

# INDICE

PARTE GENERALE .....	3
1.Introduzione .....	4
2. Il silenziamento genico .....	8
2.1. Cenni storici .....	9
3. Il meccanismo dell'RNAi .....	11
3.1 Effetti dell'RNAi.....	15
3.1.1 Meccanismo di assorbimento del dsRNA .....	16
3.1.2 Assorbimento tramite endocitosi .....	19
4. L'RNAi sugli insetti.....	21
4.1 Somministrazione di dsRNA tramite iniezione .....	23
4.2 Somministrazione orale/ingestione di dsRNA .....	24
4.3 Somministrazione di dsRNA attraverso l'utilizzo di piante transgeniche .....	26
4.4 Somministrazione di dsRNA attraverso immersione .....	28
4.5 Nuove strategie di somministrazione del dsRNA .....	29
5. RNAi e la genomica funzionale .....	30
5.1 L'RNAi come mezzo di controllo .....	31
6. Utilizzo degli insetti modello nella biologia molecolare .....	35
6.1 Tribolium castaneum (Herbst) .....	36
6.1.1 Generalità .....	36
6.1.2 Morfologia .....	38
6.1.3 Biologia .....	39
6.1.4 Danni .....	41
6.1.5 Utilizzo di Tribolium castaneum nella biologia molecolare .....	42
7. La dinamica delle specie invasive .....	45
7.1 Rhynchophorus ferrugineus (Olivier).....	49
7.1.1 Generalità .....	49
7.1.2 Morfologia .....	50
7.1.3 Biologia .....	52
7.1.4 Danni .....	53
PARTE SPERIMENTALE.....	56
8. Obiettivi della ricerca.....	57
9. Materiali e metodi .....	59
9.1. Allevamento degli insetti .....	59
9.2 Analisi bioinformatiche preliminari .....	60
9.3 Selezione geni target .....	60
9.4 Selezione dei primers.....	62

9.5 Reference genes .....	65
9.6 Estrazione RNA.....	66
9.7 T7 PCR .....	67
9.8 Clonaggio .....	67
9.9 Produzione di dsRNA.....	68
9.10 PCR quantitativa in tempo reale (qPCR) .....	69
9.11 Variazione dell'espressione genica ai diversi stadi di sviluppo.....	69
9.12 Somministrazione di dsRNA a <i>R. ferrugineus</i> .....	70
9.12.1 Iniezione.....	70
9.12.2 Ingestione .....	70
9.13 Biosaggi – <i>R. ferrugineus</i> .....	71
9.14 Somministrazione di dsRNA a <i>T. castaneum</i> .....	72
9.14.1 Iniezione.....	72
9.14.2 Ingestione .....	73
9.15 Biosaggi – <i>T. castaneum</i> .....	73
9.16. Analisi dei dati.....	76
10. Risultati .....	78
10.1. Variazione dell'espressione genica .....	78
10.2 Efficacia dsRNA su <i>R. ferrugineus</i> .....	82
10.2.1. Iniezione.....	82
10.2.3 Ingestione .....	86
10.2.3 Analisi comparativa.....	88
10.3 Efficacia dsRNA su <i>T. castaneum</i> .....	89
10.3.1 Iniezione.....	89
10.3.2 Ingestione .....	90
10.3.3 Analisi comparativa.....	92
10.4 Biosaggi .....	92
10.4.1 Iniezione.....	92
11.4.2 Ingestione .....	94
11. Considerazioni conclusive.....	96
12. Bibliografia .....	102

## **PARTE GENERALE**

## 1.Introduzione

Negli ultimi decenni, l'acquisizione di competenze trasversali e il continuo sviluppo di innovazioni tecnologiche hanno offerto innumerevoli opportunità di crescita in tutti i settori scientifici. In particolare, in quello entomologico hanno permesso di affrontare, con approcci differenti, l'importante problema del controllo degli insetti di interesse agrario e forestale.

I notevoli progressi nel campo delle biotecnologie hanno aperto nuovi scenari sia nel controllo degli artropodi parassiti, sia nell'impiego degli insetti come risorsa. Un ruolo chiave è stato svolto dallo sviluppo della genetica inversa, nella quale si deduce la funzione del gene dagli effetti provocati dalla manipolazione del gene stesso, che ha permesso lo studio delle funzioni biologiche delle proteine. Particolare interesse, all'interno della genetica inversa, ha destato la scoperta del silenziamento genico post-trascrizionale (*Post-transcriptional gene silencing* PTGS): un meccanismo naturale utilizzato da piante ed animali per sopprimere l'attività genica a livello dell'RNA messaggero (mRNA). Tale meccanismo ha offerto anche un sistema potente con il quale correlare i geni alle loro funzioni biochimiche e di sviluppo (Mello & Conte, 2004): l'RNA *interference* (RNAi). Questo è un meccanismo di silenziamento genico altamente conservato tra gli eucarioti che implica la sintesi di RNA a doppio filamento (dsRNA) per generare i siRNAs (*short interfering RNAs*) grazie ad una proteina Rnasi III- simile, chiamata Dicer (Hammond *et al*, 2000).

L'RNAi è diventata ad oggi una delle tecnologie più innovative sia per lo sviluppo di studi di genomica funzionale ma anche come un potenziale

strumento, utile per lo sviluppo di nuove metodologie finalizzate alla protezione delle colture contro insetti dannosi.

La sfida maggiore per un efficiente controllo di insetti mediante *RNAi* in campo è quella di trovare metodi efficienti e affidabili per la produzione e somministrazione di RNA a doppia elica (dsRNA). Ricerche recenti hanno dimostrato che l'*RNAi* può verificarsi negli insetti, sebbene con efficacia variabile da specie a specie. La regolazione dell'espressione genica, attraverso il trasferimento di dsRNA negli insetti, può indurre, attraverso una vasta gamma di alterazioni fenotipiche, persistenza a livello sistemico e interferenza con i processi di sviluppo e metabolici, la loro mortalità (Fire *et al.*, 1998).

Sebbene la metodologia che utilizza l'iniezione intra-addominale di dsRNA sia stata considerata, fino ad oggi, la più efficace per provocare *RNAi* negli insetti (Dzitoyeva *et al.*, 2001) è stato dimostrato che in alcune specie la somministrazione orale di dsRNA sia in grado di provocare, parimenti, effetti di *RNAi* (Whyard *et al.*, 2009; Timmons *et al.*, 1998).

Inoltre, è stato dimostrato che l'introduzione di dsRNA di insetti in piante transgeniche sia in grado di produrre effetti di *RNAi* su insetti di ordini differenti (Price and Gatehouse, 2008).

Colture transgeniche resistenti agli insetti, che esprimono le tossine *Bacillus thuringiensis* (Bt) sono già ampiamente usate in agricoltura a livello mondiale, e, nonostante la polemica che circonda l'introduzione di piante geneticamente modificate in pieno campo, questo deve essere considerato come uno dei maggiori successi della "prima generazione" di ingegneria genetica vegetale (Toenniessen *et al.*, 2003).

Tuttavia, questa tecnologia è stata distribuita a livello commerciale per proteggere le colture soltanto contro alcuni lepidotteri e coleotteri, escludendo, in alcuni casi, molte importanti specie di insetti ugualmente esiziali. Ad esempio per alcuni ditteri parassiti, tossine efficaci di Bt sono già disponibili, ma problemi tecnici hanno impedito la produzione di questa tipologia di piante transgeniche; in altri casi, come ad esempio per alcuni rincoti emitteri, non è stata ancora trovata nessuna tossina Bt con effetti insetticidi tali da garantire un adeguato grado di protezione (Mao *et al.*, 2007; Baum *et al.*, 2007). La soppressione di espressione di geni specifici negli insetti tramite *RNAi* offre la possibilità di una protezione efficace e altamente specie-specifica contro ogni specie, in quanto è possibile silenziare geni di ogni tipo, necessari per la sopravvivenza, la crescita, lo sviluppo, la riproduzione, o la capacità di alimentarsi. La minaccia che da sempre gli insetti hanno rappresentato per la produzione agricola e la conservazione del cibo, ha da incessantemente afflitto l'umanità nel corso della storia. La ricerca in entomologia applicata, di conseguenza, si è prevalentemente concentrata sullo sviluppo di strategie e tecniche per il controllo degli insetti in modo efficiente. Poiché tuttavia è noto e comprovato che alcuni artropodi predatori e i parassitoidi sono importanti alleati nella lotta contro entomi parassiti o vettori, e che altri insetti utili, come gli impollinatori, svolgono un ruolo economicamente importante, risulta evidente la necessità di adottare metodologie e misure di controllo selettive che risultino essere sostenibili e rispettose dell'ambiente. L'obiettivo della ricerca è dunque quello di dimostrare come le scoperte scientifiche in biologia molecolare quali ad esempio l'utilizzo di *RNAi* su

insetti vettori o parassiti, possano essere utilizzate per ampliare le conoscenze sui genomi degli insetti, non sottovalutando eventuali aspetti applicativi, utili per la gestione e la lotta di entomi esiziali per piante, colture e derrate alimentari.

## 2. Il silenziamento genico

Prima che l'*RNAi* fosse ben caratterizzata, i diversi fenomeni di silenziamento genico legati all'RNA venivano indicati con nomi differenti, quali ad esempio, co-soppressione dell'espressione genica, silenziamento genico indotto da virus e silenziamento genico post-trascrizionale o transgenico.

Solo in un seguito ad una più chiara comprensione del processo, è stato possibile capire come questi fenomeni fossero in realtà espressione del medesimo meccanismo.

Nonostante ciò, il fenomeno è comunque ad oggi noto con nomi differenti a seconda dei diversi regni del vivente: PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) nelle piante, *quelling* nei funghi e *RNAi* (*RNA interference*) negli animali.

La scoperta dell'*RNA interference* (*RNAi*), nel quale il dsRNA interrompe la trasmissione dell'RNA messaggero, ha avuto un enorme impatto nella genetica evolutiva, permettendo lo studio dello spegnimento di funzioni fenotipiche in organismi dove le analisi genetiche classiche risultavano laboriose o impossibili (Philip & Tomoyasu, 2011). L'*RNAi* rappresenta un enorme risorsa anche per quanto riguarda l'entomologia applicata (Price and Gatehouse, 2008; Xue *et al.*, 2012). Tuttavia il potenziale dell'*RNAi* rimane ad oggi ancora parzialmente inespresso, poiché vi è la consapevolezza che l'efficacia di questa metodologie può variare notevolmente in relazione all'insetto target selezionato, al gene, al metodo di somministrazione, alla dose utilizzata e perfino tra procedure sperimentali che utilizzano il medesimo protocollo (Terenius *et al.*, 2011).



## ***2.1. Cenni storici***

I primi studi sul silenziamento genico risalgono al 1990 (Napoli *et al.*, 1990). Alcuni ricercatori, nel tentativo di intensificare il colore viola dei petali di petunie tramite un'espressione genica potenziata del gene calcione-sintetasi (CHS), coinvolto nella via metabolica delle antocianine e quindi responsabile dell'intensità del colore dei petali della pianta, contrariamente alle aspettative, ottennero una pigmentazione inspiegabilmente ridotta del 40% nelle petunie transgeniche, che divennero addirittura più chiare con una ridotta espressione del gene endogeno oltre che del transgene (co-soppressione).

Analogamente, pochi anni dopo, un'osservazione simile venne rilevata da alcuni virologi vegetali, che, ricercando meccanismi di resistenza delle piante contro i virus, osservarono come inspiegabilmente, sia le piante a cui erano state iniettate proteine sia le piante aventi solo brevi frammenti degli RNA codificanti per quelle proteine, erano capaci di rendere le piante tolleranti o resistenti alle infezioni virali. Essi conclusero che tali molecole di RNA fossero in grado di attaccare i virus, inibendone la replicazione e la diffusione attraverso la pianta. Agendo in senso inverso, provarono in seguito ad introdurre brevi sequenze geniche all'interno dei virus che infettano piante. Allo stesso modo, in seguito all'infezione con questi virus, le piante non erano più in grado di produrre proteine da quegli specifici geni. I ricercatori chiamarono questo fenomeno silenziamento genico indotto da virus (o VIGS, dall'inglese *virus-induced gene silencing*). I fenomeni individuati fino a questo punto furono denominati silenziamento genico post-trascrizionale (Dehio & Shell, 1994).

Il meccanismo molecolare rimase comunque poco chiaro fino a quando nel 1998, i due scienziati americani Andrew Fire e Craig C. Mello ripetettero l'esperimento iniettando dsRNA all'interno del nematode *Caenorhabditis elegans*, e riscontrando un potente effetto di silenziamento. Fu in questa occasione che il termine RNA *interference* (RNAi) venne definitivamente adottato per indicare il fenomeno (Fire *et al.* 1998).

### 3. Il meccanismo dell'RNAi

Il termine *RNAi* si riferisce alla soppressione di espressione genica attraverso piccole molecole di RNA non codificanti, che avviene principalmente attraverso lo sfaldamento dell'RNA messaggero *target* tramite una sequenza specifica (Fire *et al.*, 1998).

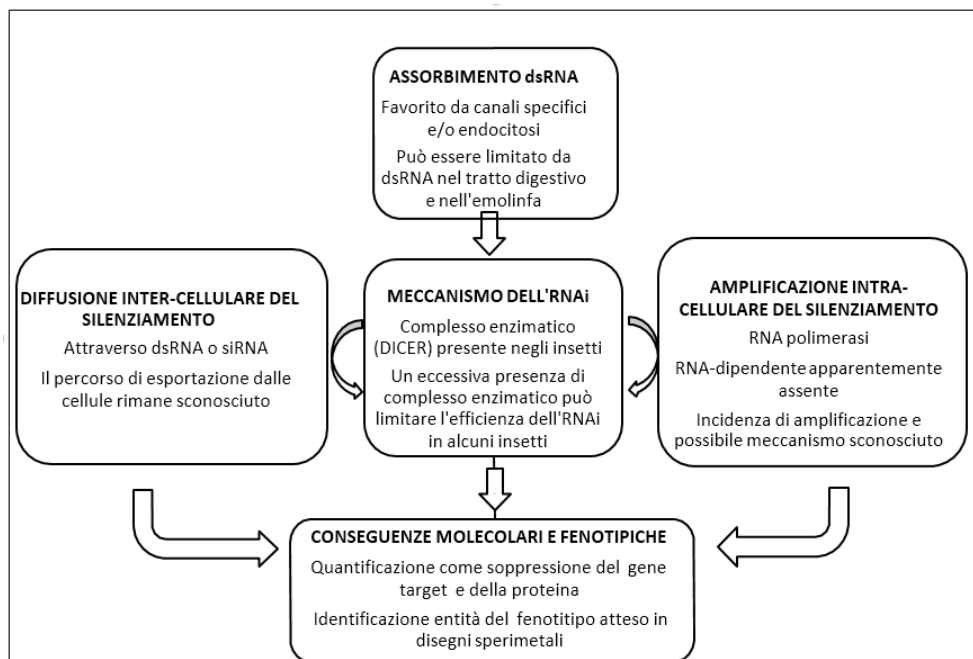


Fig.1- Il processo schematico dell'RNAi negli insetti (Scott *et al.*, 2013)

Subito dopo l'ingresso nella cellula, il dsRNA viene scomposto attraverso l'enzima RNase III Dicer in frammenti più piccoli di 20-25 bp (RNAs) con due basi sporgenti in posizione 3'. Questi frammenti vengono incorporati dal complesso enzimatico Risc (RNA induced silencing complex) nel quale un filamento dell'RNA viene eliminato (denominato "passeggero") e l'altra metà (detta "guida") è mantenuta.

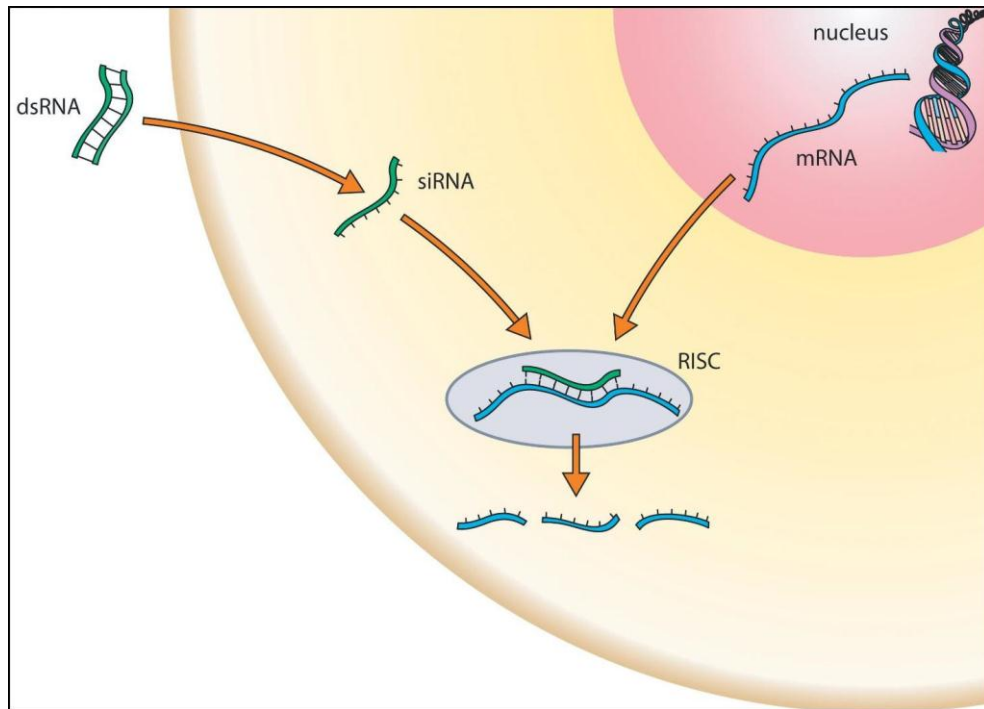


Fig.2-il meccanismo dell'RNAi (Robinson, 2004)

Il componente catalizzatore del Risc è il dominio RNase H-like della proteina Argonauta, la quale individua molecole di RNA a singola elica aventi sequenze complementari a quelle dell'RNA guida. Molti eucarioti, inclusi animali e piante, possiedono le proteine Argonauta e Dicer e hanno la capacità intrinseca di compiere l'intero processo dell'RNAi (Shabalina & Koonin, 2008). I piccoli frammenti di RNAs (*short RNA*) generati attraverso il Dicer comprendono diverse tipologie (Ghildiyal & Zamore, 2009; Matranga & Zamore, 2007; Asgari, 2013). Per gli insetti esistono, infatti, due classi principali di piccoli frammenti di RNA non codificanti (sRNAs): microRNA (miRNA) i quali sono processati attraverso la trascrizione di geni endogeni e *short interfering RNA* (siRNA), i quali derivano da molecole di dsRNA e provvedono in natura a difendere l'organismo da virus e altre minacce. Anche se la biogenesi dei miRNA e siRNA differisce nel modo in cui agiscono nel meccanismo dell'RNAi, entrambi hanno elementi comuni. Infatti ambedue (miRNA e siRNA) derivano da frammenti a doppia elica più

grandi di RNAs (piccoli frammenti di dsRNA) processati dall'enzima Ribonucleasi III e dall'enzima Dicer ed entrambi appartengono dalla famiglia delle proteine Argonata (Ketting, 2011). Queste diventano in seguito parte integrante del complesso enzimatico Risc, capace di indurre l'RNAi, il quale è in grado a sua volta, di regolare l'espressione genica.

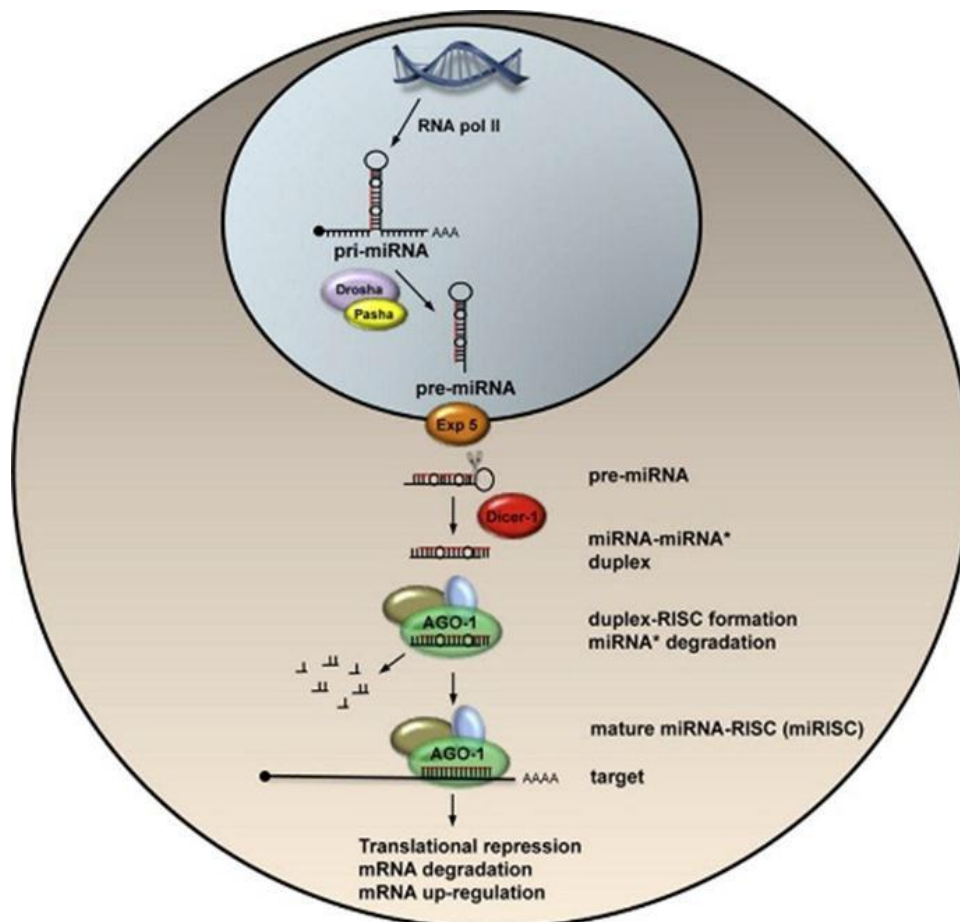


Fig.3-Percorso canonico di biogenesi dell' miRNA (Asgari, 2013)

I processi che determinano l'effetto di spegnimento dell'espressione genica generato dall'RNAi sono tre: (i) produzione e somministrazione cellulare delle molecole di RNAi (denominato anche dsRNA), (ii) produzione di molecole di dsRNA secondarie all'interno delle cellule e (iii) il trasferimento di queste molecole in altre cellule.

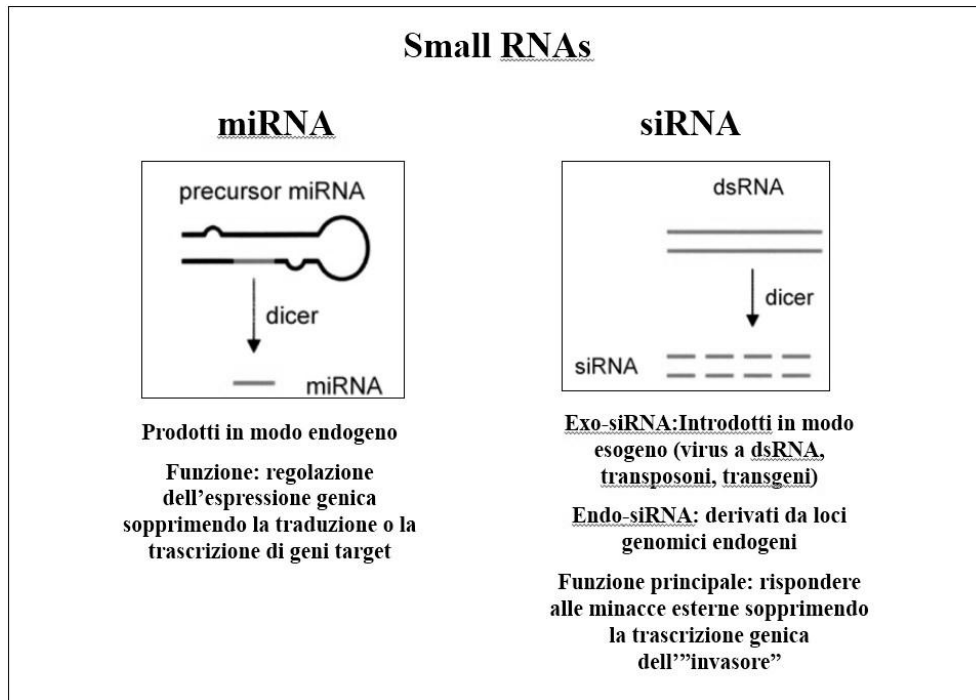


Fig.4- *Differenti tipologie di RNAs*

Nei casi in cui l'RNAi è in grado di essere trasmesso ovunque all'interno dell'organismo target, viene descritto come sistemico (Whangbo and Hunter, 2008; Huvenne and Smagghe, 2010). Sebbene assai complesso, l'intero processo di RNAi, può essere schematicamente suddiviso in tre momenti fondamentali:

(i) in un primo step una lunga catena di dsRNA, espressa naturalmente o introdotta all'interno della cellula, viene suddivisa in frammenti più piccoli di RNA a doppia elica (ssRNA) attraverso l'enzima Dicer; (ii) questo ssRNA è poi svolto attraverso un elicasi e una delle due eliche, la quale funge da guida, viene inserita all'interno del complesso Risc; (iii) il Risc a sua volta, diretto dall'RNA guida, individua l'RNA messaggero (mRNA) contenente le sequenze nucleotidiche complementari alla guida e legandosi ad esse blocca il passaggio del mRNA target e di conseguenza l'espressione genica (Winter *et al.*, 2009).

### 3.1 Effetti dell'RNAi

Per evitare confusione, quando si parla circa i differenti meccanismi coinvolti nell'RNAi, è possibile fornire alcune definizioni in maniera chiara. A tal proposito è possibile utilizzare le definizioni proposte da Whangbo e Hunter (2008) per discutere il meccanismo dell'RNAi.

Il meccanismo dell'RNAi può essere diviso in RNAi cellula-indipendente e RNAi cellula- dipendente.

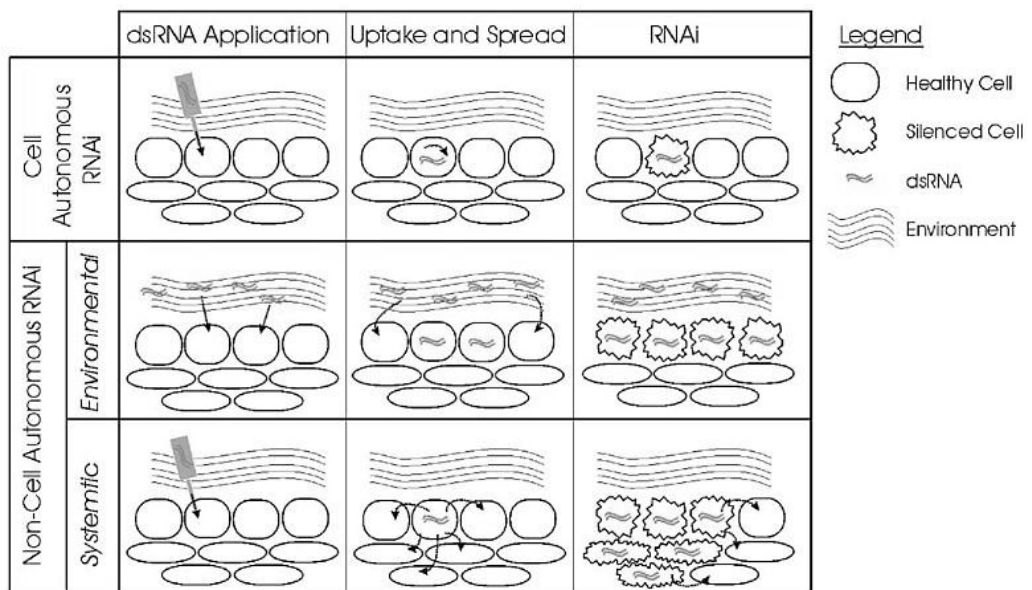


Fig.5-Riassunto schematico dei differenti tipi di RNAi (Huvenne & Smaghe, 2010)

Come il nome suggerisce, nel caso di RNAi cellula-indipendente, il processo di silenziamento è limitato alla cellula nella quale il dsRNA viene introdotto o espresso. Il meccanismo cellula- indipendente è quello più conosciuto: il dsRNA viene scisso da una RNase chiamata Dicer in corti frammenti di RNA (siRNA) i quali vengono a loro volta incorporati nel complesso enzimatico chiamato Risc che, una volta trovato il frammento omologo nell'RNA messaggero (mRNA) lo taglia, ostacolando in tal modo l'espressione genica (Meisterand Tuschl 2004; Fire 2007, Jinek & Doudna 2009, Siomi & Siomi 2009). In caso di RNAi cellula-dipendente invece, il

silenziamento ha effetto in zone, tessuti e cellule differenti dalla zona di somministrazione o produzione del dsRNA.

