di biglie metalliche all'interno della provetta. L'estrazione dell'RNA totale e il trattamento con DNAsi avvengono in un unico passaggio utilizzando il RNA plant mini kit (Qiagen) e seguendo il protocollo proposto dal produttore. Per i campioni destinati alla tecnica del RNA-seq è richiesto un estratto di elevata qualità (Tab. M.1): i parametri sono stati misurati con il nanodrop8000 (Thermo scientific) per quanto riguarda la presenza di residui di reagenti (Fig. 1) e con il Qubit (Thermo scientific) per la concentrazione. La qualità dell'RNA viene inoltre valutata con un gel di agarosio all' 1%: la presenza di bande nette (solitamente due, della dimensione di circa 2800 e 1700 bp), l'assenza di DNA, uno "smear" molto limitato e una scarsa banda sul fondo

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

sono gli elementi da prendere in considerazione per valutare sia la presenza di eventuali contaminanti che l'integrità dell'RNA.

Tab. M.1 – Requisiti del campione per l'RNA-seq.

| quantità | concentrazione | 260/280 | 260/230 | RIN |
|----------|----------------|---------|---------|------|
| 10 µg | 200 ng/µl | >1.9 | >1.8 | 7-10 |

I valori richiesti per quanto riguarda le quantità e la concentrazione possono variare sensibilmente a seconda dello strumento utilizzato, tuttavia i rapporti di assorbimento 260/280 e 260/230 (Fig. M.1), misurati allo spettrofotometro, risultano piuttosto rigidi in quanto misurano la presenza di reagenti contaminanti o di proteine che possono disturbare le reazioni durante le varie fasi del RNA-seq. Il parametro RIN, misurato attraverso l'utilizzo del "bioanalyzer system" da parte del laboratorio che esegue l'RNA-seq, misura l'integrità dell'RNA e valori inferiori a quelli riportati portano all'esclusione del campione (Tab. M.1).



Fig. M.1 –La figura mostra il tipico prospetto prodotto dal nanodrop 8000

Retrotrascrizione e qPCR.

La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando 1 µg di RNA disciolto in un volume di 11 µl di H₂O ed incubandolo con 1µl di oligo dT (500 µg/ml) e 1µl dNTPs 10mM a 65 °C per 5 minuti. Quindi si aggiunge un mix composto da 4µl di 5X MMLV first strand buffer + 2µl di 0.1M DTT + 1µl di M-MLV RT (Invitrogen) a cui segue un'incubazione per 50 minuti a 37 °C. La reazione

viene infine bloccata con una incubazione finale per 15 minuti a 70 °C. Il cDNA così ottenuto è stato diluito 1:10 prima di essere utilizzato in PCR.

La qPCR è stata condotta con il CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad) utilizzando un volume finale di 10 µl, costituito dai seguenti reagenti:

5 µl sybr green jumpstart Taq (Sigma chemicals)

2.5 µl cDNA

0.5 µl “forward primer” 10 mM

0.5 µl “reverse primer” 10 mM

1.5 µl H₂O RNAsi/DNAsi “free”

Le condizioni di amplificazione sono invece le seguenti:

1. 95°C per 3.00 minuti
2. 94°C per 0.30 secondi
3. 60°C per 0.30 secondi
4. 72°C per 0.30 secondi
5. lettura
6. ripetere i passaggi 2-5 per 40 volte
7. 50°C per 0.30 secondi
8. “Melt curve” da 65°C a 95°C: Incremento di 0.1 °C/secondo e lettura finale.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

I “primers” utilizzati sono stati disegnati utilizzando la procedura indicata sulla pagina internet della IDT (“Integrated DNA Technologies”, <https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) (tabella M.2).

Tab. M.2 – Lista “primers”.

| gene | “forward” | “reverse” |
|---|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>LOX2</i> (LIPOXYGENASE 2) | GAGCTAAGTTCAGCC | CTCCATGTTCTGCGG |
| EDS5 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 5) | CATCAGGTGATGGCTCAGAC | ACTAATCCAAGCGTGGCTCC |
| VSP1 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1) | TCTCAAGGCTGTTGGTGTAACAA | TTGTACACCACTTGCGTCAACTT |
| ACTIN | CTGGACGTGACCTTA | GAGCTTCTCCTTGATGTCTCTTAC |
| JAR1 (JASMONATE RESISTANT 1) | CTGGGAGATTTTCAGGAGAAAC | TTCCGGGAACCTAACGTAACC |
| JAZ1 (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 1) | GGCGAGCAAAGGCACCGCTA | TCCAAGAACCGGTGAAGTGAAGC |
| TUBULIN | AAACTCACTACCCCCAGCTTTG | CACCAGACATAGTAGCAGAAATCAAGT |
| UBIQUITIN 10 | TGACAACGTGAAGGCCAAGATCC | ATACCTCCACGCAGACGCAACAC |
| AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE) | TTTACGACCAAGGAGCTGAAG | CTCAGCTCCTTGGTCGTAAG |
| SID2 (SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2) | TGGTTAGCGTTGCTGGTATC | CATTCAACAGCGATCTTGCC |
| MYC2 TRANSCRIPTION FACTOR | CGGAGATCGAGTTCGCCGCC | AATCCCGCACCGCAAGCGAA |
| EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1) | CAAGAATCTTGAAGCTGTC ATTGATC | TGTCCTGTGAACACTATCTGTTTTCTACT |
| PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1) | GTTGCAGCCTATGCTCGGAG | CCGCTACCCCAGGCTAAGTT |
| EF-1ALFA (ELONGATION FACTOR 1 ALFA) | TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA | GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA |

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell’ effettore fitoplasmatico *sap11* nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

CAPITOLO 1- GLI EFFETTI DI SAP11 SULLA FECONDITÀ DI *M. QUADRILINEATUS*.

Introduzione

Sulla base delle evidenze sperimentali disponibili ed esposte negli obiettivi della tesi, abbiamo deciso di avviare una serie di esperimenti al fine di testare le nostre ipotesi sul ruolo di SAP11. Il primo di questi riguarda gli effetti di SAP11 sulla fecondità di *M. quadrilineatus*, in cui abbiamo ripetuto in parte quanto già fatto da Sugio *et al.* 2011 ma utilizzando condizioni sperimentali diverse e adeguate alle prove che verranno svolte successivamente.

L'ipotesi specifica di questa prova è che SAP11_{aywb} produce un effetto positivo sulla capacità riproduttiva degli insetti vettori mentre SAP11_{mbsp} non possiede questa funzione.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Questa ipotesi nasce da considerazioni riguardanti le abitudini alimentari di *M. quadrilineatus* e *Dalbulus maidis*, vettori dei fitoplasmi AY-WB e MBS rispettivamente, da cui SAP11aywb e SAP11mbsp derivano. *M. quadrilineatus* è un insetto polifago (Wallis 1962; Peterson 1973) che, vista la necessità di colonizzare diversi ospiti, potrebbe aver sviluppato dei meccanismi di interazione con le piante di natura poco specifica. La conseguenza potrebbe essere pertanto quella di possedere meccanismi poco efficienti nel superare le barriere di difesa poste dalla pianta in risposta all'attacco dell'insetto. La possibilità quindi di vivere su molte piante ospiti verrebbe pagata con la minore capacità di colonizzare efficacemente ciascuna di esse. In questo caso crediamo che AY-WB abbia sviluppato dei meccanismi per compensare ai limiti del suo vettore *M. quadrilineatus* nel colonizzare le piante e dare a questo un vantaggio in termini riproduttivi. Il vantaggio in effetti si realizza per entrambi gli organismi, dato che la produzione di un maggior numero di insetti che si alimentano su tessuti infetti costituisce un vantaggio anche per la diffusione del fitoplasma.

Opposto è invece il caso di *Dalbulus maidis*, insetto monofago sul genere *Zea*, vettore di MBS su mais (*Zea mais*) e pertanto altamente specializzato su questa specie. Contrariamente ad AY-WB, pensiamo che in queste condizioni MBS non abbia sviluppato alcun meccanismo per favorire il proprio vettore. L'insetto è infatti

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

altamente efficiente nel superare le difese del proprio ospite ed eventuali meccanismi per favorirne l'attività sulla pianta sarebbero superflui.

Descrizione della prova

Per verificare la nostra ipotesi sono stati condotti due esperimenti andando a valutare la capacità riproduttiva dei due insetti nella specie *A. thaliana*.

La prima prova (Tab.1.1) consiste nel confrontare la progenie prodotta da *M. quadrilineatus* quando si alimenta sulle 2 linee transgeniche SAP11aywb, SAP11mbsp e sul controllo non transgenico col0. Le piante sono state allevate secondo quanto descritto nel capitolo dei materiali e metodi e gli insetti provengono da una popolazione di età comparabile. Le piante, all'età di 5 settimane dal trapianto, sono state poste singolarmente all'interno di sacchetti forati di materiale plastico. Questi consentono agli scambi gassosi e termici di avvenire più rapidamente che all'interno delle convenzionali gabbie in plastica rigida e prevengono inoltre la formazione di depositi acquosi (dovuti alla condensazione del vapore acqueo sulle superfici interne della gabbia) nei quali gli insetti spesso si trovano invischiati. Gli insetti sono stati quindi

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

posti all' interno dei sacchetti, a contatto con le piante, in numero di 10 (7 femmine e 3 maschi) e per una tempo di 48 ore. Al termine delle 48 ore gli insetti sono stati rimossi e contati: se il numero degli insetti rimasti era minore di 10 (dovuto a mortalità accidentale) le piante venivano escluse dalla prova. Il tempo che trascorre dalla deposizione delle uova alla produzione di nuovi adulti varia tra le 4 e le 5 settimane, al termine delle quali i nuovi insetti vengono contati. La procedura prevede di lavorare all'interno di una stanza al buio, di utilizzare una fonte luminosa per attrarre gli insetti verso la parte alta di ciascun sacchetto e quindi catturarli chiudendo il sacchetto immediatamente sotto il punto in cui gli insetti si vanno a concentrare. Questa modalità è stata quella più efficace tra le varie sperimentate ed evita sia la fuga degli insetti e sia che vengano contati più volte.

L'esposizione di 48 ore è un parametro che verrà utilizzato anche in altre prove. È stato ottenuto attraverso prove preliminari in cui è stata valutata la produzione di uova a tempi di esposizione crescenti. Infatti, comparando la deposizione di uova su col0 dopo 1,2,3,4,5,6 giorni di esposizione a *Macrosteles*, si è visto che il picco di deposizione giornaliera si verifica al giorno 2. Considerata anche l'opportunità di non danneggiare eccessivamente le piante attraverso una presenza prolungata degli insetti, è stato deciso di utilizzare l'esposizione di 48 ore in tutte le prove riguardanti *Macrosteles*.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

La seconda prova (Tab. 1.2) è stata impostata come la precedente ma utilizzando questa volta piante transgeniche di mais sovraespressanti SAP11mbsp e il controllo non transgenico HIIA. Sono state utilizzate piante all'età di 3 settimane dalla semina e poste anch'esse all'interno di sacchetti forati. Gli insetti utilizzati in questo caso appartengono alla specie *D. maidis* e sia il numero che l'esposizione sono stati gli stessi della prima prova.

Tab. 1.1- Resoconto delle prova di fecondità su *M. quadrilineatus*.

| linea | n° piante | n° insetti/pianta | durata esposizione | età piante |
|-----------|-----------|-------------------|--------------------|-------------|
| SAP11aywb | 5 | 10 | 48 ore | 5 settimane |
| SAP11mbsp | 5 | 10 | 48 ore | 5 settimane |
| col0 | 5 | 10 | 48 ore | 5 settimane |

Tab. 1.2- Resoconto delle prova di fecondità su *D. maidis*.

| linea | n° piante | n° insetti/pianta | durata esposizione | età piante |
|-----------|-----------|-------------------|--------------------|-------------|
| SAP11mbsp | 5 | 10 | 48 ore | 3 settimane |
| SAP11mbsp | 5 | 10 | 48 ore | 3 settimane |
| HIIA | 5 | 10 | 48 ore | 3 settimane |

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Risultati

I dati ottenuti hanno confermato la nostra ipotesi. La prima prova mostra infatti che SAP11aywb è in grado di favorire la capacità riproduttiva di *M. quadrilineatus* mentre SAP11mbsp non produce un effetto significativo (Fig. 1.1). L'interpretazione di questo risultato ricalca quindi quanto detto nell'introduzione ed evidenzia che questo effettore ha caratteristiche diverse a seconda del fitoplasma considerato. La reazione che produce è infatti dipendente dalla specifica combinazione fitoplasma – insetto vettore e nel caso in questione favorisce la combinazione data da fitoplasma e vettore entrambi polifagi. A seguito di questo risultato, al fine di valutare gli effetti su un insetto monofago, abbiamo ripetuto l'esperimento utilizzando questa volta *Dalbulus maidis*. Sebbene questa specie sia riportata prevalentemente su mais e la compatibilità con *Arabidopsis* sia pertanto improbabile, è possibile che le piante transgeniche, interferendo con il metabolismo della pianta, riducano le cause dell'incompatibilità. Sfortunatamente questo evento non si è verificato e, sebbene l'insetto sia sopravvissuto su *Arabidopsis* per circa 10 giorni, non è stata osservata alcuna progenie. Si stanno al momento valutando altre specie di cicaline che possano rispondere ai requisiti di essere vettori di fitoplasmi e monofaghe su *Arabidopsis*.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

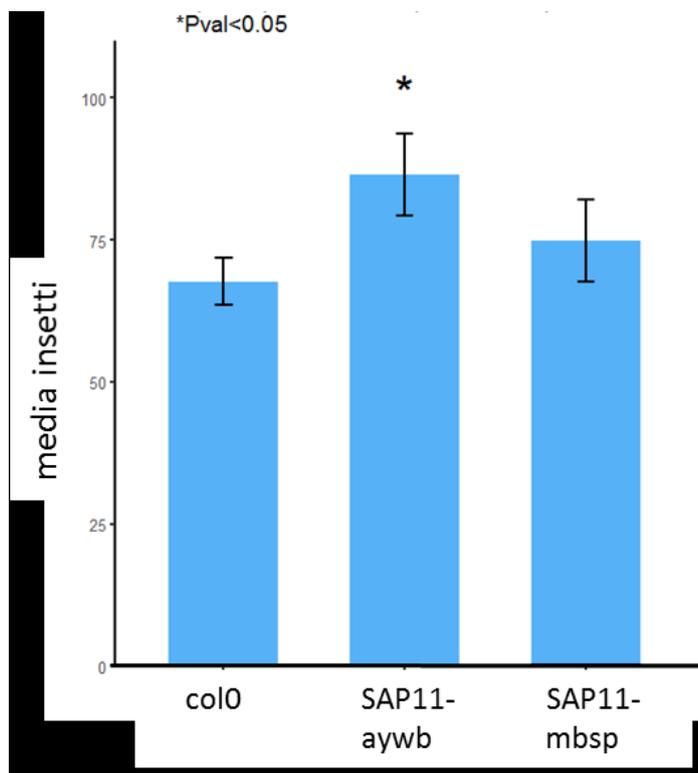


Fig. 1- Comparazione della progenie ottenuta da *M. quadrilineatus* sulle 3 linee di *Arabidopsis* testate. (*Pvalue <0.05 ANOVA, LSD test)

La seconda prova ha dato conferma invece dell'assenza di effetti su *D.maidis* da parte di MBS (Fig. 1.2). Anche in questo caso il risultato è coerente con le caratteristiche dell'insetto. Questa specie può produrre un elevato numero di ninfe su mais e provocare danni diretti molto gravi, segno dell'elevato livello di specializzazione nel superare le difese del proprio ospite.

