

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



DIPARTIMENTO DI AGRARIA

Laboratorio di Entomologia Molecolare “E. Tremblay”

DOTTORATO DI RICERCA IN
“AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA”
XXVI CICLO

Indirizzo: Entomologia e Zoologia agraria

TESI DI DOTTORATO

Valutazione di metodiche innovative
nel controllo sostenibile
di *Tuta absoluta* (Meyrick)
(Lepidoptera: Gelechiidae)

Coordinatore
Ch.mo Prof.
Domenico Carputo

Candidato
Alessandro Ricciardi

Relatore:
Ch.mo Prof.
Antonio Pietro Garonna

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

La prima documentazione letteraria riguardante il concetto di biocenosi di un sistema naturale.

“το πολύπλοκο φυσικό σύστημα το οποίο είναι κατασκευασμένο, το σύμπαν συνεχώς τροποποιήθηκε από τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των διαφόρων οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικά τροφικά δίκτυο.”

estratto dal trattato filosofico di Anassimandro “ Η φύση” “Natura”
12:3.

“Il complesso sistema naturale di cui è fatto l'universo è continuamente modificato dalle complesse interazioni che si instaurano tra i diversi organismi afferenti a differenti rete trofiche.”

Indice

RIASSUNTO	6
ABSTRACT – <i>Evaluation of innovative methods in the ecofriendly control of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)</i>	11
1. INTRODUZIONE	16
§ 1 – Origini e problematiche tassonomiche	17
§ 2 – Eco-biologia e dannosità	21
§ 3 – Metodiche di controllo	32
§ 3.1 – Metodi preventivi	32
§ 3.2 – Metodiche di contenimento diretto	35
§ 3.2.1 – Metodi biotecnici	35
§ 3.2.2 – Metodi biologici	41
§ 3.2.3 – Metodi chimici	53
§ 4 – <i>Prospettive di controllo innovative</i>	58
§ 4.1 – RNA interference: meccanismo molecolare	58
§ 4.2 – Meccanismi di assorbimento cellulare del dsRNA	66
§ 4.2.1 – Il meccanismo di assorbimento mediato da recettori trans-membrana	66
§ 4.2.2 – Il meccanismo di assorbimento mediato da endocitosi	68
§ 4.3 – Considerazioni sull’uso dell’RNAi negli insetti	69
§ 4.3.1 – Preparazione dei costrutti (dsRNAs) per l’interferenza	69
§ 4.4 – Modalità di somministrazione del dsRNA negli insetti	72
§ 4.4.1 – Microiniezioni	73
§ 4.4.2 – Immersione	74
§ 4.4.3 – Alimentazione	74
§ 4.4.4 – Sviluppo di insetti transgenici	78
§ 4.4.5. – RNAi mediata da virus	78
§ 4.5 – Fattori che influenzano l’RNAi negli insetti	79
§ 4.6 – Controllo dei fitofagi mediato da RNAi: presupposti biotecnologici e potenzialità applicative in entomologia ed in agricoltura	80
§ 4.7 – Resistenza vegetale	83
§ 4.7.1 – Meccanismi di difesa diretta	83
§ 4.7.2 – Meccanismi di difesa indiretta	87

2. SCOPO DELLA TESI	90
3. MATERIALI E METODI	93
§ 1 – Allevamento di <i>Tuta absoluta</i>	94
§ 2 – Isolamento del gene ortologo 102 in <i>T. absoluta</i>	96
§ 2.1 – Estrazione RNA totale	96
§ 2.2 – Reazioni di RT-PCR sugli estratti ottenuti	97
§ 2.3 – Scelta degli oligo utilizzati in reazioni di PCR	98
§ 2.4 – Ottimizzazione delle reazioni di PCR	99
§ 2.5 – Clonaggio amplificato del putativo gene ortologo 102	101
§ 2.6 – Sequenziamento dei putativi inserti clonati e analisi bioinformatiche	102
§ 3 – Caratterizzazione strutturale dell'ortologo 102	104
§ 3.1 – RACE 5': Sintesi della prima elica del cDNA.....	104
§ 3.2 – TdT Tailing e PCR del cDNA dC-tailed	105
§ 3.3 – RACE 3': Prove di PCR	106
§ 3.4 – Prove tecniche di PCR con oligo di controllo	109
§ 4 – Sintesi dell'RNA double stranded (dsRNA) omologo al gene 102	110
§ 5 – Prove di interferenza gene specifica: biosaggi di dsRNA 102 delivery	112
§ 5.1 – Biosaggi di microinfiltrazione fogliare	112
§ 5.2 – Trattamenti sulle uova	114
§ 6 – Valutazione di livelli misurabili di resistenza e/o tolleranza in pomodoro	119
§ 6.1 – Biosaggi in serra	121
§ 6.2 – Biosaggi in campo	123
§ 6.3 – Biosaggi in tunnel-serra: studi genetici con analisi RNA-Seq	125
§ 6.4 – Biosaggi in camera climatica	126
§ 6.4.1 – Osservazioni biotrofiche	127
§ 6.4.2 – Osservazioni biometriche	132
§ 6.4.3 – Osservazioni sul potenziale biotico	134
4. RISULTATI	135
§ 1 – Isolamento del gene ortologo 102 in <i>Tuta absoluta</i>	136
§ 1.1 – Reazioni di RT-PCR sugli estratti e ottenimento del cDNA	136
§ 1.2 – Ottimizzazione delle reazioni di PCR: scelta oligo Spod FE e Spod RE.....	137

§ 1.3 – Clonaggio amplificato del putativo gene ortologo 102	139
§ 1.4 – Sequenziamento dei putativi inserti clonati e analisi bioinformatiche	139
§ 2 – Caratterizzazione strutturale gene ortologo 102	145
§ 2.1 – RACE 5'	145
§ 2.2 – RACE 3'	146
§ 3 – Prove di interferenza gene specifica	148
§ 3.1 – Biosaggi di microinfiltrazione fogliare	148
§ 3.2 – Trattamenti sulle uova	148
§ 3.2.1 – Trattamenti non decorionanti	148
§ 3.2.2 – Trattamenti decorionanti	150
§ 3.2.3 – Trattamenti non decorionanti: rilievi sulla soprav- vivenza larvale	151
§ 3.2.4. – Trattamenti decorionanti: rilievi sulla sopravvivenza larvale	153
§ 4 – Valutazione di livelli misurabili di resistenza e/o tolleranza in pomodoro	155
§ 4.1 – Biosaggi in serra	155
§ 4.2 – Biosaggi in pieno campo	156
§ 4.3 – Biosaggi in tunnel-serra	158
§ 4.4 – Biosaggi in camera climatica	159
§ 4.4.1 – Prove sperimentali (I)	159
§ 4.4.2 – Prove sperimentali (II)	165
5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	184
§ 1 – Isolamento gene ortologo 102 in <i>Tuta absoluta</i>	185
§ 2 – Esperimenti di interferenza gene-specifica: dsRNA 102 deli- very su uova	187
§ 3 – Biosaggi di suscettibilità in linee commerciali di pomodoro	189
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	192