Ci sono due differenti tipologie di RNAi cellula-dipendente: RNAi ambientale e RNAi sistemico. L'RNAi ambientale viene descritto come il processo nel quale il dsRNA viene assorbito nella cellula dall'ambiente. Questo processo può essere osservato anche in organismi unicellulari. L'RNAi di tipo sistemico invece può avvenire solamente in organismi pluricellulari poiché esso include processi nei quali il silenziamento viene veicolato da una cellula ad un'altra o da un tipo di tessuto ad un altro. Negli organismi pluricellulari l'RNAi ambientale può essere seguito dall'RNAi sistemico e l'RNAi cellula-dipendente sarà sempre seguito dall'RNAi cellula-indipendente (Huvenne & Smaghe,2010). L'RNAi cellula-indipendente è principalmente utilizzato su piante e organismi modello, sugli insetti, viene invece generalmente utilizzato l'RNAi cellula-dipendente.

### 3.1.1 Meccanismo di assorbimento del dsRNA

Il meccanismo di assorbimento del dsRNA negli insetti non è ancora del tutto chiaro. Studi effettuati su *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* (Meigen) hanno rivelato almeno due differenti tipologie di assorbimento (Tomoyasu *et al.*, 2008; Winston *et al.*, 2002).

Gli effetti dell'RNAi nel corpo degli insetti sono determinati dalla diffusione delle molecole dell'RNAi sistemico. In piante e nematodi l'RNAi è sistemico e si diffonde attraverso l'intero organismo, viaggiando tra le cellule (Fire *et al.*,1998; Newmark *et al.*, 2003). Tuttavia, per quanto riguarda gli insetti, questo non è sempre vero. Per esempio cellule fluttuanti nell'organismo possono assorbire il dsRNA ed impedirne la diffusione (Saleh *et al.*, 2006).



In *C. elegans* geneticamente modificato, è stata identificata un'alterazione nella risposta sistemica somministrando dsRNA oralmente. Il gene in questione è stato identificato come una proteina costitutiva dell'RNAi sistemico, SID-1, gene essenziale per veicolare l'effetto dell'RNAi sistemico in *C.elegnas* (Feinberg & Hunter, 2003). Studi effettuati sul gene mutante SID hanno portato alla scoperta di due proteine coinvolte nel processo di RNAi cellula-dipendente. SID-1 è una proteina transmembrana espressa sulla superficie cellulare, con lo scopo di mediare l'effetto dell'RNAi sistemico (Winston *et al.*,2002). La proteina, espressa come già detto sulla superficie cellulare, agisce come un canale, consentendo il passaggio del dsRNA tra una cellula e l'altra e permettendo quindi l'assorbimento dello stesso. Il suo funzionamento è probabilmente strettamente correlato alla proteina SID-2, deputata al trasporto passivo del dsRNA nelle cellule di *C. elegans*. Analogamente, sono stati rinvenuti geni simili a SID-1 in alcune specie di insetti, quali ad esempio *Tribolium castaneum* (Herbst), *Bombix mori* (Linnaeus), *Apis mellifera* (Linnaeus) (Xu & Han, 2008) ed alcuni afidi (Huvenne & Smagghe, 2010). Non è stato ancora in alcun modo dimostrato invece se il gene SID-1, sebbene presente in molti insetti, svolga o meno la medesima funzione. Studi effettuati su *D. melanogater* hanno dimostrato che, in questo insetto è del tutto assente un RNAi di tipo sistemico, carenza attribuibile per l'appunto alla mancanza di un SID-1 endogeno nel genoma dell'insetto (Roignant *et al.*, 2003).

Prove eseguite su colture cellulari di *Drosophila* spp, hanno mostrato un'espressione della proteina SID- 1, che facilitavano l'assorbimento del dsRNA (Feinberg & Hunter,2003). Analogamente un comportamento simile

è stato riscontrato anche sulla locusta del deserto, *Schistocerca gregaria* (Forskål) (Dong & Friedrich, 2005) *Bombix mori* (Linnaeus) e *Epiphyas postvittana* (Walker) (Turner *et al.*, 2006). Nonostante alcuni risultati mostrino un coinvolgimento del gene SID-1 nel processo di assorbimento del dsRNA negli insetti, analisi filogenetiche e studi funzionali non supportano in alcun modo queste teorie, come ad esempio sul coleottero *T. castaneum* (Tomoyasu *et al.*, 2008). Pertanto, il processo per la piena comprensione del meccanismo di diffusione del dsRNA negli insetti rimane ad oggi ancora oggetto di studio. Altri esperimenti condotti utilizzando nematodi geneticamente modificati (*C. elegans*) hanno evidenziato come essi erano maggiormente in grado di mediare la risposta dell'RNAi se nutriti con batteri che esprimevano dsRNA specifici. Questo prodotto genico (SID-2) è una proteina transmembrana specifica dell'intestino, in grado di facilitare l'assorbimento dell'RNAi ambientale (Winston *et al.*, 2007).

La proteina SID-2 svolge la propria funzione esclusivamente nella diffusione del dsRNA dall'ambiente all'organismo e pertanto non viene direttamente coinvolta nella diffusione sistemica dell'RNAi (Winston *et al.*, 2007). Oltre a SID-2 sono state identificate altre tre proteine di trasporto di membrana (RSD-2, RSD-3, e RSD-6) in altri tessuti degli insetti (ad esempio, gonadi e ghiandole salivari) come possibili mediatori nel processo di assorbimento del dsRNA (Jose & Hunter, 2007). La proteina SID-2 è localizzata nelle pareti intestinali, facilitando probabilmente l'assorbimento del dsRNA ingerito dall'intestino. Tuttavia SID-2 da sola non è in grado di assorbire tutto il dsRNA dal lume intestinale come nel caso di SID-1 mutanti, capaci di assimilare anche dsRNA ambientale. Pertanto è possibile asserire che, la

proteina SID-2 da sola non è sufficiente e può avere solo un ruolo complementare rispetto a SID-1, svolgendo principalmente funzione di trasporto attraverso la membrana (Winston *et al.*, 2007).

Sono state ipotizzate diverse teorie di correlazione fra le due proteine, sebbene nessuna sia ancora definitivamente accreditata: (i) la proteina SID-2 modifica la proteina SID-1 per attivare il trasporto del dsRNA; (ii) la proteina SID-2 si lega al dsRNA ambientale e lo consegna alla proteina SID-1; (iii) la proteina SID-2 veicola il dsRNA tramite endocitosi, dove SID-1 lo trasporta poi nel citoplasma (Whangbo & Hunter, 2008). Ulteriori studi si renderanno necessari per la piena comprensione del fenomeno.

### 3.1.2 Assorbimento tramite endocitosi

Studi effettuati su *D. melanogaster* in cellule S2, cellule estremamente adatte per l'analisi dei processi cellulari derivanti da colture cellulari di frammenti embrionali (Schneider, 1972), hanno evidenziato la capacità di assorbire dsRNA tramite endocitosi mediata da recettori attivi.

L'inibizione farmacologica delle vie endocitiche è in grado di interrompere l'ingresso del dsRNA esogeno, inibendo di fatto il silenziamento genico. Esperimenti successivi che hanno coinvolto la H<sup>+</sup>-ATPasi vacuolare, hanno ulteriormente rafforzato l'ipotesi dell'assorbimento endocitico del dsRNA negli insetti. In *D. melanogaster* ed altri insetti, carenti della proteina SID-1, l'endocitosi sembra dunque facilitare l'assorbimento cellulare (Whyard *et al.*, 2009). Oltre a limitare gli effetti dell'RNAi, l'inibizione farmacologica dell'endocitosi in *C. elegans* si traduce anche nello "spegnimento" dell'assorbimento endocitico, causando nei nematodi una perdita di funzioni fenotipiche. Questo implica che nelle colture cellulari S2 di

*D.melanogater* non è in alcun modo coinvolto un meccanismo SID-1 ma, molto più banalmente, sono coinvolti nel processo di assorbimento recettori che regolano l'endocitosi cellulare (Saleh *et al.*, 2006 ).

Sembra infatti che, l'endocitosi mediata dai recettori sia un meccanismo di assorbimento del dsRNA alquanto comune, e potrebbe essere utilizzato anche in altre classi di insetti. Se infatti l'endocitosi mediata da recettori, fosse come si pensa un meccanismo diffuso di assorbimento del dsRNA, allora potrebbe essere relativamente semplice mirare allo spegnimento di geni vitali per gli insetti dannosi attraverso un efficace somministrazione orale di dsRNA. Una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari che aiutino a capire come l'RNA si diffonde sistemicamente all'interno dell'organismo dell'insetto, faciliterebbe l'applicazione della tecnologia dell'RNAi per il controllo dei parassiti.

#### 4. L'RNAi sugli insetti

L'RNAi è utilizzata in natura come uno dei maggiori meccanismi di difesa in piante e insetti (Matranga & Zamore, 2007; van Rij & Berezikov, 2009). Negli insetti in particolare, l'RNAi, attraverso siRNA, è considerata essere parte innata del loro sistema immunitario (van Rij & Berezikov, 2009). Il dsRNA che viene invece fornito agli insetti in maniera esogena, deve invece essere somministrato tramite iniezione o nutrimento (Roether & Meister, 2011).

Gli esperimenti che inizialmente furono condotti sul nematode *C. elegans*, dimostrarono come il dsRNA fosse in grado di degradare mRNA specifico bloccando l'espressione genica, introducendo l'utilizzo dell'RNAi come strumento per identificare la funzione genica (Roether & Meister, 2011).

L'effetto dell'RNAi può essere ottenuto in *C.elegans* anche solo immergendo il nematode nel dsRNA, nutrendolo con dsRNA o semplicemente iniettando dsRNA all'interno del suo organismo. In tutti i casi l'effetto dell'RNAi per questo animale è sistemico ma anche transiente, dimostrando come il silenziamento genico possa verificarsi ovunque e anche come il dsRNA sia in grado di innescare il fenomeno dell'RNAi attraverso un vettore RNA-dipendente RNA polimerasi (RdRp). La situazione appare invece abbastanza differente negli insetti dal momento che in essi non è presente un RdRp endogeno. Il nematode *C. elegans* e le piante possiedono questa RdRp che facilita la diffusione del silenziamento cellulare (Pak & Fire, 2007; Xie *et al.*, 2001).

In assenza di un RdRp infatti, il dsRNA negli insetti può non essere amplificato e per essere efficace, deve essere iniettato direttamente nelle

cellule e nei tessuti dove si desidera effettuare la soppressione dell'espressione genica. Un efficiente RNAi sistemico necessita anche di un sistema per amplificare il dsRNA iniziale e trasportarlo successivamente nei differenti tessuti dell'organismo (Huvenne & Smaghe, 2010). Il primo componente si basa sulla funzione dell'enzima RdRp, che come già accennato in precedenza, è molto più presente nelle piante e nel nematode *C. elegans*, nei quali è in grado di generare "siRNA secondario" che può ampiamente sostenere e amplificare la reazione dell'RNAi (Carthew & Sontheimer, 2009). Rispetto a *C. elegans*, in *Tribolium* sp manca un meccanismo robusto di RNAi sistemico (Tomoyasu *et al.*, 2008). Sebbene in *Tribolium* sp manchi qualcosa di simile all'RdRp, tuttavia il segnale di amplificazione atteso può basarsi su geni differenti che svolgono attività simili o magari con differenti meccanismi. Questo porta all'ovvia conclusione che sebbene il dsRNA possa inibire l'espressione genica negli insetti, esso non può agire in maniera continuativa, come nei nematodi (Araujo *et al.*, 2007; Tomoyasu *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2006).

Con la possibilità di acquisire conoscenze atte a incrementare gli strumenti molecolari per la trasformazione di *D. melanogaster*, sono state sviluppate differenti tipologie di vettori con lo scopo di poter somministrare in maniera efficiente molecole di RNAi come trans-geni.

I vettori che provvedono alla formazione di introni con giunzioni a forcilla hanno dimostrato di essere più efficaci rispetto a RNAs ad anello. Questa differenza può riflettersi sull'efficienza relativa delle diverse tecniche di RNAi in *D. melanogaster* e in altri insetti. La posizione d'inserimento che il dsRNA occupa nel genoma ospite sembra infatti essere assai importante,

in quanto i vettori capaci di integrazione sito-specifica hanno dimostrato di generare livelli più alti di RNAi rispetto a quelli non specifici (Roether & Meister, 2011).

A causa comunque del limitato numero di specie di insetti transgenici e della difficoltà applicativa che trasformazioni di questo tipo possono riscontrare, la produzione di una risposta di tipo sistemico negli insetti è molto spesso ottenuta generalmente tramite la somministrazione diretta di dsRNA a cellule e tessuti tramite micro-iniezioni. Sebbene il metodo delle micro-iniezioni sia il più diffuso e generalmente quello più efficiente, non è l'unico sistema utilizzato. Diversi sistemi sono stati studiati e testati in differenti gruppi di organismi (Terenius *et al.*, 2011). I principali metodi testati includono: iniezione, ingestione, immersione e utilizzo di piante transgeniche.

#### ***4.1 Somministrazione di dsRNA tramite iniezione***

Durante i primi anni di ricerca, l'iniezione o micro-iniezione direttamente su diversi tessuti e su differenti stadi di sviluppo dell'insetto, è stata utilizzata con successo come un promettente primo approccio agli effetti generati dall'RNAi (Bettencourt *et al.*, 2002; Quan *et al.*, 2002). Il dsRNA viene sintetizzato di volta in volta, a seconda del gene target sul quale si intende agire e, successivamente, iniettato nell'emocele dell'insetto (Dzitoyeva *et al.*, 2001).

Il principale vantaggio derivante dall'iniezione intra-addominale è l'elevata efficienza che si ottiene nell'inibire l'espressione genica. L'iniezione, infatti, ha la prerogativa di raggiungere immediatamente il tessuto bersaglio o l'emolinfa, apportando nell'organismo con immediatezza un quantitativo ben noto di dsRNA, a differenza di quanto accade con i metodi a immersione

e in alcuni casi con la somministrazione orale (Yu *et al.*, 2013). Tuttavia questo metodo presenta anche alcuni svantaggi, come ad esempio l'elevata precisione nell'iniezione che viene richiesta in alcuni casi e il tempo necessario ad effettuare le iniezioni individuo per individuo.

Il metodo di somministrazione del dsRNA attraverso iniezione può compromettere l'esito delle sperimentazioni a causa dello stress che l'iniezione può causare all'insetto o all'alta percentuale di morti accidentali, dovute a lesioni di organi interni. Inoltre il danno cuticolare causato durante l'iniezione, stimolando il sistema immunitario, complica ulteriormente l'interpretazione dei dati (Hanet *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2013).

#### **4.2 Somministrazione orale/ingestione di dsRNA**

La somministrazione orale di dsRNA è stata testata per la prima volta su *C. elegans* (Timmons & Fire, 1998) e successivamente provata anche su altre specie di insetti. L'RNAi in *C. elegans* è stato osservato per la prima volta nutrendo i nematodi con batteri in grado di esprimere grandi quantità di dsRNA (Yang *et al.*, 2010). Il metodo che prevede la somministrazione orale di dsRNA è tanto interessante quanto conveniente poiché trattandosi della tecnica di introduzione del dsRNA che più si avvicina alla normale etologia dell'artropode (Chen *et al.*, 2010), simula al meglio il normale nutrimento e azzera i rischi di danni fisici agli insetti. La somministrazione orale del dsRNA è vantaggiosa anche in termini di costi-benefici, nel risparmio di tempo e di lavoro e nella facilità dell'esecuzione (Tian *et al.*, 2009). Il metodo è meno invasivo e più pratico soprattutto su piccoli insetti come gli afidi e sui primi stadi larvali, neanidi e ninfe (Tian *et al.*, 2009; Timmons & Fire, 1998). La somministrazione orale di dsRNA sembra essere



il metodo più pratico poiché si utilizza una naturale apertura dell'insetto (cavità orale). Questo metodo inoltre è performante per le prove da condurre in pieno campo, rendendo possibile l'applicazione di questa tecnologia per il controllo degli insetti dannosi.

I primi studi di RNAi effettuati su insetti utilizzando la somministrazione orale non hanno dato effetti significativi di riduzione dell'espressione genica, che si sono rivelati essere in genere sensibilmente inferiori ai test eseguiti utilizzando l'iniezione intra-addominale (Rajagopal, *et al.*, 2002). Ad esempio, il gene dell'aminopeptidasi, espresso nello stomaco del lepidottero *Spodoptera littoralis* (Boisduval), veniva efficacemente silenziato tramite iniezione, invece la somministrazione orale non aveva alcun effetto di silenziamento genico. Ulteriori studi effettuati utilizzando la somministrazione di dsRNA tramite ingestione hanno poi rivelato che questo metodo può essere comunque efficace in molte specie di insetti, compresi emitteri, lepidotteri e coleotteri (Mao *et al.* 2007). Ad esempio, la somministrazione orale di dsRNA per inibire il gene carbossilesterasi EposCXE1 a larve di *Epiphyas postvittana* (Walker) ha mostrato un significativo decremento dell'espressione genica (Turner *et al.*, 2006). Il processo dell'RNAi si mantiene ben conservato negli insetti e la somministrazione orale può potenzialmente rappresentare una buona strategia di controllo, dato che una buona percentuale di insetti sono stati rinvenuti suscettibili (Belles, 2010). Sebbene l'RNAi tramite ingestione sia un fenomeno possibile e diffuso negli insetti, l'effetto non è universale e ci sono sensibili variazioni di efficacia tra i differenti *taxa* (Whangbo & Hunter, 2008). Un'altra metodologia utilizzabile per la somministrazione orale di dsRNA

è quella di fornire il nutrimento tramite gocce come descritto da Turner *et al.* (2006) dove larve al terzo stadio di sviluppo del tortrice *E. postvittana* sono state nutrite dopo 48h di affamamento con dsRNA per silenziare il gene della carbossilesterasi (CXE1) responsabile negli adulti della produzione del gene Epos PBP1. Il silenziamento di questo gene ha evidenziato l'esistenza di un RNAi sistemico in *E. postvittana* e la possibilità di persistenza del dsRNA durante tutta la durata del ciclo vitale dell'insetto, da larva ad adulto.

I meccanismi associati alla somministrazione di dsRNA tramite nutrimento hanno comunque bisogno di ulteriori perfezionamenti e indagini. Le modalità di somministrazione del dsRNA potrebbero ad esempio essere modificate rivestendo il dsRNA per facilitarne l'assorbimento nell'intestino o potrebbe essere modificata l'efficienza del silenziamento genico, come testato nella somministrazione di siRNA in cellule e tessuti di mammiferi (Kurreck, 2009). Il rivestimento del dsRNA potrebbe altresì svolgere importanti funzioni di protezione da nucleasi endogene di alcuni insetti. Inoltre il rivestimento potrebbe anche essere utile a proteggere il dsRNA da agenti esterni in formulazioni a spruzzo, ideate per essere irrorate su parti aeree di talune piante.

#### ***4.3 Somministrazione di dsRNA attraverso l'utilizzo di piante transgeniche***

Uno dei metodi più promettenti per la somministrazione del dsRNA è l'utilizzo di piante transgeniche (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007). In seguito allo sviluppo della tossina *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) su piante transgeniche, sono stati ottenuti risultati positivi e un effettivo controllo su alcuni lepidotteri (Naranjo, 2011). Tuttavia è bene ricordare che altri insetti fitomizi come afidi e aleurodi hanno rapidamente preso il sopravvento poiché la tossina *Bt*

non ha alcun effetto insetticida di queste specie di parassiti (Gatehouse & Price, 2011). Questo sottolinea l'urgente necessità di sviluppare tale metodologia in modo da renderla efficace anche per altre specie di insetti come ad esempio gli Emitteri, insetti altamente dannosi a livello mondiale, che causano, direttamente e indirettamente, milioni di dollari di danni in agricoltura ogni anno (Backus *et al*, 2005). Gli studi per creare piante transgeniche in grado di produrre dsRNA efficace contro Lepidotteri, Coleotteri ed Emitteri stanno infatti diventando sempre più comuni (Mao *et al.*, 2007). Il vantaggio principale nell'utilizzo di questa metodologia è la produzione di dsRNA continuo e stabile nel tempo. Ad esempio, Mao *et al.* (2011) in uno dei loro lavori hanno creato piante di cotone in grado di produrre dsRNA. Le larve di *Helicoverpa armigera* (Hübner) allevate su queste piante hanno mostrato un notevole ritardo nello sviluppo e le piante transgeniche apparivano meno danneggiate dagli insetti rispetto al controllo. Le analisi effettuate tramite Real Time PCR (qPCR) hanno mostrato come il livello di espressione genica del gene CYP6AE14 apparisse già ridotto dopo 4 ore dall'inizio dell'alimentazione su piante transgeniche (Chen *et al.*, 2010). Nelle piante transgeniche utilizzate è molto importante che il tasso di produzione di dsRNA sia più veloce rispetto al tasso di degradazione, poiché in passato, diversi tentativi con approcci simili hanno fallito perché sono state generate piante transgeniche con un quantitativo insufficiente di RNA trascrizionale prodotto.

#### ***4.4 Somministrazione di dsRNA attraverso immersione***

L'immersione di un organismo in una soluzione contenente dsRNA è un metodo abbastanza semplice per innescare il fenomeno dell'RNAi (Tabara *et al.*, 1998). Il primo esperimento di questo tipo fu condotto immergendo il nematode *C. elegans* in una soluzione contenente dsRNA. Il risultato ottenuto fu simile per efficienza a quello ottenuto tramite ingestione. Questa tecnica è stata in seguito utilizzata su questo organismo per effettuare analisi di funzionalità genica (Maeda *et al.*, 2001). É bene comunque ricordare che l'utilizzo di questa metodologia è più performante su singole cellule rispetto all'utilizzo di organismi interi, a causa di alcune barriere fisiche come ad esempio la cuticola dell'insetto. L' immersione di cellule S2 di *D. melanogaster* in una soluzione contenente dsRNA per i geni CycE (Cyclin E) e AGO (argonaute RISC catalytic component) ha mostrato un efficace riduzione dell'espressione di entrambi i geni per ciclo cellulare e l'aumento dei livelli di sintesi proteica (March & Bentley, 2007). Il metodo a immersione è adatto comunque solo per alcune cellule e tessuti dell'insetto nonché per stadi di sviluppo specifici di alcune specie, in grado di assorbire facilmente il dsRNA dalla soluzione. Per questi motivi il metodo viene utilizzato raramente. Embrioni di *D. melanogaster* immersi in soluzione di dsRNA hanno evidenziato un'efficacia nell'utilizzo di RNAi (Eaton *et al.*, 2002; Timmons & Fire, 1998). Effetti di RNAi sono stati riscontrati anche su larve al primo stadio di *Ostrinia furnalalis* (Guenée) spruzzate con dsRNA (Wang *et al.*, 2011). Anche se lo studio non ha indagato circa i tessuti o le cellule specifiche che sono state coinvolte nel meccanismo di silenziamento e circa la comprensione di ciò che ha condotto all'RNAi, la comprensione di questi

risultati potranno in futuro essere utili per la progettazione di nuove tecnologie basate sull'RNAi per il controllo di insetti dannosi. Uno degli studi condotti da Pridgeon *et al.*, (2008) ha ad esempio dimostrato come diluizioni di dsRNA prodotto per il gene *AaeIAP1* somministrato topicamente su adulti di *Aedes aegypti* (Linnaeus), abbia causato una notevole riduzione dell'espressione genica e mortalità delle stesse.

#### **4.5 Nuove strategie di somministrazione del dsRNA**

Recentemente è stata segnalata la possibilità di effettuare l'RNAi utilizzando le nanoparticelle come nuovo metodo di somministrazione del dsRNA (Yu *et al.*, 2013). Le nanoparticelle sono in grado di stabilizzare le molecole di dsRNA durante la somministrazione, apportando una conseguente maggiore efficienza nell'RNAi. Il dsRNA viene imprigionato in un polimero di chitosano attraverso l'utilizzo di cariche elettrostatiche, andando così a formare una nanoparticella di chitosano/dsRNA che viene poi somministrata agli insetti tramite ingestione (Zhang *et al.*, 2010). È stato anche dimostrato che l'utilizzo della tecnica *biolistic* (Gene gun) abbia avuto una buona efficacia nella veicolazione di molecole di dsRNA in embrioni di *D. melanogaster* (Yuen *et al.*, 2008); tuttavia questa tecnica al momento non è stata ancora utilizzata su nessun'altra specie. Altre tecniche, come ad esempio l'elettroporazione o l'utilizzo di virus ricombinanti, si sono mostrate efficaci su alcune specie (Travanty *et al.*, 2004). Wang e colleghi (Wang *et al.*, 2011) hanno notato effetti di RNAi, indotto dalla somministrazione diretta del dsRNA nel tegumento del lepidottero *O. furnacalis*.

## 5. RNAi e la genomica funzionale

L'uso di dsRNA per modificare l'espressione genica e chiarirne la funzionalità ha avuto inizio nel 1998, quando Kennerdell & Carthew (1998) hanno utilizzato l'RNAi per studiare i geni su *D. melanogaster*. Ad oggi, la genomica funzionale attraverso l'utilizzo dell'RNAi risulta essere stata utilizzata su più di 30 differenti specie di insetti provenienti da una grande varietà di ordini differenti, tra cui Ditteri, Coleotteri, Lepidotteri, Isotteri, Ortotteri, Imenotteri ed Emitteri. Questo approccio ha avuto un enorme successo nella caratterizzazione funzionale di geni coinvolti in una vasta gamma di processi fisiologici negli insetti tra cui: lo sviluppo, la riproduzione, il comportamento e il sistema immunitario (Belles, 2010).

La gamma di variabilità dell'RNAi sistemico è abbastanza ampia; gli insetti meno evoluti come ortotteri ed emitteri risultano essere mediamente più suscettibili al silenziamento genico rispetto a Ditteri e Lepidotteri. Fra le specie più resistenti, alcuni particolari tessuti come emociti, cellule intestinali e tessuti embrionali appaiono essere più suscettibili agli effetti dell'RNAi tramite silenziamento genico mentre, altri tessuti, come ad esempio le ghiandole salivari di alcune zanzare, sembrano essere più resistenti. In alcuni casi questa resistenza di tessuti specifici può essere superata utilizzando una maggiore quantità di dsRNA. Per esempio uno studio ha dimostrato che, mentre un quantitativo di 140 ng di dsRNA iniettato nell'emolinfa delle zanzare è stato in grado di bloccare l'espressione genica in cellule intestinali ed emociti, è stato necessario un quantitativo 10 volte superiore per bloccare l'espressione genica nelle ghiandole salivari (Boisson *et al.*, 2006).

### **5.1 L'RNAi come mezzo di controllo**

L'utilizzo dell'RNAi come pratico mezzo di controllo per gli insetti è una tecnica promettente ma ancora in fase embrionale. Una volta che tutto il potenziale di questa metodologia verrà studiato, esso ci permetterà di utilizzare una vasta gamma di potenziali target per la soppressione dell'espressione genica negli insetti. L'utilizzo di geni bersaglio multipli, ad esempio, potrebbe essere una strategia vincente per rafforzare ulteriormente l'efficacia di questo metodo nel controllo degli insetti infestanti. Il successo dell'applicabilità in campo e del possibile utilizzo dell'RNAi sotto forma di formulato commerciale, dipenderà in larga misura dalla capacità di individuare geni target efficienti, in grado di uccidere l'insetto o inibirne la resistenza a tossine specifiche.

L'approccio più interessante, in grado di confermare la possibilità di utilizzare in campo questa metodologia è l'utilizzo di piante transgeniche in grado di esprimere il dsRNA e causare lo spegnimento di geni vitali, necessari per la sopravvivenza degli insetti. Uno degli aspetti da migliorare, che al momento rappresenta ancora una piccola criticità e una possibile minaccia per altri organismi, è sicuramente la possibilità di progettare bio-pesticidi specifici per una singola specie o un gruppo di specie affini. Per evitare *side-effect* sono tutt'ora in atto diversi studi volti a risolvere il problema, che al momento viene considerato come uno dei fattori limitanti di questa tecnica. Una versione modificata del gene 2'-O-methyl ribosyl in posizione 2 nel filamento guida, è in grado di ridurre il silenziamento dei soggetti non target (Jackson *et al.*, 2006). Una soluzione possibile al problema potrebbe essere quella di

testare regioni diverse dello stesso gene o geni differenti (Yu *et al.*, 2013) valutandone l'efficacia.