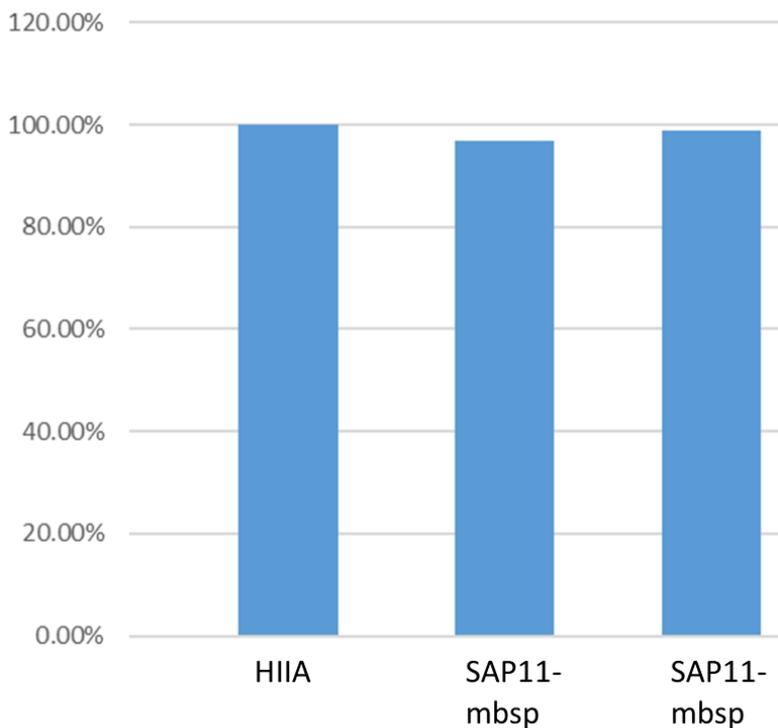


Fig. 2- Comparazione della progenie ottenuta da *D. maidis* sulle 3 linee di *Zea mais* testate. I valori sono espressi come percentuale della linea HIIA non transgenica e nessuna differenza risulta statisticamente significativa (ANOVA).

Il risultato di questi primi esperimenti costituisce il punto di partenza per ulteriori approfondimenti. In particolare verrà cercato di fare chiarezza sui meccanismi cellulari che vengono regolati da SAP11 nella pianta ospite e che possono spiegare il vantaggio ottenuto da *Macrosteles*. La nostra principale ipotesi è che SAP11aywb sia responsabile della regolazione negativa delle risposte di difesa attivate dalla pianta contro questo insetto.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

CAPITOLO 2- GLI EFFETTI DI SAP11 SUL SISTEMA ORMONALE DI ARABIDOPSIS.

Introduzione

Sulla base dei risultati esposti nel capitolo precedente la ricerca è stata orientata verso l'individuazione dei meccanismi cellulari che potrebbero spiegare questa particolare interazione pianta – fitoplasma – insetto vettore. In particolare si è voluto verificare se il vantaggio ottenuto da *M. quadrilineatus* sia dipendente da una ridotta attività dei fitormoni durante l'attacco dell'insetto alla pianta e se sia dovuta all'interazione di SAP11 con il metabolismo dell'ospite.

Inoltre, si è anche voluto chiarire quali siano i bersagli di SAP11 nella cellula ospite e quali le funzioni di tali bersagli, oltre che a valutare le differenze tra SAP11_{aywb} e SAP11_{mbsp} su entrambi i punti.

La prima domanda è pertanto se SAP11 sia in grado di modificare la produzione ormonale della pianta. La prima ipotesi è che SAP11 sopprima quelle risposte di difesa della pianta che sono regolate dall'acido jasmonico e dall'acido salicilico.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Sono già state prodotte evidenze sperimentali sul fatto che SAP11aywb sia capace di ridurre la sintesi dell'acido jasmonico. Infatti, nel lavoro condotto da Sugio *et al.* 2011 è stata misurata la produzione di acido jasmonico nelle piante transgeniche di *A. thaliana* sovraesprimenti SAP11aywb e la sintesi di *lox2*, gene che codifica una lipoxigenasi coinvolta nelle fasi iniziali della sintesi di questo fitormone (Fig. 2.1). Il trattamento utilizzato consiste nel provocare delle ferite meccaniche sulle foglie e misurare quindi i parametri ad un'ora dal trattamento. Sia la sintesi del jasmonato che l'espressione di *lox2* hanno evidenziato livelli inferiori nelle piante SAP11aywb rispetto alle piante col0, indicando pertanto questo ormone come uno dei bersagli dell'effettore. Il ruolo di questa via metabolica nelle risposte della pianta agli insetti è stato dimostrato con una prova di fecondità su *M. quadrilineatus* condotta utilizzando piante mutanti incapaci di sintetizzare *lox2* (Fig. 2.2). L'insetto ha prodotto un maggior numero di ninfe nelle piante mutanti, evidenziando gli effetti dell'acido jasmonico sull'attività riproduttiva e dando una misura dell'importanza di questo gene nella sintesi di questo ormone. Sulla base di queste evidenze, si è proceduto a valutare gli effetti di SAP11 sia su altri geni coinvolti nella sintesi dell'acido jasmonico che sulle reazioni che vengono attivate da questo ormone e che sono, in definitiva, responsabili della produzione dei composti ad azione di difesa.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

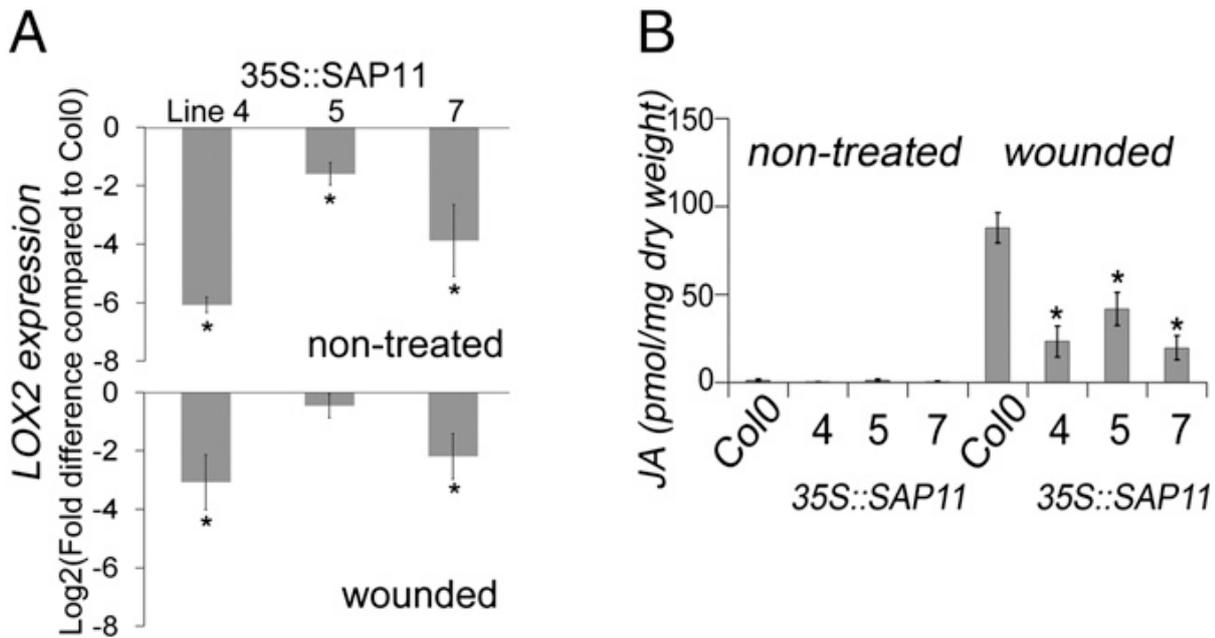


Fig. 2.1- L'espressione del gene *lox2* (A) e la sintesi dell'acido jasmonico (B) sono significativamente ridotte nelle piante sovraesprimenti SAP11aywb (dati ottenuti utilizzando 3 linee indipendenti e indicate come 4,5 e 7) quando comparate al controllo col0 (Sugio *et al.* 2011). (*Pvalue<0.05, student t test)

L'acido salicilico è un ormone che viene attivato nella pianta in risposta ad patogeni biotrofici al fine di contrastarne il processo patogenetico. La sua produzione nella pianta è antagonista di quella di altri ormoni quali acido jasmonico ed etilene, che invece sono attivati a seguito di danni meccanici, insetti e patogeni necrotrofici (McDowell e Dangl 2000). Questa distinzione tuttavia non deve essere considerata in modo troppo rigido. Infatti sono riportati svariati casi in cui entrambi gli ormoni sono coinvolti nella risposta della pianta ad un determinato stress e spesso si tratta di un

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

avvicendamento che si realizza in fasi diverse dell'infezione (Glazebrook 2005, Spoel e Dong 2008).

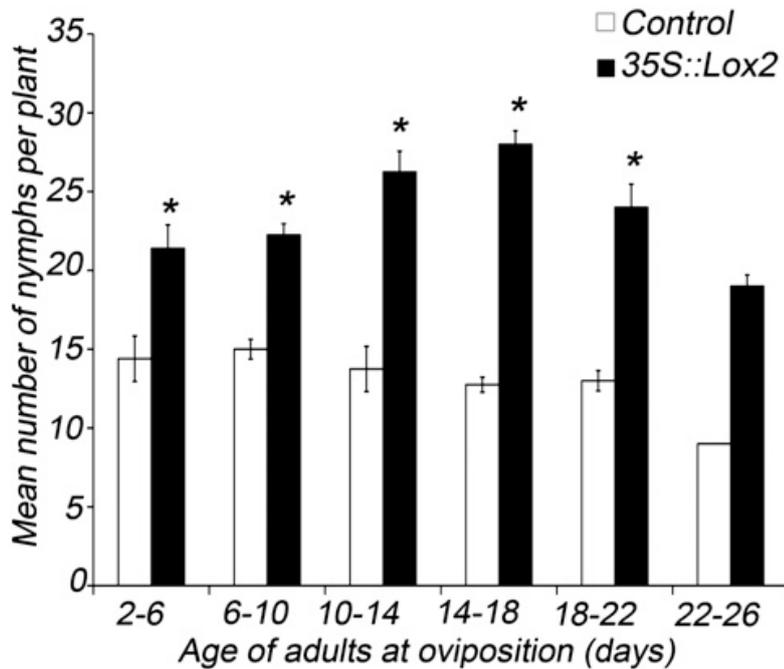


Fig. 2.2- *M. quadrilineatus* produce un maggior numero di ninfe quando si alimenta su piante mutanti che sono incapaci di esprimere *lox2* rispetto al controllo non transgenico (Sugio *et al.* 2011).

Il caso del processo infettivo di *Pythium ultimum* (Fig. 2.3) fornisce un esempio in cui la risposta della pianta vede il coinvolgimento, in tempi diversi, sia dell'acido jasmonico che dell'acido salicilico (Svecová *et al.* 2013).

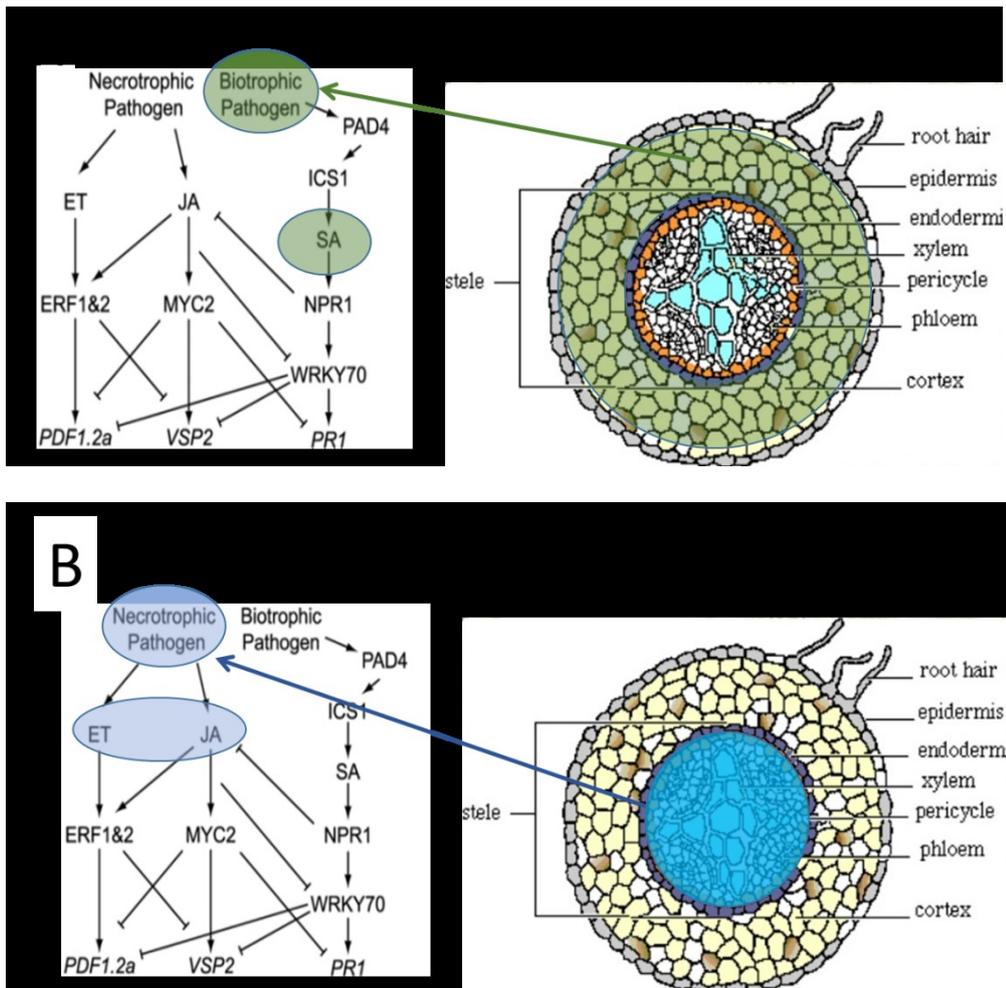


Fig. 2.3- La prima fase dell'infezione di *P. ultimum* (A) si realizza a carico delle cellule del cortex, situate sotto l'epidermide delle radici (Svecová *et al.* 2013). Questa determina l'attivazione di acido salicilico (SA) e il patogeno viene percepito come biotrofico. La seconda fase (B) interessa invece il cilindro centrale (stele) e in questo caso il patogeno viene percepito come necrotrofico e la risposta della pianta interessa l'etilene (ET) e l'acido jasmonico (JA). (foto adattata da: http://www.biologyjunction.com/plant_structure_bi1.htm).

Questo aspetto delle risposte mediate da ormoni si realizza anche per quanto riguarda gli insetti ad apparato boccale pungente-succhiante. L'attività di *Myzus persicae* sulla pianta implica sia danni meccanici e sia la secrezione di composti iniettati attraverso la saliva all'interno della pianta. La risposta deve pertanto avvenire su fronti diversi e ciò porta al coinvolgimento sia dell'acido jasmonico che dell'acido salicilico (Walling 2000; Moran e Thompson 2001). Sebbene la maggior parte di questi studi riguardi gli afidi (Bonaventure 2012), il comportamento di *M. quadrilineatus* potrebbe avere diverse fasi in comune con *M. persicae* e potrebbe quindi indurre risposte mediate dall'acido salicilico. Quindi, così come per l'acido jasmonico, valuteremo gli effetti di SAP11 su questa via metabolica considerando anche in questo caso la sintesi dell'ormone e le reazioni che questo innesca.

La seconda domanda è invece se gli effetti di SAP11 possono essere spiegati dall'interazione di questo con le TCPs. La nostra ipotesi è che SAP11_{aywb} interagisce sia con le CIN-TCPs che con le TB1-TCPs, mentre SAP11_{mbsp} interagisce solo con le seconde.

