



# ROSEMARIE TEDESCHI

## Il sistema immunitario degli insetti:

### meccanismi e nuovi approcci di studio in campo agroalimentare



[https://drive.google.com/file/d/1YhUMNdfVyXfTI-Mn97Qh6y0hLLpyeHDK/view?usp=share\\_link](https://drive.google.com/file/d/1YhUMNdfVyXfTI-Mn97Qh6y0hLLpyeHDK/view?usp=share_link)

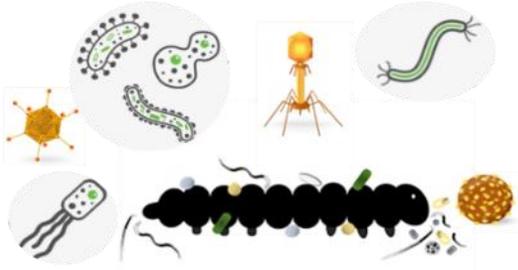
Accademia di Agricoltura  
Adunanza pubblica

Mercoledì 15 febbraio 2023  
ore 16:30



# SISTEMA IMMUNITARIO DEGLI INSETTI

## REGOLA LE INTERAZIONI CON ALTRI ORGANISMI



- ORGANISMI NOCIVI
- ORGANISMI CHE POSSONO ESSERE TOLLERATI
- MICRORGANISMI UTILI

**Meccanismi complessi attivati da diversi tipi di segnali e che possono essere regolati in modo indipendente**

**EVENTI  
CELLULARI**

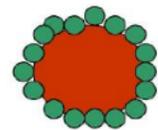
**EVENTI  
UMORALI**

EVENTI  
CELLULARI

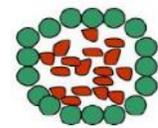
EMOCITI



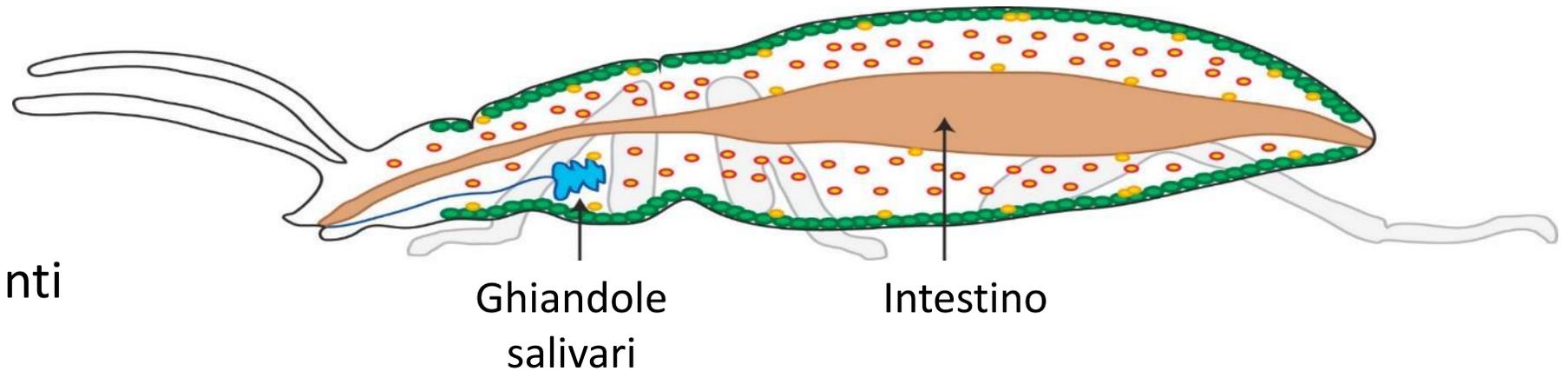
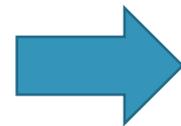
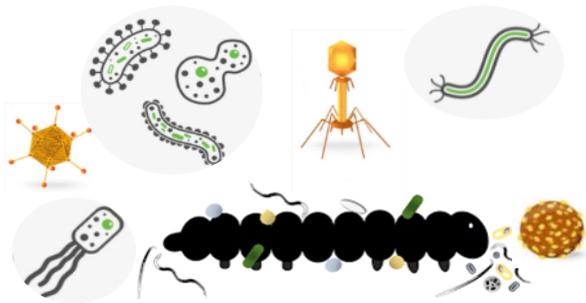
FAGOCITOSI



INCAPSULAMENTO



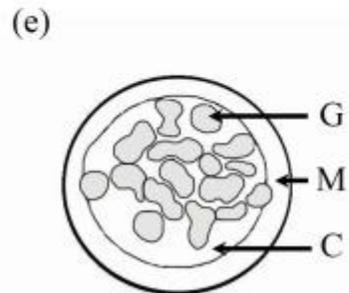
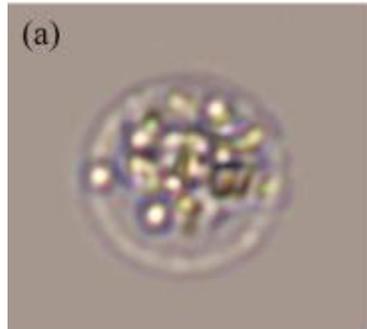
NODULAZIONE



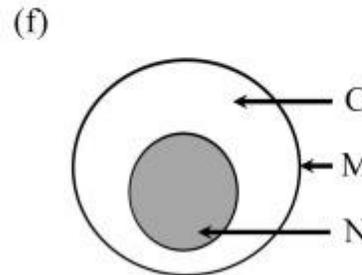
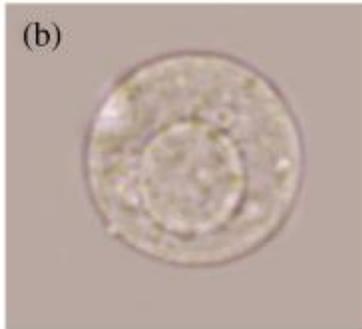
- Emociti circolanti
- Emociti sessili
- Corpi grassi

Da Hillyer *et al.*, 2016. *Developmental and comparative Immunology* 58: 102-113