Riassunto

L'estrema dannosità di *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) ha portato, a seguito della sua rapida e incontrollata diffusione in Europa, ad un incremento nell'uso di insetticidi, determinando le condizioni per un possibile sviluppo di popolazioni resistenti del fillominatore. Nonostante negli anni le contromisure abbiano raggiunto livelli di efficacia più che accettabili, il lepidottero rimane uno dei fattori chiave della coltivazione del pomodoro, anche perché gli approcci integrati di lotta non risultano pienamente validi per la difesa delle solanacee in pieno campo. Cattura massale, tecnica del disorientamento, nuove e più efficaci molecole insetticide, applicazioni di lotta biologica sono alcuni dei metodi con cui si può affrontare la lotta al fillominatore per contenere la sua dannosità.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di indagare su possibili alternative di controllo, da associare alle misure già descritte, tra cui: **A)** l'applicazione di biotecnologie innovative come il silenziamento genico post-trascrizionale mediato da dsRNA (*RNA interference*). Il target considerato (gene 102), risulta molto conservato nei lepidotteri, ed è responsabile di essenziali processi fisiologici associati alla fitness dell'insetto come la modulazione della risposta immunitaria (Falabella *et al.*, 2012). Allo scopo è stata valutata l'opportunità isolare l'ortologo 102 anche in *T. absoluta*, al fine di procedere alla sua caratterizzazione strutturale mediante tecnica RACE e ad esperimenti funzionali di interferenza gene-specifica; **B)** la valutazione di

fonti di tolleranza/resistenza presenti in germoplasma e linee commerciali di pomodoro.

A) Si è proceduto ad isolare la sequenza più conservata del gene 102 utilizzando oligo specifici Spod FE-Spod RE disegnati sulla sequenza più conservata del cDNA 102 completo di *Spodoptera littoralis* che hanno fornito prodotti PCR della stessa lunghezza di quella amplificata nel nottuide, pari a 580 bp, e successivamente è stato preparato il costrutto (dsRNA 102) per poter procedere all'interferenza gene-specifica. Negli esperimenti di RACE 3' utilizzando oligo specifici GSP RACE 3', GSP nested e oligo universale AUAP sono state ottenute bande della lunghezza stimata mediante confronto con il cDNA 102 completo di *S. littoralis* e pari a 500 bp mentre nelle prove di RACE 5' sono state ottenute bande di 180 bp endogene alla sequenza isolata e non corrispondenti alla lunghezza attesa. È stata valutata la necessità di eseguire prove di interferenza su uova in quanto, in lavori precedenti (DI LELIO, 2013), trattamenti di soluzioni stabilizzate di dsRNA 102 su ovature di *S. littoralis* hanno determinato una significativa riduzione della percentuale di schiusa delle medesime nonché una ridotta sopravvivenza di larve derivante da uova interferite. In questi biosaggi le uova di *T. absoluta* sono state trattate con tre diverse concentrazioni della dsRNA 102 solution (2000 ng/u, 200 ng/u e 20 ng/u) e i pretrattamenti decorionanti con Chlorox al 5% sono stati effettuati al fine di facilitare l'internalizzazione della soluzione negli embrioni; nei control-

li sono state utilizzate soluzioni di dsRNA GFP (200 ng/u). Non è stata osservata nessuna differenza significativa nella percentuale di schiusa delle uova tra tesi trattato e controllo e l'effetto del pretrattamento decorionante con candeggina non ha inibito significativamente la schiusa rispetto al trattamento eseguito con la sola dsRNA 102 solution.

B) Per evidenziare aspetti legati a resistenza e/o tolleranza di linee commerciali di pomodoro al lepidottero sono stati effettuati biosaggi in serra, campo e camera climatica. Nei biosaggi di suscettibilità condotti in pieno campo e serra su 8 linee commerciali di pomodoro è stato osservato che alcune linee a bacca tonda (*Biliardino alto*, *Biliardino nano* e *Cerasella*) presentavano i valori di infestazione più bassi sia per la percentuale di foglioline minate che per la percentuale di bacche infestate. Le indagini in camera climatica sono stati effettuati al fine di evidenziare e confermare la presunta bassa suscettibilità delle linee a bacca tonda riscontrata nei biosaggi precedenti. Per i fattori biotrofici riguardanti il numero di uova deposte, la percentuale di foglioline minate, la percentuale di bacche minate, la superficie fogliare minata e la tipizzazione di mine osservate su fusti, foglie e bacche la linea *Biliardino nano* è risultata essere la meno suscettibile tra tutte quelle saggiate; i risultati osservati per i fattori biometrici (evoluzione biofenologica, saggi ponderali su larve e crisalidi) e per il potenziale biotico (fecondità femmine) attestavano le stesse evidenze osservate per le valutazioni biotrofiche.

I risultati sperimentali di questo lavoro di tesi evidenziano dunque la necessità di ottimizzare ulteriormente il targeting del 102 mediante una completa caratterizzazione strutturale per ottenere effetti di interferenza gene-specifica mirati. Inoltre non è stato possibile valutare la modulazione melanogenetica codificata dal gene 102 in questa specie di lepidottero per la difficoltà di manipolare e iniettare le larve con microsferette necessarie per indurre la risposta immunitaria in saggi di incapsulamento *in vivo*. In riferimento ai risultati ottenuti dai biosaggi di interferenza su uova, sono inoltre necessarie ulteriori indagini sul ruolo svolto dal gene 102 nello sviluppo embrionale di *T. absoluta*. Risultati di precedenti ricerche (FALABELLA ET AL., 2012) hanno suggerito che tale target è presumibilmente coinvolto nella neogenesi di epitelii basali in quanto regola la biosintesi di precursori chinonici fondamentali per la deposizione di scleroproteine responsabili della durezza e stabilità fisico-meccanica del tegumento durante le mute e lo sviluppo embrionale. La bassa suscettibilità della linea Biliardino nano emersa nei biosaggi ha fornito un risultato funzionale che può essere utilizzato per inserire suddetta linea in futuri programmi di selezione per putative linee resistenti e/o tolleranti. Tale evidenza è attualmente oggetto di approfondimento e di studio in analisi trascrittomiche tipo RNA-seq finalizzate ad individuare eventuali geni candidati responsabili della bassa suscettibilità di suddetta linea al lepidottero fillominatore.