La progettazione di piante transgeniche con capacità di produrre dsRNA ha sicuramente il vantaggio di essere un metodo assai redditizio, poiché la pianta è in grado di produrre dsRNA in modo stabile e continuo. Usando una tecnologia di somministrazione per irrorazione si potrebbero trattare le piante in una particolare fase di crescita o su una particolare zona suscettibile ad attacchi di insetti alla stregua di un tradizionale insetticida; inoltre differenti specie di insetti che attaccano la pianta in momenti differenti, potrebbero essere trattati con soluzioni contenenti dsRNA differenti. Uno studio (Tenllado & Diaz, 2004) ha dimostrato che uno spray composto da preparati grezzi e dsRNA è sufficiente per silenziare i geni di virus vegetali. Il dsRNA spruzzato potrebbe essere in grado di persistere sulla pianta diversi giorni e di contrastare efficacemente le infezioni virali. Per gli insetti che attaccano l'apparato radicale, è possibile trattare il suolo con una soluzione contenente dsRNA, ma la stabilità e la persistenza di questo dsRNA nel terreno non è ancora chiara. Una volta identificato il miglior metodo per produrre il maggior quantitativo possibile di dsRNA, e il vettore più efficiente, si potrebbero anche superare le limitazioni di tipo economico di costi-efficacia per l'utilizzo del dsRNA spray. Sembra quindi evidente che la produzione di piante transgeniche sia il miglior approccio possibile, poiché il dsRNA prodotto rimane all'interno della pianta, senza subire contaminazioni o variazioni dall'esterno che possano modificarlo o degradarlo. Gli effetti dell'RNAi tramite ingestione sono comunque molto variabili, perché dipendenti da una molteplicità di fattori fra le quali la quantità di dsRNA che



il singolo individuo può consumare. Pertanto ci sarà la necessità di stabilire una dose soglia, che le piante transgeniche dovranno essere in grado di produrre per garantirne l'efficacia sull'insetto.

La scelta di utilizzare più geni bersaglio contemporaneamente è un'altra opzione che potrebbe rivelarsi valida per il controllo di quegli insetti, dove lo spegnimento di un singolo gene non si è dimostrata abbastanza efficace. In futuro, il controllo degli insetti del grano, potrebbe essere possibile tramite il rivestimento delle granaglie con dsRNA. Tuttavia sarebbe indispensabile procedere ponendo il giusto accento sui problemi che potrebbero essere legati alla sicurezza e alla salute degli utilizzatori finali, prima di ipotizzare un suo possibile utilizzo pratico.

Allo stato attuale l'idea sembra solo essere un progetto costoso e di difficile realizzazione, ma l'innovazione del progetto consisterebbe nella produzione di batteri in grado di produrre dsRNA in quantità massali (Timmons & Fire, 1998). Un certo numero di geni *target* in grado di produrre RNAi sono stati negli anni identificati e testati. Tra questi possiamo ricordarne alcuni: citocromo P450, glutatione S-transferasi,  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina, carbossilesterasi, ATPasi vacuolare, la proteina ribosomiale S4 e l'actina. La ricerca di altri potenziali geni in grado di effettuare RNAi è tutt'ora in corso. Il silenziamento di geni di insetti attraverso le piante, potrebbe pertanto diventare un potente strumento di lotta per il controllo dei parassiti dannosi. Con le tecnologie più avanzate come ad esempio il *Next Generation Sequencing* (NGS) e RNAi *target sequencing* (RIT-seq) è stato acquisito senza dubbio un grande vantaggio nella precisa selezione dei geni bersaglio (Alsford *et al.*, 2011; Gura, 2000). Il NSG permette di ottenere velocemente

i dati sul trascrittoma di un organismo non modello, fornendo la possibilità di studiare organismi di cui si hanno limitate informazioni sul genoma (Zhang *et al.*, 2012).

Il sequenziamento completo del genoma di *D. melanogaster* nel 2000 ha permesso di svolgere su questo insetto moltissimi studi di genomica funzionale (Yu *et al.*, 2013). In seguito, sono stati sequenziati i genomi di molti altri insetti fra cui *Apis mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) e *Tribolium castaneum* (Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008). Le sequenze di questi organismi sono state cruciali nelle ricerche condotte su RNAi e sulla sua applicabilità in campo. Anche se la tecnologia RNAi non può ancora essere paragonata a quella con *Bt*, è assai probabile che queste due tecnologie in futuro possano eguagliarsi, senza escludere la possibilità di un utilizzo sinergico delle differenti metodologie di controllo. L'RNAi potrebbe infatti essere in grado di funzionare bene o meglio, dove tossine *Bt* non sono riuscite a funzionare o non hanno dato i risultati sperati.

## 6. Utilizzo degli insetti modello nella biologia molecolare

Un organismo modello è una specie estensivamente studiata per comprendere particolari fenomeni biologici, in base al presupposto che le acquisizioni fatte sull'organismo modello possano fornire indicazioni sugli altri organismi. Ciò è possibile grazie al fatto che i principi biologici fondamentali, come le vie metaboliche, di regolazione e di sviluppo, e i geni che le codificano, si mantengono attraverso l'evoluzione.

I Coleotteri sono un ordine molto vasto caratterizzato da un discreto successo evolutivo. Spesso parassiti infedati a derrate e prodotti agricoli, sono causa di danni ingenti e perdite economiche per l'intera agricoltura mondiale; è pertanto sempre più impellente la necessità di creare nuove strategie eco-compatibili, in grado di gestire le popolazioni delle specie di insetti che hanno sviluppato resistenza ai metodi di lotta convenzionali come prodotti chimici di sintesi e tossine *Bt* (Bruce *et al.*, 2003). La possibilità di utilizzare i dati genomici completi di alcuni insetti ha ampliato le possibilità di studiare e identificare i geni essenziali per la crescita, lo sviluppo, la sopravvivenza degli stessi o di trovare i geni bersaglio per la progettazione di tecnologie di controllo. Ciò richiede una grande attenzione nello screening del panorama genetico dell'insetto, per identificare nell'ampio scenario genomico, quei geni che meglio si prestano come candidati ovvero quelli che una volta silenziati possano mostrare manifestazioni tali da essere utili nel controllo dell'infestante. Per facilitare questo compito, soprattutto in sede sperimentale, più volte si è preferito avvalersi di organismi modello (Knorr *et al.*, 2013). Spesso, gli organismi modello vengono scelti in base alla loro capacità di essere adattabili a

manipolazioni sperimentali. Di solito vengono preferiti quelli con breve ciclo cellulare e per i quali siano facilmente disponibili e attuabili le tecniche per manipolazione genetica (ceppi inbred, linee di cellule staminali, e sistemi di transfezione).

## 6.1 *Tribolium castaneum* (Herbst)

### 6.1.1 Generalità

Il genere *Tribolium* afferisce all'ordine Coleoptera, sottordine Polyphaga, famiglia Tenebrionidae alla quale appartengono altri insetti come *Tenebrio molitor* (Linnaeus), *Gnathocerus cornutus* (Fabricius) e



Fig 6- Adulto di *T. castaneum*

*Tenebroides mauritanicus* (Linnaeus) che parassitizzano le derrate alimentari e nel caso particolare le granaglie e gli sfarinati. A questo genere appartengono due specie molto simili dal punto di vista morfologico ed etologico: *Tribolium castaneum* (Herbst) e *Tribolium confusum* (Herbst). Entrambi gli insetti sono di colore rosso-bruno, le antenne di *T. castaneum* possiedono una vistosa clava formata da tre antennomeri che si differenziano notevolmente dai precedenti (Bousquet, 1990); il capo è semicircolare, largo e piatto con bordo anteriore del clipeo a sorta di cresta, ricoprente l'apparato boccale. Il protorace è poco più largo del capo, angoli anteriori ottusi e poco arrotondati, le elitre sono finemente punteggiate e striate, allungate, parallele, arrotondate all'estremità posteriore e solo le interstrie esterne portano una fine linea longitudinale. Il torace di *T. castaneum*, visto dall'alto, presenta le parti laterali leggermente incurvate, e inoltre la distanza tra gli occhi è inferiore fino

a due volte il diametro degli occhi stessi.

*Tribolium castaneum* è un insetto che vive sulla maggior parte di farine, granaglie parzialmente lavorate e, in generale, sui prodotti di trasformazione del frumento. Questo tenebrionide riesce anche a nutrirsi di: cioccolata, spezie, vari tipi di noci ed è stato rinvenuto come parassita delle collezioni entomologiche (Good, 1933). L'insetto non è capace di nutrirsi di cariossidi intere poiché il suo apparato boccale non si è evoluto per attaccare semi di grandi dimensioni e resistenti (Chapman, 1931). Lo stesso Autore, nel 1918, ha effettuato delle sperimentazioni per evidenziare le eventuali preferenze del tenebrionide ai differenti tipi di sfarinati, anche provenienti da semi di specie diverse.

Uovo. Le uova sono di forma ovoidale, ma solitamente appaiono di forma irregolare poiché sono ricoperti di particelle di sfarinato che aderiscono alla membrana esterna. Le dimensioni medie delle uova di *T. castaneum* sono: 0,4 mm di larghezza e 0,64 mm di lunghezza. Chapman (1918) riporta che la forma e l'aspetto generale delle uova varia in base al tipo di substrato trofico dove sono stati allevati gli adulti, dimostrando che le uova rinvenute in farine finemente macinate sono di dimensioni inferiori rispetto a quelle rinvenute in substrati più grossolani.

Larva. La larva al primo stadio è di colore bianco, con dimensioni pari a 1,14 mm di lunghezza e 0,18 mm di larghezza a livello della capsula cefalica. Prima della muta la larva si presenta inattiva, con il corpo di



Fig 7- Larve di *T. castaneum*

larghezza maggiore rispetto al capo. La cuticola si apre dorsalmente al capo e al torace in modo da permettere la fuoriuscita della larva dalle esuvie. L'insetto si presenta inizialmente di colore bianco, ma nel giro di 24h il colore vira a giallo chiaro (Chapman, 1918). Riguardo al processo di sviluppo post-embriale è stato evidenziato che *T. castaneum* non presenta un numero fisso di mute larvali, ma che questo numero può variare da 6 a 8, con maggiore frequenza 7-8 mute. Questa variazione dipende dalle condizioni esterne, come: cibo, temperatura, umidità e da caratteristiche proprie dell'individuo (Good, 1933). L'ultimo stadio larvale ha dimensioni pari a 6 mm di lunghezza e 0,69 mm di larghezza alla capsula cefalica.

### 6.1.2 Morfologia

Pupa. Le pupe di *T. castaneum* sono di tipo anoico e, ad eccezione di occasionali movimenti dell'addome, sono inattive. Appena formate sono di colore bianco-giallognolo, ma diventano gialle con il passare del tempo, ed infine di colore



Fig 8- Pupa di *T. castaneum*

bruno prima dello sfarfallamento. L'insetto a questo stadio ha una lunghezza di 3,46 mm e una larghezza di 1,12 mm, tendenzialmente il maschio si presenta di dimensioni inferiori a quelle della femmina. I due sessi di *T. castaneum* possono essere distinti allo stadio pupale mediante l'osservazione della zona ventrale dell'ultimo segmento addominale: la femmina possiede un paio di piccole appendici urogonfi, che nel maschio sono ridotte a due processi indistinti.

Adulto. L'insetto allo stadio adulto presenta una lunghezza media di 3,4 mm, e una larghezza al torace di 1,02 mm. Sembra che le femmine tendano a presentare, a questo stadio, una larghezza maggiore rispetto ai maschi,



Fig 9- Adulto di *T. castaneum*

ma questo non è un carattere costante e quindi non può essere utilizzato come criterio distintivo dei sessi. Subito dopo lo sfarfallamento, l'esoscheletro si presenta poco consistente, di colore bruno chiaro, e gli esemplari sono inattivi. Dopo 24-48h, gli insetti acquisiscono la tipica colorazione bruno-rossiccia e l'esoscheletro diventa più resistente.

### 6.1.3 Biologia

Le sperimentazioni in condizioni controllate (Chapman, 1931; Chapman & Baird, 1933; Stanley, 1932) hanno evidenziato una durata dello sviluppo, da uovo ad adulto, pari a 27 giorni alla temperatura di 32°C; a 27°C questo periodo ha una durata di 37 giorni; a 22°C il ciclo vitale del tenebrionide dura 93 giorni. Questi dati sono stati ottenuti allevando gli insetti a 75% U.R. ed utilizzando farina di frumento come substrato trofico.

Negli studi sulla relazione tra lo sviluppo di *T. castaneum* e l'umidità dell'ambiente è stato evidenziato, riguardo le uova, che esse schiudono in maggior numero a bassa U.R. rispetto a valori alti. D'altra parte le larve sopravvivono in maggior numero quando l'umidità dell'ambiente è abbastanza elevata, con un optimum al 75% U.R. (Holdaway, 1932). L'insetto allo stadio pupale ha un comportamento in relazione all'umidità molto simile a quello delle uova, ma è stato notato che ad U.R. più elevate

l'insetto non riesce a completare lo sviluppo diventando adulto (Holdaway, 1932). Inoltre, dalle medesime sperimentazioni, è emerso che gli stadi larvali sono quelli più influenzati dal contenuto di acqua dell'atmosfera; infatti a questo stadio l'insetto si sviluppa con maggiore velocità passando dal 25% al 75% di U.R. Infine, sono state effettuate delle comparazioni tra il numero di uova deposte da femmine allevate in ambienti con il 25%, 50% e 75% di U.R., dimostrando che ad umidità maggiori aumenta il numero di uova prodotte ed effettuando dei confronti tra gli allevamenti al 50% e 75% di U.R. non sussistono differenze nel numero di uova prodotte, ma nel primo caso le uova vengono deposte in tempi più brevi.

Studi sulla dinamica di popolazione in laboratorio di *T. castaneum*, effettuati ponendo un esemplare per ogni 2g di farina in quantità logaritmiche crescenti di substrato trofico, hanno dimostrato che dopo 100 giorni le popolazioni tendono ad un equilibrio pari a  $43.97 \pm 2.88$  individui per grammo di farina (Chapman, 1938). L'Autore considera questo equilibrio come il risultato dell'interazione tra il potenziale biotico della specie e la resistenza dell'ambiente. Un importante fattore nella dinamica della popolazione è il fenomeno del cannibalismo, che ha un'entità direttamente proporzionale al numero di uova e alla concentrazione della popolazione, e contribuisce quindi al mantenimento dell'equilibrio del numero totale di individui. Un'analisi più approfondita di questi dati ha evidenziato che le popolazioni di *T. castaneum* si accrescono seguendo un andamento logistico che corrisponde ad una curva di Verhulst (Gause, 1931).

Riguardo la fertilità del tenebrionide, durante l'intero periodo di ovideposizione che può durare fino a 14 mesi con una media di 9 mesi, le



femmine possono deporre da 400 a 500 uova, delle quali il 90% si schiuderanno (Good, 1933). Studi sulla relazione tra ovideposizione e temperatura hanno dimostrato che tra queste due variabili esiste una relazione diretta, infatti all'aumentare della temperatura aumenta il numero medio di uova deposte al giorno. Infine, sono stati segnalati (Good, 1933) degli artropodi che parassitizzano *T. castaneum*, come gli Acari *Acarophenax tribolii* Newsteade Duval e *Pediculoides ventricosus* Newport e l'Imenottero betilide *Rhabdepyris zae* Waterson. Tra gli esseri viventi unicellulari sono stati segnalati dei protozoi parassiti appartenenti alla sottoclasse Gregarinasina e al genere *Adelina*.

#### 6.1.4 Danni

Questa specie predilige le derrate immagazzinate, polverulente e ricche di amidi (farina, semola, crusca) ma l'elevata polifagia che lo contraddistingue gli permette di nutrirsi delle più svariate sostanze vegetali (arachidi, copra, ricino, sesamo, lino, leguminose da granella, frutta secca, cacao, cioccolato, manioca e cereali in granella).

Gli adulti possiedono ghiandole secernenti un liquido dall'odore sgradevole e questo fa sì che le derrate impregnate vadano incontro a un grave deprezzamento (Gelosi e Süß, 1991). Il pane prodotto con farine gravemente infestate da *T. castaneum* presenta un inscurimento della crosta e perfino della mollica, repellenza per l'odore e per il sapore fenolico. I chinoni secreti da questi e altri tenebrionidi sembra influiscano sulla viscosità delle farine e nell'elasticità del pane e possono avere effetti cancerogeni. Nei casi di infestazioni più gravi si ha un aumento del grado di umidità della massa della derrata con conseguente innesco di processi fermentativi (Pollini, 2001).

### 6.1.5 Utilizzo di *Tribolium castaneum* nella biologia molecolare

Il coleottero rosso della farina, *T. castaneum* è un organismo modello, che rispondendo a precise caratteristiche che ne facilitano lo studio e l'allevamento, si mostra come candidato ideale per identificare e testare i possibili geni target usati in seguito come metodo di lotta attraverso l'RNAi. *Tribolium castaneum* è innanzitutto uno dei più importanti infestanti delle derrate in tutto il mondo, il suo genoma è stato completamente sequenziato e annotato e, rispetto a *D. melanogaster*, subisce un pattern di sviluppo più primitivo durante l'embriogenesi, così come anche dopo l'embriogenesi, permettendo ai ricercatori di indagare in maniera più approfondita sugli aspetti conservativi e divergenti dello sviluppo dell'insetto. Inoltre, *T. castaneum* ha un ciclo vitale molto breve (circa quattro settimane) il che lo rende un soggetto facilmente utilizzabile per gli studi di genomica funzionale e, al tempo stesso, il più sofisticato organismo modello tra gli artropodi.

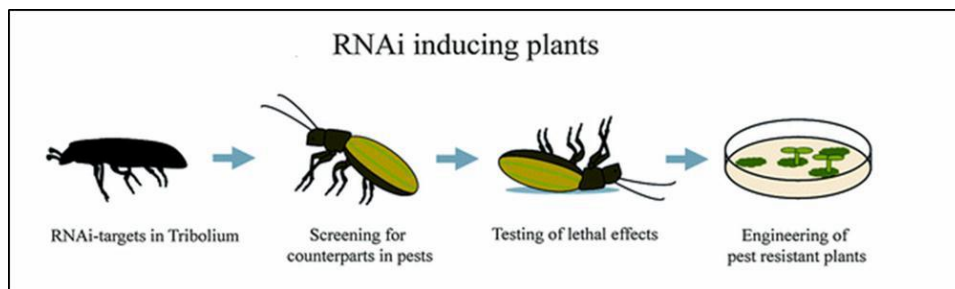


Fig 10- RNAi method in *T. castaneum*

Un altro grande e fondamentale vantaggio che *T. castaneum* possiede è la peculiare sensibilità che esso possiede nei confronti dell'RNAi e la facilità di realizzazione che il suo utilizzo implica durante lo svolgimento degli esperimenti. L'effetto dell'RNAi difatti, può raggiungere in *T. castaneum* qualsiasi tessuto e qualsiasi fase di sviluppo e l'iniezione di dsRNA

nell'emocele di femmine adulte può essere perfino utilizzato per identificare e selezionare fenotipi nella prole (Kitzmann *et al.*, 2013).

Sono stati testati numerosi geni riguardanti la cuticola, il metabolismo, lo sviluppo post embrionale, i neurorecettori e molti altri (Tab. 1).

	<b>Gene family</b>	<b>Phenotypes</b>	<b>References</b>
<b>Chitin metabolism</b>	UDP N-acetylglucosamine pyrophosphorylases (UAPs)	TcUAP1: prevents all types molting and oviposition in adult femails	Arakane <i>et al.</i> 2011
		TcUAP2: prevents larval growth	
	Chitin synthases (CHSs)	TcCHT-A: prevents all types of molting	Arakane <i>et al.</i> 2005b, 2008b
		TcCHT-B: produces lethal shrunken larvae	
	Chitinases (CHTs)	TcCHT5: prevents pupal-adult molting	Arakane and Muthukrishnan 2010b
		TcCHT7: affect pupal and adult wing expansion and abdominal contraction	
		TcCHT10: prevents all types of molting	
		TcIDGF4: prevents pupal-adult molting	
	<i>b</i> -N-acetylhexosaminidase	TcNAG1 prevents all types molting	Hogenkamp <i>et al.</i> 2008
	Chitin deacetylases (CDAs)	TcCDA1 or TcCA2 prevent all types of molting	Arakane <i>et al.</i> 2009a
<b>Cuticle tanning and pigmentation</b>	Yellows	TcYellow-y: prevents melanin in the hindwing	Tomoyasu <i>et al.</i> , 2009
		TcYellow-f: prevents pupal-adult molting	Arakane <i>et al.</i> , 2010a
	Tyrosine hydroxylase	Prevents cuticle sclerotization and pigmentation or tanning	Gorman & Arakane, 2010
	Aspartate 1-decarboxylase (ADC)	Depletion of N-b-alanine resulting in abnormally dark/black pigmentation of the adult cuticle	Arakane <i>et al.</i> 2009b
	3,4-dihydroxyphenylalanine	Lethal pupal phenotype/abnormally dark brown pigmentation of the adult cuticle	

	Laccase 2	Prevents cuticle sclerotization and pigmentation or tanning	Arakane <i>et al.</i> 2005a
<b>Embryonic post-embryonic development and reproduction</b>	JAK-STAT signaling factors and	Affects follicle cell patterning	Baumer <i>et al.</i> , 2011
	Gprotein-coupled receptors (GPCRs)	Eight GPCRs caused severe larval development and prevent larval-pupal and/or pupla-adult molting	Bai and Palli, 2010
	Nuclear receptors (NRs)	Affect egg production and oocyte maturation	Xu <i>et al.</i> , 2010
	Orthodenticle	Lateralized embryos	Kotkamp <i>et al.</i> , 2010
	Wingless (wg)/Wnt family	Important for segmentation in embryogenesis	Bolognesi <i>et al.</i> , 2008
	Wnt receptors	Frizzled-1 and Frizzled-2 collapse of the growth zone and impair embryonic axis elongation and leg development	Beermann <i>et al.</i> , 2011
<b>Neuropeptide and their receptors</b>	Crustacean cardioactive peptide	CCAPR-2, but not CCAPR-1, mediates the cardioacceleratory function	Li <i>et al.</i> 2011a
	Ecdysis hormone	Severe deficiencies in preecdysis behavior	Arakane <i>et al.</i> 2008a
	Ecdysis triggering hormone		
	Busicon, partner of bursicon	Wrinkled elytra and the deficiency in propoer folding of the hindwings	
	Crustacean cardioactive peptide	CCAP and CCAPR-2 prevent pupal-adult molting	
	Ion transport peptide (ITP) and ITP-like (IPTL)	IPT/IPTL prevent larval and pupal developments and are essential for adult molting	Begum <i>et al.</i> , 2009
<b>Wing differentiatin and development</b>	Hox genes	Ultrabithorax (Ubx) prevents transformation of the hindwings to elytra (modified forewings)	Tomoyasu <i>et al.</i> , 2005, 2009
<b>Systemic RNAi</b>	Dicers (Dcr)		Tomoyasu <i>et al.</i> 2008
	Argonautes (Ago)		
	Sid-1like		

Tab. 1- Recenti studi funzionali in *T. castaneum* basati su RNA interference (Noh *et al.*2012)

## **7. La dinamica delle specie invasive**

Si considerano invasive quelle specie aliene che hanno un impatto negativo sull'ambiente, sulle attività umane e sulla salute (Lee, 2002). Spesso sono responsabili di una riduzione della biodiversità nel territorio occupato (Human e Gordon, 1997), possono modificare l'organizzazione della comunità (Sanders *et al.*, 2003) e arrecare danni ecologici anche non immediati e visibili, alterando, per esempio, il ciclo dell'azoto attraverso il cambiamento della comunità microbica nel suolo (Hawkes *et al.*, 2005). È stato stimato che, il costo economico delle migliaia di specie invasive negli USA, dannose soprattutto per l'agricoltura, la silvicoltura e la pesca, oltre che per la salute pubblica, ammonta a circa 120 miliardi di dollari l'anno (Pimentel *et al.*, 2005). Negli ultimi secoli l'uomo ha favorito la dispersione, in precedenza limitata da barriere naturali biogeografiche, di popolazioni e specie anche a migliaia di chilometri dalle loro regioni d'origine in tutto il mondo, diminuendo l'isolamento geografico e aumentando il grado di omogeneizzazione delle specie (Olden *et al.*, 2004). Diversi aspetti possono contribuire a determinare la probabilità di insediamento di una nuova popolazione in un territorio invaso. La dimensione del numero di individui rilasciati è importante ma, anche se con una probabilità più bassa, rilasci di soli 2 o 4 individui (più frequente in natura piuttosto che invasioni di massa) possono dare origine ad una nuova popolazione (Memmott *et al.*, 2005). Il potenziale invasivo della specie è legato a caratteristiche quali un elevato tasso di accrescimento, la predisposizione ad essere trasportato (quando l'uomo è coinvolto nel processo) e la capacità di sopravvivere alle condizioni incontrate durante il trasporto stesso, l'introduzione e la

diffusione (Suarez e Tsutsui, 2008). In alcuni casi si è notato che il successo di un'invasione può essere favorito dalla capacità degli individui invasori di sfruttare i mutualisti presenti nel nuovo territorio (Callaway *et al.*, 2004). Anche le dimensioni corporee degli individui invasori possono influire sulla probabilità d'insediamento di una nuova popolazione, come dimostrato da simulazioni in acquario utilizzando *Poecilia reticulata*, pesciolino d'acqua dolce, come specie invasiva (Schröde *et al.*, 2009).

Nonostante le invasioni possano creare problemi di competizione con le specie locali e spesso comportino anche costi economici, offrono l'opportunità di studiare i processi evolutivi ed ecologici in tempo reale, su spazi e tempistiche difficili da sperimentare sulle popolazioni native (Sax *et al.*, 2007). Durante un processo d'invasione spesso è coinvolto un numero piccolo di invasori quindi si verificano effetti quali "l'effetto fondatore" o "collo di bottiglia" (Tsutsui *et al.*, 2000; Dlugosch & Parker, 2008; Colautti *et al.*, 2005) che portano ad una riduzione della variabilità genetica. In popolazioni che hanno subito diversi e successivi eventi di fondazione si può osservare una perdita cumulativa di eterozigosità. In uno studio condotto sull'ungulato *Alces alces* (Linnaeus 1758) (Broders *et al.*, 1999) è stata osservata una perdita dell'eterozigosità del 14%-30% nel primo evento invasivo fino al 46% in due eventi successivi. Questa riduzione della variabilità genetica può compromettere la capacità degli individui di far fronte a nuove pressioni selettive, portando per esempio un calo dell'immunocompetenza, come dimostrato in uno studio che ha messo a confronto due popolazioni del volatile *Petroica australis* (Sparman, 1788), una sorgente e l'altra fondata 33 anni prima da soli 5 individui (Hale e

Briskie, 2007). Il numero limitato di individui fondatori potrebbe portare a depressione da *inbreeding* riducendo la crescita della popolazione e aumentando il rischio di estinzione (Nieminem *et al.*, 2001). Questo aspetto produce un paradosso genetico su come sia possibile che popolazioni appena fondate possano superare la bassa variabilità genetica e su come l'atteso ridotto potenziale evolutivo, spesso associato con il rischio di estinzione possa diventare stabile fuori dai territorio nativo (Roman e Darling, 2007).