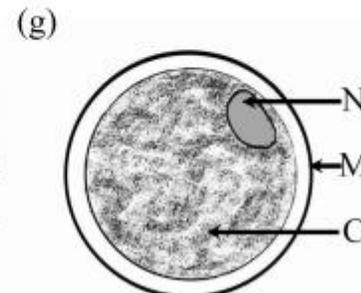
GRANULOCITI



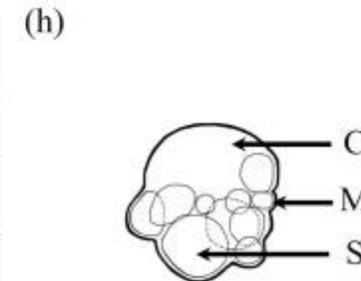
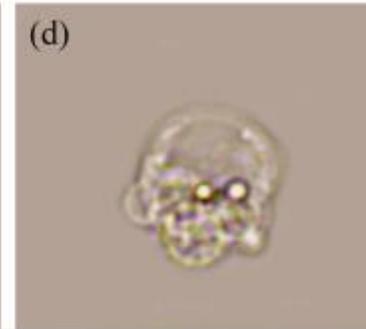
PLASMATOCITI



ENOCITOIDI



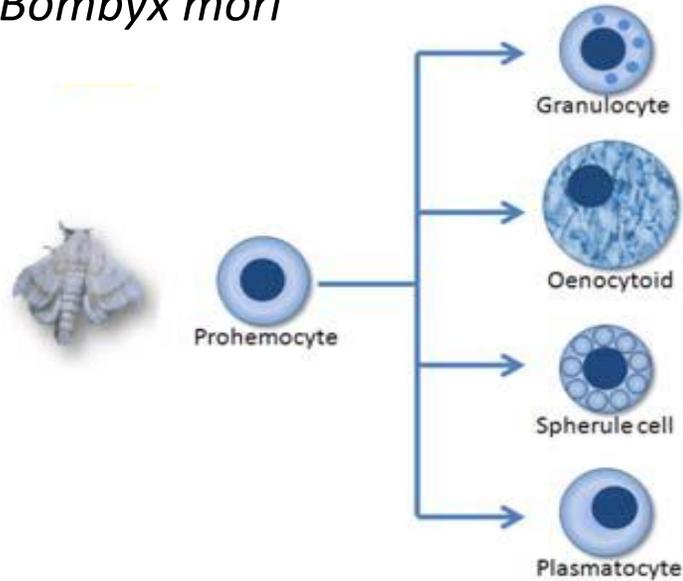
SFERULOCITI



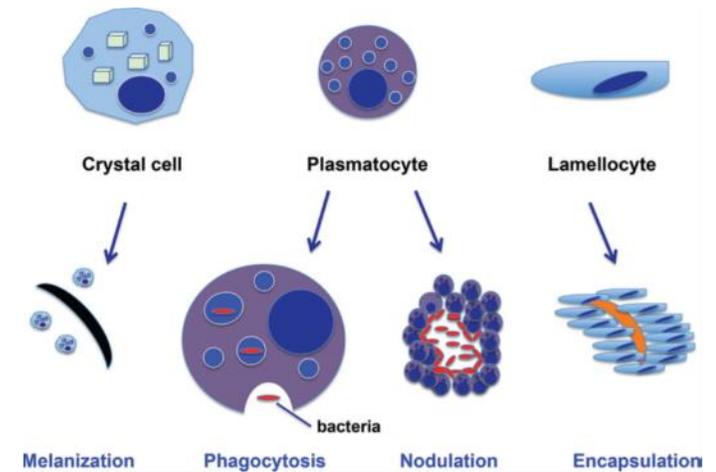
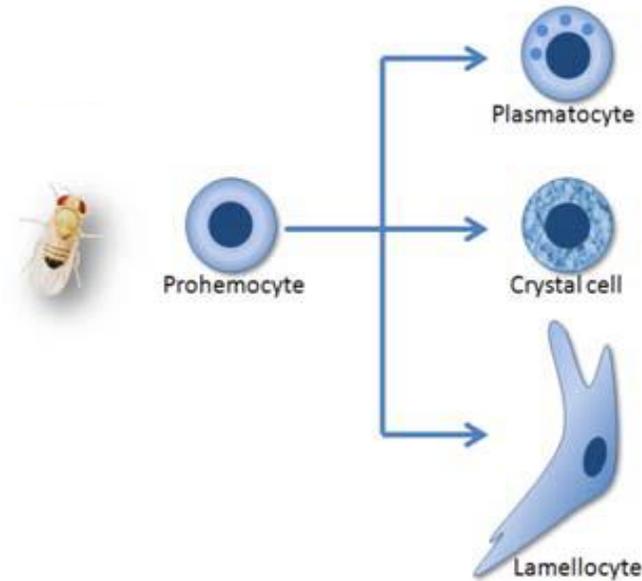
G = granuli  
M = membrana  
C = citoplasma  
N = nucleo  
S = sferule

Da Vogelweith *et al.*, 2016. *Journal of Insect Physiology* 88: 33-39

*Bombyx mori*



*Drosophila melanogaster*



Da Chandrasekar *et al.*, 2014. Short Views on Insect Biochemistry and Molecular Biology Lead Chapter Vol. (1): 3 – 56,

- PEPTIDI ANTIMICROBICI (AMPs)  
(es. cecropine, defensine, ..)
- INTERMEDI REATTIVI DELL' OSSIGENO E DELL' AZOTO
- CASCATE ENZIMATICHE  
(es. sistema proPO)



COAGULAZIONE E MELANIZZAZIONE



Aperis *et al.*, 2007. *Microbes and infection*, 9(6): 729-734.

STUDIO DEGLI EMOCITI  
IN INSETTI VETTORI

INTERAZIONI CON  
FITOPLASMI?