Ricordando quando già detto nell'introduzione, sappiamo che SAP11_{aywb} si lega e destabilizza le CIN-TCPs (Sugio *et al.* 2011). Questo viene dimostrato da esperimenti di "yeast-two-hybrid" e risulta evidente dal confronto dei fenotipi prodotti dalle piante

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

sovraesprimenti SAP11aywb e miRNA319 x 3 TCP (Fig. 2.4). Si è generato quindi una nuova linea mutante, brc1 x brc2, in cui invece viene soppressa la sintesi delle TB1-TCPs. Il fenotipo di questa linea, caratterizzato da una sovrapproduzione di steli, è molto simile a quello prodotto da SAP11mbsp, portandoci a pensare che questo effettore abbia come bersaglio principale le TB1-TCPs. SAP11aywb invece ha un fenotipo che presenta tratti in comune con entrambe le linee: lo sviluppo ridotto della pianta e la deformazione delle foglie sono tipici di miRNA319 x 3 TCP mentre l'affastellamento (anche se meno marcato) è la caratteristica in comune con brc1 x brc2.

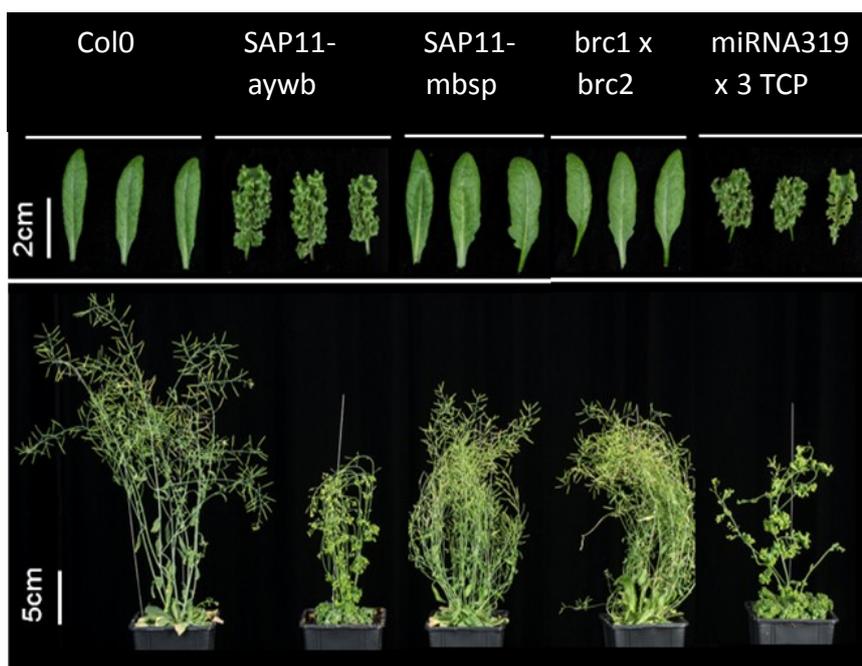


Fig. 2.4- La figura pone a confronto il fenotipo ottenuto nelle diverse linee transgeniche.

Descrizione della prova

Per verificare le ipotesi precedentemente descritte sono stati condotti due esperimenti. Il primo aveva lo scopo di valutare gli effetti di SAP11 sulla via metabolica dell'acido jasmonico. Le piante sono state allevate nelle condizioni descritte nei materiali e metodi generali fino all'età di 5 settimane dal trapianto. Le linee utilizzate sono state SAP11aywb, SAP11mbsp, miRNA319 x 3 TCP, brc1 x brc2 e col0 come controllo non transgenico. Per ciascuna linea sono state usate 5 piante da destinare al trattamento e 5 come controllo non trattato. Il trattamento è consistito nel provocare delle ferite meccaniche sulle foglie attraverso delle pinzette metalliche e ha

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

interessato 5 foglie per ciascuna pianta, scelte tra quelle inserite nella posizione intermedia dello stelo. Il numero di ferite per foglia è stato di 10 per le linee col0, SAP11mbsp e brc1 x brc2 mentre è stato di 6 per le linee SAP11aywb e miRNA319 x 3 TCP. Questa scelta è dovuta alla minore superficie fogliare di queste due linee ed è necessaria per garantire che l'intensità del trattamento sia comparabile per tutte le linee e adeguata alla superficie totale della foglia. Il trattamento così eseguito induce la sintesi dell'acido jasmonico in tempi rapidi, già dopo 30 secondi (Fig. 2.5), e il picco dell'espressione dei geni coinvolti avviene dopo 60 minuti (Glauser *et al.* 2009).

Le piante sono state quindi campionate dopo un'ora dal trattamento e il materiale raccolto è stato immediatamente immerso in azoto liquido per bloccare le reazioni in corso. Lo scopo della prova è stato quello di comparare l'espressione dei geni appartenenti a questa via metabolica e pertanto, dopo estrazione dell'RNA totale e sintesi del cDNA (vedi materiali e metodi generali), è stata effettuata una qPCR utilizzando "primers" specifici per i seguenti geni: *lox2* (lipoxygenase 2), *vsp1* (vegetative storage protein 1), *jar1* (jasmonate resistant 1), *jaz1* (jasmonate-zim-domain protein 1), *aos* (allene oxide synthase), *myc2* (transcription factor).

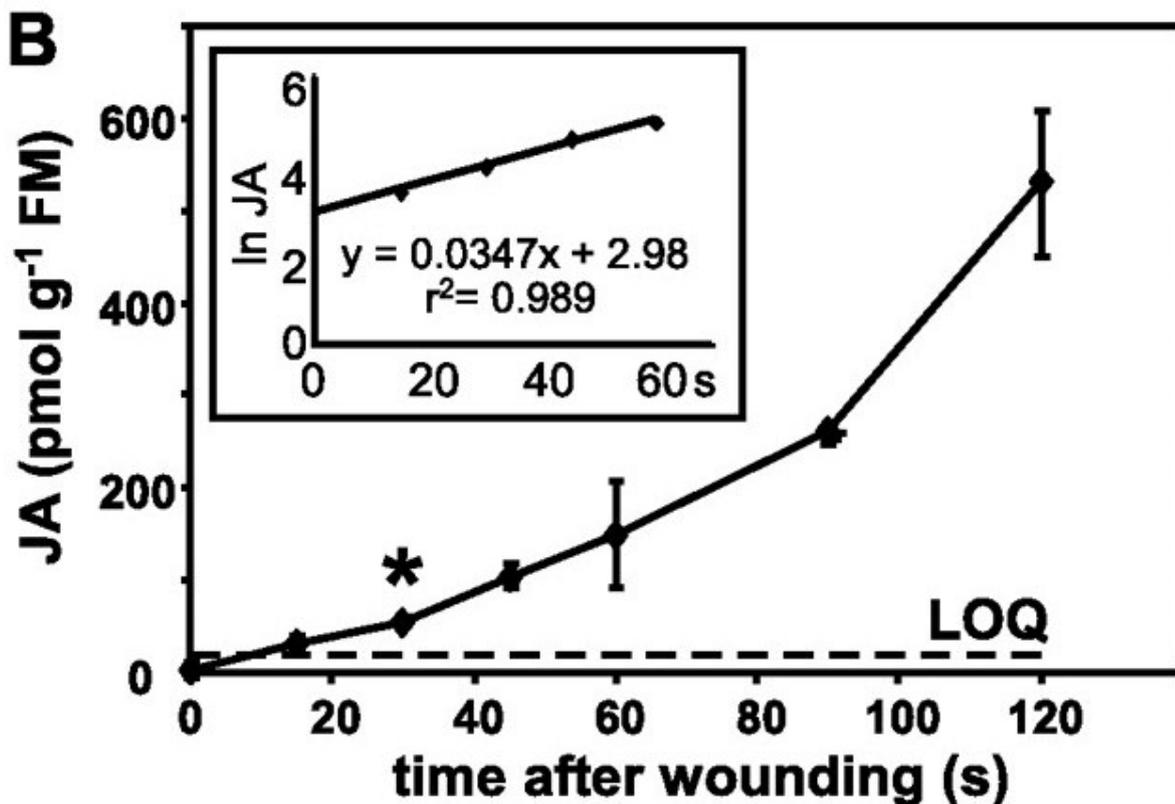


Fig. 2.5- La produzione dell'acido jasmonico viene misurata a tempi crescenti (espressi in secondi) dall'inizio del trattamento (ferite provocate con delle pinzette) e l'incremento risulta statisticamente significativo già dopo 30 secondi (Glauser et al. 2009).

Per ciascuna reazione della qPCR sono state previste 2 repliche tecniche e l'espressione di ciascun gene è stata normalizzata, utilizzando l'actina come riferimento, secondo la formula $2^{-\Delta CT}$, in cui ΔCT è la differenza tra l'espressione del gene di interesse e quella dell'actina.

Tab. 2.1- Resoconto della prova sulla via metabolica dell'acido jasmonico

| linea | n° piante | n° foglie/pianta | n° ferite/foglia | durata trattamento | eta' piante |
|------------------|-----------|------------------|------------------|--------------------|-------------|
| SAP11aywb | 5 | 5 | 6 | 1 ora | 5 settimane |
| SAP11mbsp | 5 | 5 | 10 | 1 ora | 5 settimane |
| miRNA319 x 3 TCP | 5 | 5 | 6 | 1 ora | 5 settimane |
| brc1 x brc2 | 5 | 5 | 10 | 1 ora | 5 settimane |
| col0 | 5 | 5 | 10 | 1 ora | 5 settimane |

La seconda prova era invece mirata a valutare la via metabolica dell'acido salicilico. Le piantine sono state allevate su substrato artificiale liquido (Tab. 2.2), in piastre sterili da 30 pozzetti e contenenti ciascuno 1 piantina. Le linee utilizzate sono le stesse dell'esperimento precedente così come anche il numero di piante per ciascuna linea. Il trattamento, effettuato dopo 2 settimane dalla semina, è consistito in 0.5 ml di una soluzione 1 μ M di flg22, miscelata nel substrato liquido. Flg22 è una sequenza di 22 amminoacidi estratta dalla porzione N-terminale della flagellina, proteina che costituisce il principale componente dei flagelli batterici. Questa frazione proteica è altamente conservata tra le diverse specie batteriche e viene utilizzata per la sua funzione di elicitore delle risposte di difesa nelle piante (Felix *et al.* 1999). Trattamenti con questo peptide vengono comunemente utilizzati per innescare prevalentemente la via dell'acido salicilico e le risposte di difesa da esso derivate. La durata del trattamento è stata definita sulla base del gene che si voleva valutare. Infatti, l'espressione dei geni di nostro interesse avviene a tempi diversi dall'inizio del trattamento e pertanto è stato

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

necessario prevedere una durata variabile da 1 a 24 ore ('time course') in modo da poter valutare i geni attivati sia precocemente che tardivamente (Tab. 2.3). Il campionamento e la lavorazione del materiale raccolto è avvenuto secondo le stesse modalità della prova precedente, mentre i geni scelti sono stati *sid2* (salicylic acid induction deficient 2), *pad3* (protein phytoalexin deficient 3), *eds1* (enhanced disease susceptibility 1 protein), *eds5* (enhanced disease susceptibility 1 protein) e *pr1* (pathogenesis-related protein-1-like protein). Così come nel caso precedente, sono state previste 2 repliche tecniche per ciascuna reazione nella qPCR e l'espressione di ciascun gene è stata normalizzata secondo la formula $2^{-\Delta CT}$ utilizzando l'actina come riferimento.

Tabella 2.2- Composizione del substrato liquido utilizzato per l'allevamento delle piante.

| reagente | concentrazione finale |
|--|-----------------------|
| murashige & skoog medium including vitamins(FORMEDIUM) | 0.5 X |
| Saccarosio | 0.0025 |
| MES | 1mM |

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico *sap11* nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Tabella 2.3- Riassunto della prova sull'acido salicilico. Per ciascuna delle linee sono state utilizzate 5 piantine e sono stati previsti 6 campionamenti a tempi crescenti dall' inizio del trattamento (hpt= "hours post treatment").

| linea | Frequenza dei campionamenti | | | | | |
|----------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | 0 hpt | 1 hpt | 2 hpt | 4 hpt | 8 hpt | 24 hpt |
| col-0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| brc1 x brc2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| SAP11aywb | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| SAP11-mbsp | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| miR319 x 3TCPs | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

Risultati

Effetti di SAP11 sulla via metabolica dell'acido jasmonico.

Quasi tutti i geni saggiati hanno mostrato di essere fortemente attivati dal trattamento (Fig. 2.6). Il confronto tra trattato e non trattato, nella linea col0, mostra una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$, student t test)

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

nell'espressione di tutti i geni, con l'unica eccezione di *vsp1*, confermando la via metabolica del jasmonato come una tra le principali nel coordinare le risposte di difesa a seguito dei danni di natura meccanica. La risposta al trattamento è tuttavia diversa nelle due linee SAP11. L'espressione di due geni in particolare, *lox2* e *myc2* (Fig. 2.7), risulta significativamente inferiore rispetto a *col0* e indica questi geni come ipotetici bersagli diretti dell'effettore. Entrambi i geni ricoprono un ruolo fondamentale in questa via metabolica: *lox2* codifica una lipoxigenasi che ha un ruolo fondamentale nella sintesi dell'acido jasmonico (Bell *et al.* 1995), mentre *myc2* codifica un fattore di trascrizione (MYC2) che è considerato da molti il fulcro dell'intera via metabolica (Kazan e Manners 2013, Takagi *et al.* 2016). In assenza di eventi stressanti l'attività trascrizionale di *myc2* è bloccata per mezzo delle proteine JAZ (Fig.8). La sintesi dell'acido jasmonico e della sua forma attiva JA-Ile porta invece a rompere il legame con le proteine JAZ e consente a MYC2 di attivare quella serie di reazioni che porteranno alla sintesi dei composti di difesa (Sharma e Laxmi 2015).

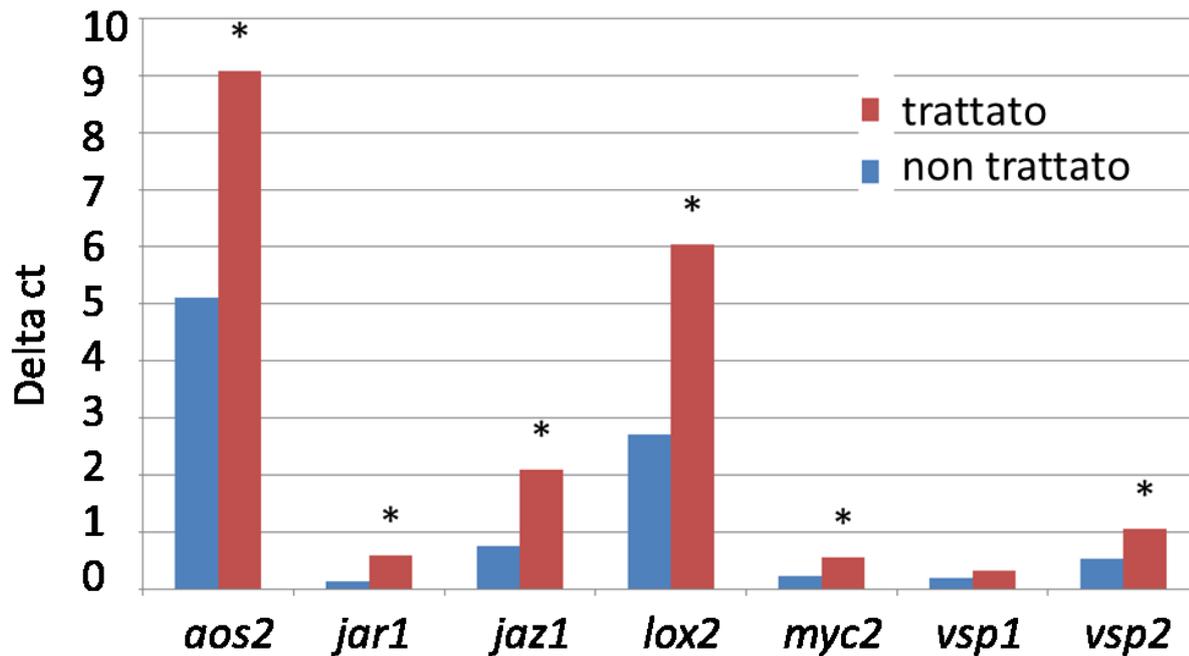


Fig. 2.6 – Risposta dei geni coinvolti nella sintesi del jasmonato (*aos2*, *jar1*, *lox2*) e nelle risposte da esso indotte (*jaz1*, *myc2*, *vsp1*, *vsp2*) in seguito al trattamento. I valori sono riportati come differenza tra l'espressione del gene in oggetto e quella del gene di riferimento (actina), usando la formula $2^{-\Delta CT}$. (* P<0.05, student t test)