Diversi studi hanno dimostrato come la perdita di variabilità genetica non sempre comprometta il successo di un'invasione. Non ha impedito, per esempio, la rapida diffusione di popolazioni introdotte dell'angiosperma *Hypericum canariense* (Linneus, 1753) (Dlugosch & Parker, 2008), mentre ha addirittura favorito l'introduzione in una specie di formiche invasive (*Linepithema humile*, Mayr, 1868), perchè associata alla riduzione dell'aggressività intraspecifica tra nidi separati (essendo elevata la similarità genetica) (Tsutsui *et al.* 2000). Il vantaggio associato alla perdita di varianti alleliche può manifestarsi anche con la formazione di nuove interazioni epistatiche e nuovi genotipi (Brodie, 2000). È stato dimostrato che durante un processo di invasione la perdita di variabilità nei tratti quantitativi (lo sono molti caratteri sotto selezione) è minimo se comparato con la perdita di variabilità molecolare e molto spesso si è evidenziata un'evoluzione adattativa in tratti quantitativi (Dlugosch & Parker, 2008). Novak & Mack (2005), eseguendo uno studio su diversi lavori su piante, hanno osservato che per le specie a riproduzione sessuale molto spesso durante un processo di invasione non si sperimenta una vera e propria

riduzione della variabilità genetica, bastando pochi individui per rappresentarne la gran parte. La perdita di variabilità genetica può essere mitigata dall'avvento di più eventi invasivi, soprattutto quando le diverse introduzioni derivano da popolazioni native diverse (Novak e Mack, 2005; Kolbe *et al.*, 2007). L'80% delle introduzioni di 8 specie di lucertole del genere *Anolis* (Daudin, 1802) prese in esame da Kolbe *et al.* (2007) è derivata da più popolazioni native diverse, dimostrando quanto questo fenomeno sia frequente. Spesso quando non si verifica un significativo calo di variabilità genetica nelle popolazioni introdotte si assume ci siano stati più eventi di invasione da popolazioni native diverse (Chun *et al.*, 2009). In un lavoro sul crostaceo *Bythotrephes longimanus* (Leydig, 1860) i risultati contrastanti tra l'evidenza di un "effetto fondatore" per una riduzione dell'eterozigosità e l'elevata variabilità allelica sono stati spiegati ammettendo introduzioni multiple da popolazioni native europee diverse e un elevato flusso genico che ha reso più omogenee le popolazioni introdotte in America (Colautti *et al.*, 2005). Quando è nota la presenza di una sola sorgente è possibile attribuire la mancata perdita di variabilità genetica nelle popolazioni invasive assumendo una colonizzazione massiva e/o continua, come hanno concluso Wattier *et al.* (2007) in uno studio sul crostaceo *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky 1894), che rapidamente si è diffuso nell'Europa occidentale dalla foce del Danubio. Nonostante la variabilità genetica neutrale non sia un parametro che permette di determinare il successo di un'invasione (Dlugosch & Parker, 2008; Tsutsui *et al.*, 2000) rimane il primo metodo generalmente usato per studiare la dinamica delle specie invasive e meglio comprendere com'è avvenuto il processo.



Fra le specie invasive maggiormente esiziali, vi è sicuramente il coleottero curculionide *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) parassita delle palme introdotto accidentalmente in Italia durante lo scorso decennio e divenuto in breve tempo un problema tutt'oggi ancora irrisolto.

## 7.1 *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)

### 7.1.2 Generalità

*Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) è un coleottero appartenente alla superfamiglia Curculionoidea, che comprende circa 60.000 specie e 6.000 generi descritti (Thompson,



Fig 11- Adulto di *Rhynchophorus ferrugineus*

1992), alla famiglia dei Curculionidae e alla sottofamiglia dei Dryophthorinae. Di origine asiatica, il punteruolo rosso delle palme ha raggiunto il bacino del Mediterraneo all'inizio degli anni 90.

In Italia il primo ritrovamento di *R. ferrugineus* risale al 2004, quando esemplari allo stadio larvale e di pupa sono stati rinvenuti su un esemplare di *Phoenix canariensis* (Chabaud, 1882) in un vivaio di Pistoia (Sacchetti *et al.*, 2005). Oggi è presente in Campania, Lazio, Puglia, Sardegna, Sicilia, Calabria, Marche, Abruzzo, Molise, Liguria e, nel 2010, anche in Basilicata. *Rhynchophorus ferrugineus* è un parassita che vive a carico esclusivo di diverse specie di palme. L'intero ciclo avviene all'interno della pianta dove le larve si nutrono dei tessuti teneri scavando gallerie, e, a completo sviluppo, tornano verso la base delle fronde per costruire il bozzolo, da cui emergono gli adulti che possono rimanere o meno sullo

stesso ospite (Dembilio *et al.*, 2009). Il punteruolo rosso è stato ritrovato su *Phoenix canariensis* e *Phoenix dactylifera* (Linneus), ma anche su specie di interesse economico quali la palma da cocco (*Cocos nucifera*, L.) e la palma da olio (*Elaeis guineensis*, Jacq). Altre specie su cui sono stati segnalati attacchi sono: *Areca catechu* (Linneus), *Arenga pinnata* (Wurmb), *Borassus flabellifer* (Linneus), *Calamus merillii* (Pcarrd), *Caryota maxima* (Pacsoa), *Caryota cumingii* (Linneus), *Corypha gebanga* (Becc. ex Lecomte), *Corypha elata* (Becc.), *Livistona decipiens* (Becc.), *Metroxylon sagu* (Rottb.), *Oreodoxa regia* (Kunth), *Phoenix sylvestris* (Roxb.), *Sabal umbraculifera* (Mart), *Trachycarpus fortunei* (Hook), *Washingtonia sp.* Occasionalmente può anche attaccare *Agave americana* e *Saccharum officinarum* (Linneus).

Alcune specie, quali la palma nana *Chamaerops humilis* (Linneus), erano ritenute immuni all'infezione grazie ad una secrezione gommosa che sembrava impedire l'attecchimento del parassita mentre sono ad oggi documentati attacchi anche a queste specie (Martín *et al.*, 2000).

### 7.1.2 Morfologia

Uova. Il numero di uova deposte in totale da una femmina può variare da alcune decine a centinaia (Murphy & Briscoe, 1999). Dopo 2-3 giorni le uova, lunghe circa 2,5mm e di colore



Fig 12- Uova di *R. ferrugineus*

variabile dal bianco al giallo più o meno intenso, schiudono e le larve neonate cominciano a nutrirsi dei tessuti più teneri scartando quelli fibrosi.

Larva. La larva è apoda e inizialmente lunga 3-4 mm, ma può superare i 5 mm a completo sviluppo. È caratterizzata da un capo fortemente sclerificato dotato di potenti



Fig 13- Larva di R. ferrugineus

mandibole con le quali scava gallerie anche molto profonde all'interno del peduncolo fogliare e dello stipite che riempie di rosura mescolata ad essudati della pianta. Essa attraversa 4-5 stadi larvali e completa lo sviluppo in circa 2 -3 mesi. La durata del periodo larvale riportata in letteratura è comunque molto variabile (Murphy e Briscoe, 1999). Da studi svolti in Spagna risulterebbe che la larva raggiunga la maturità mediamente in 96 giorni, dopo avere effettuato 3-4 mute (Esteban-Durán *et al.*, 1998). A maturità la larva si dirige nella parte più esterna della galleria dove cessa di alimentarsi e costruisce un bozzolo con le fibre della pianta; all'interno tali fibre risultano molto serrate e rivestite da uno strato liscio impermeabile costituito da una secrezione mucosa prodotta dalla prepupa (Wattanapongsiri, 1966; Ferry e Gomez, 2002).

Pupa. Il bozzolo così formato misura circa 80x35 mm, è ovale e leggermente allungato. Generalmente il bozzolo è formato entro cavità scavate alla base dei peduncoli fogliari, oppure tra la sostanza



Fig 14- Pupa di R. ferrugineus

organica all'ascella delle foglie. Anche la durata della fase pupale indicata da diversi Autori è molto variabile, da 2-3 settimane a 50 giorni

(Wattanapongsiri, 1966; Murphy e Briscoe, 1999).

Adulto. Gli adulti di *R. ferrugineus*

presentano un colore variabile dal rosso ruggine al marrone-rossastro, con elitre caratterizzate da striature nere di forma e numero variabili. La lunghezza



può variare da 19 a 45 mm (Esteban- Duràn *et al.*, 1998) e la larghezza da 11,50 a 15,50 mm (Wattanapongsiri, 1966). Le femmine hanno generalmente un rostro più lungo, più sottile ed arcuato rispetto agli individui maschili, nei quali, inoltre, è presente una fitta peluria. Studiando lo sviluppo di *R. ferrugineus* a temperature costanti, Salama *et al.*(2002) ha evidenziato come questa fase duri 18 giorni a 21,2°C e di 13 giorni a 29,5°C per individui allevati su frutti di banana. Nella stessa palma e durante tutto l'anno è possibile trovare tutti gli stadi post-embriionali del punteruolo. Diverse prove hanno dimostrato che l'intero ciclo biologico può essere svolto, da agosto- settembre, in circa 70 giorni, per cui si può ipotizzare che l'insetto completi almeno due generazioni annue nei nostri ambienti.

Fig 15- Adulto di *Rhynchophorus ferrugineus*

### 7.1.3 Biologia

*Rhynchophorus ferrugineus* si sviluppa tipicamente come endofita all'interno delle palme attaccate. Generalmente gli adulti sono maggiormente attratti da piante danneggiate o malate, ma è diffusa anche l'infestazione di piante sane (Murphy e Briscoe, 1999).

Nelle zone d'origine a clima caldo, il punteruolo rosso compie più generazioni nel corso dell'anno di circa tre mesi e mezzo ciascuna. I maschi di *R. ferrugineus* producono un feromone d'aggregazione capace di richiamare

molti individui, al fine di favorire il successo riproduttivo. La femmina vive circa tre mesi e depone circa 55 le uova in fori praticati con il rostro sia alla base delle foglie o dei giovani germogli, nonché in piccole ferite dello stipite anche in posizione non apicale, che poi sono richiuse con materiale impastato a saliva.

#### *7.1.4 Danni*

Il danno è causato dall'attività trofica delle larve che scavano gallerie all'interno dello stipite delle palme. In questo modo è ostacolata la traslocazione degli elementi nutritivi tanto da pregiudicare lo sviluppo e minare la stabilità della pianta. Le piante attaccate possono evidenziare un disseccamento delle foglie centrali e/o la fuoriuscita di essudati dal tronco, tuttavia in genere è difficile rilevare la presenza del fitofago se non quando l'infestazione è ad uno stadio avanzato e la sopravvivenza della pianta è ormai compromessa. Quando l'attacco interessa l'apice vegetativo, nelle fasi iniziali è possibile osservare erosioni sulle giovani foglie e/o fori alla base delle stesse. In seguito all'attacco si verificano fenomeni di marcescenza e fermentazione, a seguito dei quali dalla massa dei tessuti vegetali danneggiati si origina un caratteristico odore acidulo ed un innalzamento della temperatura.

Le foglie apicali iniziano a collassare facendo assumere alla pianta un assetto asimmetrico della cima. Nei casi di gravi infestazioni l'intera cima si piega afflosciandosi sulle foglie inferiori e la pianta appare come capitozzata. Nel caso in cui le larve danneggiano il meristema principale si ha la morte della pianta. Le palme infestate muoiono in 4 - 8 mesi, a seconda dell'età della pianta e dell'entità dell'infestazione. È stato osservato come un numero

limitato di larve siano capaci di uccidere grossi esemplari di oltre 60 anni d'età e 20 metri di stipite. Le foglie laterali non più ancorate allo stipite possono, talvolta, cadere costituendo un potenziale pericolo, inoltre, alla loro base si possono osservare residui di rosario umido e gallerie all'interno delle quali si possono rinvenire larve e bozzoli. L'ovideposizione avviene quasi sempre nella corona apicale, ma se la pianta presenta lesioni in punti diversi dello stipite, queste possono attrarre gli adulti attraverso la produzione di sostanze volatili. In questo caso, in cui è molto difficile individuare la presenza dell'infestazione, sono danneggiate porzioni non apicali del tronco, su cui si possono insediare anche patogeni agenti di marciumi compromettendo la stabilità della pianta. Il punteruolo rosso inizialmente ha infestato le palme delle Canarie di sesso maschile di età superiore ai 50 anni, successivamente sono state riscontrate infestazioni di esemplari di sesso femminile e piante giovani. Inoltre, sono state accertate infestazioni su piante adulte di *P. dactylopera*, *Washingtonia sp.*, *Chaemerops humilis*, *Syagrus romanzoffianum*, *Livistonia chinensis*, *Howea forsteriana*, *Jubaea chilensis* ed anche su piante giovani di *Sabal sp.*





Foto 16-17 Danni causati da *R. ferrugineus*

## **PARTE SPERIMENTALE**



## 8. Obiettivi della ricerca

Le fasi preliminari della sperimentazione hanno riguardato l'individuazione di specie entomatiche, di elevato interesse agronomico e/o forestale, che potessero rappresentare un obiettivo sensibile, per l'elevata importanza in termini di dannosità e di potenziale biotico, sui quali testare l'efficacia e/o valutare la riduzione dell'espressione genica, della tecnica dell'*RNA interference* (RNAi).

In virtù di quanto prima menzionato, sono stati selezionati due Coleotteri come *target* del progetto di ricerca: *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) e *Tribolium castaneum* (Herbst).

*Rhynchophorus ferrugineus*, comunemente noto come Punteruolo Rosso delle Palme, è un parassita delle palme (Arecaceae) e ad oggi ha ormai raggiunto una diffusione quasi cosmopolita. Il coleottero rappresenta una minaccia concreta e ancora molto difficile da controllare a causa del concorso di molteplici fattori che favoriscono la proliferazione del fitofago quali, ad esempio, la motilità elevata degli adulti, in grado di eludere eventuali barriere di protezione o di contenimento, e la bassa efficacia dei trattamenti convenzionali.

*Tribolium castaneum*, comunemente noto con il nome di Tribolio rosso (o castano o delle farine), è un infestante delle derrate alimentari (soprattutto sfarinati) di diffusione cosmopolita e causa di ingenti perdite economiche nel settore cerealicolo. *Tribolium castaneum*, inoltre, è comunemente utilizzato come insetto modello da più di un decennio nelle sperimentazioni genetiche. La scelta dei due differenti insetti oggetto della sperimentazione ha tenuto in considerazione l'affinità filogenetica dei due soggetti (Hunt *et al.*, 2007),

l'importanza economica che essi rispettivamente rivestono, la semplicità di somministrazione del dsRNA e la possibilità di comparare i risultati ottenuti. I due entomi, infatti, si contrappongono sul piano sperimentale per essere l'uno insetto modello (*T. castaneum*) dal genoma completamente sequenziato ed annotato, sul quale l'RNAi è stato ampiamente testato, e l'altro (*R. ferrugineus*) coleottero dal genoma poco noto e sul quale la somministrazione del di RNA a doppia elica (dsRNA) e la relativa efficacia della tecnica RNAi risultava ancora mai testata.

Scopo della ricerca, è stato pertanto quello di trovare metodi affidabili ed efficienti per la produzione e somministrazione di dsRNA per differenti geni, per entrambi gli insetti. Inoltre, è stata valutata anche in maniera comparativa, la risposta dei due insetti a differenti dosaggi e a differenti metodi di somministrazione di dsRNA, tenendo in considerazione i possibili effetti a carico dei processi di sviluppo e metabolici.

La sperimentazione si è inoltre occupata di indagare circa i possibili aspetti applicativi.

## 9. Materiali e metodi

### 9.1. Allevamento degli insetti

Entrambi gli insetti target utilizzati, sono stati posti in allevamento a condizioni termo-igrometriche controllate, al fine di raggiungere un numero di individui sufficienti ad effettuare le sperimentazioni previste. Per tutte le prove e per entrambi gli insetti, sono state utilizzate unicamente larve all'ultimo stadio di sviluppo, stadio ritenuto maggiormente suscettibile all'RNAi (Griebler *et al.*, 2008). Inoltre gli ultimi stadi larvali di entrambe le specie sono i responsabili dei danni economici più ingenti.

*Rhynchophorus ferrugineus*. Gli insetti, a diversi stadi di sviluppo, sono stati prelevati su esemplari di *Phoenix canariensis* Chabaud e *Phoenix dactylifera* L. nel comune di Locri (RC) (38.236149 N, 16.264725 E). Successivamente gli stessi sono stati trasportati in laboratorio e posti in celle climatizzate alla temperatura  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 60-70% U.R., L:D 12:12, suddivisi per stadio di sviluppo e collocati all'interno di contenitori in plastica sui quali sono state effettuate piccole aperture per consentire il passaggio dell'aria. Per l'allevamento massale ed il mantenimento degli insetti in laboratorio è stata utilizzata la metodologia proposta da Kaakeh *et al.* (2005).

*Tribolium castaneum*. Gli insetti utilizzati sono stati prelevati dalla collezione del Dipartimento di Biologia molecolare dell'Università di Newcastle Upon Tyne (UK), dove si è svolta parte della sperimentazione. Le larve venivano allevate su di una miscela composta al 90% di farina e al 10% di lievito di birra liofilizzato e poste in celle climatizzate alla temperatura di  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 60-70 % U.R, L:D 12:12, collocate all'interno di contenitori in vetro di forma cilindrica, sui quali erano presenti piccole aperture sulla parte superiore, per

consentire il passaggio dell'aria (Whyland *et al.*, 2009).

### ***9.2 Analisi bioinformatiche preliminari***

Nella fase iniziale del progetto di ricerca, a seguito dell'individuazione degli insetti target, sono state condotte preliminarmente una serie di analisi bioinformatiche volte alla selezione dei geni verso i quali indirizzare la sperimentazione. La selezione dei geni utilizzati può influenzare significativamente l'efficacia dell'RNAi sugli insetti: Terenius *et al.* (2011) hanno osservato che su 130 geni utilizzati su Lepidotteri per analisi di silenziamento genico, solo il 38% è stato silenziato efficacemente, mentre il 48% e il 14% dei geni non sono stati silenziati o si è registrata una bassa efficacia. È stato inoltre osservato che i geni legati al sistema immunitario hanno una percentuale di silenziamento mediamente più alta. Il gene bersaglio ideale per l'RNAi produce dell'mRNA con elevato *turnover*, che codifica per una proteina con una breve emivita.

### ***9.3 Selezione geni target***

**$\alpha$ -amilasi.** L'  $\alpha$ -amilasi è un enzima, appartenente alla classe delle idrolasi che catalizza l'endoidrolisi di legami glucosidici in oligosaccaridi e polisaccaridi contenenti tre o più residui. Le amilasi agiscono sui legami  $\alpha$ -glucosidici di amido e glicogeno. Anche se la cellulosa è comune nella dieta di insetti fitofagi, l'innata capacità di digerirla è rara.

I carboidrati sono presenti nel cibo prevalentemente come polisaccaridi e disaccaridi e, una volta ingeriti, sono scissi in monosaccaridi, facilmente assimilabili attraverso la parete intestinale. L'assorbimento dei monosaccaridi in generale avviene passivamente attraverso la parete intestinale, ma è

possibile che questa diffusione sia facilitata da una proteina *carrier*. Gli zuccheri presenti nell'emolinfa vengono poi assorbiti dalle cellule lipidiche che circondano l'intestino. La diffusione richiede un differente gradiente di concentrazione per dirigere il movimento degli zuccheri dall'intestino nell'emolinfa. Per mantenere questo gradiente, il glucosio assorbito è convertito nel disaccaride trealosio, consentendo così il passaggio di più glucosio dall'intestino (Klowden, 2007).

**V-ATPasi.** Le ATPasi sono una classe di enzimi che catalizzano una specifica reazione grazie all'energia ricavata dall'idrolisi di ATP in ADP e  $P_i$ . L'attività ATPasica è presente in tutti gli organismi viventi ad oggi noti. Spesso tali enzimi sono proteine integrali di membrana (ancorate alla membrana plasmatica) e spostano un soluto attraverso la membrana stessa.

La V-ATPasi o protone-vacuolare adenosina trifosfatasi, nota anche come pompa protonica, è la forza motrice che regola il movimento di alcuni ioni e la concentrazione di protoni nelle cellule degli insetti. Questa trasduzione dell'idrolisi dell'ATP in una corrente protonica, in assenza di altri ioni, eccita le membrane delle cellule dei tubi malpighiani. La traslocazione di protoni nel lume del tubo svolge anche un ruolo chiave nella regolazione del pH e l'acidificazione dei compartimenti cellulari. I protoni trasportati nel lume ritornano alla cellula a mediante un catione  $H^+$  promotore degli scambi di sodio e di potassio dalla cellula nel lume, il quale regola il processo escretore. Sebbene gli insetti fitofagi trasportino principalmente ioni potassio, insetti ematofagi, come le zanzare, trasportano ioni sodio e cloruro, e l'emittero ematofago *Rhodnius* trasporta sia ioni sodio che potassio. La V-ATPasi si occupa di regolare la produzione di tutti questi ioni e degli scambi

di sodio e di potassio creando un gradiente passivo di piccoli soluti. Per alcune tossine e metaboliti si verifica un trasporto di tipo attivo, seguendo un percorso di trasmissione cellulare. Sostanze a basso peso molecolare, tra cui l'acido urico, si muovono attraverso le cellule per diffusione passiva, ma diversi composti tossici più grandi, come alcaloidi vegetali, vengono rimossi dall'emolinfa per tramite di un trasporto attivo. Anioni organici sono trasportati dalle cellule, consentendo loro di smaltire insetticidi e di altri composti tossici indesiderati (Klowden, 2007).

**Recettore dell'ecdisona.** Negli artropodi, la muta è controllata dall'oscillazione dei livelli di ecdisona e neotenina. A livello molecolare, questo ormone svolge la sua funzione regolativa legandosi ad un complesso eterodimerico formato da due recettori nucleari: il recettore dell'ecdisona (EcR) e il recettore X retinoico (RXR), omologo del recettore ultraspiracle (USP). Negli insetti, il complesso EcR/USP regola direttamente i geni target primari dell'ecdisona, tra i quali Broad-Complex (BR-C), E74 ed E75. Questi geni codificano fattori di trascrizione che mediano ed amplificano il segnale ormonale regolando un ampio assortimento di geni target secondari coinvolti nel passaggio larva- pupa. (Thummel, 1995; King- Jones & Thummel, 2005).

#### ***9.4 Selezione dei primers***

Il database NCBI GenBank è stato utilizzato come fonte principale per la selezione dei geni da utilizzare nella sperimentazione. L'attenzione è stata posta, per entrambi gli insetti, sui geni che codificano per l' $\alpha$ -amilasi, la V-ATPasi e il recettore dell'ecdisona.

Per *R. ferrugineus* i geni sono stati individuati tramite allineamento di

sequenze nucleotidiche e amminoacidiche, utilizzando specie e famiglie filogeneticamente affini all'insetto target presenti sulla banca dati NCBI. Le porzioni conservate dei geni sono state confrontate con il database TSA (*Transcriptome Shotgun Assembly*) di *R. ferrugineus*, che contiene il genoma completo dell'insetto, ma senza annotazioni in merito alle funzioni dei singoli geni. Per *T. castaneum* i geni sono stati selezionati utilizzando le sequenze disponibili su GenBank. Per *T. castaneum* nessuna altra operazione si è resa necessaria poiché, in quanto organismo modello, l'insetto presenta l'intero genoma completamente sequenziato e annotato. I geni selezionati sono stati i medesimi scelti per *R. ferrugineus*, al fine di poter rendere i dati finali comparabili. La scelta dei geni target è stata principalmente dettata, oltre che dalla presenza di informazioni di geni sequenziati di coleotteri tassonomicamente vicini a *R. ferrugineus*, soprattutto dall'importanza biologica che gli stessi rivestono in quanto tutti codificanti proteine essenziali per la vita e lo sviluppo degli insetti.

Una volta individuate le sequenze, i primers sono stati disegnati utilizzando i programmi: Primer- BLAST, PRIMER3 e E-RNAi.

<b><math>\alpha</math>-amilase</b>			
<b>Primer Name</b>	<b>Primer sequence (5'-3')</b>	<b>Product length</b>	<b>Primer use</b>
ALPHFW	CTT AGG TCC CTG CTT CCG TG	511pb	PCR
ALPHRV	ATC CGG GAG ACC AGT GGT AA	511pb	PCR
ALPHT7FW	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GTG GAA AAC TGG GGA ACA GGG	437pb	dsRNA synthesis
ALPHT7RV	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT CTC CAC TAG CTG TAG CCG	437pb	dsRNA synthesis

<b>ATPase</b>			
<b>Primer Name</b>	<b>Primer sequence (5'–3')</b>	<b>Product length</b>	<b>Primer use</b>
ATP2FW	TGA AAC TGA ATT CGA TGG TGA ACG	489bp	PCR
ATP2RV	GCC CAA CGT GAA GTA GAA TCAG	489bp	PCR
ATPT7FW	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGAG TG CAA GTT TGG CCT GTG CGT	414bp	dsRNA synthesis
ATPT7RV	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GCATTG TAA CCC ATA TCA CGG	414bp	dsRNA synthesis
<b>Ecdyson receptors</b>			
<b>Primer Name</b>	<b>Primer sequence (5'–3')</b>	<b>Product length</b>	<b>Primer use</b>
ECDR2FW	CAC CGA CGA CTG GCT AAG TT	547bp	PCR
ECDR2RV	CGT ACT GTT GGG CTT GTC CT	547bp	PCR
ECDRT7FW	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GGT CGC ACG CCT TTA CAG TTA	419bp	dsRNA synthesis
ECDRT7RV	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GCT GTA CCT CGG GAA CGA CAC	419bp	dsRNA synthesis

Tab 2 - Primers selezionati per *R. ferrugineus* per i geni dell' $\alpha$ -amilase, V-ATPase e recettore dell'ecdisona.

<b>&gt;gi 167466184 ref NM_001114376.1</b>			
<b><i>Tribolium castaneum</i> alpha amylase (LOC663954), mRNA</b>			
<b>Primer Name</b>	<b>Primer sequence (5'–3')</b>	<b>Product length</b>	<b>Primer use</b>
ALPHiFW	CGGAGTGGAACTGCTTGAT	421bp	PCR
ALPHiREV	TACCCAATGGTGAAGGCGAC	421bp	PCR
ALPHiT7FW	TAATACGACTCACTATAGGGA GATCGACAACCACGACAACCA	353bp	dsRNA
ALPHiT7REV	TAATACGACTCACTATAGGGA GTTGTTTCCTCTCCCGAAGGC	353bp	dsRNA



>gi 237681144 ref NM_00116 0245.1	<i>Tribolium castaneum</i> ATPase, class II, type 9B mRNA		
<b>Primer Name</b>	<b>Primer sequence (5'-3')</b>	<b>Product length</b>	<b>Primer use</b>
ATPtFW	GATGGGTTGAGGACGTTGGT	437bp	PCR
ATPtREV	CTTCGAGACTATCGCCGCTT	437bp	PCR
ATPtT7FW	TAATACGACTCACTATAGGGA GTCGTCTCTCCGTAACCGACC	310bp	dsRNA
ATPtT7REV	TAATACGACTCACTATAGGGA GGTCTTGTTTTCGCCGGAAGG	310bp	<u>dsRNA</u>
>gi 213512187 ref NM_00114 1918.1	<i>Tribolium castaneum</i> ecdysone receptor (Ecr), var B, mRNA		
<b>Primer Name</b>	<b>Primer sequence (5'-3')</b>	<b>Product length</b>	<b>Primer use</b>
ECDRtFW	TCCGGTTACCACTACAACGC	584bp	PCR
ECDRtREV	AGAGCGATCTGGTCTTCCCT	584bp	PCR
ECDRtT7FW	TAATACGACTCACTATAGGGA GGCGAGATGAAACGCAGATGG	315bp	dsRNA
ECDRtT7REV	TAATACGACTCACTATAGGGA GAGCCGTCTGGATGATGGTG	315bp	dsRNA

Tab 3 - Primers selezionati per *T. castaneum* per i geni dell' $\alpha$ -amilase, V-ATPase e recettore dell'ecdisona.

### 9.5 Reference genes

Nella ricerca biologica, la tecnica di PCR real-time (qPCR) è l'approccio più riproducibile e sensibile per l'analisi di espressione genica ed è stato ampiamente utilizzato per misurare e confrontare livelli di trascrizione genica in molteplici studi (Bustin, 2002; Derveaux *et al.*, 2010). Se la tecnica di qPCR, da un lato è molto sensibile nel misurare i livelli di espressione genetica, dall'altro la qualità dei risultati può essere influenzata da diverse variabili tra cui la tipologia e la qualità dei reagenti, la stabilità dell'RNA, la sua quantità e il suo grado di purezza, l'efficienza di trascrizione inversa e l'efficienza della PCR (Bustin & Nolan, 2004; Mahoney *et al.*, 2004).

Per evitare distorsioni, sono state ideate nel tempo una serie di strategie per

la normalizzazione dei dati, compreso il campionamento a peso o a volume di tessuti simili al fine di garantire dimensioni simili di campione (Huggett *et al.*, 2005), il *targeting* del DNA genomico (Talaat *et al.*, 2002) e l'utilizzo di molecole di RNA “artificiale” (Bustin & Nolan, 2004). Come riportato ampiamente in letteratura, il metodo più adatto per la quantificazione dell'mRNA è quello di includere standard interni, chiamati geni costitutivi o *reference genes*. Dal momento che questi geni, oltre a essere necessari per i processi cellulari fondamentali sono coinvolti in altri meccanismi biochimici, si presume che i loro livelli di espressione genica siano uniformi e non influenzabili per cause endogene (Thellin *et al.*, 1999). Tra questi troviamo:  $\beta$ -actina, 18S RNA ribosomiale (18S rRNA) proteina ribosomiale RP6, fattore di allungamento 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e molti altri (Nicot *et al.*, 2005; Radonic *et al.*, 2004).