COLTURE PRIMARIE  
DI EMOCITI



*Cacopsylla melanoneura*



'*Candidatus* phytoplasma mali'



*Cacopsylla pyri*



'*Candidatus* phytoplasma pyri'



*Euscelidius variegatus*



Fitoplasma della Flavescenza dorata

## STUDIO DEGLI EMOCITI IN INSETTI VETTORI

## COLTURE PRIMARIE DI EMOCITI

### PROTOCOLLO PER COLTURE DI EMOCITI DI INSETTI VETTORI



-  → lavaggi in NaClO, etanolo, H<sub>2</sub>O sterile
- 2 ♀♀/pozzetto con 1 ml di terreno di coltura
- Incubazione a 24-26°C
- Aggiunta di 0,2 ml di terreno ogni 48 h
- Osservazione giornaliera al microscopio invertito

Sf900™ III SFM

sopravvivenza < 2 gg

Ex-Cell® 405

sopravvivenza ~ 30 gg

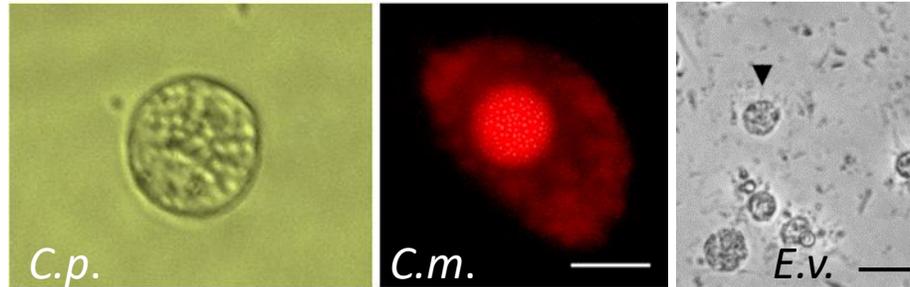
Hert-Hunter 70  
(HH70)

sopravvivenza > 60-90 gg

## STUDIO DEGLI EMOCITI IN INSETTI VETTORI

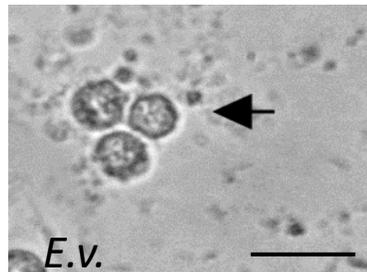
## COLTURE PRIMARIE DI EMOCITI

## OSSERVAZIONE DEI TIPI CELLULARI



### GRANULOCITI

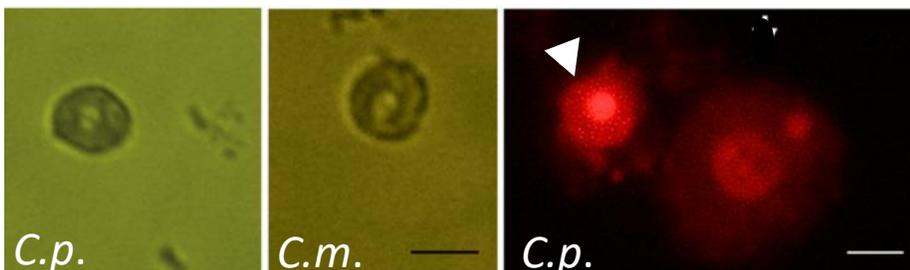
- *C. pyri*, *C. melanoneura*
- *E. variegatus*



### PROEMOCITI

- *E. variegatus*

— 10 μm

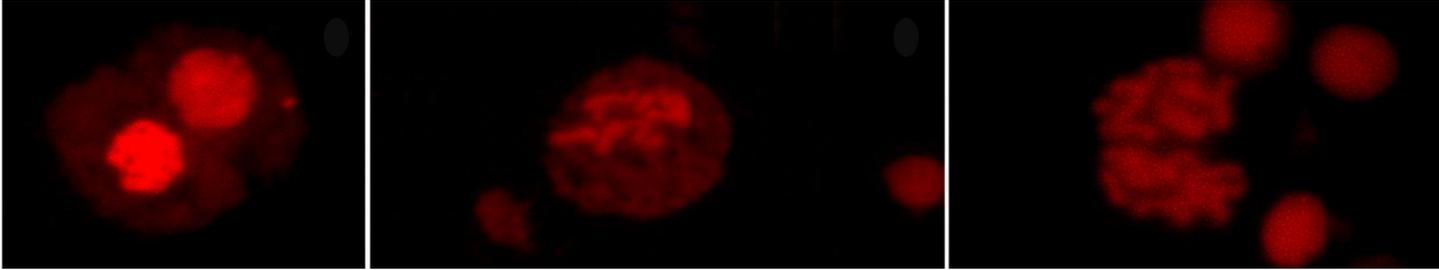


### PLASMATOCITI

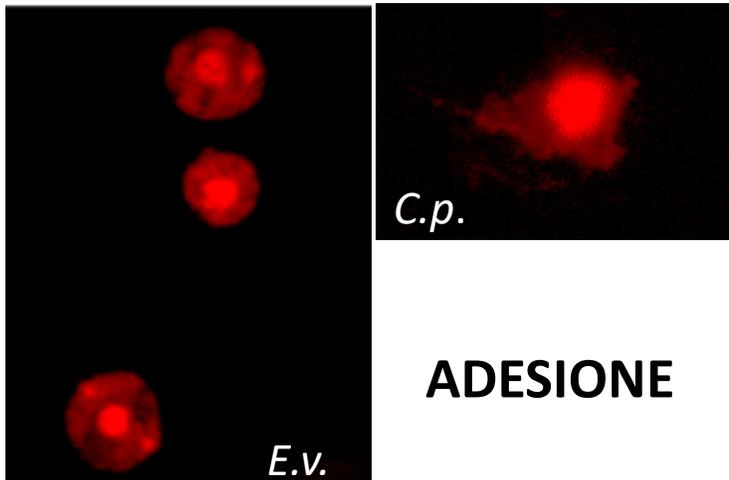
- *C. pyri*, *C. melanoneura*

Monti *et al.*, 2014. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 50: 797-801

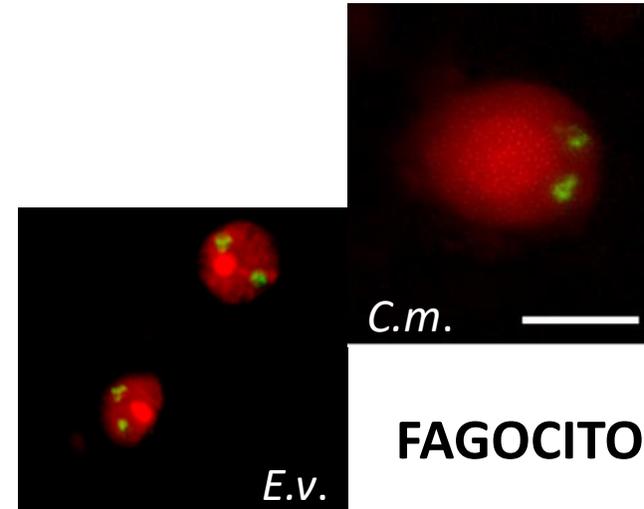
Tedeschi *et al.*, 2017. *Invertebrate Survival Journal* 14: 63-72