ABSTRACT

Evaluation of innovative methods in the ecofriendly
control of *Tuta absoluta*
(Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)

The extreme harmfulness of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) has caused, as a result of its rapid and uncontrolled spread in Europe, an increase in the use of chemical insecticides, determining the conditions for a possible development of resistant populations of the pinworm. Despite in recent years the different control strategies applied have reached acceptable levels of effectiveness, the moth remains a key pest of tomato in field crops. The integration of pheromone based control (mass trapping and mating disruption techniques), new effective insecticide molecules and biological control options allows a reduction of the economic impact of this pest in most protected crops.

The aim of this Phd thesis was to investigate about the possibility to develop alternative measures like: **A)** innovative biotechnology such as the post-transcriptional gene silencing mediated by dsRNA (RNA interference). The target considered (gene 102) is highly conserved in Lepidoptera, and responsible for lethal physiological processes associated to the fitness of the insect as the modulation of the immune response (see Falabella et al., 2012). The encoding activity of this gene has validated the necessity to isolate the orthologue 102 also in *T. absoluta*, in order to proceed to its structural characterization by RACE technique and functional experiments of gene-specific interference; **B)** the assessment of tolerance and/or resistance sources present in tomato germoplasm and commercial tomato lines.

A) The most conserved sequence of the 102 gene has been isolated using specific primers 102 Spod FE- Spod RE designed on the most conserved sequence of the complete cDNA 102 of *Spodoptera littoralis*. PCR products of the same length as that amplified in the noctuid, amounting to 580 bp have been obtained. Subsequently the construct (dsRNA 102) for the gene-specific interference has been prepared. In the RACE 3' experiments using specific primers GSP RACE 3', GSP nested and universal primer AUAP, bands of the estimated length by comparison with the complete cDNA 102 of *S. littoralis* and equal to 500 bp has been obtained. In the RACE 5' experiments bands of 180 bp endogenous to sequence previously isolated and not corresponding to the expected length have been obtained. Interference trials on eggs of *T. absoluta* have been carried out, as in previous work (SEE DI LELIO, 2013), treatments of stabilized dsRNA 102 solutions on *S. littoralis* eggs determined a significant reduction in the percentage of hatching, as well as a reduced survival of larvae resulting from interfered eggs. In these bioassays *T. absoluta* eggs were treated with three different concentrations of dsRNA 102 solution (2000 ng /u, 200 ng /u e 20 ng /u) and dechoriation pretreatments with Chlorox 5% were performed in order to facilitate the internalization of the solution in embryos; the control eggs were soaked in GFP dsRNA solutions at the concentration of 200 ng/u. No significant difference in the hatching between treated and control eggs was

recorded. The effect of dechoronation pretreatment with bleach has not significantly inhibited the hatching compared to the treatment performed with only dsRNA 102 solution.

B) To investigate resistance and/or tolerance sources of commercial tomato lines in order to limit the leafminer development bioassays were conducted in greenhouse, field and climate chamber. The result of open field and greenhouse bioassays on eight commercial tomato lines showed that the lowest infestation were recorded for commercial cherry tomato lines (Biliardino alto, Biliardino nano and Cerasella) for both the percentage of mined leaves that for the percentage of infested fruits. Bioassays were carried out in a climatic chamber in order to highlight and confirm the presumed low susceptibility observed in field. The investigated biotrophic factors (number of eggs, percentage of leaves and fruits mined, the leaf surface ratio and the mines type observed on stems, leaves and fruits) showed that the Biliardino nano line was less susceptible. The results recorded for the biometric parameters (development time, larval and pupal weight) and the biotic potential (female fecundity) confirmed the previous biotrophic evaluations.

The experimental data produced by this PhD thesis demonstrate the necessity to further optimize the gene 102 targeting through a complete structural characterization in order to obtain well targeted gene-specific interference effects. Moreover it has been impossible

to evaluate the melanogenetic modulation encoded by the 102 gene in this moth species due to the difficulty of injecting larvae of *T. Absoluta* with beads necessary to induce the immune response *in vivo* encapsulation bioassays. Further investigations are also required to highlight the role played by the 102 gene in embryonic development. A previous research (FALABELLA ET AL., 2012) suggested that this target is supposedly involved in the basal epithelia neogenesis controlling the biosynthesis of quinone precursors indispensable for the deposition of scleroproteins essential in the hardness and physical-mechanical stability of the integument during the moulting and embryonic development. The low susceptibility of the Biliardino nano line emerged in the bioassays provided a functional result useful to include this line in future selection programs for putative resistant and/or tolerant lines. This evidence is currently the subject of a transcriptomic analysis of RNA-seq aimed to identify possible candidate genes responsible for the low susceptibility of this line to the tomato pinworm *T. absoluta*.

1.

Introduzione

§ 1 – Origini e problematiche tassonomiche

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), nota anche come fillominatrice del pomodoro o tignola sudamericana del pomodoro, è ormai diventato un grave flagello infeudato a diverse solanacee coltivate e spontanee in Sud America ed Europa. Il suo inquadramento tassonomico ha subito nel tempo diverse modifiche. Infatti nel 1917 Edward Meyrick, noto entomologo inglese, pubblicò un articolo in cui descriveva diverse nuove specie di microlepidotteri raccolte sulle Ande: una di queste specie, rappresentata in particolare da un unico esemplare maschio, e catturata ad Huancayo in Perù centrale, nel mese di luglio, a 3200 m di altitudine, fu denominata *absoluta* e ascritta al genere *Phthorimea* (genere da egli stesso creato nel 1902). Dopo un lungo periodo di stasi, ha inizio una serie di revisioni sistematiche che porta questa specie a cambiare più volte genere. Nel 1962 J. F. Clarke, descrivendo alcuni microlepidotteri rivenuti in Giappone, cita anche *absoluta*, considerandola come *Gnorimoschema*. Nel 1964 il celebre entomologo cecoslovacco Povolny istituì il genere *Scrobipalpula* e pochi anni dopo (1967) vi include la specie *absoluta*; ancora lo stesso autore, nel 1987, in un lavoro specialistico sull'entomofauna sudamericana, sposta diverse specie, tra cui anche *absoluta*, nel nuovo genere *Scrobipalpuloides*. Infine sempre Povolny, nel 1993, recupera il vecchio genere *Tuta* (istituito da Strand nel 1911) e vi include, tra le altre specie, anche *absoluta*. Il genere

Tuta e la sua specie tipo *atriplicella* furono descritti da Kieffer e Jörgesen nel 1910. Meyrick (1925) mise il genere *Tuta* in sinonimia con *Gnorimoschema*.