In tutte le prove effettuate, è stato selezionato il gene codificante per la proteina ribosomiale RP6, sia per *R. ferrugineus* e che per *T. castaneum*, selezionandolo come *reference gene* nella procedura sperimentale (Tab.4), in quanto si è assunto che la sua espressione, essendo gene costitutivo, fosse indipendente delle condizioni sperimentali (Thellin *et al.*, 1999; Lord e t al., 2010; Yang *et al.*, 2014).

Primer sequence(5'–3')	Primer name	Primer sequence(5'–3')	Primer name
AGATATATGGAAGCATCATGAAGC	RpS6FW	GCAGATGCTTTAGGCGATGA	HRFRp6F
CGTCGCTCTCTTTGCTCAAATTG	RpSCT2RV	AAACGGACCCTGCTGTTAGT	HRFRp6R

Tab 4- Reference genes primers selezionati per *T. castaneum* e *R. ferrugineus*

### **9.6 Estrazione RNA**

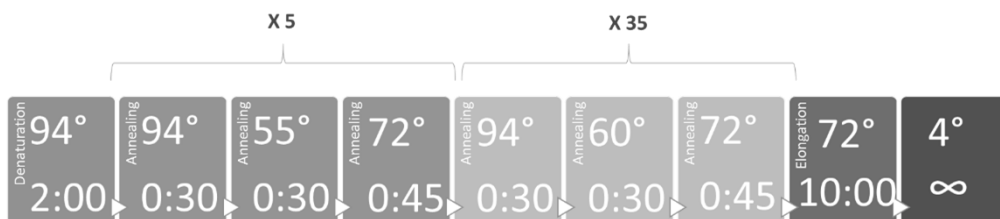
L'RNA totale è stato estratto da larve all'ultimo stadio larvale di *R. ferrugineus* e *T. castaneum* utilizzando PerfectPure RNA Tissue Kit (5

PRIME<sup>®</sup>) seguendo le istruzioni riportate nel manuale del produttore. Alla fine del processo estrattivo, per verificare il buon esito del procedimento, la concentrazione di RNA è stata misurata utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop 2000<sup>®</sup> (Thermo Scientific<sup>®</sup>). Successivamente l'acido nucleico è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando l'enzima Precision nanoScript<sup>™</sup> Reverse Transcription (Primer design<sup>®</sup>) seguendo le istruzioni riportate nel manuale del produttore.

### 9.7 T7 PCR

Il cDNA ottenuto dalla retro-trascrizione dei campioni, veniva poi impiegato in una PCR utilizzando i primers con sequenza promotore T7, necessari per la successiva produzione di dsRNA.

L'amplificazione dei campioni è stata effettuata utilizzando DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific<sup>®</sup>) nelle quantità consigliate nel manuale del produttore, e secondo il seguente schema di temperature e cicli:



Per verificare le dimensioni del prodotto di PCR e il buon esito del procedimento, il campione veniva poi sottoposto ad elettroforesi su gel all'1% di agarosio (5 PRIME<sup>®</sup>) e 0.0000001% di GelRed<sup>™</sup> (Biotium<sup>®</sup>) solubilizzati in buffer TBE 1X. Dopo la corsa elettroforetica, il gel era osservato mediante un transilluminatore UV (ChemiDoc<sup>™</sup>, BIORAD<sup>®</sup>)

### 9.8 Clonaggio

Al fine di avere conferma che il prodotto di PCR corrispondesse al target

selezionato, per i geni è stato effettuato il clonaggio in cellule di *E. coli*, utilizzando il kit Strata cloning® kit (Agilent Technologies®) seguendo le istruzioni riportate nel manuale del produttore. Le colonie che risultavano positive all'inserzione di un frammento all'interno del plasmide venivano raccolte e messe in coltura in *LB broth* con kanamicina a 37°C e frequenza di agitazione di 12 Hz. Dopo 16-18h il plasmide contenente l'insero veniva purificato dalle cellule in coltura mediante l'utilizzo del kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®) seguendo le istruzioni riportate nel manuale del produttore. La lunghezza dell'insero nelle colonie positive al clonaggio è stata poi verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio, con le medesime modalità riportate in precedenza, dopo il taglio con enzima di restrizione EcoRI (Life Technologies®). Il purificato veniva poi inviato ad un servizio esterno per il sequenziamento Sanger. Le sequenze ottenute sono state successivamente analizzate tramite il software FinchTV 4.0 e confrontate con



Fig18- Clonaggio. Selezione colonie batteriche.

il database NCBI.

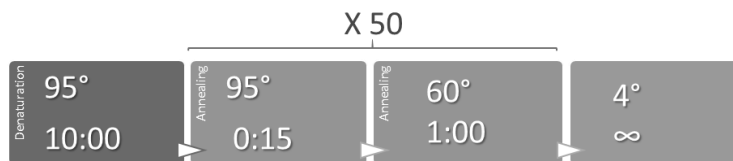
### **9.9 Produzione di dsRNA**

È stato prodotto dsRNA per i geni dell' $\alpha$ -amilasi della V-ATPasi e del recettore dell'ecdisone, utilizzando il kit MEGAscript® RNAi Kit (Life Technologies®) seguendo le istruzioni riportate nel manuale del produttore.

Partendo da 1 µl di cDNA, e attraverso l'utilizzo di primers specifici, è stato ottenuto un prodotto con una concentrazione iniziale di  $\approx 700$  ng/µl per *R. ferrugineus* e di  $\approx 1000$  ng/µl per *T. castaneum*. Il dsRNA prodotto è stato poi visualizzato dopo elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

### 9.10 PCR quantitativa in tempo reale (qPCR)

Al fine di constatare l'avvenuto silenziamento dei geni selezionati e testati veniva eseguita una qPCR utilizzando lo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies®). Per le prove è stato utilizzato come agente intercalante il SYBR® green (Life Technologies®) seguendo le istruzioni riportate nel manuale del produttore. Il settaggio utilizzato durante le prove ha previsto l'utilizzo del seguente schema di temperature e cicli:



### 9.11 Variazione dell'espressione genica ai diversi stadi di sviluppo

Per verificare l'eventuale variazione dell'espressione genica durante lo sviluppo post embrionale per i geni selezionati (Douglas *et al.*, 2000), sono state condotte analisi per ogni stadio di sviluppo di *R. ferrugineus* e *T. castaneum*, usando la procedura esplicitata in precedenza.

Successivamente è stata eseguita una qPCR per verificare, se ai diversi stadi di sviluppo dell'insetto ci fosse una differenza statisticamente significativa nella espressione dei differenti geni, in modo da poter individuare il target più sensibile sul quale eseguire i test. La prova è stata effettuata su 5 esemplari per ogni stadio di sviluppo ed è stata replicata tre volte.

## **9.12 Somministrazione di dsRNA a *R. ferrugineus***

### **9.12.1 Iniezione**

Al fine di verificare l'efficacia del dsRNA ed il relativo fenomeno dell'RNAi su *R. ferrugineus*, è stato somministrato dsRNA per i geni target, tramite iniezione intra-addominale, a sei esemplari all'ultimo stadio larvale dell'insetto (5 larve + 1 larva di controllo). Ogni prova è stata replicata tre volte.

Prima di ogni prova, e dopo 72h dall' iniezione, le larve sono state poste su di una bilancia elettronica di precisione per osservare eventuali variazioni in termini di peso.

Le larve sono state prelevate e anestetizzate con anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) all'interno di contenitori in plastica (Jianxiu *et al.*, 2013). Per ogni gene sono stati testati due differenti dosaggi: 5µl di dsRNA alla concentrazione di 300 ng/µl (1500ng) e 5µl di dsRNA alla concentrazione di 1100ng/µl (5500ng).

L'iniezione è stata eseguita fra il terzo e il quarto urite utilizzando il microiniettore Femtojet<sup>®</sup> (Eppendorf GmbH). Dopo 48h dall'iniezione si è proceduto con l'estrazione dell'RNA totale (PerfectPure RNA Tissue Kit<sup>®</sup> - 5Prime GmbH) e alla sua retrotrascrizione in cDNA (Precision qScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription kit<sup>®</sup> - Primer Design Ltd). In seguito è stata eseguita una qPCR per verificare l'avvenuto silenziamento.

### **9.12.2 Ingestione**

Sono state poi avviate prove volte ad accertare il funzionamento del fenomeno dell'RNAi sull'insetto target tramite ingestione dei dsRNA (Coy *et al.*, 2012; Fang Zhu *et al.*, 2010). Sono state prelevate sei larve (5 larve + 1 larva controllo) all'ultimo stadio di sviluppo e sono state poste in affamamento per 48h. Successivamente il dsRNA veniva posto su piccole

porzioni di mela del peso di  $\approx 5$ g. Sono stati testati due differenti dosaggi: 5 $\mu$ l di dsRNA alla concentrazione di 300 ng/ $\mu$ l (1500ng) e 5  $\mu$ l di dsRNA alla concentrazione di 1100ng/ $\mu$ l (5500ng). Ogni prova è stata replicata tre volte. Dopo 72 h dalla somministrazione tramite ingestione orale si è proceduto con l'estrazione dell'RNA totale (PerfectPure RNA Tissue Kit<sup>®</sup> - 5Prime GmbH) e alla sua retrotrascrizione (Precision qScript<sup>™</sup> Reverse Transcription kit<sup>®</sup> - Primer Design Ltd) (Jianxiu *et al.*, 2013). In seguito è stata eseguita una qPCR per verificare l'avvenuto silenziamento.

### **9.13 Biosaggi – *R. ferrugineus***

Per valutare l'efficacia dell'RNAi in relazione alla diminuzione dell'espressione genica per i geni target, sono stati condotti biosaggi per i geni oggetto di studio, volti a valutare la percentuale di mortalità nel tempo ed eventuali variazioni fenotipiche. Per ogni prova sono state utilizzati gruppi di 5 larve all'ultimo stadio di sviluppo larvale; l'esperimento è stato replicato 3 volte.

Iniezione. Per ogni gene venivano somministrati ad ogni larva 5 $\mu$ l di dsRNA alla concentrazione di 300 ng/ $\mu$ l (1500ng) tramite microiniezione eseguita fra il terzo e il quarto urite addominale utilizzando il microiniettore Femtojet<sup>®</sup> (Eppendorf). Dopo l'iniezione le larve venivano poste singolarmente contenitori in plastica sui quali venivano eseguiti piccoli fori per l'aerazione, poste in una cella climatizzata ( $27\pm 1^\circ\text{C}$ , 60-70% U.R, L:D 12:12) ed alimentate con la loro dieta. La sopravvivenza delle larve veniva monitorata ogni 24 h per un periodo di due settimane.

Ingestione. Le larve venivano poste in affamamento per 48h. Successivamente 5 $\mu$ l di dsRNA alla concentrazione di 300 ng/ $\mu$ l (1500ng) veniva posto su

piccole porzioni di mela del peso di  $\approx 5\text{g}$  all'interno di piccoli contenitori in plastica sui quali venivano eseguiti piccoli fori per l'aerazione, e le larve collocate singolarmente all'interno di essi. I contenitori erano poi collocati in una cella climatizzata ( $27\pm 1^\circ\text{C}$ , 60-70% U.R, L:D 12:12) una volta consumata la porzione di mela le larve venivano alimentate con la loro dieta. La sopravvivenza delle larve veniva monitorata ogni 24 h per un periodo di due settimane.

#### **9.14 Somministrazione di dsRNA a *T. castaneum***

##### *9.14.1 Iniezione*

Per verificare l'efficacia del dsRNA ed il relativo fenomeno dell'RNAi su *T. castaneum*, è stato somministrato dsRNA per i geni della V-ATPase e per il recettore dell'ecdisione, tramite iniezione intra-addominale, a 5 esemplari all'ultimo stadio larvale dell'insetto. La prova è stata replicata tre volte. Le larve sono state prelevate e anestetizzate con anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) all'interno di contenitori in plastica (Jianxiu *et al.*, 2013). Per ogni gene sono stati somministrati  $0.2\mu\text{l}$  di dsRNA alla concentrazione di  $800\text{ ng}/\mu\text{l}$  ( $150\text{ng}$ ) per larva. L'iniezione è stata eseguita fra il terzo e il quarto urite addominale utilizzando il microiniettore Nanoject II (Drummond Scientific). Dopo 48 h dall'iniezione si è proceduto con l'estrazione dell'RNA totale (PerfectPure RNA Tissue Kit® - 5Prime GmbH) e alla sua retrotrascrizione (Precision qScript™ Reverse Transcription kit® - Primer Design Ltd) In seguito è stata eseguita una qPCR per verificare l'avvenuto silenziamento.



#### 9.14.2 Ingestione

Al fine di verificare l'efficacia del dsRNA per i geni della V-ATPase e del il recettore dell'ecdisione e il relativo fenomeno dell'RNAi tramite ingestione sono state eseguite prove volte a valutarne il funzionamento.

Sono state prelevate sei larve (5 larve + 1 larva controllo) all'ultimo stadio di sviluppo e poste in affamamento per 48h. Successivamente, 150ng di dsRNA venivano aliquotati sul fondo di pozzetti di piastre per colture cellulari, addizionando 10 mg di dieta. Dopo 24h a 25°C, per ogni pozzetto veniva posizionata una larva di *T. castaneum*.. Ogni prova è stata replicata tre volte.

Dopo 72h dalla somministrazione tramite ingestione orale si è proceduto con l'estrazione dell'RNA totale (PerfectPure RNA Tissue Kit® - 5Prime GmbH) e alla sua retrotrascrizione (Precision qScript™ Reverse Transcription kit® - Primer Design Ltd) (Jianxiu *et al.*, 2013). In seguito veniva eseguita una qPCR per verificare l'avvenuto silenziamento.

#### 9.15 Biosaggi – *T. castaneum*

Per valutare l'efficacia dell'RNAi in relazione alla diminuzione dell'espressione genica per i geni target, sono stati condotti biosaggi per i geni oggetto di studio, volti a valutare la percentuale di mortalità, la percentuale di impupamento ed eventuali variazioni fenotepiche.

Per ogni prova sono state utilizzati gruppi di 15 larve all'ultimo stadio di sviluppo, l'esperimento è stato replicato 3 volte.

Iniezione. Per ogni gene sono stati somministrati 0,2µl di dsRNA alla concentrazione di 800 ng/µl (150ng) per larva. L'iniezione è stata eseguita fra il terzo e il quarto urite addominale utilizzando il microiniettore Nanoject II

(Drummond Scientific). Dopo l'iniezione le larve venivano poste singolarmente in piastre con pozzetti per colture cellulari, insieme ad un quantitativo di farina pari a circa 10mg. La piastra veniva poi sigillata con Parafilm™, sui quali venivano eseguiti piccoli fori per l'aerazione, e posta in una cella climatizzata ( $27 \pm 1$  °C, 60-70 % U.R, L:D 12:12). La sopravvivenza delle larve è stata monitorata ogni 24 h per un periodo di due settimane.

Ingestione. 150ng di dsRNA venivano aliquotati sul fondo di pozzetti di piastre per colture cellulari, addizionando 10 mg di dieta. Dopo 24h a 25°C, gli insetti venivano posti singolarmente nei suddetti pozzetti, dopo essere stati in affamamento per 72h.

La piastra veniva poi sigillata con Parafilm™, sui quali venivano eseguiti piccoli fori per l'aerazione, e posta in una cella climatizzata ( $27 \pm 1$  °C, 60-70 % U.R, L:D 12:12 ). La sopravvivenza delle larve è stata monitorata ogni 24 h per un periodo di due settimane.

**dsRNA (1)**

Genes	$\alpha$ -amylase	V-ATPase	Recettore dell'ecdisone
<b>Methods</b>			
injection	1500ng	1500ng	1500ng
	5500ng	5500ng	5500ng
Oral delivery	1500ng	1500ng	1500ng
	5500ng	-	5500ng

**Biosaggi (1)**

Genes	$\alpha$ -amylase	V-ATPase	Recettore dell'ecdisone
<b>Methods</b>			
injection	1500ng	-	1500ng
	-	-	-
Oral delivery	1500ng	-	1500ng
	-	-	-

**dsRNA (2)**

Genes	$\alpha$ -amylase	V-ATPase	Recettore dell'ecdisone
<b>Methods</b>			
injection	-	150ng	150ng
	-	-	-
Oral delivery	-	150ng	150ng
	-	-	-

**Biosaggi (2)**

Genes	$\alpha$ -amylase	V-ATPase	Recettore dell'ecdisone
<b>Methods</b>			
injection	-	150ng	150ng
	-	-	-
Oral delivery	-	150ng	150ng
	-	-	-

Tab 5 -6 Tabella riassuntiva prove effettuate su R. ferrugineus(1) e T. castaneum (2).

### 9.16. Analisi dei dati

Prima di procedere all'analisi statistica dei risultati ottenuti, si è ritenuto opportuno procedere alla normalizzazioni dei dati, in base alla relativa procedura sperimentale. I dati riguardanti la mortalità osservata nei biosaggi sono stati corretti rispetto alla mortalità osservata nel controllo negativo utilizzando la formula di Abbott, come di seguito riportata:

$$\begin{aligned} & \textit{Percentuale di mortalità corretta (\%)} \\ & = 1 - \frac{\textit{numero di esemplari vitali nel campione Trattato}}{\textit{numero di esemplari vitali nel campione di Controllo}} \times 100 \end{aligned}$$

Inoltre, questo dataset è stato trasformato utilizzando la formula  $\arcsin\sqrt{(x)}$ , in modo da soddisfare i presupposti richiesti dalle analisi statistiche parametriche. I dati derivanti dalle analisi di qPCR sono stati normalizzati rispetto al *reference gene* utilizzando il metodo  $\Delta\Delta Cq$  (esempio in Tab. 7).

L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando la procedura *Generalized Linear Model* (GLM), e il test *post-hoc* di Tukey per i confronti multipli. Il GLM è stato costruito per ognuna delle due specie inserendo, come fattori fissi, il metodo di somministrazione, il gene e la dose somministrata, insieme alle loro interazioni a 2 e a 3 vie. I dati di comparazione dell'efficacia tra due dosi differenti, all'interno del medesimo esperimento, sono stati confrontati tramite l'ANOVA univariata, dopo aver verificato il *dataset* per gli assunti richiesti tramite i test di Levene e di Shapiro-Wilk.

L'intera procedura di analisi dei dati è stata effettuata tramite l'utilizzo dei software Microsoft Excel® 2013 e IBM® SPSS® 20.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	siRNA	Conc.	C <sub>q</sub> GAPDH	C <sub>q</sub> ALDOA	ΔC <sub>q</sub>	ΔC <sub>q</sub> Expression	Mean ΔC <sub>q</sub> Expression	ΔC <sub>q</sub> Expression StdDev	ΔΔC <sub>q</sub> Expression	ΔΔC <sub>q</sub> Expression StdDev	%KD
2	Treatment										
3					$=(C_q\text{ALDOA}$	$=2^{-\Delta C_q}$	Average	StdDev	Normalize to NTC		$=(1-\Delta\Delta C_q)*100$
4					$- C_q\text{GAPDH})$		Replicates	Replicates			
5	ALDOA	10 nM	20.6	27.6	7.01	0.008	0.009	0.002	0.027	0.004	97
6			20.8	27.3	6.54	0.011			=G5/G14	=H5/G14	
7			20.9	27.6	6.69	0.010					
8		1 nM	20.7	25.6	4.89	0.034	0.034	0.003	0.111	0.010	89
9			20.6	25.4	4.75	0.037			=G8/G17	=H8/G17	
10			20.6	25.6	5.00	0.031					
11		0.1 nM	20.7	23.5	2.82	0.142	0.123	0.016	0.394	0.052	61
12			20.6	23.7	3.10	0.117			=G11/G20	=H11/G20	
13			20.4	23.6	3.17	0.111					
14	NTC	10 nM	20.5	22.2	1.72	0.304	0.349	0.051	1.000	0.145	
15			21.2	22.5	1.31	0.403			=G14/G14	=H14/G14	
16			21.0	22.5	1.56	0.339					
17		1 nM	21.2	22.5	1.37	0.387	0.306	0.073	1.000	0.239	
18			20.7	22.5	1.81	0.285			=G17/G17	=H17/G17	
19			20.6	22.6	2.03	0.245					
20		0.1 nM	21.9	23.4	1.48	0.358	0.312	0.045	1.000	0.145	
21			20.7	22.6	1.90	0.268			=G20/G20	=H20/G20	
22			20.5	22.2	1.69	0.310					
23	Mock	N/A	20.8	22.1	1.29	0.409	0.364	0.077	1.168	0.247	
24	Transfected		20.2	22.1	1.86	0.275			=G23/G20	=H23/G20	
25			20.9	22.2	1.29	0.409					
26	Untreated	N/A	20.7	22.4	1.69	0.310	0.331	0.039	1.062	0.125	
27			21.0	22.4	1.41	0.376			=G26/G20	=H26/G20	
28			20.8	22.5	1.70	0.308					

Tab7- Esempio del metodo  $\Delta\Delta C_q$  (Bustin & Stephen,2006).

## 10. Risultati

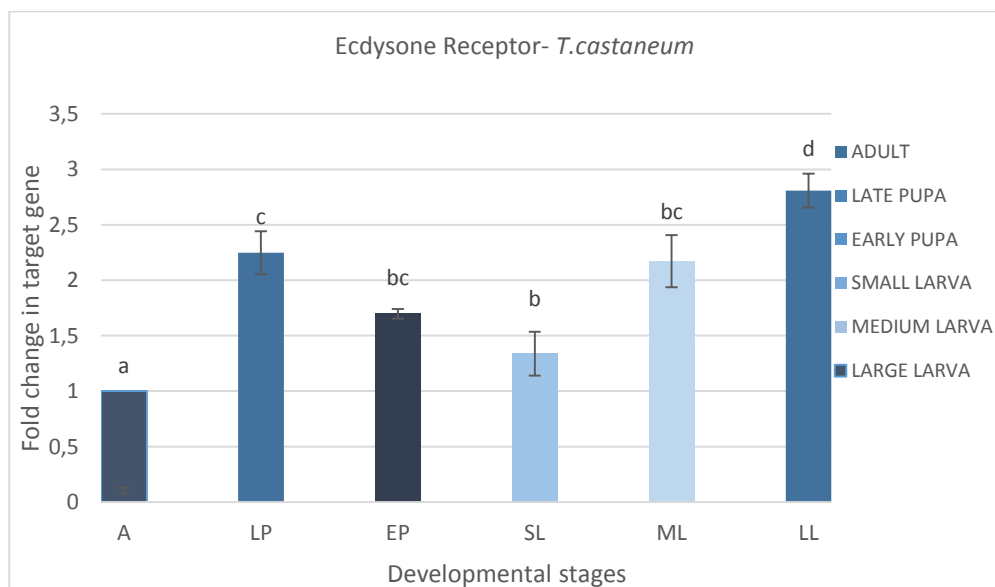
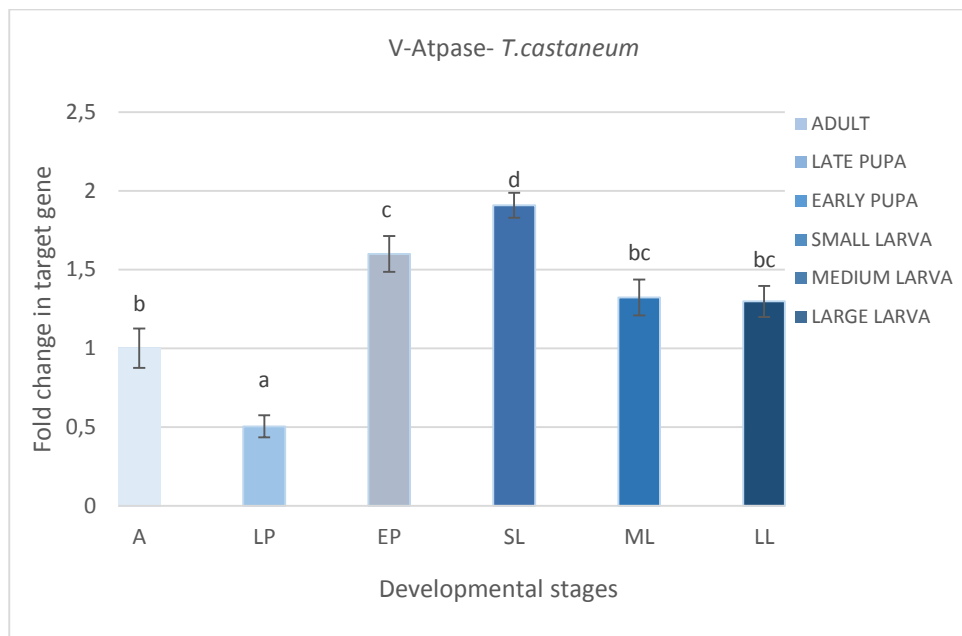
### 10.1. Variazione dell'espressione genica

Le prove effettuate per verificare l'eventuale variazione dell'espressione dei geni target selezionati nei diversi stadi di sviluppo degli insetti oggetto di studio hanno evidenziato, per il medesimo insetto e gene target, differenze significative tra i diversi stadi di sviluppo (*R. ferrugineus* VATPase  $F_{5,12}=63,58$ ;  $P<0,001$ , *R. ferrugineus*  $\alpha$ -amilase  $F_{5,12}=27,038$ ,  $P<0,001$ , *T. castaneum* recettore dell'ecdisone  $F_{5,12}=36,125$ ;  $P<0,001$ , *T. castaneum* VATPase  $F_{5,12}=82,461$ ;  $P<0,001$ ).

Le prove condotte su *T. castaneum* hanno evidenziato una più elevata espressione del gene della V-ATPase negli stadi larvali e nelle giovani pupe (< 24h) mentre nello stadio adulto l'espressione genetica era inferiore, in ogni caso a quella registrata a carico delle larve, ma superiore a quella evidenziata a carico delle pupe mature (> 24h) ( $F_{5,12}=82,461$ ;  $P<0,001$ ) (Graf. 1). Differenze statisticamente significative sono state evidenziate tra pupe neoformate (< 24 h) e quelle mature nelle quali l'espressione del gene era inferiore di circa tre volte. Facendo riferimento agli stadi larvali, l'espressione genica della V-ATPase era significativamente superiore nelle larve di terza età rispetto a quelle di 4° e 5° età.

Per il gene del recettore dell'ecdisone (Graf. 2), l'espressione genetica era statisticamente diversa sia tra i diversi stadi oggetto dell'indagine nonché tra le diverse età del medesimo stadio di sviluppo ( $F_{5,12}=36,125$ ;  $P<0,001$ ). Il valore più basso è stato registrato a carico degli adulti mentre l'espressione genica per il recettore dell'ecdisone raggiungeva i livelli massimi nelle larve mature (quinta età). Nelle larve, l'espressione genica per il recettore dell'ecdisone,

incrementava con l'aumentare dell'età delle larve, mentre diminuiva con l'aumentare dell'età delle pupe.



Graf 1-2- Livelli di espressione genica in *T. castaneum* ai diversi stadi di sviluppo post-embrionale.

I risultati relativi alla variazione di espressione genica in *R. ferrugineus* ai differenti stadi di sviluppo, hanno evidenziato differenze statisticamente significative ( $F_{5,12}=63,58$ ;  $P<0,001$ ) per il gene della V-ATPase. Nelle diverse età larvali l'espressione genica era abbastanza omogenea, anche se i valori medi tendevano a crescere con l'aumentare dell'età larvale. In generale,

le pupe hanno evidenziato dei valori mediamente inferiori a quelli registrati a carico delle larve e simili a quelli registrati negli adulti (Graf. 3).