**MITOSI** a partire dal 12°-  
15° giorno post-coltura



**ADESIONE**



**FAGOCITOSI**

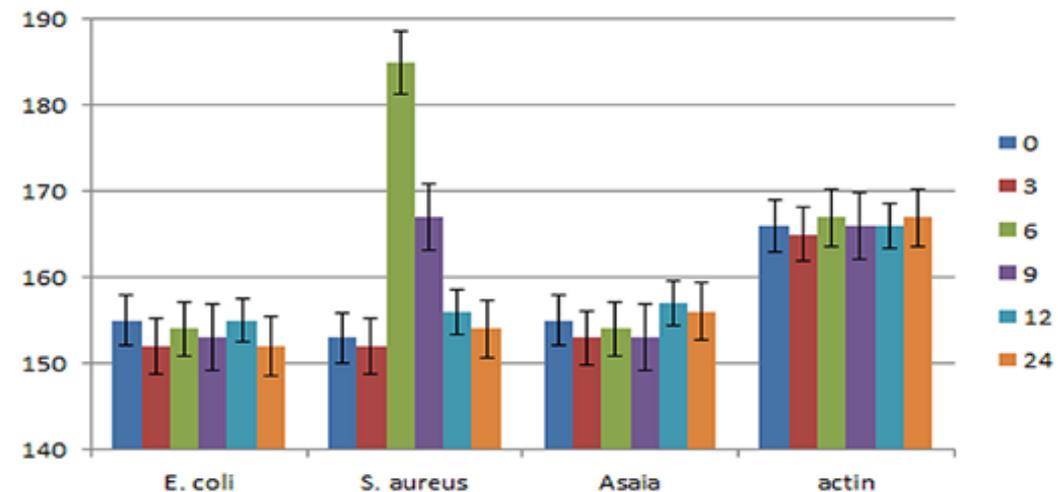
Monti *et al.*, 2014. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal 50: 797-801

Tedeschi *et al.*, 2017. Invertebrate Survival Journal 14: 63-72

- Emociti di *E. variegatus* incubati con soluzioni di  $10^9$  cellule/ml di *Staphylococcus aureus* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -) e *Asaia* sp. per 0, 3, 6, 9, 12 e 24 ore.
- Estrazione dell'RNA totale ed RT-PCR semiquantitativa



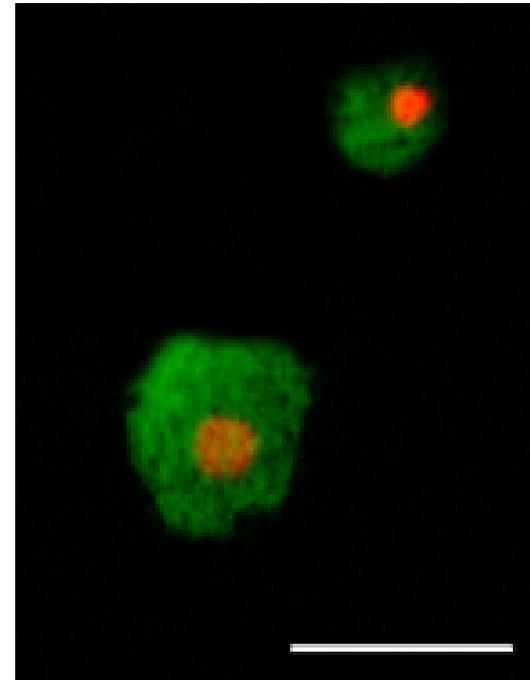
Solo *S. aureus* è in grado di incrementare l'espressione della defensina dopo 6 h



Tedeschi *et al.*, 2017. *Invertebrate Survival Journal* 14: 63-72

- Ibridazione *in situ* con sonda marcata con digossigenina

**Il gene per la defensina  
viene trascritto dagli  
emociti di *E. variegatus*  
coltivati in vitro**



Tedeschi *et al.*, 2017. Invertebrate Survival Journal 14: 63-72

- Messo a punto un protocollo per il mantenimento e lo studio di colture primarie di emociti di insetti vettori di fitoplasmi
- Dimostrata la capacità degli emociti di *E. variegatus* di sintetizzare peptidi antimicrobici appartenenti alla famiglia delle defensine → lo studio può essere esteso ad altri geni
- Le colture primarie di emociti possono dunque essere un utile strumento
  - per lo studio *in vitro* delle interazioni tra gli insetti e i patogeni da essi veicolati
  - per chiarire i meccanismi alla base della competenza e dell'efficienza di alcuni insetti piuttosto che di altri nel trasmettere i fitoplasmi
  - per l'individuazione di nuovi target per la lotta ai vettori o per il controllo della trasmissione, quindi per lo sviluppo di nuove strategie di difesa delle colture

# EFFETTI DELLA DIETA SULLE RISPOSTE IMMUNITARIE DI INSETTI ALLEVATI A SCOPO COMMERCIALE → INSETTI AD USO *FEED* E *FOOD*



- Elevata densità di allevamento → stress
- Accumulo di rifiuti
- Diete poco proteiche
- Temperature sopra 35°C
- Elevata umidità
- Forte consanguineità



insetti molto più sensibili all'attacco da parte di virus, funghi e batteri entomopatogeni

- Entomopatogeni arrivati con i substrati
- Entomopatogeni portati dagli operatori (sul corpo o i vestiti)



Effetti subletali



elevata mortalità  
negli allevamenti



Sviluppo di m.o. opportunisti  
come conseguenza delle  
malattie

RIPRODUZIONE

COMPETIZIONE

RISPOSTE IMMUNITARIE

- **INSETTI PIÙ ATTIVI DAL PUNTO DI VISTA RIPRODUTTIVO HANNO UNA PIÙ BASSA RESISTENZA ALLE INFEZIONI**
- ✓ Grilli: femmine con un'elevata frequenza di accoppiamento hanno un minor numero di emociti in circolo
  - ✓ *Tenebrio molitor*: minore attività della fenolossidasi dopo l'accoppiamento
  - ✓ *D. melanogaster*: femmine sperimentalmente infettate, dopo l'accoppiamento presentano:
    - minore sopravvivenza
    - maggiore carica del patogeno
    - minore inducibilità di geni che codificano per AMPs