Hodges e Becker classificarono nel 1990 *T. atriplicella* come congenere della specie tipo del genere *Phthorimaea*, *P. operculella* (Zeller), e conseguentemente questi due generi furono messi in sinonimia. Nel 1993 Povolny reinstallò *Tuta* come genere indipendente a tutti gli effetti, anche se i due generi furono nuovamente messi in sinonimia da Lee *et al.* (2009) sulla base della similarità della morfologia dell'apparato genitale maschile di *T. atriplicella* (**Fig. 1a**) e *P. operculella* (**Fig. 1b**).

Attualmente un recente studio sui Gnorimoschemini europei (Huemer e Karsholt, 2010) ha confermato l'approccio di considerare *Tuta* come genere valido e indipendente.

Il lepidottero è una specie originaria del Sud America, in particolare della regione andina (Perù, Bolivia e Cile). La prima presenza del lepidottero nel nostro continente è stata registrata in Spagna, nelle zone di Valencia e delle Isole Baleari (Urbaneja *et al.*, 2010). Dalla Penisola iberica le infestazioni hanno interessato rapidamente l'Europa meridionale, Italia compresa, Nord Africa (Marocco, Tunisia ed Algeria), Europa nord-orientale e successivamente anche il Medio Oriente in particolare Cipro, Turchia, Bahrain e Kuwait (DESNEAUX, 2010; TROPEA GRAZIA ET AL., 2012). Anche paesi dell'Europa setten-

trionale come Olanda, Germania ed Inghilterra sono state interessate dalle infestazioni (POTTING, 2009). Il ritrovamento di *T. absoluta* a latitudini anche ben superiori a quelle originarie dimostra una notevole capacità di adattamento dell'insetto, che si è facilmente acclimatato nei nuovi areali, riproducendosi con popolazioni numerose per buona parte dell'anno.

In Italia le prime infestazioni su pomodoro sono state osservate nella primavera del 2008 in Calabria e nell'autunno dello stesso anno in Sardegna, Sicilia, Campania e Liguria. Nel 2009 nuovi attacchi sono stati segnalati anche in Italia settentrionale ed in particolare in Piemonte e Friuli-Venezia Giulia (**Fig. 2**).



Fig. 1 – Armatura genitale maschile di *Tuta atriplicella sensu absoluta* (a) e *Phtorimea operculella* (b).

I monitoraggi, condotti nel 2010 in queste ultime regioni, hanno evidenziato come *T. absoluta* sia ormai largamente diffusa già pochi

mesi dopo la segnalazione. In particolare, in Piemonte, in località dove la coltivazione del pomodoro è più intensa ed ha un ciclo più lungo (ambiete protetto) sono stati segnalati danni ingenti per gli agricoltori sia sulla parte aerea delle piante (fusti e foglie) che sulle bacche (SAN-NINO e ESPINOSA, 2010a).

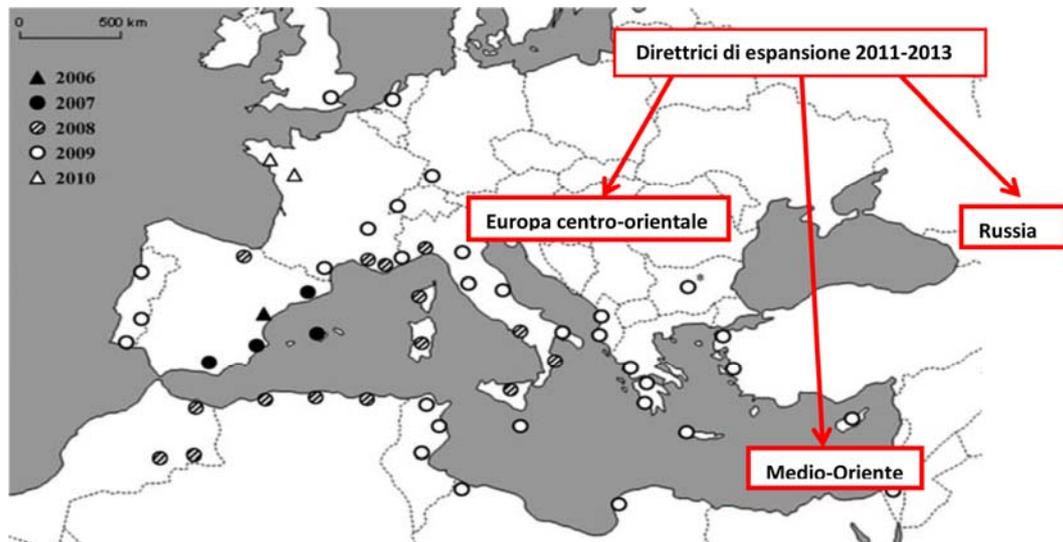


Fig. 2 – Diffusione di *T. absoluta* in Italia e nei diversi areali del Mediterraneo

§ 2 – Eco-biologia e dannosità

Tuta absoluta ha abitudini alimentari circoscritte quasi esclusivamente alle solanacee. Nei suoi areali di origine, oltre ad essere ritrovata su pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), altre segnalazioni hanno riguardato specie vegetali botanicamente congeneri a quest'ultima quali *L. hirsutum*, *L. puberulum* e *L. pimpinifolium*.

Altre solanacee coltivate appetite al gelechide sono patata (*Solanum tuberosum*), melanzana (*S. melongena*) e peperone (*S. muricatum*). Il tabacco (*Nicotiana tabacum*) non sembra essere invece specie particolarmente appetita. Sono stati segnalati, inoltre, anche occasionali attacchi a piante di altre famiglie botaniche come fagiolo e cavolo (SANNINO, 2012). Ultimamente in Sicilia sono stati segnalati anche danni in serra anche ad alchechengi (*Physalis peruviana*).

Tra le spontanee considerate come possibile serbatoio di infestazione si segnalano inoltre la comune erba morella (*S. nigrum*), seguita da altre specie della stessa famiglia (*S. bonariensis*, *Datura stramonium*, *D. ferox*, *Lycium spp.*, *Nicotiana spp.*).