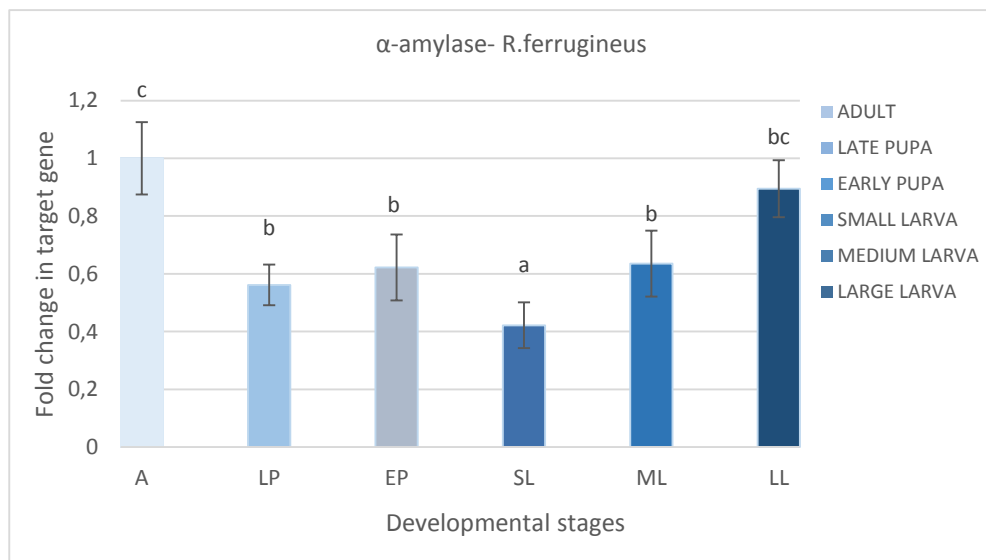
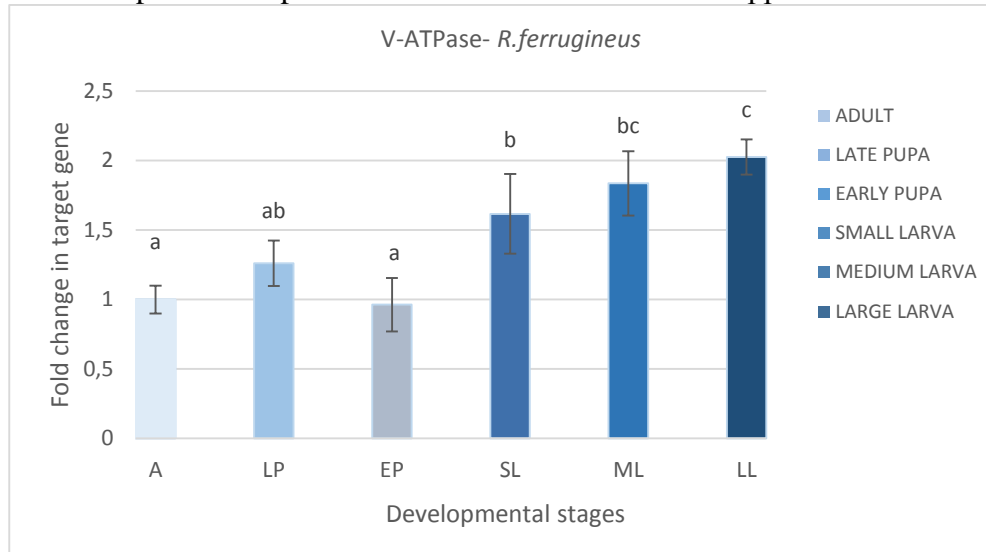
Per lo stesso insetto, il gene dell' $\alpha$ -amilasi non ha invece mostrato livelli di espressione differenti in maniera significativa ( $P < 0,05$ ) tra gli stadi di adulto e di larva matura.

Per lo stesso insetto, il gene dell' $\alpha$ -amilasi ha invece mostrato livelli di espressione genica progressivamente crescenti nelle diverse età delle larve (Graf. 4). Differenze statisticamente significative sono state evidenziate tra i diversi stadi ed età ( $F_{5,12}=27,038$ ,  $P < 0,001$ ). L'espressione genica ha raggiunto il massimo nello stadio di adulto e nelle larve mature.

In generale, gli stadi preimmaginali mostrano molto spesso una maggiore percentuale di silenziamento. Ad esempio, nel caso del lepidottero *Spodoptera frugiperda* (Smith), è stato osservato un effetto di silenziamento maggiore nell'ultimo stadio larvale rispetto alle forme adulte (Griebler *et al.*, 2008 ). Per questo motivo, unitamente a riflessioni legate all'importanza che lo stadio larvale comporta in termini di dannosità, la facilità di somministrazione del dsRNA, e i risultati sopra esposti si è deciso di



utilizzare per tutte le prove larve all'ultimo stadio di sviluppo.



Graf 3-4- Livelli di espressione genica in *R. ferrugineus* ai diversi stadi di sviluppo post-embrionale.

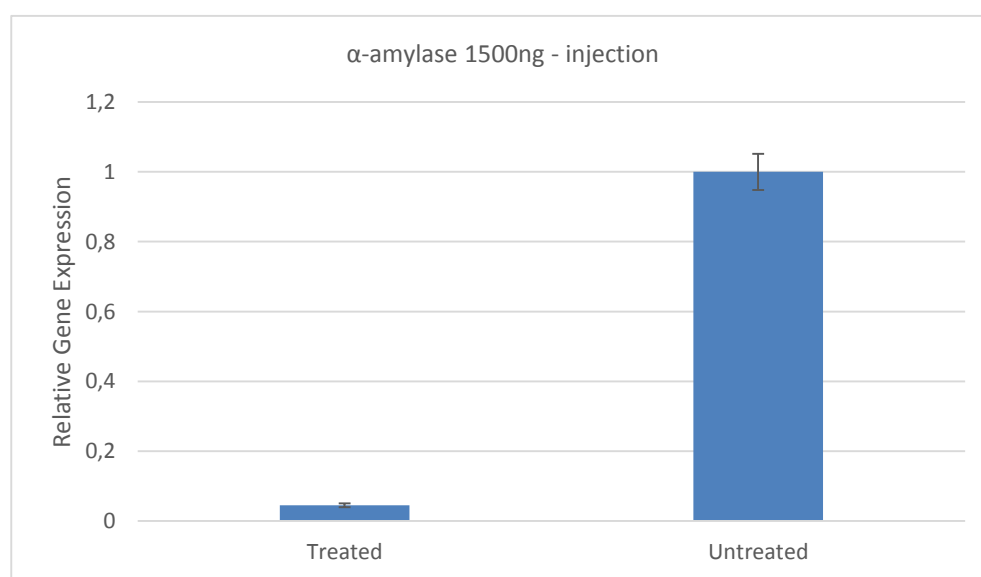
## 10.2 Efficacia dsRNA su *R. ferrugineus*

Il GLM ha riportato, per i fattori inseriti nel modello ( $F_{10, 181}=17,678$ ;  $P<0,001$ ), differenze tra i geni testati ( $F_{2, 181}=62,745$ ;  $P<0,001$ ), per l'interazione tra il gene testato e il metodo di somministrazione ( $F_{2, 181}=7,519$ ;  $P=0,001$ ), e tra il gene stesso e la concentrazione del dsRNA utilizzata ( $F_{2, 181}=10,69$ ;  $P=0,011$ ).

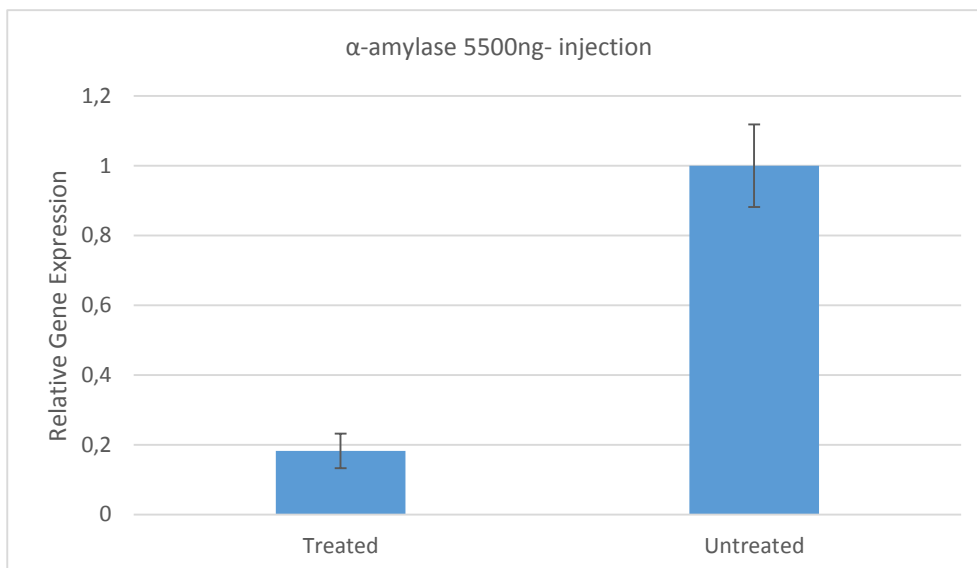
### 10.2.1. Iniezione.

I dati relativi alla somministrazione di dsRNA tramite iniezione intraddominale su larve di *R. ferrugineus* ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i diversi geni analizzati ( $F_{2, 73}=52,911$ ;  $P<0,001$ ) e le diverse concentrazioni testate ( $F_{1, 73}=6,206$ ;  $P=0,015$ ).

L'iniezione di dsRNA per il gene dell' $\alpha$ -amilasi alla concentrazione di 1500ng ha evidenziato una significativa riduzione dell'espressione genica, pari al 95,42% rispetto al controllo ( $F_{1, 28} = 54,80$ ;  $P<0,001$ ). Per lo stesso gene, alla concentrazione di 5500ng è stato riscontrato un effetto di silenziamento genico pari all'81% ( $F_{1, 28} = 27,036$ ;  $P<0,001$ ) (Graf. 5-6).

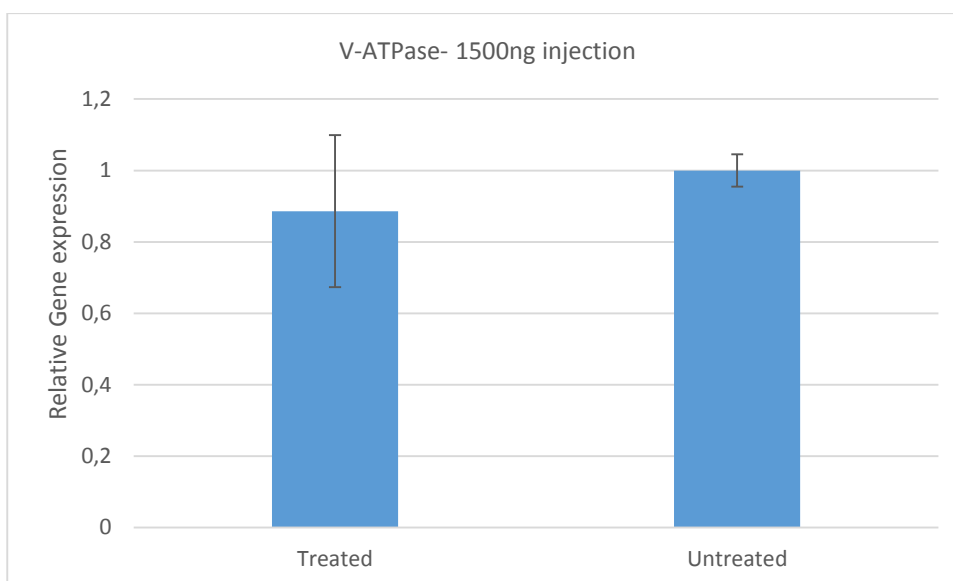


Graf 5 –Riduzione dell'espressione genica su *R.ferrugineus* per il gene  $\alpha$ -amilasi 1500ng– iniezione

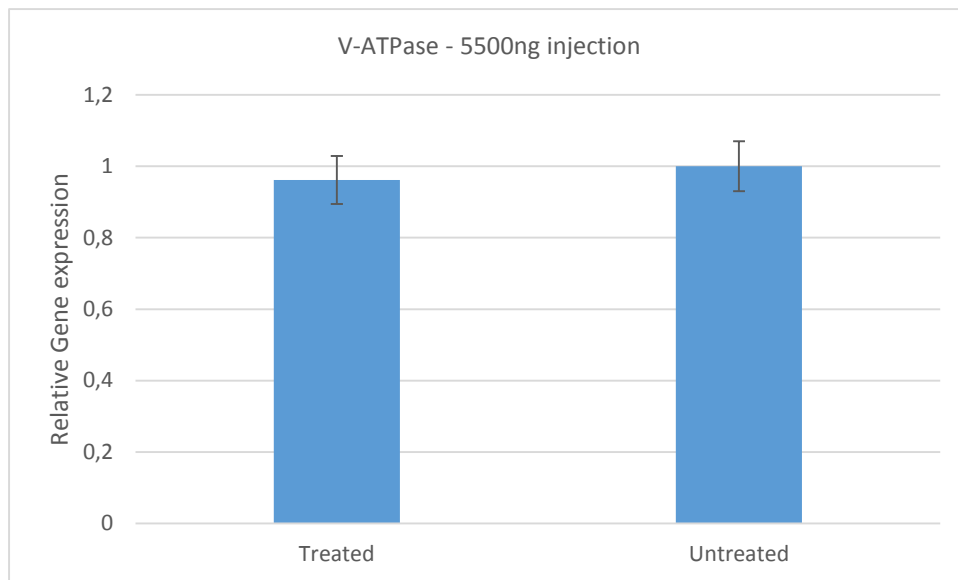


Graf 6 –Riduzione dell’espressione genica su *R.ferrugineus* per il gene  $\alpha$ -amilasi 5500ng – iniezione

Invece, per il gene della V-ATPasi, sia alla concentrazione di 1500ng che alla concentrazione di 5500ng di dsRNA, non vi è stata alcuna riduzione significativa dell’espressione di questo gene nell’insetto ( $F_{1, 28} = 0,212$ ;  $P > 0,05$ ;  $F_{1, 28} = 0,887$ ;  $P > 0,05$ ) (Graf.7-8)

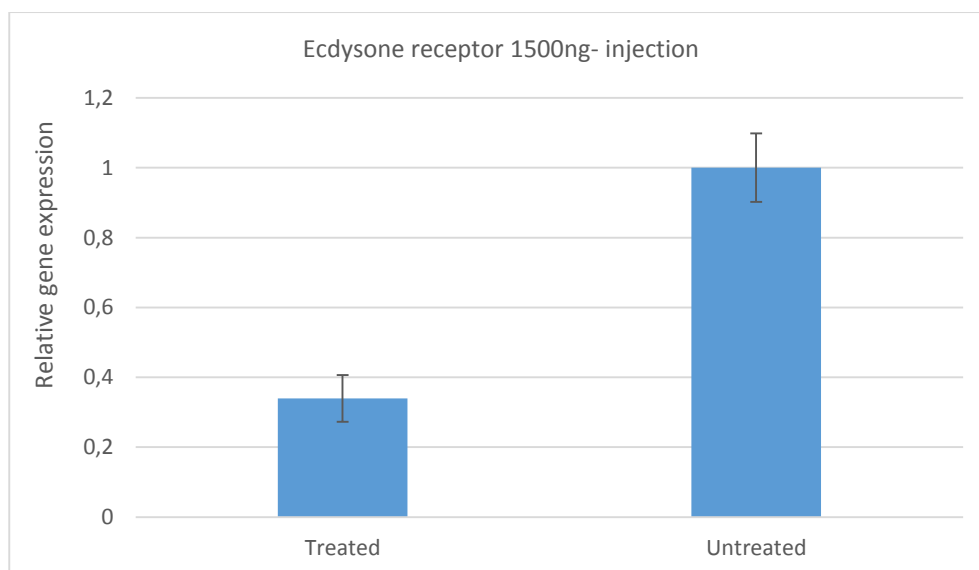


Graf 7-Riduzione dell’espressione genica su *R. ferrugineus* per il gene V-ATPasi-1500ng iniezione

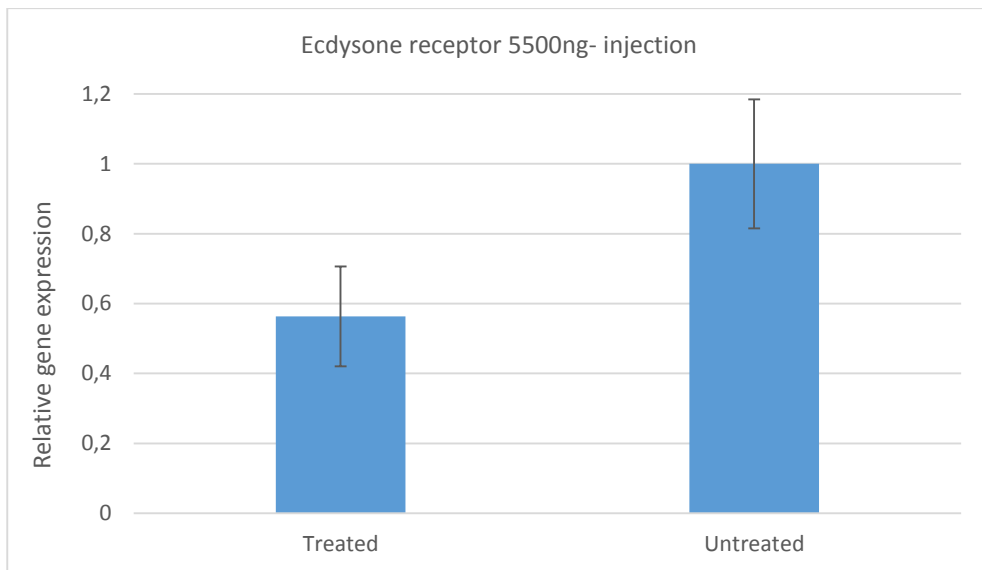


*Graf 8-Riduzione dell'espressione genica su R. ferrugineus per il gene V-ATPasi-5500ng iniezione*

Il gene recettore dell'ecdisione, in seguito alla somministrazione di dsRNA alla dose di 1500ng, ha indotto una riduzione dell'espressione genica pari al 66% ( $F_{1,34} = 14,211$ ;  $P = 0,01$ ) (Graf.7). Alla concentrazione di 5500ng per lo stesso gene, la riduzione dell'espressione genica è stata di circa il 40% ( $F_{1,34} = 0,393$ ;  $P < 0,01$ ) (Graf.9).



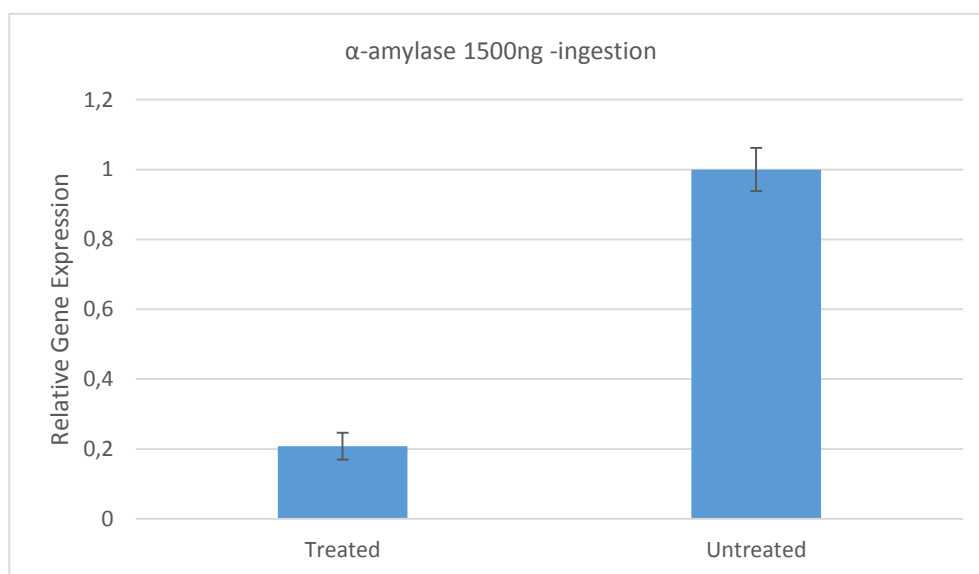
*Graf 9 –Riduzione dell'espressione genica su R. ferrugineus per il gene Recettore dell'ecdisione 1500ng – iniezione*



*Graf 10 – Riduzione dell'espressione genica su R. ferrugineus per il gene del recettore dell'ecdisione 5500ng – iniezione*

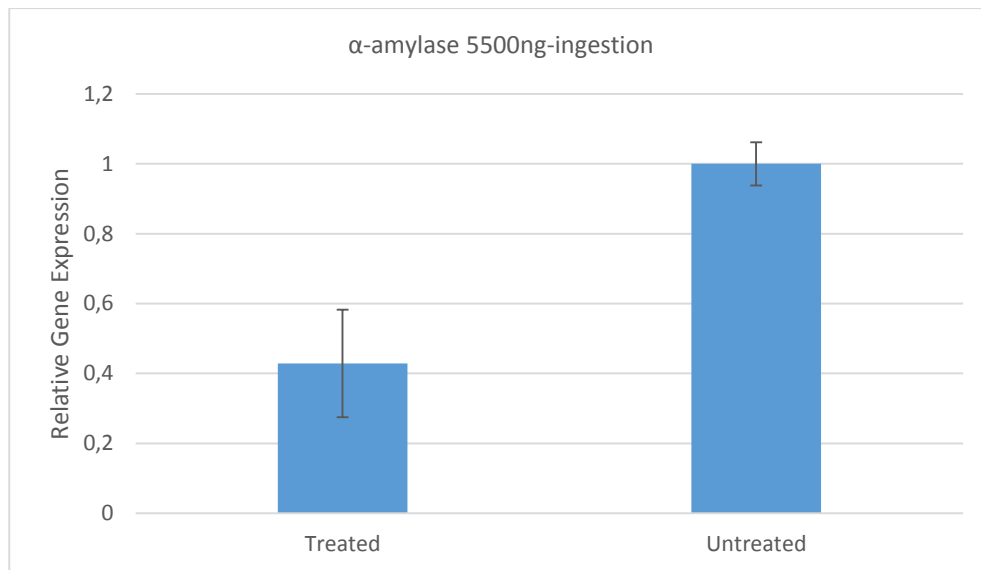
### 10.2.3 Ingestione

Il dsRNA somministrato attraverso il nutrimento, ha evidenziato un differente effetto di riduzione dell'espressione genica ( $F_{5, 108}=11,093$ ;  $P<0,001$ ), tra i diversi geni ( $F_{2, 108}=19,295$ ;  $P<0,001$ ) e sia nell'interazione geni\*concentrazioni testate ( $F_{2, 108}=7,671$ ;  $P=0,001$ ), evidenziando l'efficacia dell'RNAi su *R. ferrugineus*, anche attraverso questa metodologia di somministrazione e quindi la capacità dell'insetto di acquisire il relativo



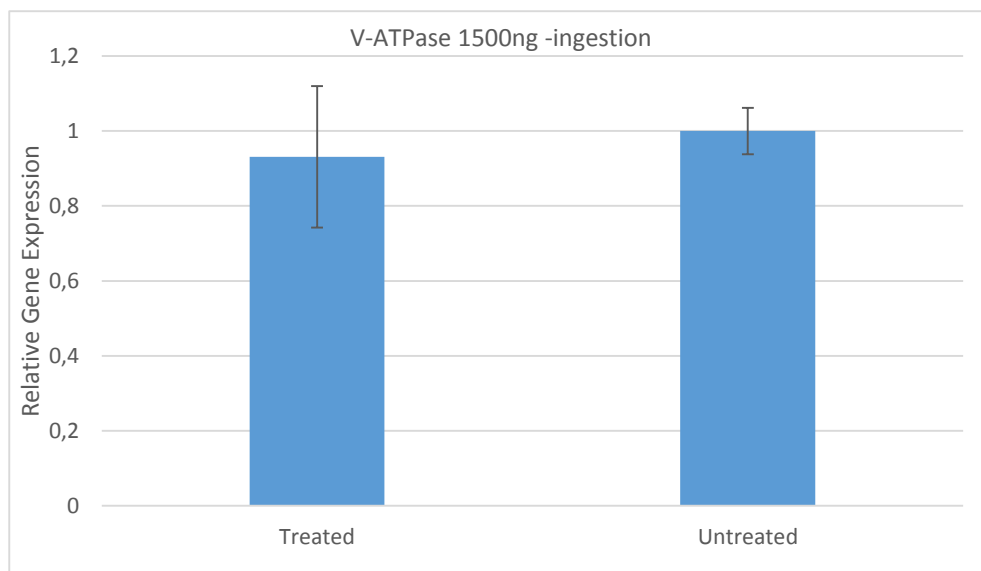
Graf 11 –Riduzione dell'espressione genica su *R. ferrugineus* per il gene α-amilasi 1500ng – ingestione

il dsRNA attraverso il lume intestinale. Per il gene dell'α-amilasi è stata riscontrata un'efficacia statisticamente significativa già alla dose più bassa testata, pari a 1500ng, con una riduzione di espressione genica di circa l'80%. Anche alla dose di 5500ng è stata ottenuta una significativa variazione del gene con una riduzione rispetto al controllo del 57,14%. ( $F_{1,28}=50,93$ ;  $P<0,001$ ;  $F_{1,28}=21,649$ ;  $P<0,001$ ) (Graf 10-11).



Graf 12 –Riduzione dell'espressione genica su *R. ferrugineus* per il gene  $\alpha$ -amilasi 5500ng – ingestione

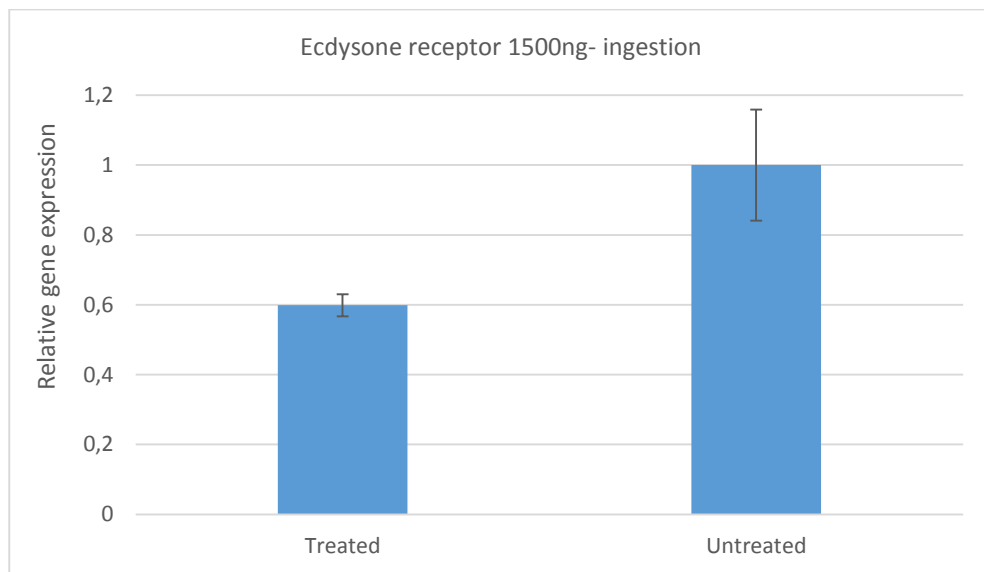
Per il gene della V-ATPasi, anche con questo metodo di somministrazione del dsRNA non è stata riscontrata alcuna differenza a nessuna concentrazione ( $F_{1, 27} = 0,496$ ;  $P > 0,05$ ) (Graf.13).



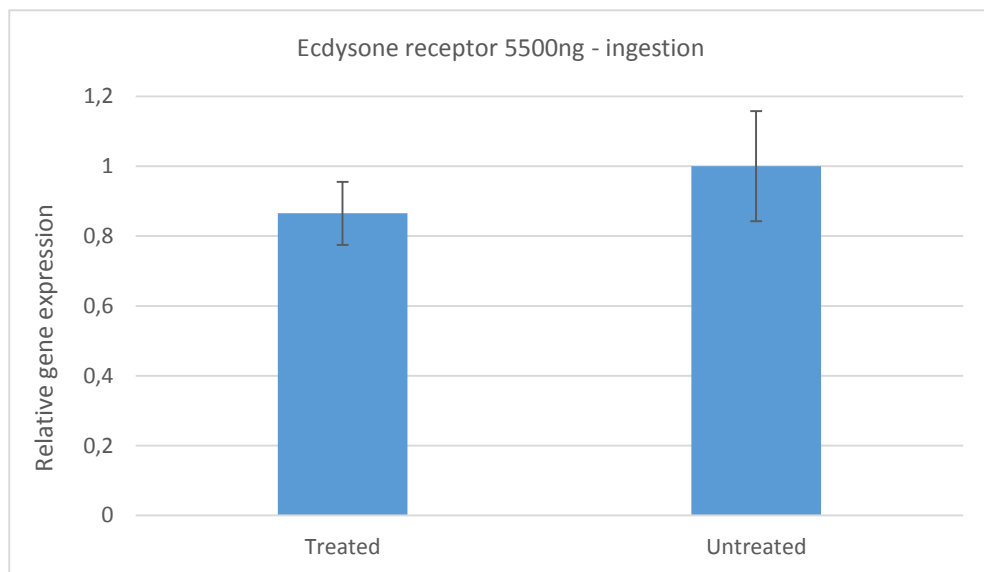
Graf 13-Riduzione dell'espressione genica su *R. ferrugineus* per il gene V-ATPasi-5500ng iniezione

Il gene recettore dell'ecdisione ha mostrato su *R. ferrugineus* una riduzione dell'espressione genica anche attraverso il metodo della somministrazione orale pari al 33,09% ( $F_{1, 34} = 8,711$ ;  $P < 0,01$ ), meno efficace si è rivelata essere la dose di 5500ng, con una riduzione dell'espressione genica pari al 13%

( $F_{1,33}=4,643$ ;  $P<0,01$ ) (Graf.13-14).