Gli effetti di SAP11aywb su *lox2* sono già noti (Sugio et al. 2011) mentre quelli su *myc2* e gli effetti di SAP11mbsp su entrambi i geni costituiscono una novità sulle funzioni di questi effettori. Inoltre viene evidenziato che la soppressione di *lox2* è correlata all' interazione di SAP11 con tutte le TCPs della classe II: entrambe le linee miRNA319 x 3TCP e brc1 x brc2 mostrano infatti la soppressione di questo gene al pari delle due linee SAP11. Il coinvolgimento delle

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

TB1-TCPs rappresenta una novità poiché finora è stato dimostrato solamente il ruolo delle CIN-TCPs (Schommer *et al.* 2008) e in particolare della TCP4, indicando che le CIN-TCPs e le TB1-TCPs potrebbero avere delle funzioni in comune. La sottoregolazione di *myc2* invece sembra essere correlata solamente alle TB1-TCPs e infatti la linea *brc1 x brc2* ha valori di espressione ridotti mentre *miRNA319 x 3TCP* ha valori comparabili con *col0*.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico *sap11* nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

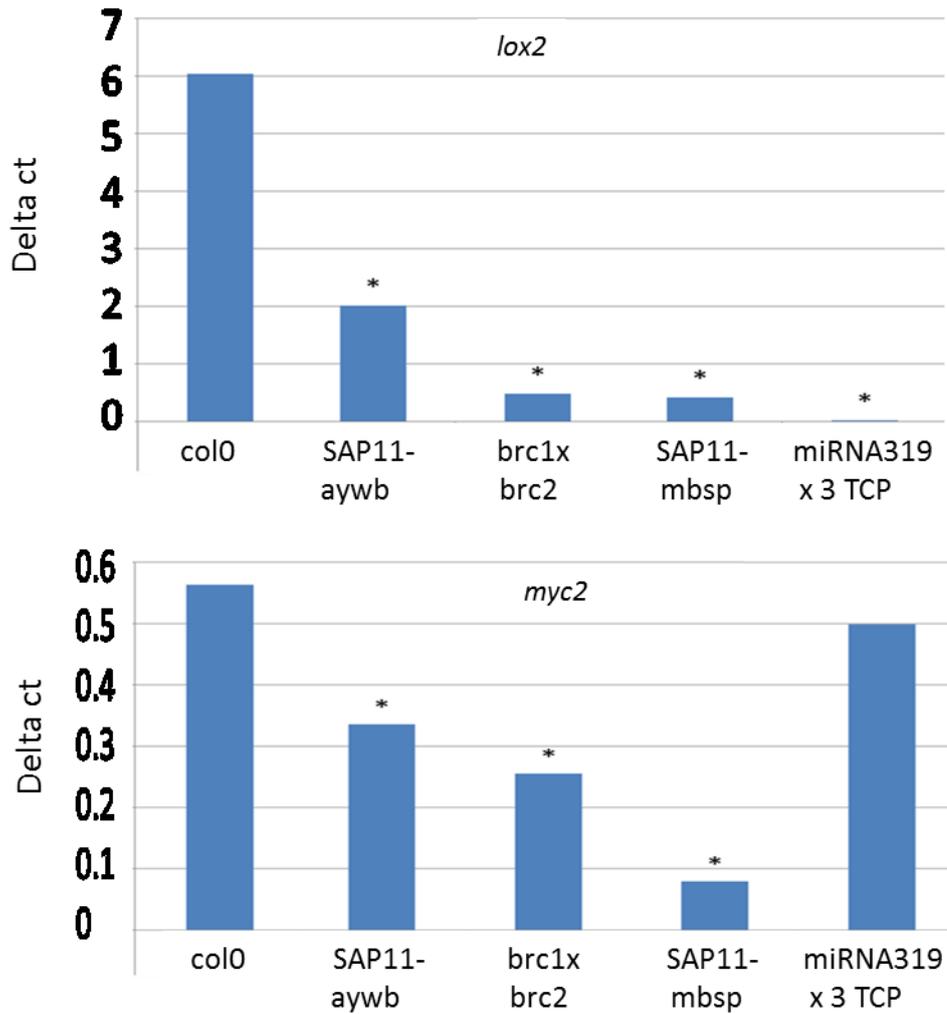


Fig. 2.7 – Espressione dei geni *lox2* e *myc2* nelle piante trattate. I valori sono riportati come differenza tra l'espressione del gene in oggetto e quella del gene di riferimento (actina), usando la formula $2^{-\Delta CT}$. (*= $P < 0.05$, tukey test)

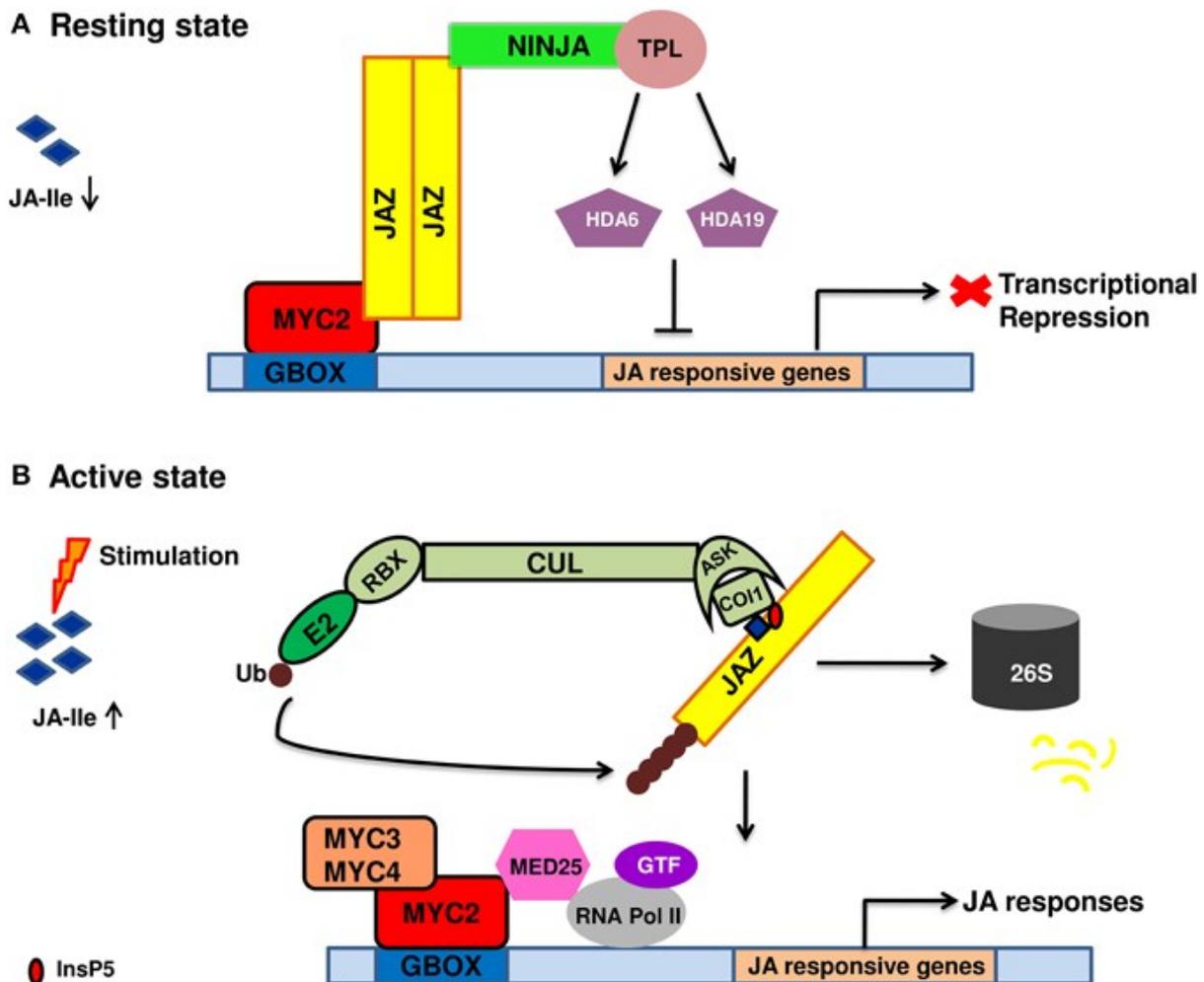


Fig. 2.8 – In di assenza di stress l’attività trascrizionale di MYC2 viene controllata dalle proteine JAZ(A) mentre il JA-Ile rompe il legame con queste proteine (B) e permette l’attivazione delle risposte di difesa (Sharma e Laxmi 2015).

Effetti di SAP11 sulla via metabolica dell'acido salicilico.

Come atteso, l'espressione dei geni considerati in questa prova si verifica in tempi diversi (Fig. 2.9) e mentre *sid2*, *eds1*, *eds5* e *pad3* raggiungono il picco dopo 4 ore dall'inizio del trattamento, *pr1* richiede 24 ore prima di raggiungere livelli significativi. La risposta nelle linee SAP11 è, anche questa volta, diversa rispetto a col0 e in particolare sono i geni *sid2* e *pr1* che mostrano un'espressione significativamente alterata. Considerando l'espressione di *sid2* e *pr1* a 4 e 24 ore rispettivamente, si evidenzia che SAP11 aywb sopprime l'espressione di entrambi e che lo stesso effetto si ripete nella linea miRNA319 x 3TCPs. Tuttavia la SAP11 mbsp e la linea brc1 x brc2 producono un effetto opposto e questi geni sono significativamente sovraespressi in queste due linee (Fig. 2.10). Questo effetto opposto sull'acido salicilico può essere spiegato dalle diverse funzioni delle CIN-TCPs e TB1-TCPs e pertanto fornisce una ulteriore prova dell'interazione tra SAP11 con questi fattori di trascrizione.

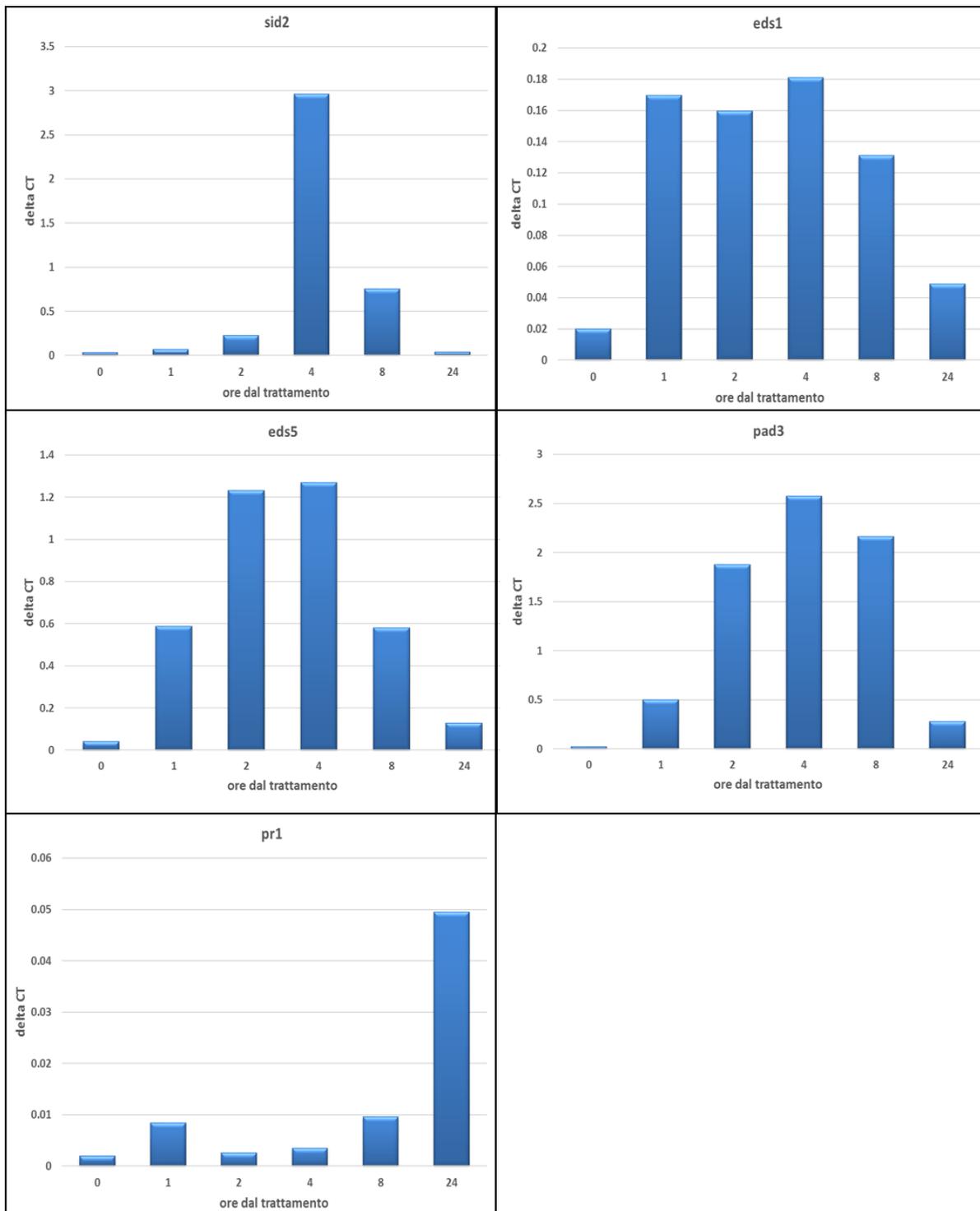


Fig. 2.9– Espressione dei geni saggiati a diversi tempi dall’inizio del trattamento con flg22.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell’ effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

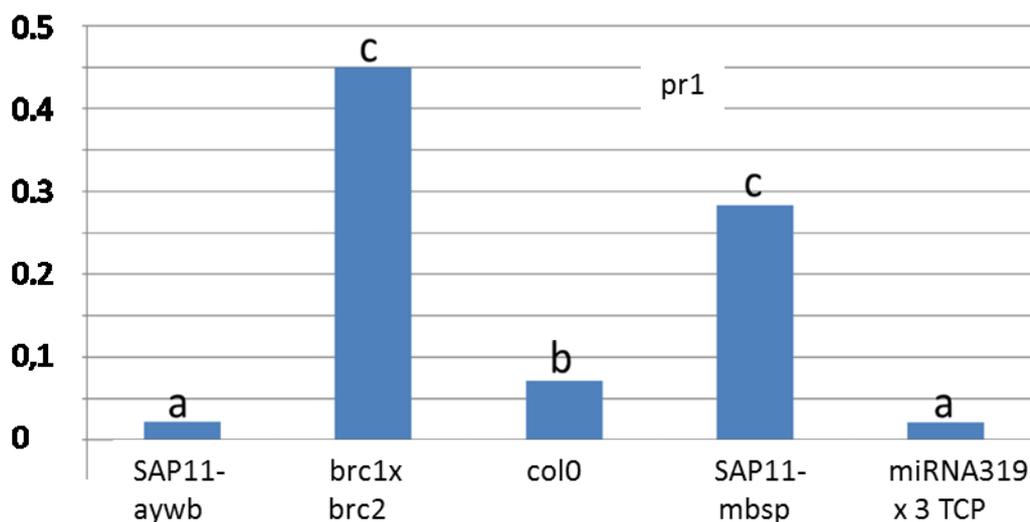
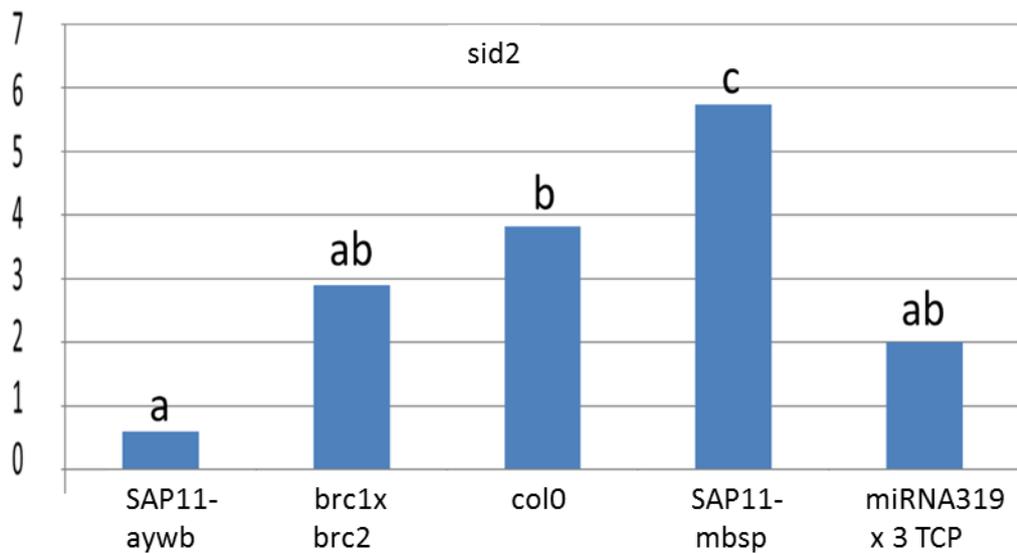


Fig. 10– Confronto tra le 5 linee per i geni *sid2* e *pr1*. I valori sono riportati come differenza tra l'espressione del gene in oggetto e quella del gene di riferimento (actina), usando la formula $2^{-\Delta CT}$. (*= P<0.05, LSD test)

Conclusioni

Le prove condotte hanno fornito importanti indizi sui meccanismi adottati dai fitoplasmi per manipolare il sistema ormonale della pianta ospite e comprometterne quindi le risposte di difesa contro stress sia abiotici che biotici. La risposta ai danni meccanici viene alterata da SAP11 in due punti fondamentali, la sintesi del jasmonato (*lox2*) e la produzione dei composti di difesa specifici (*myc2*) mentre il trattamento con flg22 porta a differenze nell'espressione di *sid2* e *pr1* (sintesi dell'acido salicilico e reazioni a valle).