T. absoluta è una specie omodinama, con ciclo normalmente privo di diapausa, e può compiere fino a 8-12 generazioni all'anno, in gran parte dei paesi del Bacino del Mediterraneo, sia in pieno campo che in serra (MIRANDA ET AL., 1998).

In genere come gli altri gelechidi, anche questo lepidottero ha abitudini crepuscolari e notturne, restando di giorno nascosto tra la

vegetazione o al suolo, con le ali disposte aderenti al corpo e le antenne poggiate sopra; se disturbato spicca brevi voli, zigzaganti e bassi. Le temperature di alimentazione influiscono notevolmente sulla longevità dell'adulto, che vive fino a sei settimane a 15 °C e solo pochi giorni (4-5) a 35 °C. La durata del ciclo vitale dipende strettamente dalle condizioni ambientali, con tempi medi di 76,3 giorni con temperatura prossima ai 14,0°C, di 39,8 giorni con 19,7°C e di 23,8 giorni a 27,1°C. Le soglie termiche dei diversi stadi sono state stimate pari a $6,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $7,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $9,2 \pm 1^\circ\text{C}$ rispettivamente per uovo, larva e pupa; la soglia termica complessiva è stata determinata pari a $8,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (Barrientos *et al.*, 1998).

Gli adulti di *T. absoluta* sono in grado di riprodursi già dopo 24 ore dallo sfarfallamento; essi sono lunghi 6-7 mm, con le femmine solitamente più grandi dei maschi e presentano ali lungamente frangiate. Normalmente quelle anteriori sono strette e lanceolate, mentre le posteriori, vagamente subtrapezoidali, presentano l'angolo apicale prominente e digitiforme (**Fig. 3**). Le antenne sono semplici e filiformi con anellature bianche e nere alternate (**Fig. 4**).

I due sessi possono distinguersi esteriormente, oltre che per la diversa conformazione dei frenuli (composti da un'unica grossa setola nei maschi (**Fig. 5a**) e da un fascetto di tre setole (**Fig. 5b**) sottili nelle femmine), per il diverso rivestimento del lato inferiore dell'addome, che si presenta nei maschi bianco sporco con diffuse squamu-

le grigiastre sui lati, nelle femmine bianco candido con quattro serie sublaterali ben nette di linee oblique nere (**Fig. 6**) (SANNINO ED ESPINOSA, 2010b). Dallo sfarfallamento all'accoppiamento intercorre un tempo variabile, in funzione della temperatura, normalmente necessario per il completamento della maturazione delle gonadi. In genere tale periodo varia da poche ore nei maschi a circa 22 ore nelle femmine (Sannino, 2012). La fecondità della femmina si aggira mediamente intorno a 100-150 uova, con un minimo di 40 e un massimo di 260 circa. Il periodo di ovideposizione può prolungarsi per una settimana, con un picco tra il terzo e il quinto giorno.

Le uova, ellittico-subcilindriche e di colore bianco-giallognolo (**Fig. 7**), sono deposte sulle parti epigee della pianta, isolatamente o in gruppi disordinati di 2-5 elementi. Sulle piante piccole vengono preferiti i palchi apicali, mentre sui frutti le ovideposizioni hanno luogo preferibilmente su quelli ancora verdi e in particolare sul calice.

Lo sviluppo embrionale oscilla da un minimo di 4-5 giorni a 30 °C a un massimo di 10-11 giorni a 15 °C. Il limite termico inferiore è di 12 °C, quello superiore è di 35 °C, ma un tasso di mortalità elevato si verifica in corrispondenza dei valori estremi (BENTANCOURT ET AL., 1996). IMENES ET AL. (1990) registrarono per il completamento dello stadio di uovo una durata di 5-6 giorni. Al termine di tale periodo la neolarva sgusciata, prima di iniziare lo scavo di una mina, esplora il substrato per diversi minuti (fino a circa 30) per trovare il punto ido-

neo alla penetrazione. Sulle foglie pratica un foro di 0,15-0,20 mm di diametro e, nutrendosi del solo parenchima, rispettando epidermide superiore ed inferiore, scava una mina lineare e sottilissima (**Fig. 8**), che in seguito si slarga diventando di aspetto vescicoloso (**Fig. 9**) con uno sviluppo di circa 2,5 cm² di diametro. Le gallerie prodotte sui frutti (**Fig. 10**), di calibro non superiore a 1-1,5 mm, raramente penetrano oltre il centimetro e mezzo di profondità. I fori d'ingresso, se disposti intorno al calice, sono inizialmente poco evidenti, perchè coperti dai sepali, ma diventano in pochi giorni manifesti in quanto l'area interessata invaia precocemente, evidenziando anche un accumulo di escrementi (**Fig. 11**).

Le larve sono in grado di spostarsi sulla pianta; la loro dispersione è stata posta in relazione con la temperatura nella mina, l'esaurimento di cibo, l'accumulo di materiale fecale e la presenza di marciumi (TORRES ET AL., 2001). Raggiunta la maturità, alla IV età (**Fig. 12**), la maggior parte delle larve fuoriesce dalle mine, lasciandosi cadere al suolo e formando un bozzolletto sericeo lungo 7-9 mm. Normalmente solo una minoranza della popolazione larvale trova riparo sulla pianta in particolare tra le foglie infestate o nella zona del calice ove in genere tessono una copertura sericea. Al contrario le larve che si incrisalidano all'interno delle mine non tessono bozzoli. Subito dopo aver tessuto questo astuccio sericeo, la larva prima di diventare crisalide, per almeno 1-2 giorni passa per una fase eopupale in cui è im-

mobile, afaga e contratta. Normalmente le crisalidi presentano una lunghezza media di 5-6 mm e sono cilindriche, di colore inizialmente verde (**Fig. 13a**), poi sempre più scuro (**Fig. 13b**) sino alla fuoriuscita dell'adulto. In genere la fase larvale ha una durata variabile soprattutto in rapporto alla temperatura e alla qualità del cibo, oscillante in media da 13 a 37 giorni, con una soglia termica inferiore di sviluppo intorno a 6 °C. L'elevata densità di popolazione, rallentando la crescita della larva, può allungare di alcuni giorni la durata di questo stadio.

La durata della ninfosi varia in genere da un minimo di 8-12 giorni, nelle generazioni che si susseguono durante l'anno, a un massimo di due mesi, nella generazione svernante. IMENES ET AL. (1990), per il completamento di questo stadio, ottennero in laboratorio valori compresi tra 9 e 10 giorni.