Graf 13–Riduzione dell'espressione genica su *R. ferrugineus* per il gene Recettore dell'ecdisione 1500ng



Graf 14 –Riduzione dell'espressione genica su *R. ferrugineus* per il gene Recettore dell'ecdisione 5500ng

### 10.2.3 Analisi comparativa

L'analisi comparativa dei dati tra i differenti metodi di somministrazione del dsRNA (iniezione e ingestione), ha evidenziato una maggiore efficacia del metodo iniettivo rispetto a quello che prevedeva la somministrazione orale



a entrambe le dosi utilizzate. È stata inoltre evidenziata una maggiore efficacia della concentrazione inferiore (1500ng) rispetto a quella più alta (5500ng) per il gene dell' $\alpha$ -amilasi ( $F_{1, 28} = 18,90$ ;  $P < 0,001$ ) e del recettore dell'ecdisone ( $F_{1,28} = 6,26$ ;  $P < 0,01$ ). L'analisi non è stata effettuata per il gene della V-ATPase poiché nei test precedenti non è stata evidenziata alcuna differenza tra i campioni trattati e quelli non trattati ( $P > 0,05$ )

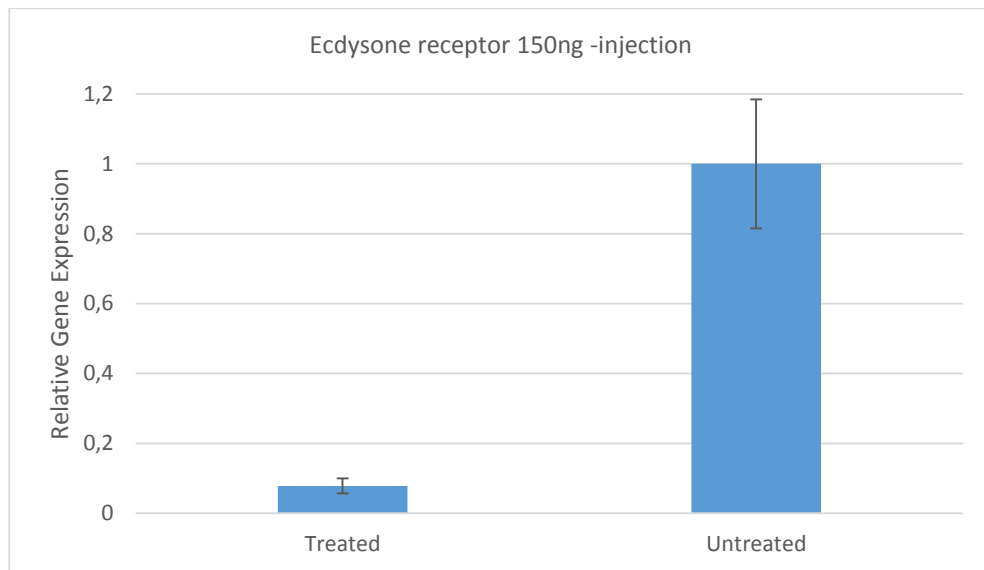
### ***10.3 Efficacia dsRNA su *T. castaneum****

L'analisi tramite GLM sui risultati riguardanti le prove di RNAi nei confronti di *T. castaneum* ha riportato degli effetti positivi dei fattori fissi inseriti nel modello ( $F_{3, 68} = 95,084$ ;  $P < 0,001$ ), mettendo in evidenza le differenze che esistono tra i diversi geni oggetto di studio ( $F_{1, 68} = 278,546$ ;  $P < 0,001$ ) e anche tra i metodi di somministrazione ( $F_{1, 68} = 6,693$ ;  $P < 0,001$ ).

#### ***10.3.1 Iniezione***

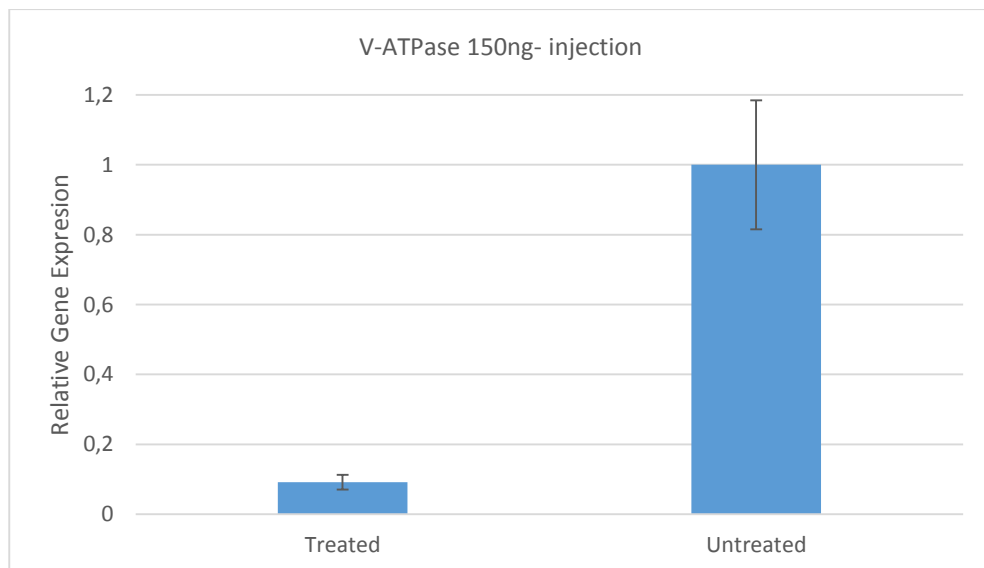
Le analisi condotte sui dati relativi alla somministrazione di dsRNA tramite iniezione intra-addominale su larve di *T. castaneum* hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i diversi geni analizzati.

Per il gene del recettore dell'ecdisone, alla concentrazione di 150 ng si è ottenuta una riduzione dell'espressione genica, pari al 92,20% ( $F_{1, 16} = 5,088$ ;  $P < 0,01$ ) (Graf.14).



*Graf 15-Riduzione dell'espressione genica su T. castaneum per il gene recettore dell'ecdisona – iniezione 150ng*

Anche per il gene della V-ATPase l'analisi statistica dei dati ha mostrato un'effetto di riduzione dell'espressione del gene tramite RNAi pari a circa il 90% (Graf.15) ( $F_{1,16} = 9,213$ ;  $P < 0,01$ ).

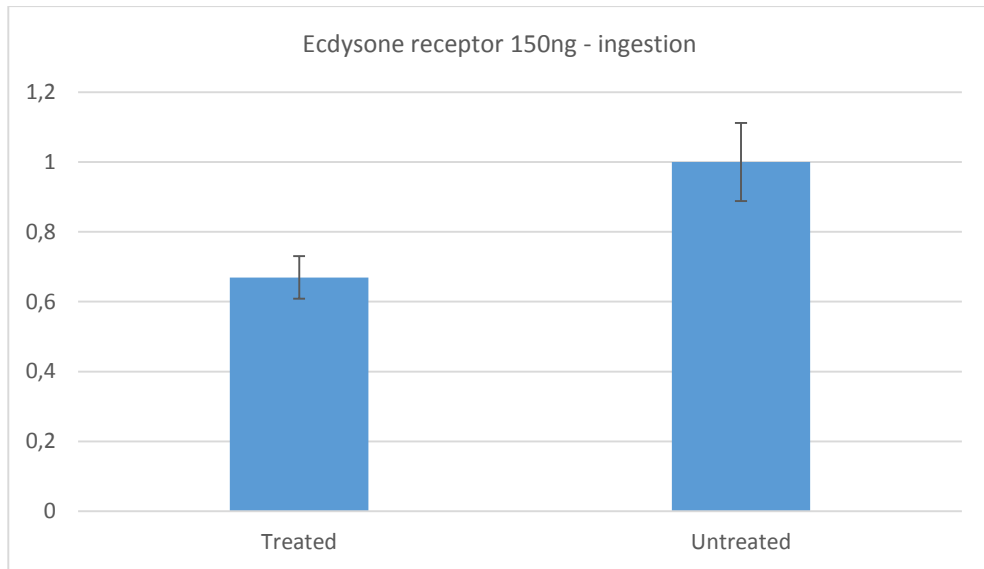


*Graf 16-Riduzione dell'espressione genica su T. castaneum per il gene V-ATPase – iniezione 150ng*

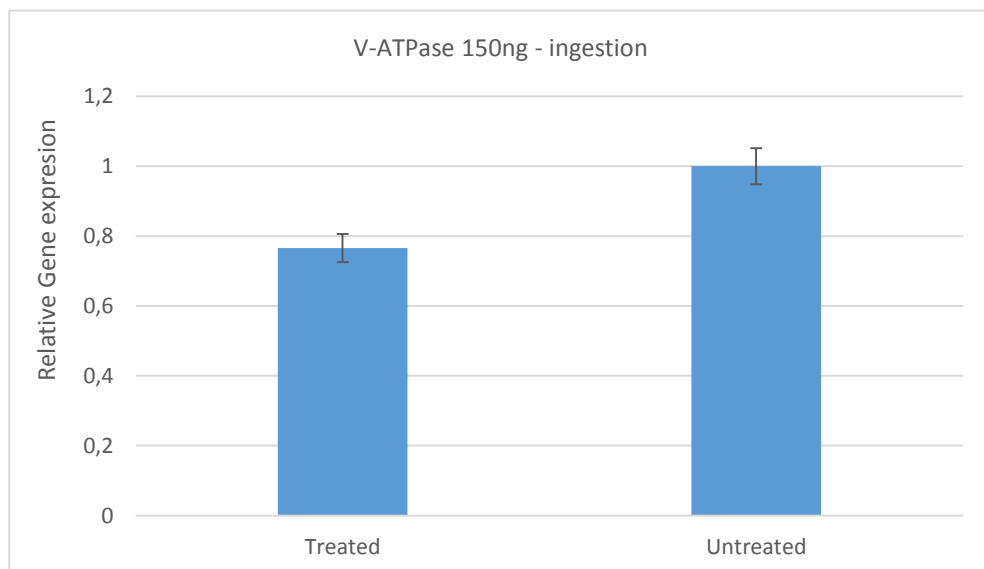
### *10.3.2 Ingestione*

I dati relativi alla somministrazione di dsRNA tramite ingestione hanno rivelato un'efficacia inferiore a quella osservata nella prova precedente, sebbene comunque con differenze significative dal punto di vista statistico.

Per il gene del recettore dell'ecdisone la riduzione dell'espressione genica è stata pari a al 22,15% ( $F_{1,16} = 12,741$ ;  $P < 0,01$ ) mentre per il gene della V-ATPase l'espressione genica ha subito un decremento del 12,35% ( $F_{1,16} = 3,177$ ;  $P < 0,1$ ) (Graf 16-17).



Graf 17- Riduzione dell'espressione genica su *T. castaneum* per il gene recettore dell'ecdisone – ingestione 150ng



Graf 18- Riduzione dell'espressione genica su *T. castaneum* per il gene V-ATPase – ingestione 150ng

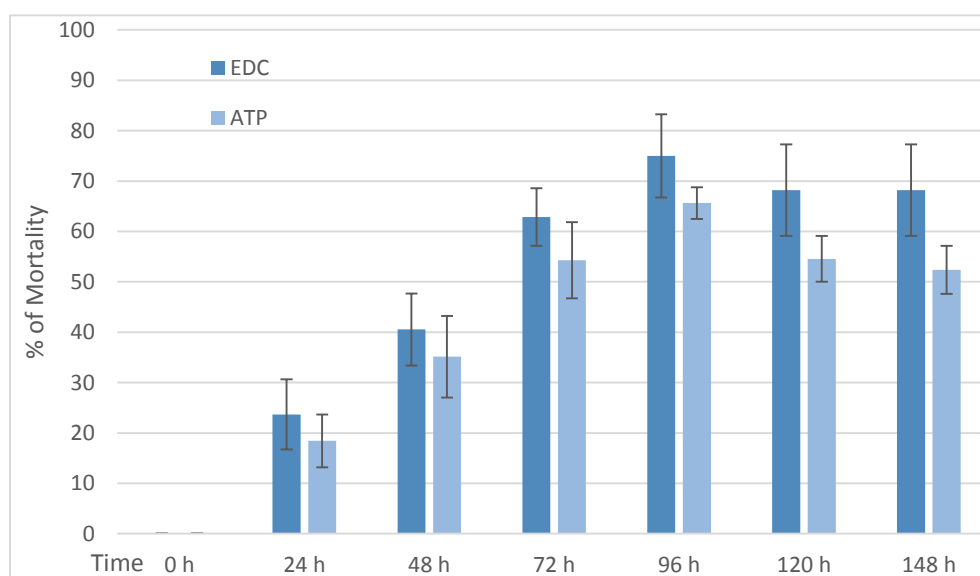
### 10.3.3 Analisi comparativa

L'analisi comparativa dei dati tra i differenti metodi di somministrazione del dsRNA (iniezione e ingestione) ha mostrato, anche in questo caso, una maggiore efficacia del metodo iniettivo rispetto a quello che prevedeva la somministrazione orale ( $F_{1,68} = 6,693$ ;  $P < 0,001$ ).

## 10.4 Biosaggi

### 10.4.1 Iniezione

I dati relativi ai biosaggi effettuati su *T. castaneum*, successivamente alla somministrazione di 150ng di dsRNA tramite iniezione, per entrambi i geni V-ATPasi e recettore dell'ecdisone, hanno evidenziato un progressivo aumento della mortalità nel tempo per entrambi i geni testati. Tra i due geni non si sono osservate delle differenze significative ( $P > 0,05$ ).

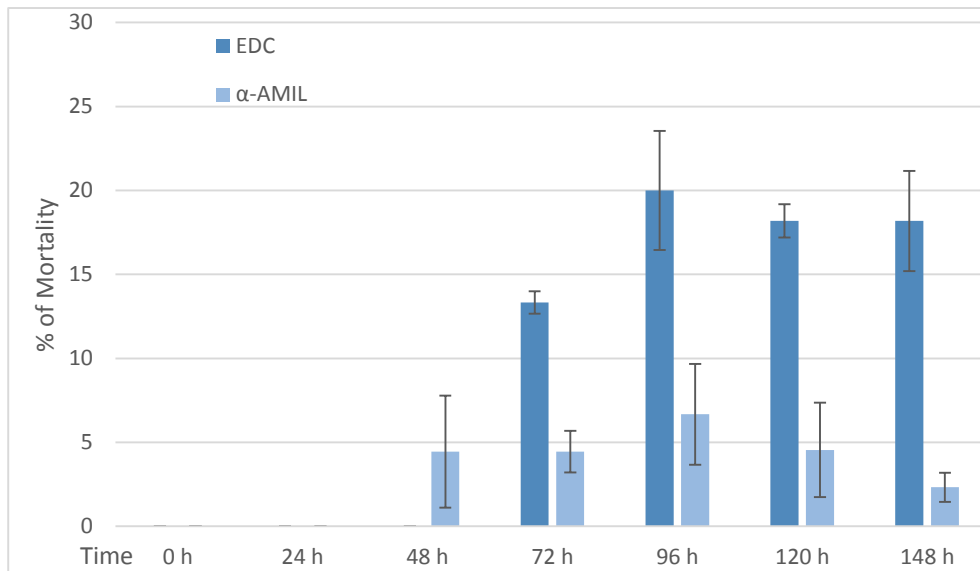


Graf.19-Percentuale di mortalità nel tempo su *T. castaneum* per i geni Recettore dell'ecdisone e V-ATPase- Iniezione

La mortalità corretta degli insetti ha raggiunto per entrambi i geni, il picco massimo dopo 96 ore dall' iniezione, per poi decrescere gradatamente e attestarsi fra il 60 e il 70%. Questo è da imputarsi ad un incremento di

mortalità nel plot di controllo, probabilmente per cause che esulano dalla procedura sperimentale.

La percentuale di impupamento dei soggetti si è mantenuta sotto il 10% nei test condotti per il gene della V-ATPase, per tutta la durata della prova. Nessun soggetto a cui era stato somministrato il dsRNA per il gene del recettore dell'ecdisione ha invece raggiunto lo stadio di pupa. Durante i rilievi non sono state evidenziate variazioni fenotipiche evidenti, sebbene circa il 20% delle larve trattate a termine delle prove effettuate mostrassero dimensioni leggermente superiori alla media ( $\pm 0,7$  cm).

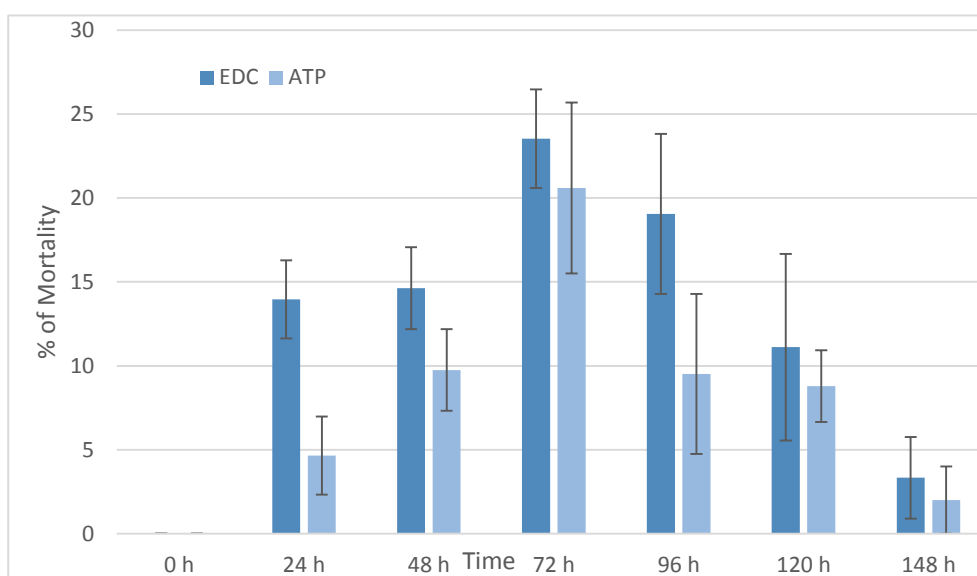


Graf.20-Percentuale di mortalità nel tempo su *R. ferrugineus* per i geni Recettore dell'ecdisione e  $\alpha$ -amilasi- Iniezione

I biosaggi effettuati su *R. ferrugineus* alla dose di 1500ng per i geni dei recettori dell'ecdisione e  $\alpha$ -amilasi non hanno mostrato un'elevata percentuale di mortalità, la quale si è mantenuta sempre sotto il 20% durante l'intero corso della prova. Per la prova effettuata con il gene recettore dell'ecdisione, su circa il 25% delle larve sono state ravvisate alcune malformazioni fenotipiche, quali restringimenti della porzione toracica e addominale.

#### 11.4.2 Ingestione

Similmente a quanto avvenuto in *R. ferrugineus*, i risultati ottenuti nei biosaggi effettuati su *T. castaneum* a seguito della somministrazione di 150ng di dsRNA tramite ingestione, per i geni di V-ATPasi e recettore dell'ecdisone, hanno mostrato un progressivo aumento della mortalità nel tempo per entrambi i geni testati, raggiungendo il picco massimo dopo 72h dall' inizio della prova, con una mortalità massima registrata del  $23,52 \pm 2,94\%$  per il recettore dell'ecdisone e del  $20,58 \pm 5,09\%$  per la V-ATPase.



Graf.21-Percentuale di mortalità nel tempo su *T. castaneum* per i geni Recettore dell'ecdisone e V-ATPase- Ingestione

Le prove eseguite per testare l'efficacia del dsRNA per il recettore dell'ecdisone hanno evidenziato su *T. castaneum* una mortalità significativamente più alta rispetto quelle condotte nei confronti della V-ATPase dopo 24 ore dalla somministrazione del dsRNA ( $F_{1, 4} = 8,000$ ;  $P=0,047$ ).

Durante biosaggi eseguiti su *R. ferrugineus* per i geni recettore dell'ecdisone e  $\alpha$ -amilasi tramite ingestione non è stato registrato nessun decesso dei soggetti testati.

In questa prova, nessuna delle larve sulle quali sono stati eseguiti i test si è impupata, per entrambi i geni testati. Durante i rilievi non sono state evidenziate variazioni fenotipiche evidenti.

## **11.Considerazioni conclusive**

L'RNA *interference* (RNAi) è un meccanismo di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica altamente conservato tra eucarioti superiori (Carthew & Sontheimer, 2009; Berezikov, 2011). Lo schema di azione dell'RNAi sembra essere molto più complesso di quanto ipotizzato originariamente, lasciando presupporre che questo comprenda solo una porzione di meccanismi ben più complessi che coinvolgono processi di regolazione nei livelli di proteine nelle cellule (Bartel, 2009).

Il lavoro svolto ha permesso di approfondire alcuni aspetti legati al fenomeno, fornendo informazioni circa l'efficacia del metodo nella riduzione dell'espressione dei geni selezionati per gli insetti target, a differenti dosi e mediante differenti metodi di somministrazione.

In letteratura è stato ampiamente dimostrato che negli insetti l'RNAi è più efficace negli stadi più giovani rispetto agli ultimi stadi di sviluppo. Inoltre quando il dsRNA è iniettato in esemplari all'ultimo stadio larvale l'effetto dell'RNAi può perdurare più a lungo, da diversi mesi fino all'intera durata della vita dell'insetto (Miller *et al.*, 2012). Queste valutazioni, unitamente a riflessioni di carattere pratico, legate alla facilità di manipolazione degli insetti e di somministrazione del dsRNA, hanno portato alla scelta dell'ultimo stadio di sviluppo larvale per tutte le prove effettuate nel corso della sperimentazione. Inoltre, le analisi preliminari, effettuate su entrambi gli insetti, volte ad indagare circa gli aspetti legati alla percentuale di espressione dei geni ai differenti stadi di sviluppo, hanno fornito indicazioni utili nella scelta del target da utilizzare nelle prove successive.

La tecnica di silenziamento genico post-trascrizionale legata al fenomeno



dell'RNAi, sebbene ormai largamente consolidata in svariati settori scientifici, è stata per la prima volta testata, in questo progetto di ricerca, sul coleottero curculionide *R. ferrugineus*. Le prove condotte su *T. castaneum* hanno invece confermato l'efficacia della tecnica sull'insetto modello, come ampiamente dimostrato in numerosi studi riportati in letteratura (Bucher *et al.*, 2002; Bucher, 2008; Knorr *et al.*, 2013; Noh *et al.*, 2012).

I risultati ottenuti mostrano come in entrambi gli insetti oggetto di studio, il fenomeno dell'RNAi indotto tramite somministrazione di dsRNA sia attraverso l'iniezione intra-addominale che tramite ingestione, appaia efficace già a basse concentrazioni.

I test effettuati sull'efficacia di somministrazione di dsRNA hanno evidenziato una riduzione significativa dell'espressione genica per i geni dell' $\alpha$ -amilasi e per il recettore dell'ecdisione in *R. ferrugineus* e per i geni della V-ATPase e del recettore dell'ecdisione in *T. castaneum*, sottolineando una maggiore efficacia nelle prove dove il dsRNA è stato somministrato tramite iniezione, rispetto al metodo che ha previsto la somministrazione orale. Il dato trova ampia conferma in bibliografia (Dzitoyeva *et al.*, 2001, Bettencourt *et al.*, 2002; Quan *et al.*, 2002).

L'analisi comparativa delle prove effettuate utilizzando diverse concentrazioni, ha mostrato inoltre un'efficacia maggiore alle concentrazioni più basse, rispetto a quelle più alte. Il fenomeno, apparentemente atipico, trova in realtà riscontro in diversi lavori scientifici (Meyering-Vos & Müller, 2007; Shakesby *et al.*, 2009) che sostengono come per ogni organismo vi sia una concentrazione ottimale di dsRNA, estremamente variabile in relazione a innumerevoli fattori. Un aumento di dsRNA quindi, non sempre

corrisponde ad un aumento di percentuale del silenziamento genico. Analisi effettuate, infatti, hanno sottolineato come non vi sia alcuna correlazione evidente tra la concentrazione di dsRNA iniettato e il grado di silenziamento (Arakane *et al.*, 2005; Boisson *et al.* 2006; Whyard *et al.*,2009). Ad esempio è stato osservato un fenotipo letale in *Lygus lineolaris* de Beauvois a dosi di dsRNA di 100ng, effetto che a dosi superiori non è stata più riscontrato (Walker & Allen, 2010). È pertanto ipotizzabile che per *R. ferrugineus*, la dose più alta utilizzata, pari a 5500ng, sia da considerarsi eccessiva.

Le prove effettuate su *R. ferrugineus* utilizzando il gene della V-ATPase, non hanno riportato alcuna differenza significativa rispetto al controllo. Le cause che hanno portato al mancato silenziamento del gene sull'insetto target, sono al momento oggetto di ulteriori studi, volti ad indagare circa le cause di un possibile errore nella valutazione dei parametri utilizzati per la scelta del gene target.

Su una base teorica, le differenze di efficacia sistemica o ambientale o il mancato funzionamento dell'RNAi per un determinato gene negli insetti può essere causata da diversi meccanismi. Una delle possibili cause è che in alcuni di essi, manca un corrispettivo omologo funzionale dei due tipi di geni necessari per l'RNAi di tipo sistemico che sono invece presenti in *C. elegans* (Tomoyasu *et al.*, 2008; Roignant *et al.*, 2003; Whyard *et al.*, 2009) l'RdRP e il SID-1. Vista l'assenza di un RdRp, infatti, il dsRNA negli insetti può non essere amplificato e, per essere efficace, deve essere iniettato direttamente nelle cellule e nei tessuti dove si desidera effettuare la soppressione dell'espressione genica. Il segnale di amplificazione atteso può in alternativa basarsi su geni differenti che svolgono attività simili o magari con differenti

meccanismi. Quindi, sebbene il dsRNA possa inibire l'espressione genica negli insetti, appare ancora poco chiaro in che misura e con quali modalità essi siano in grado di sopperire a queste carenze (Pak & Fire, 2007; Xie *et al.*, 2001).

I primer selezionati per il gene dell' $\alpha$ -amilasi su *T. castaneum* non hanno amplificato per il frammento di DNA corrispondente, impedendo di fatto la creazione di dsRNA e la relativa somministrazione, ed il completamento delle prove previste.

La selezione del gene da silenziare può influenzare significativamente l'effetto dell'RNAi negli insetti (Terenius *et al.*, 2011). Analisi effettuate hanno evidenziato che su 130 geni usati per l'analisi, solo il 38% hanno avuto un alta percentuale di silenziamento mentre il 48% non ha avuto alcun effetto di riduzione sulla percentuale di espressione genica e il 14% ha avuto un basso livello di efficacia (Terenius *et al.*, 2011).

La scelta della regione all'interno del gene è un altro importante fattore che può determinare il successo o l'insuccesso della metodologia che utilizza l'RNAi. Inoltre anche la lunghezza del dsRNA è in grado di influenzare la capacità di assorbimento e di silenziamento (Mao *et al.*, 2007; Saleh *et al.*, 2006). È plausibile dunque che la concomitanza di uno o più fattori siano stati la causa del cattivo esito della prova. Ulteriori studi si renderanno necessari per meglio comprendere le cause che sono state alla base del fenomeno.

I biosaggi effettuati su *T. castaneum* per entrambi i geni testati e per entrambi i metodi utilizzati, hanno confermato i dati ottenuti dalle prove di efficacia tramite somministrazione di dsRNA. La percentuale di mortalità osservata

sembra essere in linea con i dati ottenuti nelle prove precedenti, il dato sembra trovare conferma anche nella più alta percentuale di riduzione dell'espressione genica evidenziata dalla qPCR effettuata nelle prove di efficacia.

I biosaggi su *R. ferrugineus* per i geni testati hanno invece mostrato una bassa percentuale di mortalità in relazione alla percentuale di riduzione dell'espressione genica. La motivazione è presumibilmente riconducibile alla presenza di cofattori, quali ad esempio nel caso dell' $\alpha$ -amilasi l'intervento di microorganismi simbiotici presenti all'interno del tratto intestinale dell'insetto, in grado di sopperire in parte alla mancanza del gene (Tavaglia *et al.*, 2014).