Tuttavia, mentre SAP11aywb e SAP11mbsp producono un effetto simile sull'acido jasmonico, meno chiara risulta l'interpretazione degli effetti del trattamento con flg22. Se la risposta della linea SAP11aywb è coerente con quanto visto nella prova precedente non si può dire altrettanto della linea SAP11mbsp che, sovraesprime invece *sid2* e *pr1*, producendo quindi il potenziale effetto di amplificare le risposte della pianta. Il trattamento con flg22 simula un attacco batterico e una maggiore produzione di acido salicilico implica una risposta più efficiente a questi patogeni. La risposta di entrambe le linee SAP11 è inoltre coerente con quella di miRNA319 x 3TCPs e *brc1* x *brc2*. Infatti, ricordando i presupposti esposti nell'introduzione, abbiamo avuto conferma che l'attività di SAP11aywb è legata all'interazione con le CIN-TCPs così come quella di

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

SAP11mbsp alle TB1-TCPs. Le ipotesi risultano quindi in buona parte confermate: SAP11 altera le vie metaboliche degli acidi jasmonico e salicilico e tale risultato trova spiegazione nell' interazione di SAP11 con le TCPs.

Le risposte della pianta ai danni meccanici e a flg22 potrebbero mimare ciò che si verifica anche a seguito dell'attacco di insetti. In questo caso la minore efficienza nelle risposte, causata da SAP11, potrebbe essere tra i responsabili delle migliore performance riproduttiva osservata su *M. quadrilineatus*.

CAPITOLO 3- ANALISI TRASCRIPTOMICA DEGLI EFFETTI DI SAP11 SULLE RISPOSTE DI *ARABIDOPSIS THALIANA* CONTRO *MACROSTELES QUADRILINEATUS*.

Introduzione

Nel capitolo precedente è stato evidenziato che SAP11 può alterare la sintesi di ormoni che hanno un ruolo fondamentale nelle risposte di difesa che la pianta attiva a seguito di stress di natura biotica e abiotica. Sulla base di questi risultati si è ritenuto che SAP11 possa produrre anche altri effetti, sempre legati alle difese della pianta, che potrebbero aiutare a capire come SAP11 favorisca l'attività riproduttiva di *M. quadrilineatus*. Per indagare meglio su questo aspetto, è stato condotto un nuovo esperimento in cui le piante sono state esposte all'insetto e si è poi misurata l'espressione di tutti i geni attivati dalla pianta in risposta a questo specifico stress. Questo permette di valutare tutte le vie metaboliche coinvolte nella risposta e cercare di individuare quelle risposte specifiche che potrebbero spiegare l'effetto su *M. quadrilineatus*. Si tratta quindi di ricreare una condizione simile a quella che si verifica durante il processo di trasmissione dei fitoplasmi, nel momento in cui il vettore si va ad alimentare sulla pianta e questa deve attivare composti ad azione diretta o indiretta al fine di respingere o ostacolare l'attività degli insetti. Così come nel capitolo

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

precedente, si è inoltre valutato se la risposta delle linee SAP11 può essere spiegata dalla loro interazione con le TCPs.

Descrizione della prova

Come già accennato, la prova consiste nell'esporre le piante ad insetti e misurarne quindi l'espressione genica. Per questa prova sono state utilizzate le stesse linee e con le stesse modalità di allevamento esposte nel capitolo 2 (Tab. 3.1). Le piante, all'età di 5 settimane, sono state esposte a *M. quadrilineatus* utilizzando delle "clip-cages" (Fig. 3.1). Queste sono delle piccole gabbie per insetti (diametro di 2 cm) che vengono applicate alle foglie a mo' di pinza. Sono in materiale plastico, chiuse alle estremità con una rete a maglia molto fine e permettono di standardizzare la superficie fogliare esposta e il numero di insetti utilizzati nella prova. Questo accorgimento è stato necessario per poter confrontare piante con sviluppo diverso, così come nel caso delle linee SAP11aywb e miRNA319x 3TCPs, nelle quali la superficie fogliare è meno estesa rispetto a quella delle altre linee.

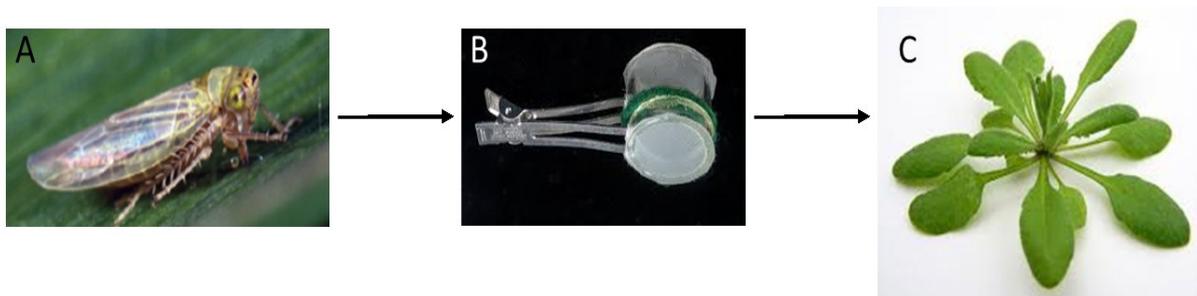


Fig. 3.1– Gli insetti vengono prima anestetizzati con CO₂ e quindi posti all'interno della “clip-cage” che può così essere applicata alla foglia.

Sono stati utilizzati 5 insetti/”clipcage” (3 femmine e 2 maschi) e la durata dell'esposizione è stata di 48 ore. Per ciascuna linea sono state utilizzate 4 piante per il trattamento e, ovviamente, altrettante come controllo non trattato alle quali sono state applicate comunque le “clipcages” ma senza alcun insetto all'interno. La durata di 48 ore è stata quella utilizzata anche nell' esperimento sulla fecondità di *M. quadrilineatus* descritto nel primo capitolo. Questa combinazione di numero di insetti e durata dell'esposizione, basata su esperimenti preliminari (capitolo 1), permette di valutare sia i danni prodotti dalle punture di nutrizione e sia l'eventuale effetto elicitore delle uova deposte. Al termine delle 48 ore, le piante sono state campionate ritagliando rapidamente solo la superficie esposta all'insetto e contenuta all'interno della “clipcage”. I campioni sono stati immediatamente immersi in azoto liquido per bloccare tutte le reazioni in corso e quindi conservati a -80 °C prima di essere

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

processati. Lo scopo di questa prova è quello di misurare l'espressione di tutti i geni attivati dalla pianta a seguito del trattamento. A questo scopo è stata utilizzata la tecnica RNA-seq e pertanto la preparazione dei campioni prevede l'estrazione di RNA totale e il trattamento con DNAsi. Queste due fasi sono state completate utilizzando il kit commerciale RNeasy plant mini kit (Qiagen) e seguendo il protocollo fornito dal produttore. I campioni destinati al RNA-seq devono rispettare criteri molto rigidi (Tab. 3.2) che sono stati verificati utilizzando il nanodrop8000 (Thermo scientific) per quanto riguarda la presenza di residui di reagenti del kit, il Qubit (Thermo scientific) per la concentrazione e con un gel di agarosio all' 1% per valutare l'integrità dell'RNA (vedi materiali e metodi generali). Infine, il sequenziamento è stato condotto presso l'Earlham Institute (Norwich, UK) che ha inoltre provveduto all' allineamento delle sequenze ottenute sul genoma di *Arabidopsis thaliana*.

Tab. 3.1 – Riassunto della prova.

| linea | n° piante | n° insetti/foglia | durata trattamento | eta' piante |
|------------------|-----------|-------------------|--------------------|-------------|
| SAP11aywb | 4 | 5* | 48 ore | 5 settimane |
| SAP11mbsp | 4 | 5* | 48 ore | 5 settimane |
| miRNA319 x 3 TCP | 4 | 5* | 48 ore | 5 settimane |
| brc1 x brc2 | 4 | 5* | 48 ore | 5 settimane |
| col0 | 4 | 5* | 48 ore | 5 settimane |

* 2 maschi + 3 femmine

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Tab. 3.2 – Requisiti del campione per l' RNA-seq.

| quantità | concentrazione | 260/280 | 260/230 | RIN |
|----------|----------------|---------|---------|------|
| 10 µg | 200 ng/µl | >1.9 | >1.8 | 7-10 |

Risultati

L'analisi dei dati ottenuti dal RNA-seq ha rivelato un quadro piuttosto complesso. L'esposizione delle piante agli insetti porta ad una modifica profonda del metabolismo cellulare andando a coinvolgere svariate vie metaboliche. Analizzando la risposta della linea di riferimento col0 (Fig.3.2), si può vedere che l'esposizione delle piante agli insetti induce una variazione significativa ($P < 0.05$, DEseq, Benjamini-Hochberg corrected) dell'espressione di circa 2000 geni, attivando una risposta che coinvolge il 7.5% dell'intero genoma. La maggior parte dei geni sono sovraespressi e sono coinvolti non soltanto nelle risposte di difesa ma anche in altri aspetti del metabolismo cellulare. I geni sottoespressi invece sono in larga misura coinvolti in reazioni legate all'attività dei cloroplasti (gruppo 1 nella tabella 3.3) e quindi probabilmente al metabolismo energetico. Questa conclusione non è tuttavia l'unica possibile: viste le sempre crescenti evidenze scientifiche sul ruolo dei cloroplasti nei meccanismi di difesa (Li *et al.* 2014;

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Delfino *et al.* 2015; Petre *et al.* 2016) è possibile che la sottoregolazione di questi geni contribuisca alla risposta della pianta contro *M. quadrilineatus*.



Fig. 3.2 – I gruppi 1-35 comprendono geni con funzioni simili e coinvolti negli stessi processi metabolici (Tab. 3.3). Ciascun quadrato rappresenta un gene e i valori sono espressi come $\log_2(\text{trattato}/\text{non trattato})$. Il colore rosso indica che i geni sono sovraespressi e il verde che sono sottoespressi.

La sottoregolazione dei geni del gruppo sembra essere un aspetto specifico della combinazione pianta-insetto in questione. Infatti, l'esposizione di *A. thaliana* a

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Myzus persicae o a *Bemisia tabaci*, in condizioni sperimentali simili a quelle di questo esperimento (Mugford S. comunicazione personale), porta ad una espressione genica molto diversa e soprattutto non mostra la particolare risposta a carico dei geni in questione (Fig. 3.3). La soppressione di questi geni sembra essere un aspetto specifico della combinazione pianta-insetto in questione. Infatti, l'esposizione di *A. thaliana* a *Myzus persicae* o a *Bemisia tabaci*, in condizioni sperimentali simili a quelle del nostro esperimento, porta ad una espressione genica molto diversa e soprattutto non mostra la particolare risposta a carico dei geni in questione (Fig. 3.3).

Tabella 3.3– Raggruppamento dei geni di *Arabidopsis* sulla base delle funzioni biochimiche.

| | gruppo |
|----|--|
| 1 | fotosintesi |
| 2 | Metabolismo dei carboidrati primario |
| 3 | Metabolismo dei carboidrati secondario |
| 4 | glicolisi |
| 5 | fermentazione |
| 6 | gluconeogenesi/ ciclo del gliossilato |
| 7 | Reazioni OPP |
| 8 | Ciclo di Krebs |
| 9 | Trasporto di elettroni / sintesi di ATP |
| 10 | Parete cellulare |
| 11 | Metabolismo dei lipidi |
| 12 | Metabolismo dell'azoto |
| 13 | Metabolismo degli amminoacidi |
| 14 | Assimilazione dello zolfo |
| 15 | Metabolism dei metalli |
| 16 | Metabolismo secondario |
| 17 | Metabolism degli ormoni |
| 18 | metabolismo di co-fattori e vitamine |
| 19 | Sintesi dei tetrapirroli |
| 20 | Stress biotici e abiotici |
| 21 | Reazioni di ossidoriduzione |
| 22 | Metabolism delle poliammine |
| 23 | Metabolism dei nucleotidi |
| 24 | Biodegradazione dei composti xenobiotici |
| 25 | Metabolismo C1 |
| 26 | Reazioni miste |
| 27 | Metabolismo del RNA |
| 28 | Metabolismo del DNA |
| 29 | Proteine |
| 30 | Diffusione dei segnali |
| 31 | Cellula |
| 32 | micro RNA |
| 33 | Sviluppo |
| 34 | Trasporto |
| 35 | Non classificate |

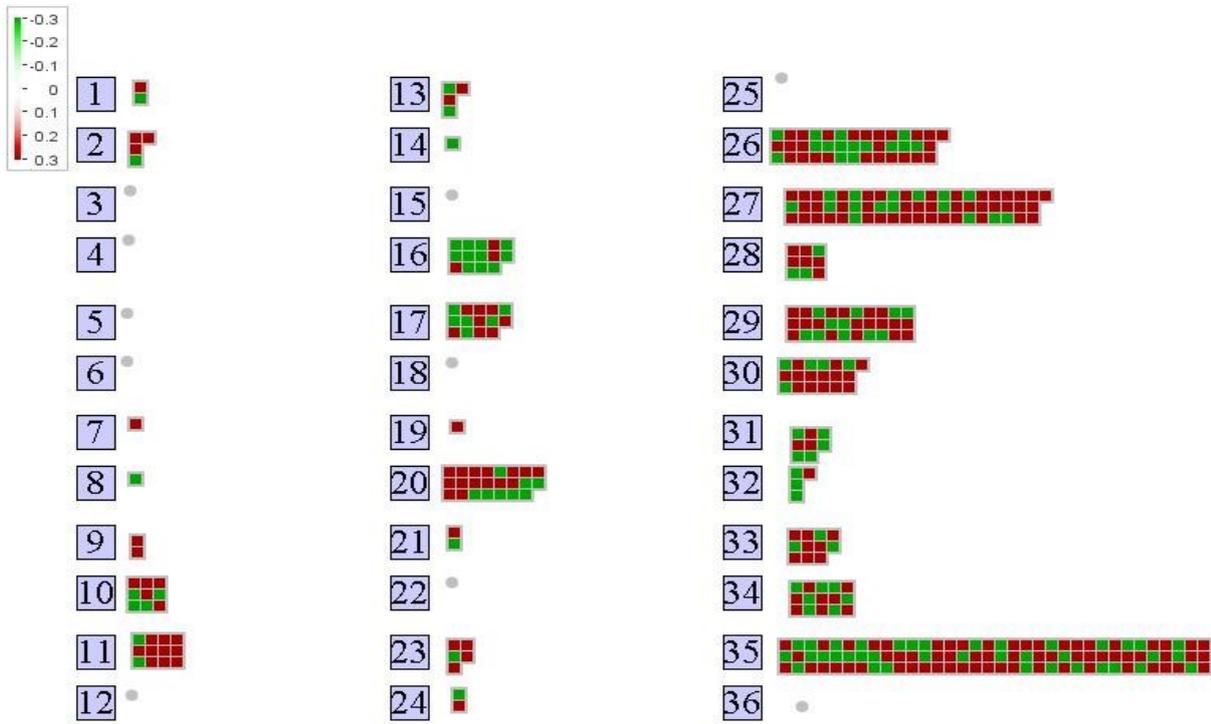
Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

M. persicae



Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

B. tabaci



Fig. 3.3 – Geni attivati dall'esposizione di *A.thaliana* a *M. persicae* e *B. tabaci* (gentile concessione di S. Mugford, John Innes Centre, UK).