I danni sono causati dall'attività trofica larvale su tutta la parte aerea della pianta. Le rosure sulle bacche sono molto più gravi, perché portano soventemente allo scarto del prodotto. Il danno è quantificabile calcolando non solo la percentuale di frutti colpiti alla raccolta, ma anche quelli caduti a terra a causa dell'indebolimento dovuto alla presenza della tignola. In conseguenza dell'attacco foglie, frutti e apici vegetativi sono facilmente soggetti ad attacchi indiretti di patogeni batterici e fungini con successivo sviluppo di muffe e marciumi. I danni hanno riguardato anche pomodoro trasformato con frequente rinvenimento di larve nelle conserve.

Normalmente i frutti attaccati a maturità e subito avviati alla lavorazione industriale non presentano spesso alterazioni evidenti e possono sfuggire a cernite e controlli soprattutto in partite con basso livello di attacco.

In generale la lotta a *T. absoluta* è spesso resa difficile da diversi fattori “bio-intrinseci” quali:

- alto numero di generazioni;
- endoficità delle larve capaci di annidarsi all’interno degli organi vegetali attaccati;
- diffusione delle colture sotto serra;
- presenza costante di adulti e uova con continue reinfestazioni, dovute sia alla diversa velocità di sviluppo delle larve che alla differente durata dei cicli riscontrabile tra popolazione su colture in pieno campo ed in serra.

Con l’attività trofica, se non adeguatamente controllata, *T. absoluta* è in grado di causare attacchi economicamente rilevanti determinando perdite potenziali di produzione dal 70 al 100% (**Fig. 14**). Tali valori sono da considerarsi ancora più significativi se si valuta che il pomodoro conta una produzione annuale pari approssimativamente a 30 milioni di tonnellate con valori stimati intorno ai 10 miliardi di euro.



Fig. 3 – Particolare delle ali dell'adulto di *T. absoluta*. L'apertura alare è di 11-13 mm.



Fig. 4 – Capo del gelechide con anulature delle antenne bianche e nere

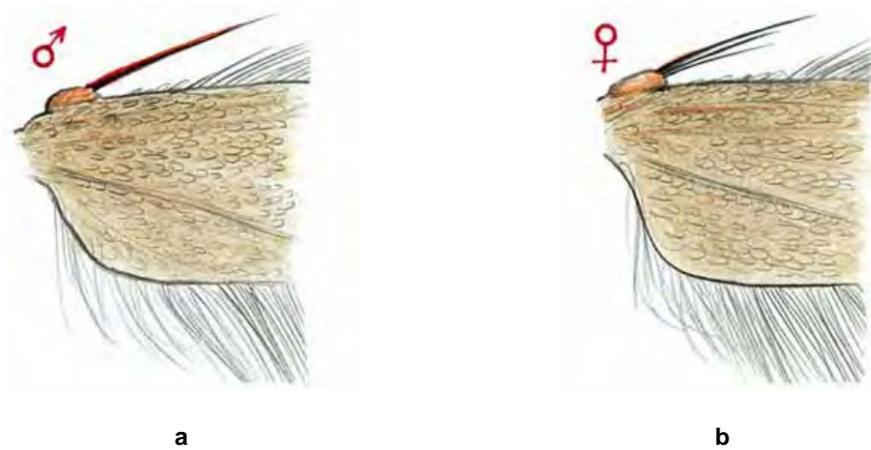


Fig. 5 – Per sessare gli adulti è utile osservare la conformazione dei frenuli ed il diverso numero degli stessi localizzati nella parte basale dell'ala posteriore del maschio (a) e della femmina (b).



Fig. 6 – Per sessare gli adulti è utile osservare il diverso rivestimento dell'addome nel maschio e nella femmina.



Fig. 7 – Uova di *T. absoluta* deposte sulla pagina inferiore delle foglie



Fig. 8 – Mine lineari derivanti dall' iniziale attività trofica del gelechide



Fig. 9 – Mina matura con le tipiche camere vescicolose ed espansioni digitiformi.



a



b

Fig. 10 – Mine non coalescenti (**a**) e coalescenti mature (**b**) su bacche.



Fig. 11 – Fori di ingresso larvali intorno a sepali e calice con accumulo di escrementi.



Fig. 12 – Larva matura di *T. absoluta* (foto prof. Gennaro Viggiani).

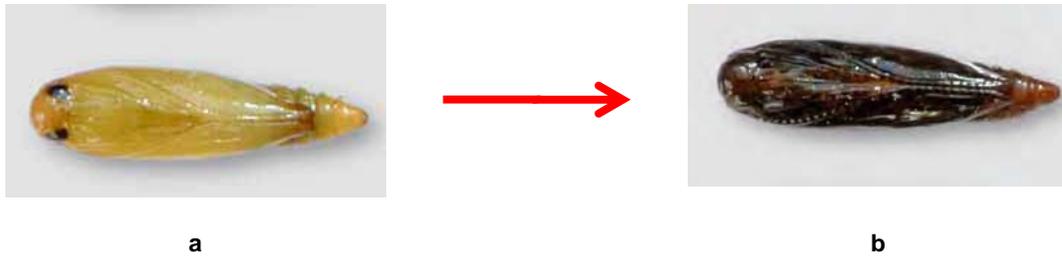


Fig. 13 – Crisalidi di *Tuta absoluta* al III giorno (a) e al VII giorno (b) di ninfosi.



Fig. 14 – Piante di pomodoro interessate da infestazioni di *T. absoluta*. (A) infestazioni iniziali; (B) infestazioni severe.

§ 3 – Metodiche di controllo

L'estrema dannosità di *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) ha portato, a seguito della sua rapida e incontrollata diffusione in Europa, ad un uso indiscriminato di insetticidi, determinando le condizioni per un possibile sviluppo di popolazioni resistenti del fillominatore. Nonostante negli anni le contromisure abbiano raggiunto livelli di efficacia più che accettabili, il lepidottero rimane uno dei fattori chiave della coltivazione del pomodoro, anche perché gli approcci integrati di lotta non risultano pienamente validi per la difesa delle solanacee in pieno campo. Cattura massale, disorientamento, nuove e più efficaci molecole insetticide, applicazioni di lotta biologica sono alcuni dei metodi con cui si può affrontare la lotta al fillominatore per contenere la sua dannosità. Indagini sull'interazione insetto-pianta ospite o strategie innovative di controllo basate su sofisticati metodi biotecnici sono allo studio.