- **CARENZE NUTRIZIONALI**

- risposte immunitarie ridotte

- cambiamenti nell'espressione di geni di immunità (es. AMPs)

- **ELEVATO RAPPORTO PROTEINE:CARBOIDRATI**

- aumenta attività antimicrobica,

- maggiore capacità incapsulamento

- maggior numero di emociti

- **CAPACITÀ DI SELEZIONARE ALIMENTI PER SOPPERIRE A DEFICIENZE IMMUNITARIE**



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/dci](https://www.elsevier.com/locate/dci)

Nutritional immunology: Diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*

Heiko Vogel <sup>a</sup>, Ariane Müller <sup>b</sup>, David G. Heckel <sup>a</sup>, Herwig Gutzeit <sup>b</sup>,  
Andreas Vilcinskas <sup>c,d,\*</sup>

- Crescente interesse per la possibilità di modulare la produzione di AMPs:
  - Rafforzare il sistema immunitario degli insetti negli allevamenti massali → minore rischio di malattie negli allevamenti
  - Evitare l'uso di antibiotici





- ▶ Dieta a base di cereali (dieta Gainesville)
- ▶ Dieta Gainesville addizionata di oli vegetali (5% su peso umido):

**olio di soia**



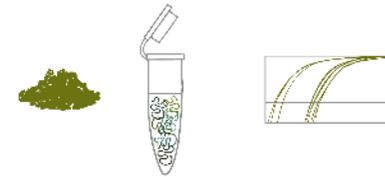
**olio di mais**



**olio di girasole**



Espressione genica AMPs



- Difensina
- Cecropina

Estrazione dell'emolinfa

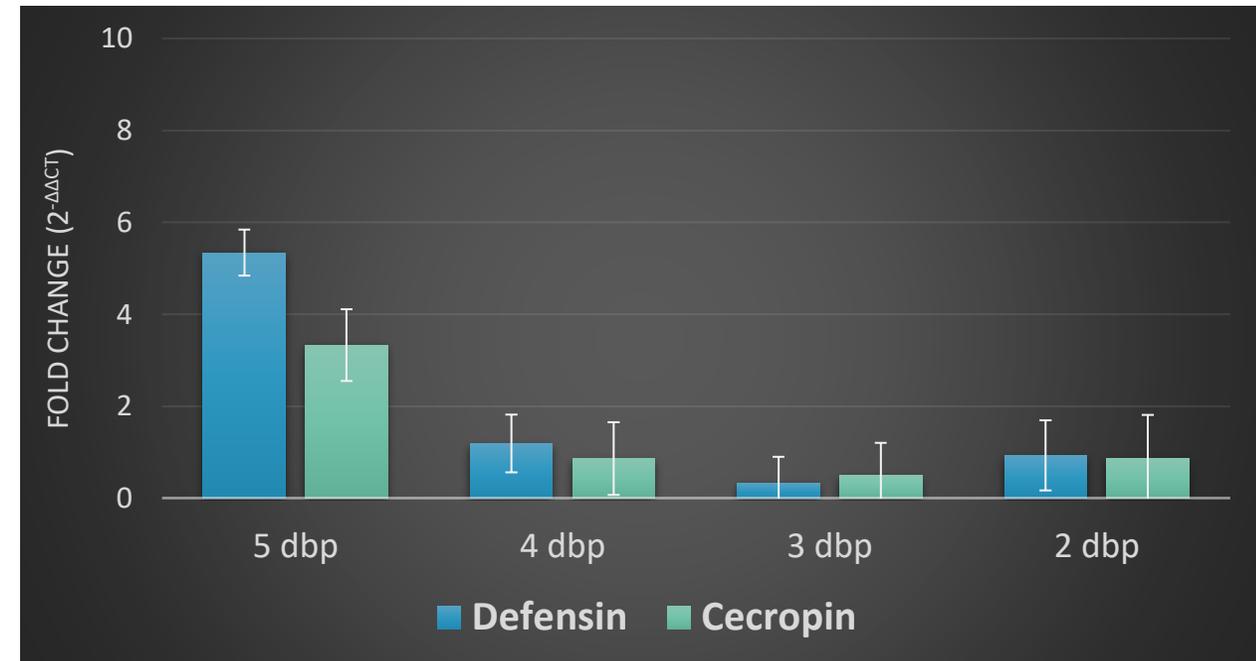
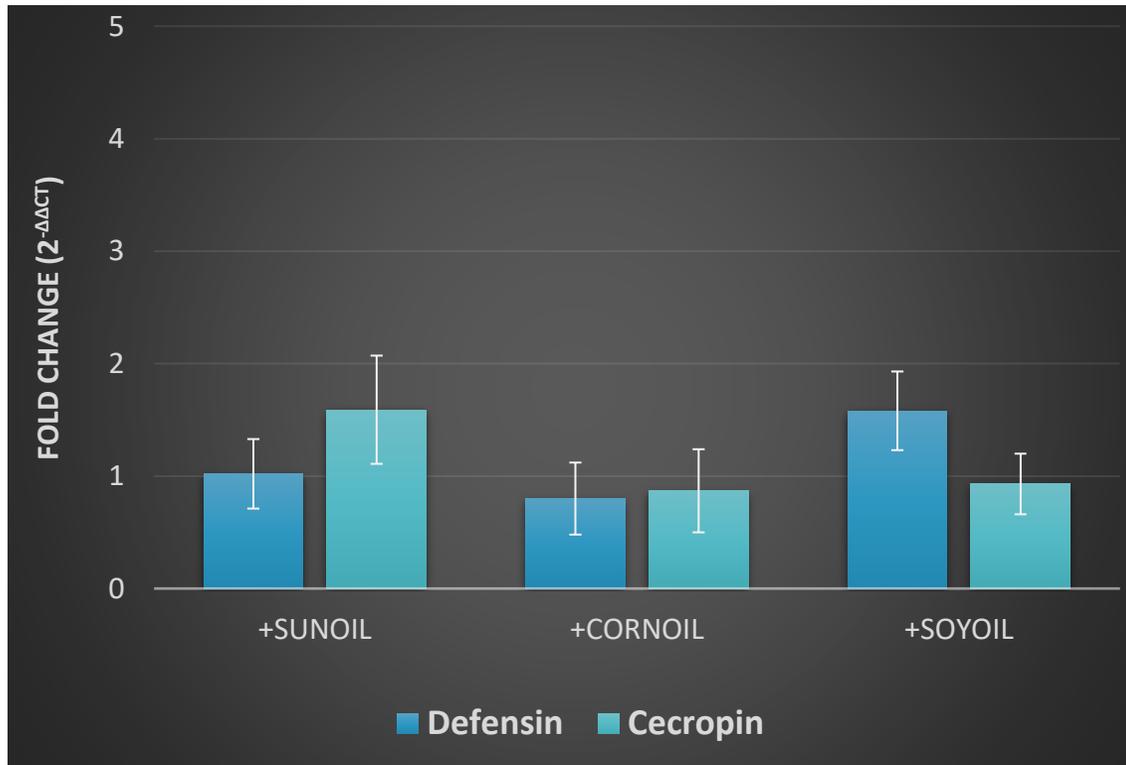