Per quanto coinvolga diversi processi metabolici, la risposta della pianta è tuttavia più marcata su alcuni meccanismi, coinvolgendo in questi un maggior numero di geni rispetto a quanto atteso sulla base delle probabilità e mostrando inoltre livelli di espressione più elevati ($P < 0.05$, Wilcoxon rank sum test, Benjamini-Hochberg corrected):

- Gruppi 1 e 29: includono geni coinvolti nella fotosintesi di cui si è già parlato;

- Gruppo 20: contiene geni che vengono attivati durante le risposte di difesa della pianta a stress di natura sia biotica che abiotica. Le vie metaboliche di ormoni quali acido abscissico, acido jasmonico, acido salicilico ed etilene sono incluse in questo gruppo;

- Gruppo 26: vi appartengono geni che codificano enzimi o parti di essi. È un gruppo abbastanza generico la cui analisi fornisce solitamente informazioni complementari agli altri gruppi;

- Gruppo 30: include geni responsabili del riconoscimento di molecole estranee alla pianta.

I gruppi 20 e 30 comprendono geni che portano alla sintesi della maggior parte composti di difesa. Questa può essere schematizzata suddividendola in 3 fasi principali (Fig. 3.4):

1. percezione di molecole estranee alla cellula attraverso i recettori di membrana;
2. produzione di un segnale che viene diffuso all'interno della cellula e che va ad attivare la sintesi di fitormoni;
3. attivazione delle risposte di difesa specifiche contro lo stress in atto.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Questi dati mostrano quindi come la pianta abbia la capacità di riconoscere in modo preciso la presenza di insetti appartenenti a specie diverse e di attivare perciò risposte specifiche. Mostra inoltre come l'intero metabolismo sia coinvolto in tali risposte, implicando generalmente una sovraespressione dei geni coinvolti ma, in parallelo, sopprimendone degli altri coinvolti in processi ritenuti non prioritari o antagonisti a quelli di difesa.

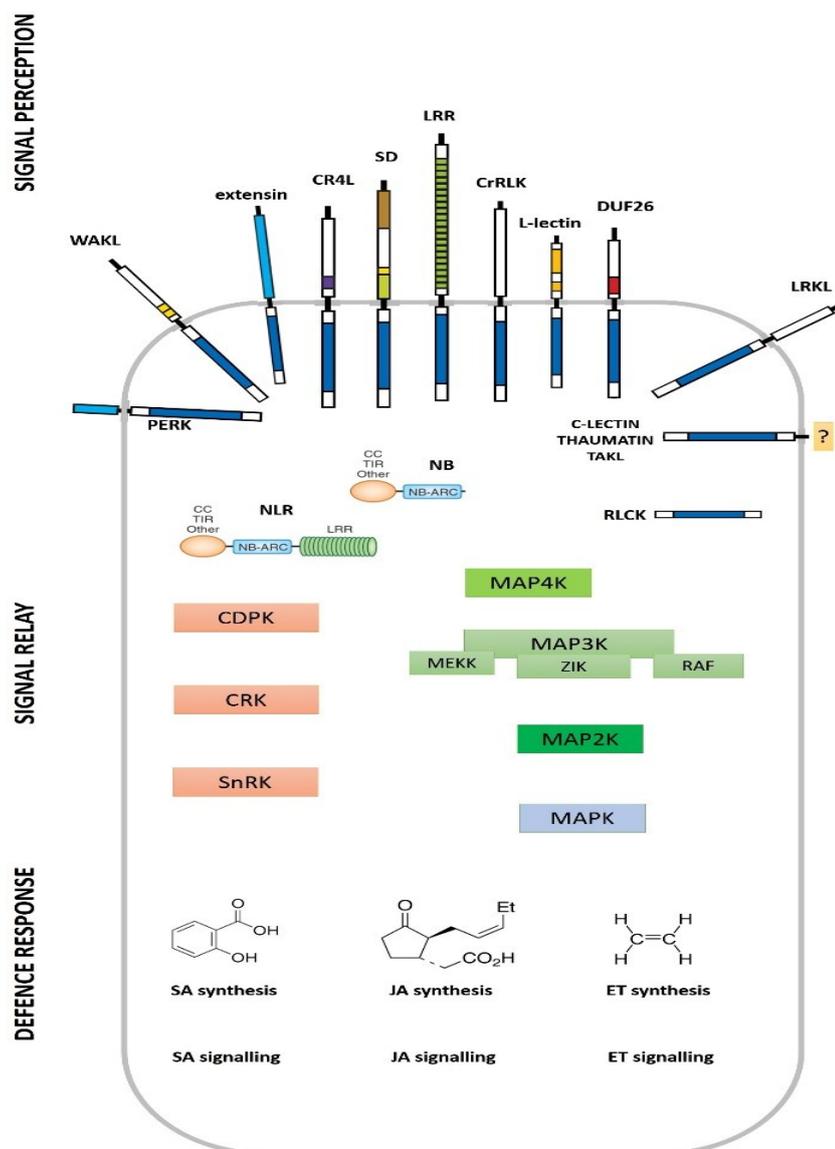


Fig. 3.4 – La prima fase è costituita dal riconoscimento del segnale esterno (immagine ottenuta per gentile concessione di Zigmunds Orlovskis) e questo coinvolge uno svariato numero di recettori (“signal perception”). Il segnale percepito deve essere quindi tradotto in risposte mediate dall’attività di fitormoni (“defence response”). Diverse chinasi hanno invece la funzione di collegamento tra queste due fasi (“signal relay”). (Chisholm *et al.* 2006)

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell’ effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.
 Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali
 In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

SAP11aywb altera la risposta della pianta.

Analizzando la risposta delle linee SAP11, risultano inoltre evidenti delle grosse differenze, soprattutto per quanto riguarda la linea SAP11aywb. Attraverso l'analisi delle componenti principali è stato possibile effettuare una prima valutazione qualitativa delle differenze tra SAP11aywb e col0 (Fig. 3.5). Le due linee mostrano un'espressione genica simile nella condizione di non trattato e l'analisi produce un raggruppamento che include tutti i campioni di entrambe le linee. Queste si discostano invece in modo evidente quando vengono considerati i campioni trattati: i 4 campioni di ciascuna linea vengono collocati in posizioni diverse del grafico formando due gruppi che si separano sulla base sia della prima che della seconda componente principale. Questo significa che gli effetti di SAP11aywb diventano rilevanti solo a seguito dell'esposizione della pianta a *M. quadrilineatus*, evidenziando una possibile specificità di azione dell'effettore nei confronti di questo vettore.

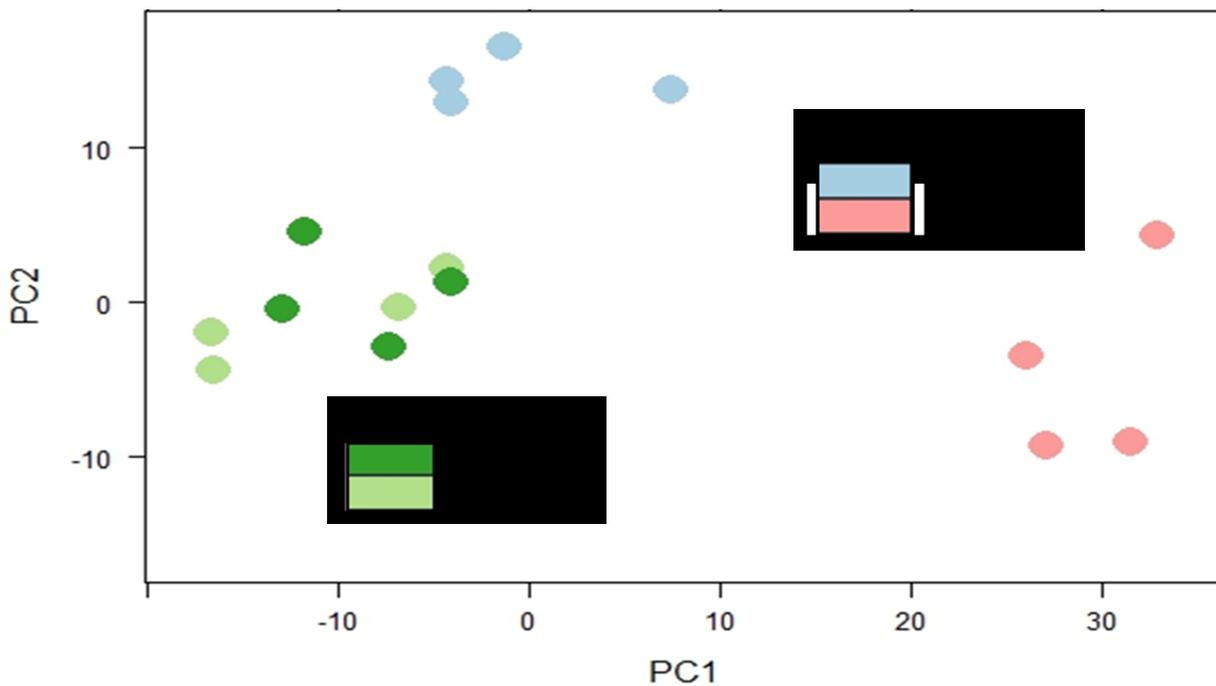


Fig. 3.5 – Analisi delle componenti principali effettuata sull'espressione genica dei campioni esposti e non esposti.

Al fine di individuare i geni responsabili della differenza tra SAP11aywb e col0 è stata condotta una ulteriore analisi (Fig. 3.6) utilizzando il modello gaussiano misto. Questa funzione permette di individuare se una popolazione di dati contiene una sub-popolazione con caratteristiche diverse da quelle della popolazione data. In questo caso i dati possono essere spiegati con due curve separate caratterizzate da picco e ampiezza diversi. Con questo sistema si è potuto

individuare i geni che vengono regolati da SAP11aywb e verificare inoltre che la maggior parte di essi sono sottoregolati.

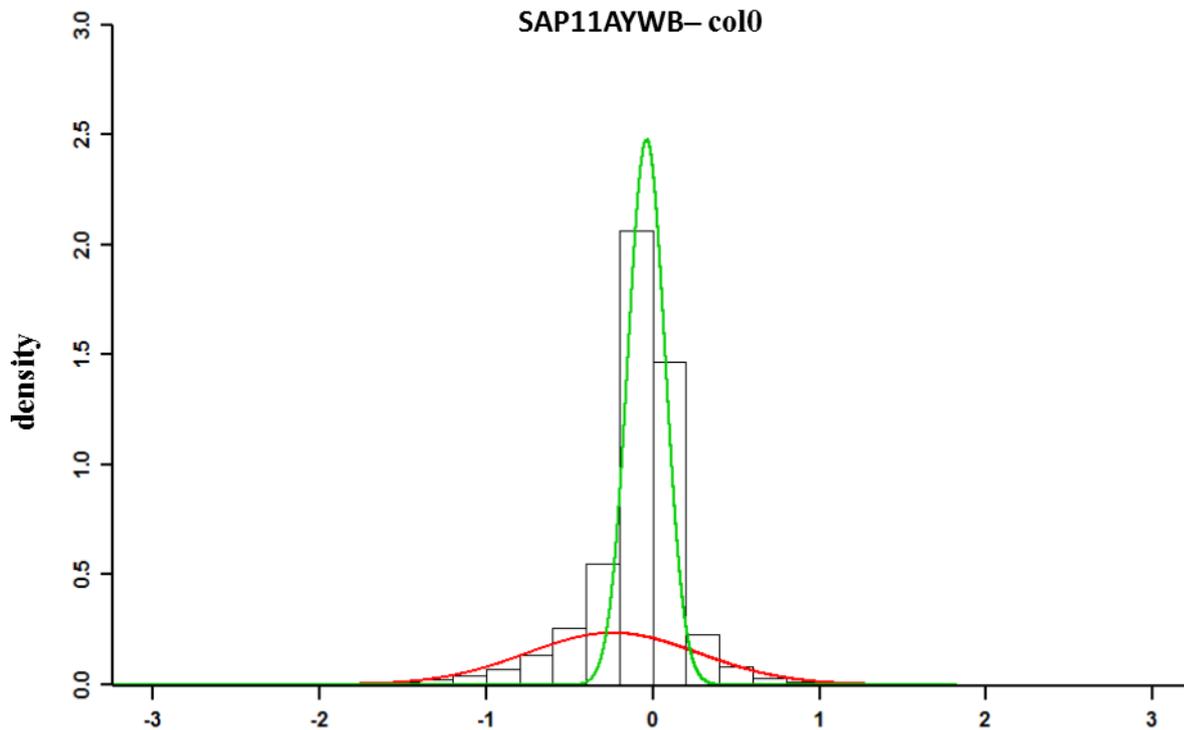


Fig. 3.6 – Il grafico riporta le differenze per ciascun gene tra SAP11aywb e col0, riportate in ascissa secondo la formula: $\log_2(\text{SAP11aywb trattato} / \text{SAP11aywb non trattato}) - \log_2(\text{col0 trattato} / \text{col0 non trattato})$. La curva verde individua quei geni per cui la differenza non è significativa mentre quella rossa è relativa ai geni regolati da SAP11aywb.

Infine è stata valutata l'espressione di quei geni che sono noti per avere funzioni nelle risposte di difesa della pianta contro stress di natura biotica e abiotica (Fig. 3.7). Il risultato ottenuto è che SAP11aywb sopprime l'espressione della maggior parte di questi geni, alterando quindi i meccanismi di difesa della pianta e fornendo una possibile spiegazione alla migliore performance riproduttiva osservata su *M. quadrilineatus* quando si alimenta sulle piante della linea SAP11aywb.