Il catabolismo del dsRNA potrebbe inoltre influenzare l'efficienza dell'RNAi somministrato per via orale. La presenza di enzimi in grado di degradare gli acidi nucleici presenti all'interno dell'intestino in grado di degradare il dsRNA è una possibilità da tenere in considerazione (Arimatsu *et al.*, 2007) Sebbene il dsRNA sia abbastanza stabile, potrebbe essere digerito dalle ribonucleasi specifiche. In alcuni insetti l'attività di sostanze enzimatiche degradanti il dsRNA può ridursi durante la muta o in affamamento (Rodriguez *et al.*, 2010).

L'RNAi ha un enorme potenziale come strumento nel controllo degli insetti dannosi (Gordon and Waterhouse, 2007; Price & Gatehouse, 2008), ma appare evidente come il percorso da seguire per valutare attentamente i molteplici aspetti che possano influenzarne il funzionamento e l'effettiva applicabilità sia ancora lungo.

Il maggior problema che l'utilizzazione di qualsiasi approccio che prevede l'utilizzo dell'RNAi in insetti è dovuto all'assenza di amplificazione del dsRNA all'interno dell'insetto, perciò il quantitativo somministrato deve essere

sufficiente a ridurre in modo efficace espressione genica del target proposto. Questo problema potrebbe essere superato individuando geni-obiettivo altamente sensibili, per il quale anche soltanto una leggera modifica o cambiamenti transitori del livello di espressione possano avere per l'insetto conseguenze disastrose. Un approccio diffuso per affrontare la bassa persistenza, è risultato nello sviluppo di piante transgeniche ospitanti costrutti che producono continuamente i frammenti di dsRNA necessari. Mentre questo approccio ha dimostrato essere funzionale, presenta gravi inconvenienti in quanto richiede tempo, un lungo processo realizzativo e problematiche di tipo normativo prima che la pianta ingegnerizzata possa essere utilizzata in pieno campo.

La sempre crescente comprensione del fenomeno faciliterà sempre più l'affinamento delle metodologie, ispirando nuove strategie di applicabilità e fornendo nuove soluzioni a molte delle attuali problematiche associate ai sistemi biologici (Burand & Hunter, 2013).

Oltre un decennio di sperimentazioni sull'RNA negli insetti ha mostrato l'enorme potere che le tecnologie possiedono nel migliorare il controllo delle popolazioni entomatiche. È comunque doveroso precisare, come anche la ricerca ha confermato, che la tecnica dell RNAi non è da intendersi come una panacea, ma introduce sicuramente una più ampia gamma di nuove scelte concettuali e tecnologiche fra i possibili mezzi di controllo già esistenti.

## 12. Bibliografia

- Alsford, S., Turner, D. J., Obado, S. O., Sanchez-Flores, A., Glover, L., Berriman, M., *et al.* (2011). High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Research*, 21, 915–924.
- Arakane Y, Baguinon MC, Jaspuria S, Chaudhari S, Doyungan, A, Kramer KJ *et al.* (2011). Both UDP N-acetylglucosamine pyrophosphorylases of *Tribolium castaneum* are critical for molting, survival and fecundity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 42–50.
- Arakane Y, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR (2010a). Identification, mRNA expression and functional analysis of several yellow family genes in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 : 259– 266.
- Arakane Y, Li B, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kramer KJ, Park Y (2008a). Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of Development*. 125: 984–995.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ (2005a). Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11337–11342.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD *et al.* (2005b). The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Molecular Biology* 14 : 453–463.
- Araujo, R. N., Santos, A., Pinto, F. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J., & Pereira, M. H. (2006). RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the

- triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 683 – 693.
- Arimatsu, Y., Kotanib, E., Sugimurab, Y., & Furusawa, T. (2007). Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*.
  - Asgari, S. (2013). MicroRNA functions in insect. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 388–397.
  - Backus, E. A., Serrano, M. S., & Ranger, C. M. (2005). Mechanisms of hopperburn: an overview of insect taxonomy, behavior, and physiology. *Annual Review of Entomology*, 50, 125–151.
  - Bai H, Palli SR (2010). Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Developmental Biology* 344: 248–258.
  - Bartel, D., (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*.136:215–233.
  - Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., *et al.* (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 1322–1326.
  - Baumer D, Trauner J, Hollfelder D, Cerny A, Schoppmeier M (2011). JAK-STAT signalling is required throughout telotrophic oogenesis and short-germ embryogenesis of the beetle *Tribolium*. *Developmental Biology*. 350: 169–182.
  - Beermann A, Pruhs R, Lutz R, Schroder R (2011). A context dependent combination of *Wnt* receptors controls axis elongation and leg development in a short germ insect. *Development* 138: 2793–2805.
  - Begum K, Li B, Beeman RW, Park Y (2009). Functions of ion transport peptide and ion transport peptide-like in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 717–725.

- Belles, X. (2010). Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annual Review of Entomology*, 55, 111–128.
- Benjamin N. Philip and Yoshinori Tomoyasu (2011). Molecular Methods for Evolutionary Genetics Methods in Molecular Biology, vol. 772, DOI 10.1007/978-1-61779-228-1\_28.
- Berezikov, E., (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat.Rev. Genet.*12, 846–860.
- Bettencourt, R., Terenius, O., & Faye, I. (2002). Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Molecular Biology*, 11, 267–271.
- Boisson, B., Jacques, J., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., Vernick, K., Bourgouin, C., (2006). Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Lett.* 580, 1988–1992.
- Bolognesi R, Farzana L, Fischer TD, Brown SJ (2008). Multiple Wnt genes are required for segmentation in the short-germ embryo of *Tribolium castaneum* . *Current Biology* 18: 1624– 1629.
- Bousquet Y.(1990). Beetles associated with stored products in Canada. Canadian Government Publishing Centre, Ottawa 189-192.
- Brodie III, E.D. (2000). Why evolutionary genetics does not always add up. In: Epistasis and the evolutionary process. Ed. Wolf J.B., Brodie E.D. e Wade M.J., 3-19.
- Bruce E. Tabashnik,, Yves Carrière, Timothy J. Dennehy, Shai Morin, Mark S. Sisterson, Richard T. Roush,, Anthony M. Shelton,, and Jian-Zhou Zhao, (2003). Insect Resistance to Transgenic *Bt* Crops: Lessons from the Laboratory and Field. *Journal of Economic Entomology* 96(4):1031-1038. 2003.
- Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M., (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera).*Curr. Biol.* 12, R85–R86.



- Burand J.P, Hunter W.B. (2013). RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology* 112 .S68–S74.
- Bustin S. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription
- Bustin S.A, Nolan T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques: JBT* 15: 155–166.
- Bustin, Stephen A., (2004-2006) ed. *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla, CA: International University Line, Print.
- Callaway R.M., Thelen G.C., Rodriguez A. and Holben W.E. (2004). Soil biota and exotic plant invasion. *Nature* 427: 731-733.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*,136, 642–655.
- Chapman, R. N., Lilian, B., (1933). The biotic constants of *Tribolium confusum* Duval. *Anat. Rec.*, 57: 108.4.
- Chapman, Royal N. (1918). The confused flour beetle (*Tribolium confusum* Duval). *Minn. State Ent. Report*, 17: 73-94.
- Chapman, Royal N. (1931). *Animal Ecology with Especial Reference to Insects*. N.Y.: McGraw-Hill Book Co. 464.
- Chun Y.J., Nason J.D. and Moloney K.A. (2009). Comparison of quantitative and molecular genetic variation of native vs. invasive populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria* L. Lythraceae). *Molecular Ecology*18: 3020-3035.
- Colautti R.I., Manca M., Viljanen M., Ketelaars H.A.M., Bürgi H., Macisaac H.J. and Heath D.D. (2005). Invasion genetics of the Eurasian spiny waterflea: evidence for bottlenecks and gene flow using microsatellite. *Molecular Ecology*14: 1869-1879.

- Coy, N. D. Sanscrainte, K. C. Chalaire, A. Inberg, I. Maayan, E. Glick, N. Paldi & J. J. Becnel (2012). Gene silencing in adult *Aedes aegypti* mosquitoes through oral delivery of double-stranded RNA. *Applied Entomology* 136 : 741–748.
- Dehio C. and Schell J. (1994). Identification of plant genetic loci involved in a post transcriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (12): 5538-5542.
- Dembilio Ó, Llácer E., Martínez de Altube M.M., Jacas J.A. (2009). Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest Management Science. Journal of molecular endocrinology* 29:23–39.
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50: 227–230.
- Dlugosch K.M. and Parker I.M. (2008a). Invading populations of an ornamental shrub show rapid life history evolution despite genetic bottlenecks. *Ecology Letters* 11: 701-709.
- Dlugosch K.M. and Parker I.M. (2008b). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*. 17: 431-449.
- Dong, Y., & Friedrich, M. (2005). Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnology*, 5, 25–32.
- Douglas S., Mandla S., Gallant J., (2000). Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190: 247–260.

- Dzitoyeva S, Dimitrijevic N and Manev H, (2001). Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. *Mol Psychiatry* 6:665–670.
- Eaton, B. A., Fetter, R. D., & Davis, G. W. (2002). Dynactin is necessary for synapse stabilization. *Neuron*, 34, 729–741.
- Esteban-Duran, J., J.L. Yela, C.F. Beitia and A.A. Jimenez. (1998). Biology of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) Coleoptera: Curculionidae: Rhynchophorinae), in the laboratory and field, life cycle, biological characteristics in its zone of introduction in Spain, biological method of detection and possible control. *Boletin de Sanidad Vegetal Plagas*, 24: 737-748.
- Fang Zhu, Jingjing Xu, Roshan Palli, Joseph Ferguson and Subba R Palli (2010). Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag Sci* 2011; 67: 175–182.
- Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301, 1545–1547.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC, (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Gatehouse, J. A., & Price, D. R. G. (2011). Protection of crops against insect pests using RNA interference. *Insect Biotechnology*, 2, 145–168.
- Gause G., F., (1931). The influence of ecological factors on the size of population. *Amer. Nat.* 65:70-75.
- Gelosi A., Süß L., (1991). Insetti e acari dei cereali in magazzino. Edagricole-Edizioni Agricole.
- Ghildiyal, M., Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 10, 94–108.

- Good, N. E. (1933). Biology of the flour beetles, *Tribolium confusum* Duv., and *T. ferrugineus* Fab.. Journ. Agr. Res., 46: pp. 327-334.
- Gordon, K.H.J., Waterhouse, P.M., (2007). RNAi for insect-proof plants RID A-1976-2008. Nat. Biotechnol. 25, 1231–1232.
- Gorman MJ, Arakane Y (2010). Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 40: 267–273.
- Griebler, M., Westerlund, S. A., Hoffmann, K. H., & Meyerring-Vos, M. (2008). RNA interference with the allato regulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. Journal of Insect Physiology, 54, 997 – 1007.
- Grossmann, D., Scholten, J., Prpic, N.-M., (2009). Separable functions of wingless in distal and ventral patterning of the Tribolium leg. Develop. Genes Evol. 219, 469–479.
- Gura, T. (2000). A silence that speaks volumes. Nature, 404, 804–808.
- Hale K.A. and Briskie J.V. (2007). Decreased immune competence in a severely bottlenecked population of an endemic New Zealand bird. Animal Conservation 10:2-10
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, C.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature 404: 293- 296.
- Han, Y. S., Chun, J., Schwartz, A., Nelson, S., & Paskewitz, S. M. (1999). Induction of mosquito hemolymph proteins in response to immune challenge and wounding. Development and Comparative Immunology, 23, 553–562.
- Hannon GJ, RNA interference (2002). Nature 418:244–251.

- Hawkes C.V., Wren I.F., Herman D.J. and Firestone M.K. (2005). Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecology Letters* 8:976-985.
- Hogenkamp DG, Arakane Y, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Beeman RW (2008). Characterization and expression of the beta-N-acetylhexosaminidase gene family of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 478–489.
- Holdaway, F.G. (1932). An experimental study of the growth of population of the flour beetle *Tribolium confusum* Duval, as effected by atmospheric moisture. *Ecol. Monographs*, 2: 261-304.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* 6: 279–284.
- Human K.G. and Gordon D.M. (1997). Effects of argentine ants on invertebrate biodiversity in northern California. *Conservation Biology* 11: 1242-1248.
- Hunt T, Bergsten J, Levkanicova Z, Papadopoulou A, John O S, Wild R., Hammond P.M, Ahrens D, Balke M, Caterino, M. S., Gómez-Zurita J., Ribera I., Barraclough T. G., Bocakova M., Bocak L, and Vogler A.P. A Comprehensive Phylogeny of Beetles Reveals the Evolutionary Origins of a Superradiation (2007). *Science* (5858), 1913-1916.
- Huvenne, H., Smagghe, G., (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology* 56,227–235.
- Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., *et al.* (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “*off-target*” transcript silencing. *RNA*, 12, 1197–120.
- Jeffrey G. Scott, Kristin Michel, Lyric C. Bartholomay, Blair D. Siegfried, Wayne B. Hunter, Guy Smagghe, Kun Yan Zhu, Angela E. Douglas, (2013). Towards the

elements of successful insect RNAi, *Journal of Insect Physiology*, Volume 59, Issue 12: 1212-1221.

- Jianxiu Yao, Dorith Rotenberg, Alireza Afsharifar, Karen Barandoc-Alviar, Anna E. Whitfield (2013). Development of RNAi Methods for *Peregrinus maidis*, the Corn Planthopper. *PLoS ONE* 8(8): e70243.
- Jie Li, Qihong Chen, Yongjun Lin,<sup>b</sup> Tingru Jiang,<sup>a</sup> Gang Wua and Hongxia Huaa (2011). RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) based on dsRNA ingestion. *Pest Manag Sci.* Jul;67(7):852-9.
- Jinek, M., Doudna, J.A., (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 405–412.
- Jose, A. M., & Hunter, C. P. (2007). Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual Review of Genetics*, 41, 305–330.
- Kaakeh, W. (2005). Longevity, fecundity, and fertility of the red palm weevil, *Rynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) on natural and artificial diets. *Emir. J. Agric. Sci.*. 17 (1): 23-33.
- Kapelinskaya, T.V., Martynova, E.U., Korolev, A.L. and Mukha, D.V. (2013). Primary characterization of German cockroach, *Blattella germanica* BgDENV infected BGE-2 cells cDNA library. *Molekulyarnaya Biologiya*, 2014, Vol. 48, 2: 349–352.
- Kennerdell, J.R., Carthew, R.W., (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* 95, 1017–1026.
- Ketting, R., (2011). The many faces of RNAi. *Develop. Cell* 20, 148–161.
- Kitzmann, P., Schwirz, J., Schmitt-Engel, C., Bucher, G. (2013). RNAi phenotypes are influenced by the genetic background of the injected strain. *BMC Genomics*, 14 (1), 5-15.
- Klowden, Marc J. (2007). *Physiological systems in insects*. University of Idaho

- Knorr, E., Bingsohn, L., Kanost, M.R., Vilcinskas, A. (2013). *Tribolium castaneum* as a model for high-throughput RNAi screening. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 136:163-178.
- Kolbe J.J., Glor R.E., Schettino L.R., Lara A.C., Larson A. and Losos J.B. (2007). Multiple sources, admixture, and genetic variation in introduced *Anolis* lizard populations. *Conservation Biology*. 21: 1612-1625.
- Kotkamp K, Klingler M, Schoppmeier M (2010). Apparent role of *Tribolium* orthodenticle in anteroposterior blastoderm patterning largely reflects novel functions in dorsoventral axis formation and cell survival. *Development* 137: 1853– 1862.
- Kurreck, J. (2009). RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie, International Edition*, 48, 1378–1398.
- Lee C.E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*. 17.
- Li B, Beeman RW, Park Y (2011a). Functions of duplicated genes encoding CCAP receptors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Insect Physiology* 57: 1190–1197.
- Liu, P., Kaufman, T., (2004a). Hunchback is required for suppression of abdominal identity, and for proper germ band and growth and segmentation in the intermediate germ band insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development* 131: 1515–1527.
- Liu, P., Kaufman, T., (2004b). Kruppel is a gap gene in the intermediate germ band insect *Oncopeltus fasciatus* and is required for development of both blastoderm and germ band-derived segments. *Development*. 2004b; 131: 4567–4579.
- Liuqi Gu, Douglas C. Knipple (2013) - Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection* 45:36- 40.

- Lomazzo, E., Hussmann, G.P., Wolfe, B.B., Yasuda, R.P., Perry, D.C., Kellar, K.J., (2011). Effects of chronic nicotine on heteromeric neuronal nicotinic receptors in rat primary cultured neurons. *Journal of Neurochemistry* 119, 153–164.
- Lord, J.C., Hartzler, K., Toutges, M., Oppert, B. (2010). Evaluation of quantitative PCR reference genes for gene expression studies in *Tribolium castaneum* after fungal challenge *Journal of Microbiological Methods*, 80 (2), 219-221.
- Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M., & Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNA. *Current Biology*, 11, 171–176.
- Magaña C, Hernández-Crespo P, Brun-Barale A, Couso-Ferrer F, Bride JM, Castañera P, Feyereisen R, Ortego F. (2008). Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis Capitata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 756-762.
- Mahoney DJ, Carey K, Fu MH, Snow R, Cameron-Smith D, *et al.* (2004). Real-time RT PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiological genomics* 18: 226–231.
- Mahoney S.P., Montevecchi W.A. and Davidson W.S. (1999). Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada. *Molecular Ecology* 8: 1309-1315.
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., *et al.* (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25, 1307–1313.
- Mao, Y. B., Tao, X. Y., Xue, X. Y., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2011). Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research*, 20, 665–673.



- Martín M.M., Cabello T., Barranco P., de la Peña J.A. (2000). Rango de hospedantes de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) y diámetro de la palmera hospedante (Coleoptera, Curculionidae) in Boletín de sanidad vegetal. Plagas,; 26(1):73-78.
- Matranga, C., Zamore, P.D. (2007). Small silencing RNAs. Current Biology 17, 789–793.
- Meister, G., Tuschl, T., (2004). Mechanism of gene silencing by double-stranded RNA. Nature 431, 343–349.
- Mello C. and Conte D. (2004) Revealing the world of RNA interference. Nature 431(7006):338-42.
- Memmott J., Craze P.G., Harman H.M., Syrett P. and Fowler S.V. (2005). The effect of propagule size on the invasion of an alien insect. Journal of Animal Ecology 74:50-62.
- Meyering-Vos, M., Muller, A., (2007). RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Journal of Insect Physiology 53, 840– 848.
- Miller, S. C., Miyata, K., Brown, S. J., & Tomoyasu, Y. (2012). Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi. PloS One, 7(10) e47431.
- Mito, T., Nakamura, T., Bando, T., Ohuchi, H., Noji, S., (2011). The advent of RNA interference in entomology. Entomol. Sci. 14, 1–8.
- Mito, T., Ronco, M., Uda, T., Nakamura, T., Ohuchi, H., Noji, S., (2008). Divergent and conserved roles of extradenticle in body segmentation and appendage formation, respectively, in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Dev. Biol. 313, 67–79.

- Murphy, S. T., & Briscoe B. R. (1999). The red palm weevil as an alien invasive: biology and the prospects for biological control as a component of IPM. *Bio control News Inf.* 20: 35-46.
- Napoli, C., Lemieux C., Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous synthase gene *intrans*. *Plant Cell.* 4:279-289.
- Naranjo, S. E. (2011). Impacts of *Bt* transgenic cotton on integrated pest management.
- Newmark, P. A., Reddien, P. W., Cebria, F., & Alvarado, A. S. (2003). Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *PNAS*, 100, 11861–11865.
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany* 56: 2907–2914.
- Nieminen M., Singer M.C., Fortelius W., Schöps K. and Hanski I. (2001). Experimental confirmation that inbreeding depression increases the extinction risk in butterfly populations. *The American Naturalist.* 157: 237-244.
- Noh, M. Y., Beeman, R. W., Arakane, Y. (2012). RNAi-based functional genomics in *Tribolium castaneum* and possible application for controlling insect pests *Entomological Research*, 42 (1), pp. 1-10.
- Novak S.J. and Mack R.N. (2005). Genetic bottlenecks in alien plant species. In *Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography*. Ed. Sax D.F., Stachowicz J.J. and Gaines S.D., . 201-228.
- Olden J.D., N. LeRoy Poff, Douglas M.R., Douglas M.E. and Fausch K.D. (2004). Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution* 19.

- Pak, J., Fire, A., (2007). Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* 315, 241–244.
- Pimentel D., Zuniga R. and Morrison D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52: 273-288.
- Pitino, M., Coleman, A., Maffei, M., Ridout, C., Hogenhout, S., 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE* 6, e25709
- Pollini A., (2001). *Manuale di entomologia applicata*. Edagricole, Bologna. 1-1462.
- Price D.R.G. & Gatehouse J.A. (2008) RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol.* 26 393–400.
- Pridgeon, J. W., Zhao, L., Becnel, J. J., Strickman, D. A., Clark, G. G., & Linthicum, K. J. (2008). Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*, 45, 414–420.
- Quan, G. X., Kanda, T., & Tamura, T. (2002). Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. *Insect Molecular Biology*, 11, 217–222.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siebert W, *et al.* (2004). Guide line to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 313: 856–862.
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., & Bhatnagar, R. K. (2002). Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 46849 – 46851.
- Rinkevich, F.D., Scott, J.G., (2013). Limitations of RNAi of a 6 nicotinic acetylcholine receptor subunits for assessing the in vivo sensitivity to spinosad. *Insect Science* 20, 101–108.

- Robinson R (2004). RNAi Therapeutics: How Likely, How Soon. PLoS Biol 2(1): e28.
- Rodriguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borra's-Hidalgo, O., Wright, D. J., & Ayra-Pardo, C. (2010). RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. Environmental Microbiology, 12, 2894
- Roether, S., Meister, G., (2011). Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. Biochimie 93, 1905–1915.
- Roignant, J. Y., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J. A., & Antoniewski, C. (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform specific RNAi in *Drosophila*. RNA, 9, 299–308.
- Roman J. and Darling J.A. (2007). Paradox lost : genetic diversity and the success of aquatic invasions, Trends in Ecology and Evolution22: 454-464.
- Ronco, M., Uda, T., Mito, T., Minelli, A., Noji, S., Klingler, M., (2008). Antenna and all gnathal appendages are similarly transformed by homothorax knock-down in the cricket *Gryllus bimaculatus* . Dev. Biol. 313, 80–92.
- Sacchetti P., Camèra A., Granchietti A., Rosi M.C. e Marzialetti P. (2005). Prima segnalazione in Italia del curculionide delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus*. Notiziario del Centro Sperimentale per il vivaismo di Pistoia. 144: 6-9.
- Salama H.S., Hamdy M.K. and El-Din M.M. (2002). The thermal constant for timing the emergence of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.), (Coleoptera, Curculiodinae). Journal of Pest Science 75: 26-29.
- Saleh, M. C., Van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., *et al.* (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. Nature Cell Biology, 8, 793–802.
- Sanders N.J., Gotelli N.J., Heller N.E. and Gordon D.M. (2003) Community disassembly by an invasive species. PNAS100: 2474-2477.

- Schneider, I., (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol.* 27, 353-365.
- Schröder A., Nilsson K.A., Persson L., van Kooten T. and Reichstein B. (2009). Invasion success depends on invader body size in a size-structured mixed predation-competition community. *Journal of Animal Ecology* 78: 1152-1162.
- Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfried, B.D., Hunter, W.B., Smagghe, G., Zhu, K.Y., Douglas, A.E. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, 59 (12), 1212-1221.
- Shabalina, S.A., Koonin, E.V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology and Evolution* 23, 578–587.
- Shakesby, A.J., Wallace, I.S., Isaacs, H.V., Pritchard, J., Roberts, D.M., Douglas, A.E., (2009). A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 1–10.
- Siomi, H., Siomi, M.C., (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396–404.
- Suarez A.V. and Tsutsui N.D. (2008). The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology* 17: 351-360.
- Tabara, H., Grishok, A., & Mello, C. C. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence *Science*, 282, 430–431.
- Tagliavia, M., Messina, E., Manachini, B., Cappello, S., Quatrini, P. (2014). The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *BMC Microbiology*, 14 (1).
- Talaat AM, Howard ST, Hale IV W, Lyons R, Garner H, *et al.* (2002). Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic acids research* 30: e104–e104.

- Tenllado, F., Llave, C., & Diaz-Ruiz, J. R. (2004). RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*, 102, 85–96.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J.L., Barthel, A., *et al.*, (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology* 57, 231–245.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, *et al.* (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology* 75: 291–295.
- Thompson R.T. (1992). Observations on the morphology and classification of weevils (Coleoptera: Curculionoidea) with a key to major groups. *Journal of Natural History* .26: 835-891.
- Thummel, C.S. (1995). From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of Drosophila nuclear receptor super family members. *Cell*, 83 :871-877.
- Tian, H., Peng, H., Yao, Q., Chen, H., Xie, Q., Tang, B., *et al.* (2009). Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacterial expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PloS One*, 4, e6225.
- Timmons, L., Fire, A., (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Toenniessen GH, O’Toole JC, DeVries J (2003). Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Curr Opin Plant Biol* 6:191–198 96.
- Tomoyasu Y, Arakane Y, Kramer KJ, Denell RE (2009). Repeated co-options of exoskeleton formation during wing-to-elytron evolution in beetles. *Current Biology*. 19:2057–2065.

- Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D., & Bucher, G. (2008). Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, 9, R10.
- Travanty, E. A., Adelman, Z. N., Franz, A. W. E., Keene, K. M., Beaty, B. J., Blair, C. D., *et al.* (2004). Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 607–613.
- Tsutsui N.D., Suarez A.V., Holway D.A. and Case T.J. (2000). Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *PNAS* 97: 5948-5953.
- Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., & Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15, 383–391.
- Van Rij, R.P., Berezikov, E., (2009). Small RNAs and the control of transposons and viruses in *Drosophila*. *Trends Microbiol.* 17, 163–171.
- Verras M, Mavroidis M, Kokolakis G, Gourzi P, Zacharopoulou A, Mintzas AC. (1999) . Cloning and characterization of CcEcR. An ecdysone receptor homolog from the mediterranean fruit fly *Ceratitidis Capitata*. *European Journal of Biochemistry*, 265: 798–808.
- Walker, W.B. and Allen, M.L. (2010) . Expression and RNA interference of salivary polygalacturonase genes in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* *Journal of Insect Science*, 10, 173.
- Wang, Y., Zhang, H., Li, H., & Miao, X. (2011). Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PloS One*, 6, e18644.

- Wattanapongsiri A. (1966). A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Department of Agriculture Science Bull., Bangkok, 1: 1-328.
- Wattier R.A., Haine E.R., Beguet J., Martin G., Bollache L., Muskó I.B., Platvoet, D. & Rigaud T. (2007). No genetic bottleneck or associated microparasite loss in invasive populations of a freshwater amphipod. *Oikos* 116: 1941-1953.
- Whangbo, J. S., & Hunter, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24, 297–305.
- Whyard, S., Singh, A. D., & Wong, S. (2009). Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 39, 824–832.
- Winston, W. M., Molodowitch, C., & Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative trans-membrane protein SID-1. *Science*, 295, 2456–2459.
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 104, 10565–10570.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R., Diederichs, S., (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C., Chen, Z., (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6516–6521.
- Xu J, Tan A, Palli SR (2010). The function of nuclear receptors in regulation of female reproduction and embryogenesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* . *Journal of Insect Physiology* 56 : 1471–1480.



- Xu, W., & Han, Z. (2008). Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids. *Journal of Insect Science*, 8,1–6.
- Xue, X.Y., Mao, Y.B., Tao, X.Y., Huang, Y.P., Chen, X.Y., (2012). New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. *Advances in Insect Physiology* 42, 73–117.
- Yang, Q., Li, Z., Cao, J., Zhang, S., Zhang, H., Wu, X., Zhang, Q., Liu, X. (2014). Selection and assessment of reference genes for quantitative PCR normalization in migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *PLoS ONE*, 9 (6).
- Yang, Y. L., Zhu, Y. C., Ottea, J., Husseneder, C., Leonard, B. R., *et al.* (2010). Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharali*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 592–603.
- Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., *et al.* (2013). Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, 20,4–14.
- Yuen, J. L., Read, S. A., Brubacher, J. L., Singh, A. D., & Whyard, S. (2008). Biolistics for high-throughput transformation and RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)*, 2(5), 247–254.
- Zha, W., Peng, X., Chen, R., Du, B., Zhu, L., (2011). Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One* 6, e20504.
- Zhang, H., Li, H. C., & Maio, X. X. (2012). Feasibility, limitation and possible solution of RNAi based technology for insect pest control. *Insect Science*, 1, 16.
- Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through

larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19, 683–693.

- Zhou, X., Wheeler, M.M., Oi, F.M., Scharf, M.E., (2008). RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem Mol Biol.*;38 (8):805-15.