Inibizione crescita batterica

# EFFETTO DELLA DIETA SUL SISTEMA IMMUNITARIO

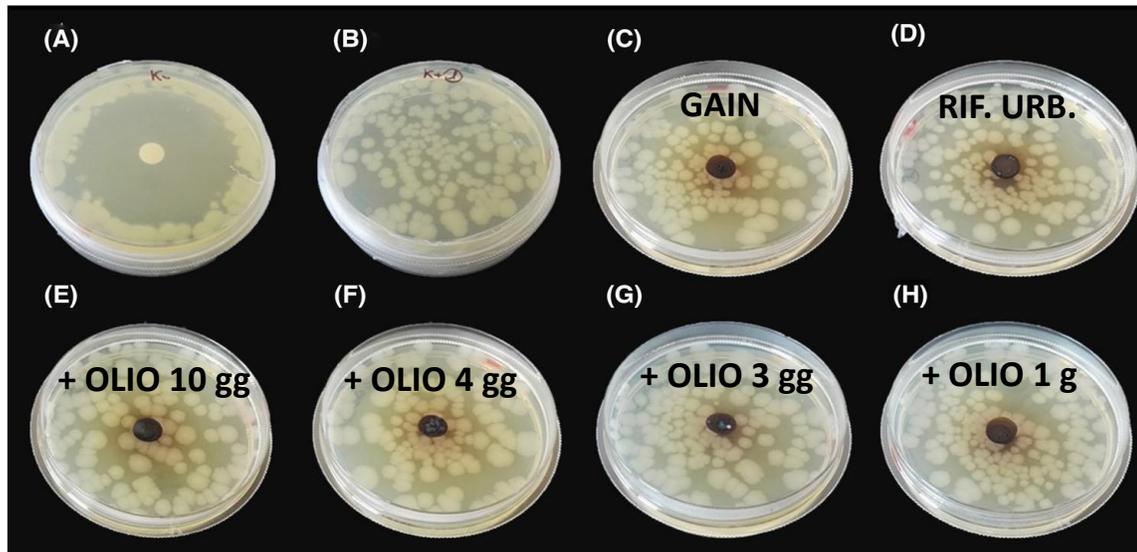
## Aggiunta di oli vegetali alla dieta

### Olio di girasole

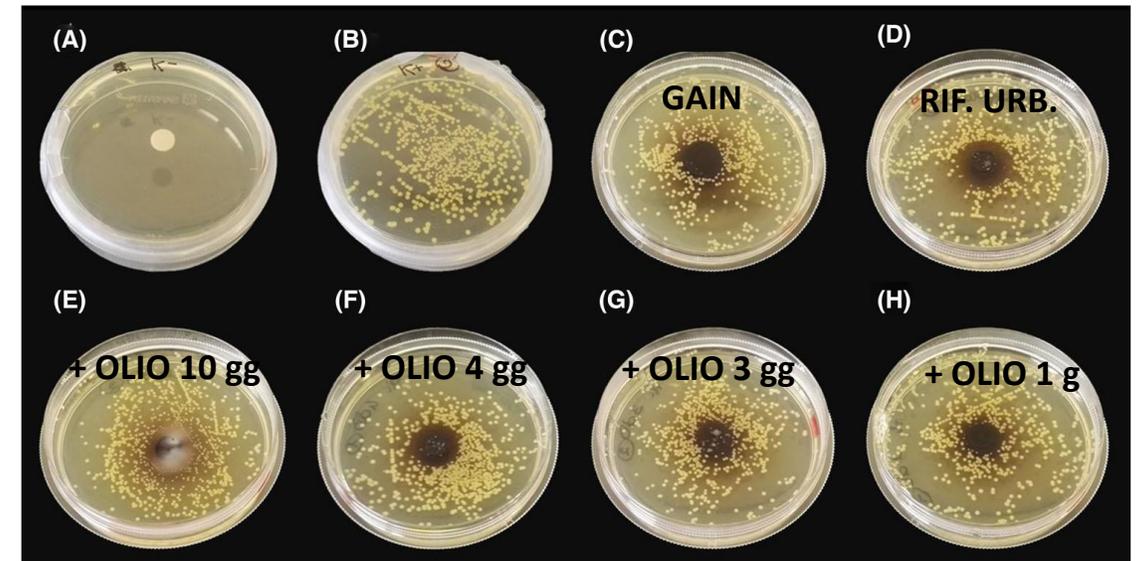


Candian *et al.*, 2023. *Insect Science*, DOI 10.1111/1744-7917.13165