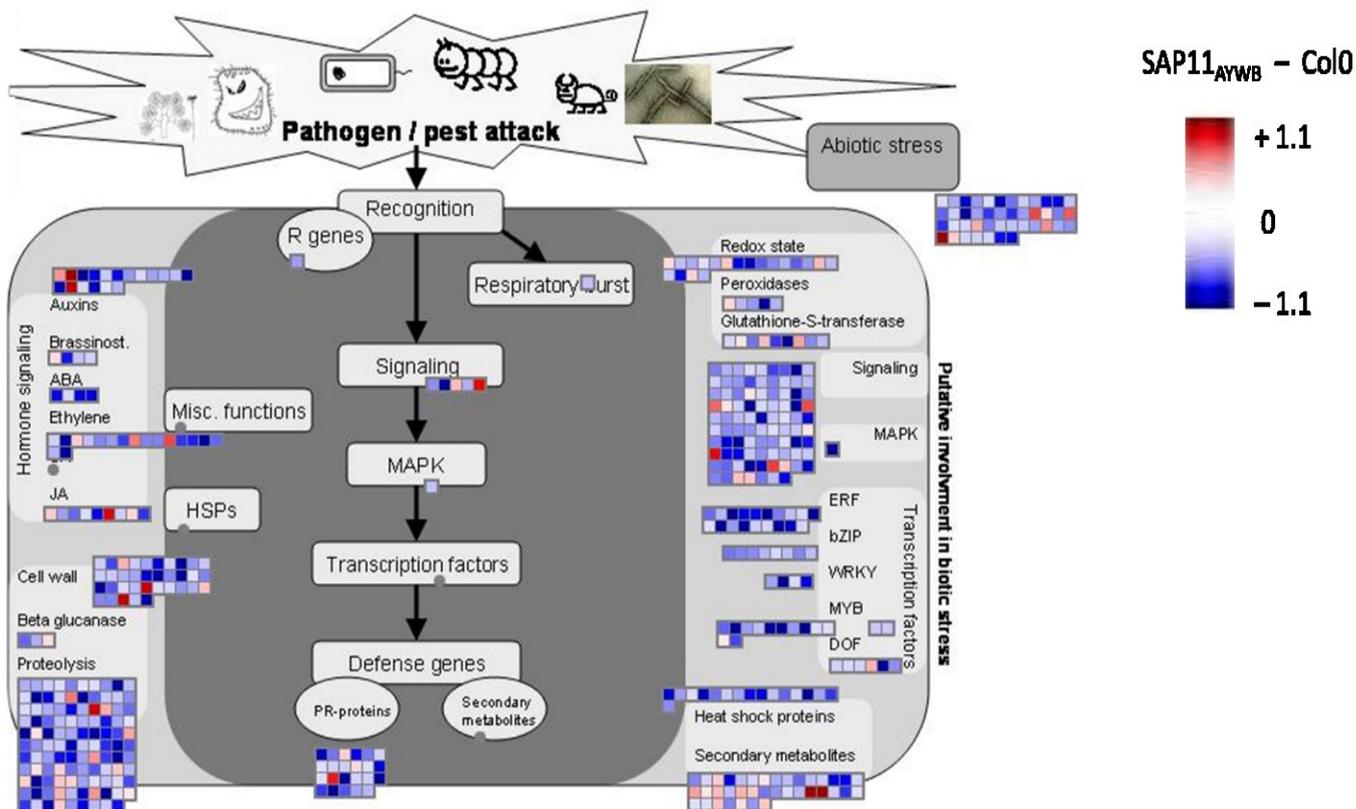


Fig. 3.7 – Effetti di SAP11aywb nella regolazione dei meccanismi di difesa. I geni riportati in figura (rappresentati dai singoli quadratini), espressi come differenza tra l'espressione nelle piante SAP11aywb e le piante col0, hanno un valore negativo, indicando la regolazione negativa delle difese della pianta da parte dell'effettore .

L'analisi vista in precedenza è stata ripetuta anche per la linea SAP11mbsp e i risultati sono stati comparati con quelli ottenuti per SAP11aywb (Fig. 3.8). Svitati geni sono sottoregolati anche nella linea SAP11mbsp tuttavia sia il numero totale che l'intensità della sottoregolazione sono nettamente inferiori. Anche questo effettore ha quindi un impatto negativo sul metabolismo della pianta e sui meccanismi di difesa ma l'effetto è meno marcato che per SAP11aywb.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

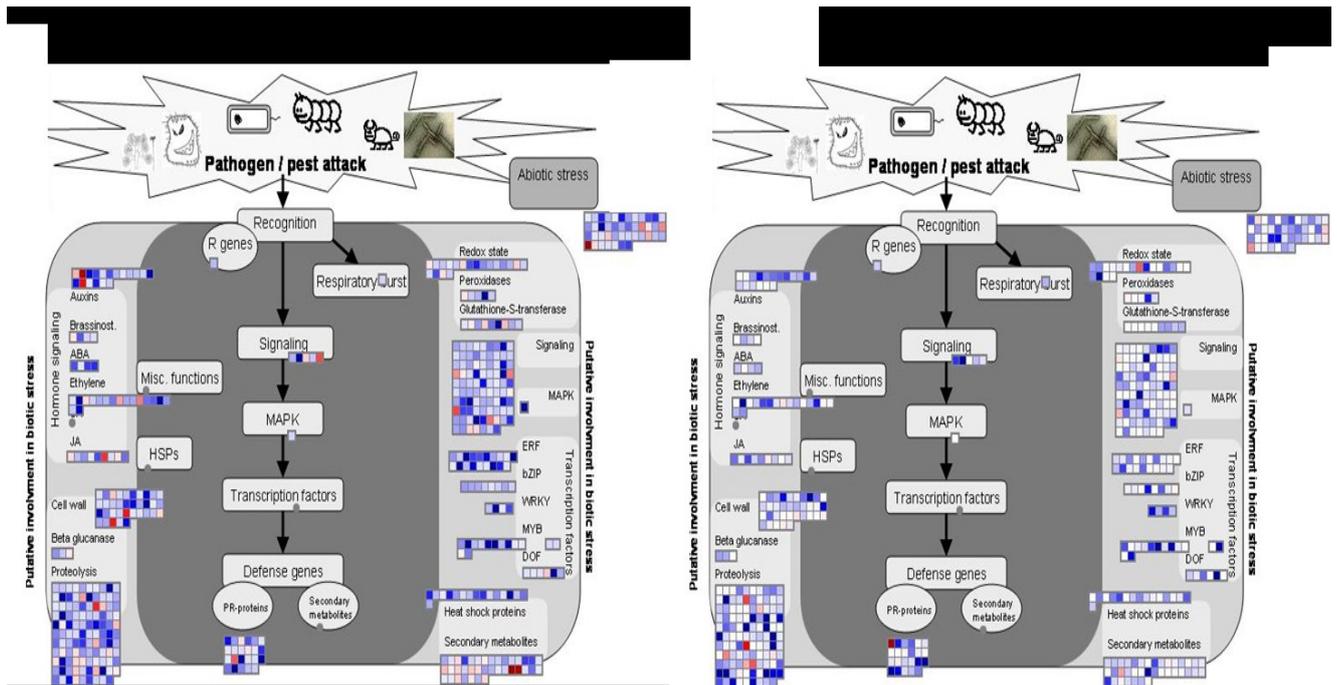


Fig. 3.8 – Comparazione della regolazione dei geni operata da SAP11aywb e SAP11mbps a livello dei meccanismi di difesa.

Infine, è stata analizzata anche la risposta delle linee miRNA319 x 3 TCPs e brc1 x brc2 per valutare, anche in questo caso, se la risposta delle linee SAP11 è dipendente dall'interazione dell'effettore con le TCPs. Per i motivi esposti nel capitolo 2, la risposta attesa, schematizzata nella figura 3.9, è che i geni espressi da SAP11aywb rappresentino la somma di quelli espressi da miRNA319 x 3TCPs e da brc1 x brc2, mentre SAP11mbps e brc1 x brc2 esprimono all'incirca gli stessi geni.

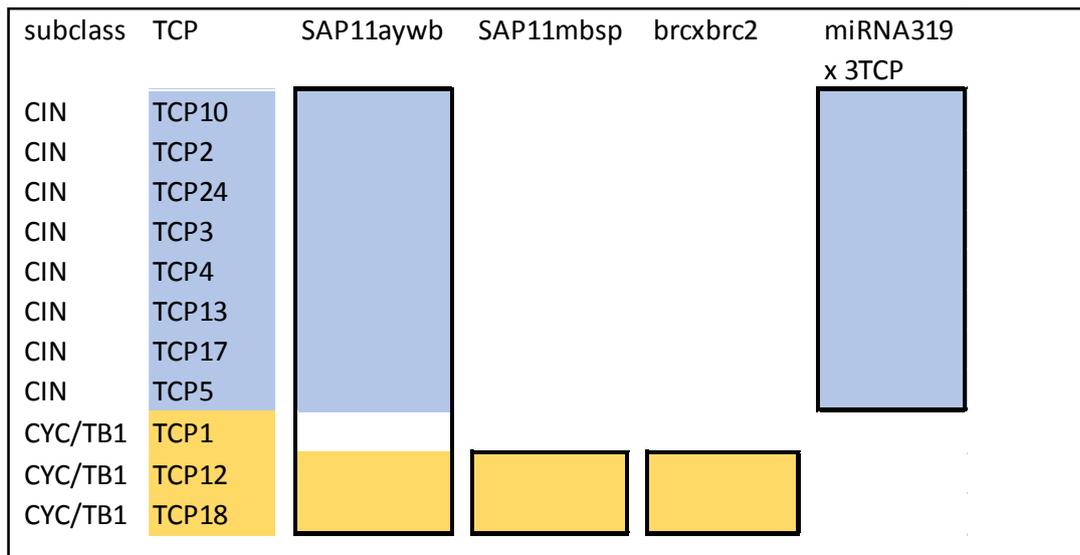


Fig. 3.9- Interazione di SAP11aywb e SAP11mbsp con le TCPs (Pecher *et al.* dati non pubblicati). Le aree di colore blu indicano l'interazione delle linee con le CIN-TCPs mentre le aree in giallo quella con le TB1-TCPs.

Per fare questo confronto sono stati considerati i geni che differiscono significativamente (DEseq, $P < 0.05$) tra ciascuna delle linee transgeniche e la linea col0, considerando solo i campioni trattati. La comparazione evidenzia la condivisione di un numero elevato di geni tra le linee in oggetto tuttavia i risultati ottenuti non rispettano in modo rigoroso la previsione (Fig. 3.10). Infatti, 366 geni vengono espressi unicamente da SAP11aywb: questo fatto era inatteso poiché ci si aspettava che la maggior parte dei geni fossero condivisi con miRNA319 x 3 TCPs e brc1 x brc2. Inoltre, 219 dei 358 geni espressi da SAP11mbsp vengono condivisi con miRNA319 x 3TCPs, mostrando che questo effettore potrebbe

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

interagire anche con le CIN-TCPs. Infine 215 dei 362 geni di *brc1 x brc2* sono condivisi con *miRNA319 x 3TCPs* suggerendo la presenza di funzioni in comune tra le CIN-TCPs e le TB1-TCPs.

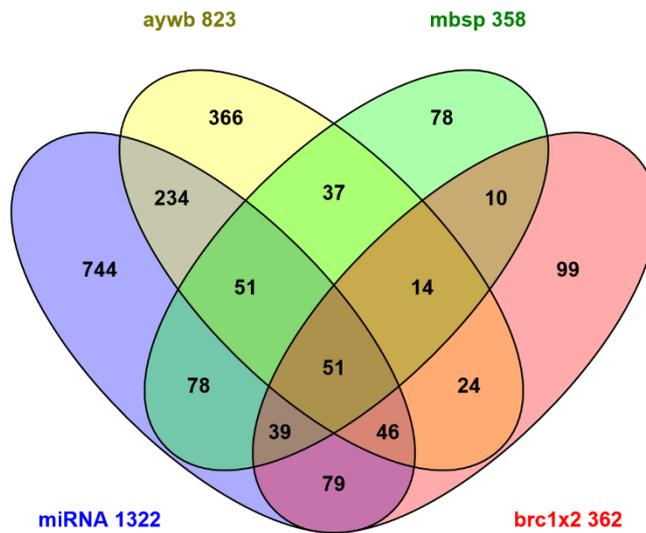


Fig. 3.10- Confronto tra le 4 linee transgeniche sulla base della analisi DEseq. Ciascun diagramma contiene i geni che, per ciascuna linea, differiscono significativamente dalla linea col0 (DEseq, $P_{adj} < 0.05$).

Le possibili spiegazioni di queste discordanze potrebbero essere le seguenti:

1. SAP11 non agisce esclusivamente sulle TCPs ma potrebbe avere anche altri bersagli. Questo spiegherebbe i geni espressi da SAP11aywb e

SAP11mbsp che non vengono condivisi con le linee miRNA319 x 3
TCPs e brc1 x brc2 ;

2. Poichè SAP11 interagisce simultaneamente con le CIN-TCPs e TB1-TCPs l'effetto finale potrebbe dipendere da fenomeni di antagonismo e/o sinergia tra i geni regolati dalle TCPs.

Conclusioni

Questo capitolo tratta delle modalità con cui l'effettore fitoplasmatico SAP11 agisce nel modulare la risposta dell'ospite all'esposizione a *M. quadrilineatus*. Gli effetti di un attacco di sole 48 ore sono consistenti: la pianta attiva numerosi processi metabolici risultanti nell'espressione di circa 2000 geni, circa il 7.5% dei geni espressi in totale. Tra i processi più rappresentati spiccano ovviamente quelli coinvolti nelle risposte di difesa e nel riconoscimento di agenti esterni alla cellula attraverso i quali la pianta tenta di ostacolare l'attività del fitofago. Inoltre si verifica una parallela soppressione dei geni coinvolti nell'attività dei cloroplasti: sebbene in letteratura sia riportato un loro coinvolgimento nelle difese della pianta (Delfino *et al.* 2015), l'effettivo ruolo di questi geni rimane da chiarire essendo solitamente legati a processi di crescita.

Così come per l'esperimento con flg22 descritto nel capitolo 2, si ripropone la differenza tra SAP11aywb e SAP11mbsp. Nel primo, i geni coinvolti nel

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell'effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum "Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo" – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

riconoscimento dello stress e nelle risposte di difesa sono soppressi indicando un generale deficit contro l'attacco di insetti. Questo risultato è coerente con l'osservazione in cui *M. quadrilineatus* produce una maggiore progenie nelle piante transgeniche sovraesprimenti SAP11aywb e suggerisce quindi i possibili meccanismi che regolano questo fenomeno. La percezione della presenza degli insetti viene alterata e le successive difese risultano meno efficaci portando ad un beneficio per l'insetto.

La linea mbsp invece non mostra differenze significative rispetto a col0: la risposta agli insetti non viene alterata e queste piante non agevolano il proprio vettore in alcun modo.

Infine viene confermata la relazione presente tra SAP11 e le TCPs. I geni attivati da SAP11aywb e SAP11mbsp trovano una coincidenza con quelli attivati da miRNA319 x 3 TCPs e brc1 x brc2. La coincidenza tuttavia non è assoluta e questo indica che le modalità di azione di SAP11 potrebbero non limitarsi alla interazione con le TCPs oppure anche che l'effetto finale di SAPP11 sia una risultante dell'interazione simultanea con le CIN-TCPs e TB1-TCPs.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

CONCLUSIONI

Le premesse di questo lavoro erano che AY-WB manipola il metabolismo di *A. thaliana* al fine di favorire la riproduzione del proprio insetto vettore *M. quadrilineatus* e che questo effetto trovava una parziale spiegazione nell'attività dell'effettore SAP11 (Sugio *et al.* 2011). Sulla base di queste premesse sono state formulate due ipotesi principali sostenendo che l'interazione di SAP11 con la pianta ospite si realizza a carico dei fattori di trascrizione TCP e che tale interazione porta ad una soppressione delle risposte di difesa della pianta. Le due ipotesi sono state verificate con diversi esperimenti evidenziando che solo SAP11aywb produce un effetto positivo sulla riproduzione di *M. quadrilineatus* mentre SAP11mbsp non favorisce questo insetto nè *D. maidis*, a cui questo effettore è associato. Entrambi gli effettori sono in grado di alterare il metabolismo ormonale così come anche molte altri meccanismi coinvolti nelle risposte di difesa della pianta ma gli effetti indotti da SAP11aywb sono più marcati di quelli di SAP11mbsp. L'interazione di entrambi gli effettori con la pianta si realizza, seppur non in modo esclusivo, con le TCPs, che infatti riproducono parte dei risultati visti sia da SAP11aywb che da SAP11mbsp e possono spiegare anche i fenotipi anomali prodotti da queste piante.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – Curriculum “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Il risultato più interessante è quindi quello ottenuto su SAP11aywb:

1. AY-WB favorisce l'attività del proprio vettore *M. quadrilineatus* al fine di favorire la propria diffusione;
2. L'effettore SAP11 secreto dal questo fitoplasma dimostra di spiegare parte del fenomeno;
3. Le ragioni di tale effetto risiedono nella soppressione dei meccanismi di difesa che la pianta attiva contro *M. quadrilineatus*.