§ 3.1 – Metodi preventivi

La conoscenza delle componenti antagoniste indigene e in particolare dei potenziali entomofagi e le strategie per la loro conservazione, devono essere considerati come una priorità in attuazione della difesa di un fitofago esotico. Diversi parassitoidi e predatori indigeni sono stati segnalati su *T. absoluta* nel bacino del Mediterraneo (DESNEAUX ET AL., 2010; GABARRA E ARNÒ, 2010; MOLLÀ ET AL., 2010; LIO-

NI ET AL., 2011; FERRACINI ET AL., 2012; URBANEJA ET AL., 2012; ZAPPALÀ ET AL., 2012a). Questi limitatori naturali si sono rapidamente adattati al nuovo parassita e potenzialmente hanno un ruolo centrale come fattori di limitazione nei confronti della Tignola del pomodoro. Le specie di parassitoidi riscontrati possono anche svilupparsi a spese di ospiti alternativi che vivono sulla flora spontanea. I dati fin qui raccolti indicano che tendenzialmente la loro abbondanza è correlata alla presenza di flora spontanea e colture sempreverdi che costituiscono un elemento fondamentale della biodiversità funzionale (ALTIERI e NICHOLS, 2004). In tale ambito, andrebbe approfondito il ruolo ecologico che rivestono alcune piante spontanee diffuse nei nostri ambienti e già segnalate come piante ospiti di fitofagi alternativi. Tra le diverse essenze segnalate, si pone l'attenzione in particolare su *S. nigrum* L., *Parietaria officinalis* L., *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. Ai fini applicativi sarebbe interessante verificare la costituzione di possibili reti trofiche funzionali in prossimità e all'interno delle colture per agevolare la permanenza in ambiente di componenti antagoniste utili al contenimento non solo di *T. absoluta* ma anche di altri importanti fitofagi quali aleirodi, afidi e acari. Sebbene resti da chiarire l'effettivo ruolo rivestito dalla biodiversità funzionale e dalle tecniche di gestione dell'habitat, è comunque plausibile che le popolazioni del fitofago possano essere significativamente ridotte dall'azione di contenimento svolta dalla comunità dei nemici naturali indigeni

(GARDINER ET AL., 2009). Pertanto, sono auspicabili indagini per migliorare le conoscenze sulle biocenosi antagoniste indigene ottimizzando la loro attività attraverso una gestione razionale dell'habitat all'interno e all'esterno della coltura (PERDIKIS ET AL., 2011). In tal senso, una precoce installazione e mantenimento della comunità antagonista, o di alcuni suoi componenti all'interno dell'ambiente coltivato può essere artificialmente ottenuto anche con l'uso di cosiddette *banker plants*. Queste costituiscono un sistema tri-trofico di piante non produttive artificialmente infestate da un fitofago, che funge da ospite alternativo per l'entomofago di cui si voglia agevolare l'insediamento (FRANK, 2010). Nell'ambito delle misure preventive di tipo più prettamente agronomico, sono da considerare la rimozione tempestiva dei resti della coltura antecedente e la loro distruzione, al fine di ridurre la permanenza in campo di materiale infestato, che rappresenta un'importante fonte d'inoculo per le future coltivazioni. Inoltre, nel rispetto delle più elementari buone pratiche agricole (GAP – *Good Agricultural Practices*) è indispensabile adottare adeguate rotazioni colturali con sufficienti intervalli temporali tra le varie coltivazioni di pomodoro e impiegare materiale di riproduzione indenne. Nel contenimento della tignola particolare rilievo assumono tutte quelle pratiche colturali quali la distruzione dei residui delle coltivazione atte a ridurre il potenziale di infestazione e l'eliminazione delle solanacee spontanee possibili ospito alternativi del fitofago sia all'interno sia

all'esterno delle serre. Gli avvicendamenti colturali con piante diverse dalle solanacee che interrompono il ciclo dell'insetto e le lavorazioni superficiali del terreno che distruggono le crisalidi svernanti nei detriti del suolo possono concorrere a contrastare il fillominatore.

§ 3.2 – **Metodiche di contenimento diretto**

§ 3.2.1 – **Metodi biotecnici**

Come per altri insetti del pomodoro, caratterizzati da elevata prolificità, ad esempio il nottuide *Spodoptera littoralis* (Boisduval), anche per questa tignola è opportuno contrastarne lo sviluppo sin dall'inizio, evitando che raggiunga densità troppo elevate. Nelle regioni meridionali presenze significative di adulti di *T. absoluta* si registrano a partire dalla primavera (o anche prima nelle serre), con un incremento della popolazione fino ad estate-autunno, seguito da una diminuzione graduale con l'abbassamento delle temperature. È necessario quindi già da marzo-aprile mettere in campo dispositivi di monitoraggio per il rilevamento dei voli e contemporaneamente porre in atto una costante vigilanza delle coltivazioni per individuare i primi attacchi, contro cui intervenire tempestivamente con i prodotti autorizzati.

Confusione/disorientamento sessuale

Il feromone sessuale di *T. absoluta* è stato identificato chimicamente come una miscela 90:10 (3E,8Z,11Z)-tetradecatrien-1-yl aceta-

to e (3E,8Z)-tetradecadien-1-yl acetato e il suo potere attrattivo è stato positivamente testato in Paesi extraeuropei sia in serra che in pieno campo (FILHO ET AL., 2000). Tuttavia, sperimentazioni preliminari di applicazioni di disturbo dell'accoppiamento condotte sia in pieno campo sia in coltura protetta hanno fornito risultati controversi. Successive prove, condotte in Spagna e in Italia utilizzando varie tipologie di diffusori (NAVARRO LOPIS ET AL., 2010; MARTIMARTI ET AL., 2010; VACAS ET AL., 2013; COCCO ET AL., 2012b; COCCO ET AL., 2013), hanno evidenziato un soddisfacente livello di contenimento ma se applicate in serre adeguatamente isolate al fine di prevenire o almeno limitare accidentali introduzioni di adulti dall'esterno; resta tuttavia da definire la sostenibilità economica della tecnica. Recenti studi hanno rivelato la capacità di esemplari di *T. absoluta* allevati in laboratorio di riprodursi per partenogenesi accidentale (CAPARROS MEGIDO ET AL., 2013); l'origine di questo fenomeno non è stato ancora chiarito e sebbene non sia stata ancora evidenziata la presenza di popolazioni partenogenetiche in natura, questo ritrovamento potrebbe avere sostanziali implicazioni sull'efficacia di queste tecniche.