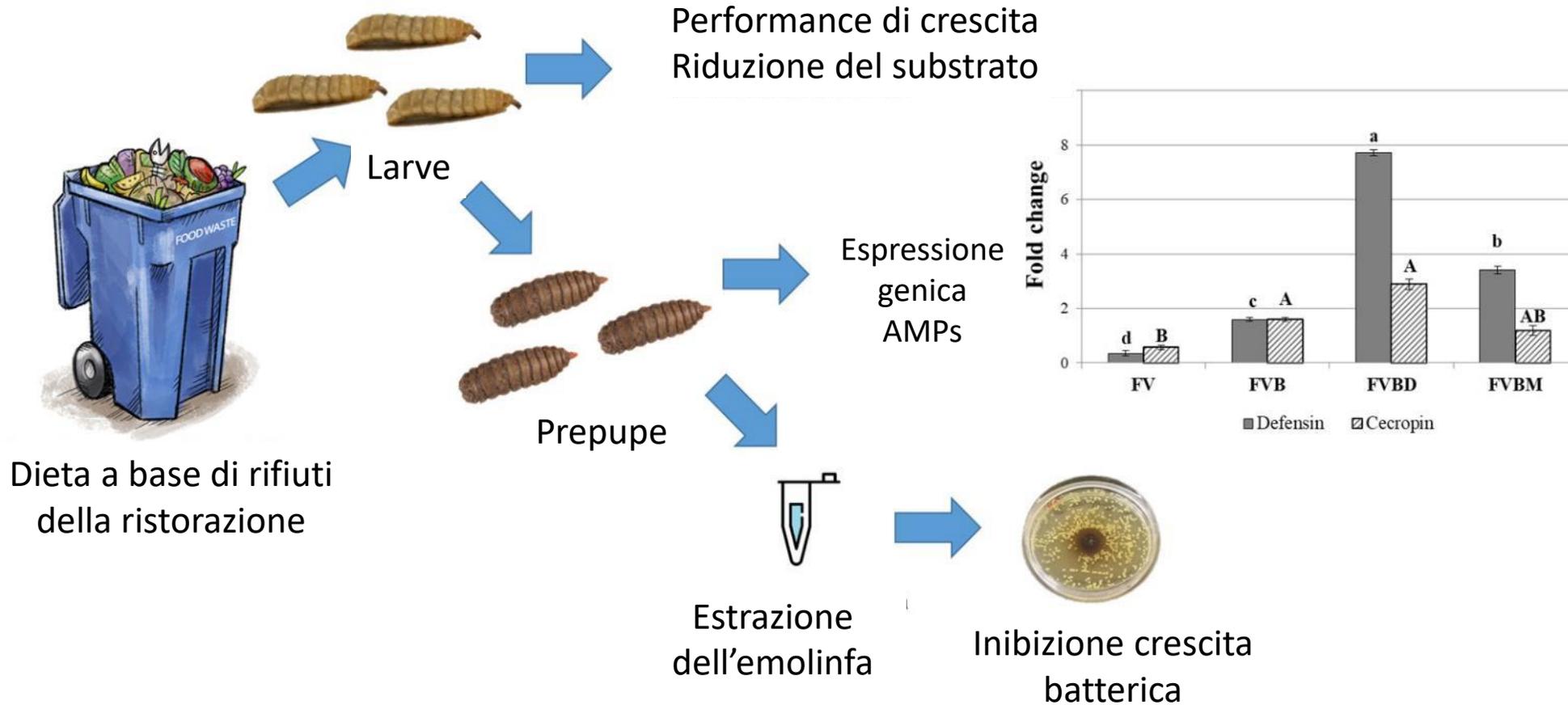
*Escherichia coli* +48 h



*Micrococcus yunnanensis* +48 h



GAIN = dieta Gainsville

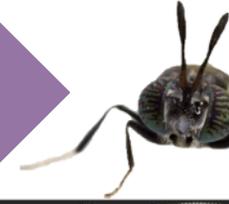


Candian *et al.*, 2023, *Life*, 13: 213.

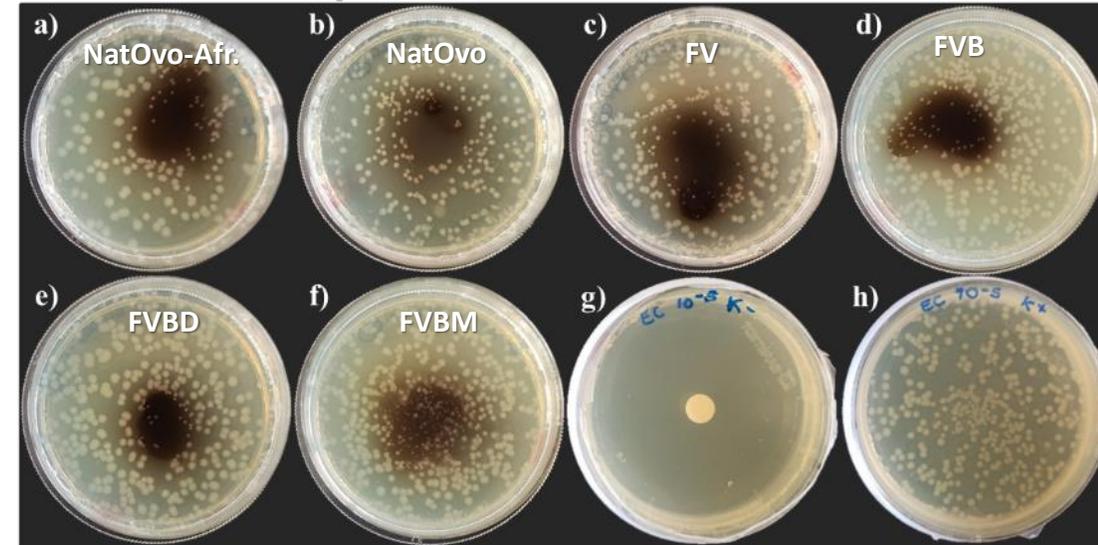
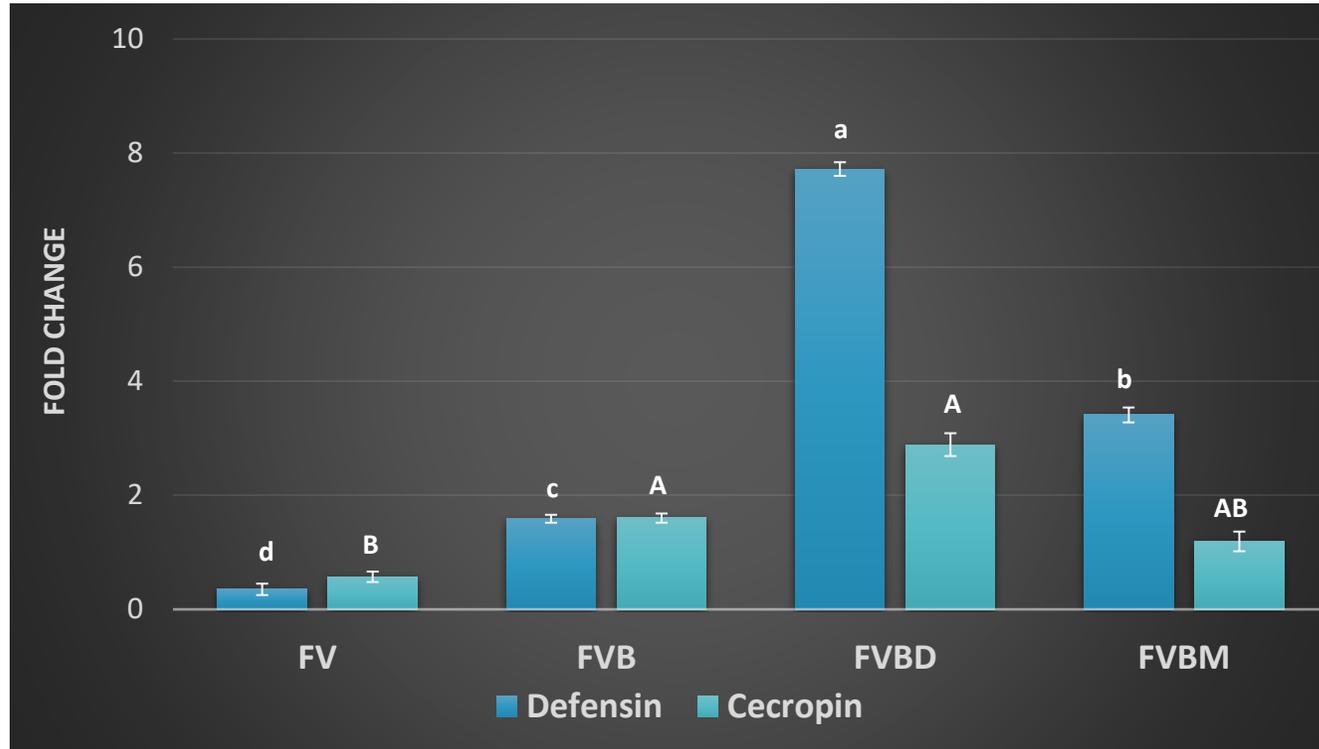