Pertanto il processo di diffusione dei fitoplasmi non può essere considerato un evento casuale e dipendente solo dalla possibilità che il vettore si alimenti su una pianta infetta, ma si tratta di un processo attivamente regolato dal fitoplasma.

Questa conclusione è ovviamente valida nel caso della specifica combinazione AY-WB e *M. quadrilineatus* ma combinazioni diverse di fitoplasma e insetto vettore potrebbero produrre esiti diversi. Inoltre è possibile che anche altri prodotti del metabolismo fitoplasmatico siano coinvolti e che l'esito finale dipenda dalla loro interazione.

BIBLIOGRAFIA

Ali, J. G., Agrawal, A. A. (2012). Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in plant science*, 17(5), 293-302.

Alma, A. (2008). Insetti vettori. In: I Georgofili - Quaderni 2006, Vol. VIII, Fitoplasmii e fitoplasmosi di vite, pomacee e drupacee, 19-31.

Ammar, E. D., Hogenhout, S. A. (2006). Mollicutes associated with arthropods and plants. In *Insect Symbiosis, Volume 2* (pp. 97-118). CRC Press.

Andersen, M. T., Liefting, L. W., Havukkala, I., Beever, R. E. (2013). Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of 'Candidatus *Phytoplasma australiense*' reveals genome plasticity. *BMC genomics*, 14(1), 529.

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Radek, A. J., Shevchenko, D. V., Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of bacteriology*, 188(10), 3682-3696.

Bai, X. D., Correa, V. R., Toruno, T. Y., Ammar, E. D., Kamoun, S., Hogenhout, S. A. (2009). AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22 18–3010.1094/MPMI-22-1-0018

Beanland, L., Hoy, C. W., Miller, S. A., Nault, L. R. (1999). Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) transmission of aster yellows phytoplasma: does gender matter?. *Environmental Entomology*, 28(6), 1101-1106.

Beanland, L., Hoy, C. W., Miller, S. A., Nault, L. R. (2000). Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 93(2), 271-276.

Beanland, L., Noble, R. and Wolf, T. K. (2006). Spatial And temporal distribution of North American Grapevine yellows disease and potential vectors of the causal phytoplasmas in Virginia. *Environmental Entomology*. 35, 332--- 344.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Bell, E., Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8675-8679.

Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Front. Biosci.* 12:673–689 10.2741/2092

Bertin, S., Guglielmino, C. R., Karam, N., Gomulski, L. M., Malacrida, A. R., Gasperi, G. (2007). Diffusion of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball in Europe: a consequence of human trading activity. *Genetica*, 131(3), 275-285.

Bonaventure, G. (2012). Perception of insect feeding by plants. *Plant Biology*, 14(6), 872-880

Bosco, D., Galetto, L., Leoncini, P., Saracco, P., Raccach, B., Marzachi, C. (2007). Interrelationships between “*Candidatus Phytoplasma asteris*” and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of economic entomology*, 100(5), 1504-1511.

Bressan, A., Sémétey, O., Arneodo, J., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E. (2009). Vector transmission of a plant-pathogenic bacterium in the *Arsenophonus* clade sharing ecological traits with facultative insect endosymbionts. *Phytopathology*, 99(11), 1289-1296.

Breton, M., Duret, S., Danet, J. L., Dubrana, M. P., Renaudin, J. (2010). Sequences essential for transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector, *Circulifer haematoceps*, revealed by plasmid curing and replacement based on incompatibility. *Applied and environmental microbiology*, 76(10), 3198-3205.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814.

Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 10 526–535 10.1016/j.tplants.2005.09.008

Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., Schulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17 1175–1184 10.1094/MPMI.2004.17.11.1175

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

- Cimerman, A., Pacifico, D., Salar, P., Marzachi, C. and Foissac, X. (2009) Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Appl Environ Microbiol*
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H., Windsor, G. D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 607-617.
- Contaldo, N., Satta, E., Zambon, Y., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. (2016). Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of microbiological methods*, 127, 105-110.
- Curkovic Perica, M., Lepedus, H., Music, M. S. (2007). Effect of indole-3-butyric acid on phytoplasmas in infected *Catharanthus roseus* shoots grown in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* 268 171–177. [10.1111/j.1574-6968.2006.00577.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00577.x)
- Delfino, L., Tillich, M., de Torres Zabala, M., Studholme, D., Littlejohn, G., Bölter, B., ... Licht, D. (2015). Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors.
- Deng, S., Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes.- *Journal of Microbiological Methods*, 14: 53-61.
- Diezel, C., Allmann, S., Baldwin, I. T. (2011). Mechanisms of Optimal Defense Patterns in *Nicotiana attenuata*: Flowering Attenuates Herbivory- elicited Ethylene and Jasmonate Signaling. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(12), 971-983.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967). Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18 265–276.
- Firrao, G. 2004. "Candidatus phytoplasma" a taxon for the wall-less, non helical prokaryotes that colonize plant phloem and insect. *Int. J. Systematic Evolutionary Microbiology*, 54:1-13.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico *sap11* nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* " Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo " – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Firrao, G., Garcia-Chapa, M., Marzachi, C. (2007). Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 1353-1375.

Franova, J. (2011). Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64, S287-S288.

Galetto, L., Bosco, D., Balestrini, R., Genre, A., Fletcher, J., Marzachi, C. (2011). The major antigenic membrane protein of “*Candidatus Phytoplasma asteris*” selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. *PLoS One*, 6(7), e22571.

Girling, R. D., Madison, R., Hassall, M., Poppy, G. M., Turner, J. G. (2008). Investigations into plant biochemical wound-response pathways involved in the production of aphid-induced plant volatiles. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3077-3085.

Glauser, G., Dubugnon, L., Mousavi, S. A., Rudaz, S., Wolfender, J. L., Farmer, E. E. (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34506-34513.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205-227.

Gundersen, D. E., Lee, M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151.

Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N., Dickinson, M. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of the *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘*Candidatus Phytoplasma*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

Hofweber, R., Horn, G., Langmann, T., Balbach, J., Kremer, W., Schmitz, G., Kalbitzer, H. R. (2005). The influence of cold shock proteins on transcription and translation studied in cell-free model systems. *The FEBS journal*, 272(18), 4691-4702.

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9 403–423 [10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x)

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico *sap11* nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

- Hoshi, A., Ishii, Y., Kakizawa, S., Oshima, K., Namba, S. (2007). Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 105.
- Kessler, A., Halitschke, R., Baldwin, I. T. (2004). Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science*, 305(5684), 665-668.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A. M. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*. *BMC Genomics* 9:306 10.1186/1471-2164-9-306
- Kwon, M. O., Wayadande, A. C., Fletcher, J. (1999). *Spiroplasma citri* movement into the intestines and salivary glands of its leafhopper vector, *Circulifer tenellus*. *Phytopathology*, 89(12), 1144-1151.
- Lee, I. M., Zhao, Y., Bottner, K. D. (2006). SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol. Cell. Probes* 20 87–91 10.1016/j.mcp.2005.10.001
- Lee, I. M., Gundersen-Rindal D. E., Davis R. E., Bartoszyk I.M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Lee, J., Eschen-Lippold, L., Lassowskat, I., Böttcher, C., Scheel, D. (2015). Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases. *Frontiers in plant science*, 6.
- Lessio, F., Tedeschi, R., Alma, A. (2007)- Population dynamics, host plants and infection rate with stolbur phytoplasma of *Hyalestes obsoletus* Signoret in North-Western Italy.- *Journal of Plant Pathology* 89: 97-102.
- Li, G., Froehlich, J. E., Elowsky, C., Msanne, J., Ostosh, A. C., Zhang, C., Alfano, J. R. (2014). Distinct *Pseudomonas* type- III effectors use a cleavable transit peptide to target chloroplasts. *The Plant Journal*, 77(2), 310-321.
- Liefting, L. W., Sutherland, P. W., Ward, L. I., Paice, K. L., Weir, B. S., Clover, G. R. (2009). A new ‘*Candidatus Liberibacter*’ species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease*, 93(3), 208-214.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell’ effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

Madden, L. V., Nault, L. R., Heady, S. E., Styer, W. E. (1984). Effect of maize stunting mollicutes on survival and fecundity of *Dalbulus* leafhopper vectors. *Annals of applied biology*, 105(3), 431-441.

Maffei, M. E., Mithöfer, A., Boland, W. (2007). Before gene expression: early events in plant–insect interaction. *Trends in plant science*, 12(7), 310-316.

Maixner, M., (1994). Transmission of German grapevine yellows (Vergilgungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis*, 33: 103-104.

Maixner, M., Langer, M. (2006). Prediction of the flight of *Hyalesthes obsoletus*, vector of stolbur phytoplasma, using temperature sums. *IOBC wprs Bulletin*, 29(11), 161

Makarova, O, Contaldo, N, Paltrinieri, S, Kawube, G, Bertaccini, A. (2012) DNA Barcoding for Identification of ‘Candidatus Phytoplasmas’ Using a Fragment of the Elongation Factor Tu Gene. *PLOS ONE*

Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., Seemüller, E. (1999). Chromosome size of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805-810.

McDowell, J. M., Dangl, J. L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in biochemical sciences*, 25(2), 79-82.

Moran, P. J., Thompson, G. A. (2001). Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. *Plant Physiology*, 125(2), 1074-1085.

Murrall, D. J., Nault, L. R., Hoy, C. W., Madden, L. V., Miller, S. A. (1996). Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89(5), 1223-1232.

Musetti, R., di Toppi, L. S., Ermacora, P., Favali, M. A. (2004). Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*, 94(2), 203-208.

Musetti, R., Sanità di Toppi, L., Marabottini, R., Borselli, S., Martini, M., Badiani, M., Osler, R. (2006). The recovery of grapevine from phytoplasmas: variation of

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

antioxidant status in leaf tissues. In Extended Abstracts 15th ICVG Meeting, Stellenbosch, South Africa (pp. 3-7).

Muto, A., Osawa, S. (1987). The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 166-169.

Nakashima, K., Hayashi, T., Chaleroon, W., Wongkaew, P., Sirithorn, P. (1995). Detection of DNA of phytoplasmas associated with phyllody disease of sesame in Thailand. *Japanese Journal of Phytopathology*, 61(6), 519-528.

Nault, L. R. (1990). Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica*, 35(2), 165-175.

Nault, L. R., Ammar, E. D. (1989). Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annual review of entomology*, 34(1), 503-529.

Orlovskis, Z., Canale, M. C., Thole, V., Pecher, P., Lopes, J. R., Hogenhout, S. A. (2015). Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. *Current Opinion in Insect Science*, 9, 16-23.

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H. Y., Wei, W., Suzuki, S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat. Genet.* 36 27–2910.1038/ng1277

Osler, R., Carraro, L., Loi, N., Refatti, E. (1993). Symptom expression and disease occurrence of a yellows disease of grapevine in northeastern Italy. *Plant Disease*, 77(5), 496-498.

Pacifico, D., Alma, A., Bagnoli, B., Foissac, X., Pasquini, G., Tessitori, M. and Marzachi, C. (2009) Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology*

Palermo, S., Arzone, A., Bosco, D. (2001). Vector- pathogen- host plant relationships of chrysanthemum yellows (CY) phytoplasma and the vector leafhoppers *Macrostelus quadripunctulatus* and *Euscelidius variegatus*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 99(3), 347-354.

Pertot, I., Musetti, R., Pressacco, L., Osler, R. (1998). Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* infected by the agent of the

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios* 95 13–23

Peterson, A. G. (1974). Host plant and aster leafhopper relationships. In *Proceedings... annual meeting*.

Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., Kamoun, S. (2016). Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. *Cellular microbiology*, 18(4), 453-465.

Purcell, A. H. (1988). Increased survival of *Dalbulus maidis*, a specialist on maize, on non- host plants infected with mollicute plant pathogens. *Entomologia experimentalis et applicata*, 46(2), 187-196.

Razin, S., Yogev, D., Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 1094–1156

Razin, S. (2007). Molecular biology and genomics of Mollicutes. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 101.

Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R., Blua, M. J., Mizell Iii, R. F., Andersen, P. C. (2004). The biology of xylem fluid–feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), 243-270.

Schmid, G. (1965). Five and more years of observations on the proliferation virus of apples in the field. *Zast. Bilja*, 16, 285-291.

Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas, pp. 369-380. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, Vol. 1 (Razin S., Tully, J. G., Eds).- Academic Press, San Diego, CA, USA.

Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS biology*, 6(9), e230.

Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., Boudon-Padieu, E.(1998).- The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevines in France. *Journal of Phytopathology* 146: 549-556.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

- Sharma, M., Laxmi, A. (2015). Jasmonates: emerging players in controlling temperature stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 6.
- Sharon, R., Soroker, V., Wesley, D., Zahavi, T., Harrari, A., Weintraub, G. (2005). *Vitex agnus-castus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. *J. Chem. Ecol.* 31: 1051-1063.
- Spoel, S. H., Dong, X. (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell host microbe*, 3(6), 348-351.
- Strauss, E. (2009) Phytoplasma research begins to bloom. *Science*. 2009;325:388–390.
- Sugio, A., Kingdom, H. N., MacLean, A. M., Grieve, V. M., Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 E1254–E1263 10.1073/pnas.1105664108
- Sugio, A., MacLean, A. M., Kingdom, H. N., Grieve, V. M., Manimekalai, R., & Hogenhout, S. A. (2011a). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual review of phytopathology*, 49, 175-195.
- Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H. Y., Yamaji, Y. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 4252–4257 10.1073/pnas.0508668103
- Svecová, E., S. Proietti, C. Caruso, G. Colla and P. Crinò. (2013). Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extract against *Pythium ultimum* in tomato. *Crop Prot.* 43:223-230
- Takagi, H., Ishiga, Y., Watanabe, S., Konishi, T., Egusa, M., Akiyoshi, N., Shimada, H. (2016). Allantoin, a stress-related purine metabolite, can activate jasmonate signaling in a MYC2-regulated and abscisic acid-dependent manner. *Journal of experimental botany*, 67(8), 2519-2532.
- Todd, J. L., Madden, L. V., Nault, L. R. (1991). Comparative growth and spatial distribution of *Dalbulus* leafhopper populations (Homoptera: Cicadellidae) in relation to maize phenology. *Environmental Entomology*, 20(2), 556-564.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari

- Tran-Nguyen, L. T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K. S. (2008). Comparative genome analysis of “Candidatus *Phytoplasma australiense*”(subgroup tuf-Australia I; rp-A) and “Ca. *Phytoplasma asteris*” strains OY-M and AY-WB. *Journal of bacteriology*, 190(11), 3979-3991.
- Vallet-Gely, I., Lemaitre, B., Bocard, F. (2008). Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 302-313.
- Walling, L. L. (2000). The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2), 195-216.
- Wallis, E. (1962). Host plant preference of the six-spotted leafhopper. *Journal of Economic Entomology*, 55(6).
- Weintraub, P. G., L. Beanland. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev*
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J., Maniloff, J., Woese, C.R. (1989) A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 171: 6455–6467
- Wilson, M. R., Weintraub, P. G. (2007). An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 177.
- Zhang, J., Hogenhout, S. A., Nault, L. R., Hoy, C. W., Miller, S. A. (2004). Molecular and symptom analyses of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. *Phytopathology*, 94(8), 842-849.

Gabriele Moro – Studio del ruolo dell' effettore fitoplasmatico sap11 nelle interazioni pianta-parassita-vettore.

Tesi di Dottorato in Scienze Agrarie. – *Curriculum* “ Monitoraggio E Controllo Degli Ecosistemi Agrari E Forestali

In Ambiente Mediterraneo “ – Ciclo XXIX

Università degli Studi di Sassari