# EFFETTO DELLA DIETA SUL SISTEMA IMMUNITARIO

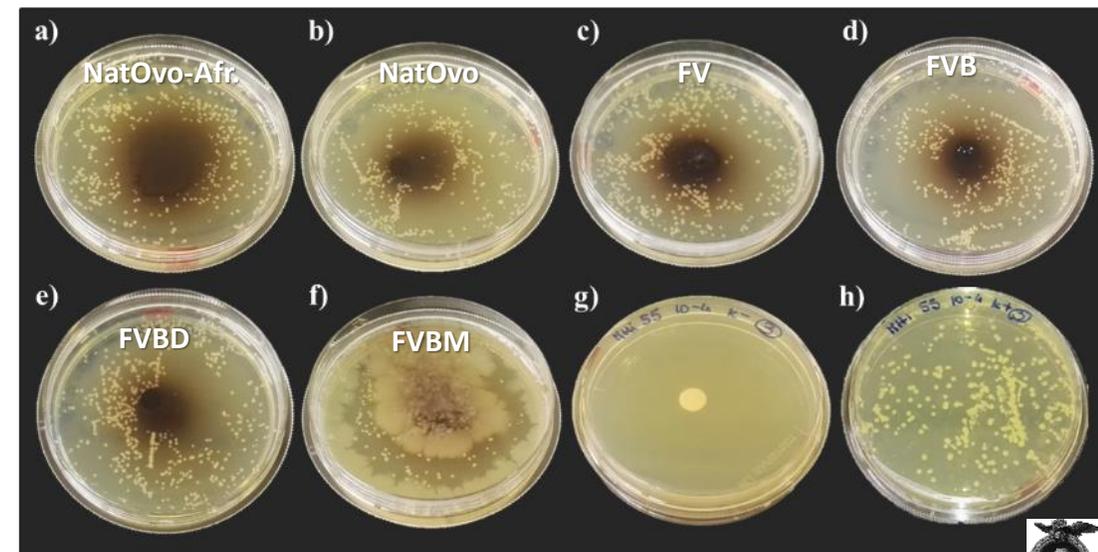
## Allevamento su rifiuti della ristorazione



*Escherichia coli*



*Micrococcus yunnanensis*



**FV**= frutta e verdura

**FVB**= frutta, verdura e pane

**FVBD**= frutta, verdura, pane e latticini

**FVBM**= frutta, verdura, pane, pesce e pollo

Candian *et al.*, 2023, *Life*, 13: 213.



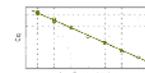
# EFFETTO DELLA DIETA SUL SISTEMA IMMUNITARIO

## Uso di scarti agro-industriali



Performance di crescita

Espressione genica AMPs



- Coleoptericina-1
- Cecropina-2

Estrazione dell'emolinfa



Inibizione crescita batterica

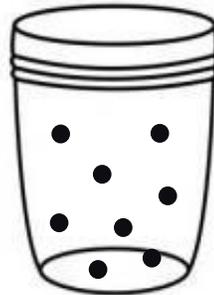


# EFFETTO DELLA DIETA SUL SISTEMA IMMUNITARIO

Somministrazione di probiotici alla dieta



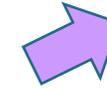
Crusca



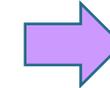
+Probiotico 1



+Probiotico 2



**Mortalità**

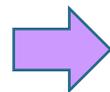


**Espressione AMPs**



**Inibizione crescita batterica**

*T. molitor*



**3 diete**

## CONCLUSIONI

- Colture primarie di emociti aprono nuove possibilità di studio sul sistema immunitario degli insetti ed in particolare sugli insetti vettori
- Possibilità di modulare le risposte immunitarie degli insetti mediante la dieta



Salvaguardare gli  
insetti utili



Affinare le strategie di  
lotta a quelli dannosi

- Necessità di comprendere il destino degli AMPs nella filiera degli insetti come alimento

# Grazie per l'attenzione