Cattura massale

Ai fini della cattura massale degli adulti, possono essere impiegate trappole basate su tre sistemi attrattivi: feromonico, luminoso e misto. Anche queste trappole devono essere collocate fin dal trapian-

to della coltura a non più di 80 cm da terra e in ragione di 2-3/1000 m² di serra. Sono disponibili in commercio varie tipologie, anche se molte varianti di fattura artigianale sono utilizzate in campo. Le trappole innescate con il feromone sessuale (**Fig. 15**) sono costituite da un recipiente di circa 40 cm di diametro e 20 cm di altezza contenente acqua miscelata a un blando tensioattivo (olio e/o detergente) per impedire ai maschi caduti nell'acqua di sfuggire; il dispenser è collocato poco al disopra del livello dell'acqua. Diverse tipologie di trappole luminose sono adottate, prevalentemente su base empirica. Le differenze riguardano sia la fonte luminosa che il funzionamento; si usano in genere lampade fluorescenti ovvero fonti di luce ultravioletta, queste ultime in genere sono abbinata a griglie elettrificate o ad aspiratori per l'eliminazione degli adulti attratti dalla trappola. Queste trappole vengono attivate normalmente durante la notte e, sfruttando la fototassi positiva degli adulti di entrambi i sessi di *T. absoluta*, ne consentono una massiccia eliminazione. Prove sperimentali condotte per valutare l'efficacia di queste trappole nel contenimento delle infestazioni in campo hanno fornito risultati variabili in funzione di fattori ambientali e colturali (COCCO ET AL., 2012a). Le trappole a feromoni hanno dimostrato di poter garantire un sufficiente livello di protezione della coltura. Tuttavia, l'aumento della loro densità pur causando un aumento del numero di maschi catturati per trappola, non riduce significativamente la presenza di femmine fecondate e quindi

le infestazioni; ciò viene attribuito alla capacità da parte dei maschi di accoppiamenti multipli. Diversamente, le trappole luminose catturano anche un'alta percentuale di femmine e risultano in genere più efficaci. A bassa/moderata densità di popolazione (ciclo colturale estivo-vernino), le trappole luminose sono efficaci nel ridurre il numero di mine fogliari mentre, con livelli di densità medi/alti (cicli colturali invernali/estivi) anche le trappole luminose sono da sole inefficaci nel controllare le infestazioni (COCCO ET AL., 2012a; CAPARROS MEGIDO, 2103). Molto più diffuse sono invece le trappole a funzionamento "misto" ovvero feromoni/luce che vengono collocate sia all'interno che all'esterno delle serre e, in virtù delle maggiori capacità di cattura, sono anche più apprezzate dagli operatori. Infatti, l'associazione della fonte luminosa e del feromone assicura la cattura di entrambi i sessi consentendo maggiori livelli di protezione della coltura. In campo si possono riscontrare diverse tipologie di trappole miste molto spesso di fattura artigianale ma ultimamente in commercio sono disponibili anche modelli a funzionamento automatico e alimentati ad energia solare (**Fig. 16**). Queste trappole, pur se dotate di una fonte luminosa a led a bassa intensità, permettono di ottenere elevati livelli di cattura all'interno della serra. Prove comparative condotte in ambienti serricoli italiani ed europei (COCCO ET. AL., 2013) hanno dimostrato una maggiore efficacia di queste trappole rispetto a quelle con lampade elettriche tradizionali, nonostante il ridotto periodo di attivazione. I-

noltre, considerata la ridotta intensità luminosa, si riducono i rischi di attrazione di adulti dall'esterno della serra, cosa che in genere ne scoraggia la collocazione all'interno degli apprestamenti protetti. L'efficacia di questi dispositivi in ambiente protetto è comunque strettamente vincolata alle condizioni d'isolamento della serra in modo da ridurre l'accesso di adulti dall'esterno della struttura (MONSERRAT DELGADO, 2009). Più di recente sono stati messi a punto altri dispositivi per la cattura massale che utilizzano non solo l'attrattivo feromonico ma anche la componente cromoattrattiva; si tratta di fasce collanti di colore giallo innescate con il feromone sessuale di *T. absoluta*, larghe circa 40 cm e che possono essere collocate all'interno delle serre per diversa lunghezza. Queste trappole, in virtù della loro colorazione, possono essere utilmente impiegate anche per la cattura massale di altri fitofagi, quali aleirodi e ditteri fillominatori. Per evitare la cattura di entomofagi eventualmente rilasciati, è possibile ricorrere a fasce collanti sempre attivate con il feromone ma trasparenti (AL-ZAIDI, 2011; SOLIMAN, 2013).

Attract and kill

Nell'ambito delle strategie d'impiego dei feromoni, appare particolarmente interessante e innovativa la tecnica dell'*attract and kill* che si può realizzare mediante l'applicazione, all'interno di serre ben isolate, di pannelli gialli ricoperti da un'emulsione cerosa impregnata

di piretroide (cipermetrina) e innescati con il feromone sessuale della tignola (AL-ZAIDI, 2011; SOLIMAN, 2013). Considerata, anche in questo caso, la potenziale dannosità nei confronti di entomofagi, il loro utilizzo deve essere attentamente valutato nel caso di rilasci di questi ultimi.

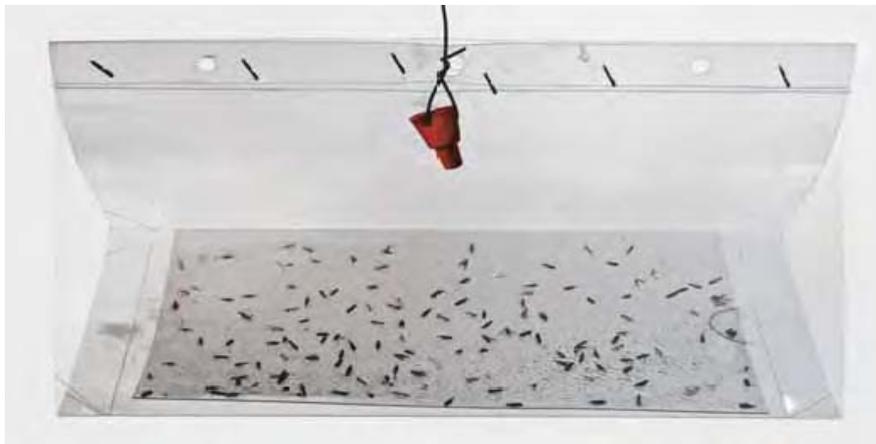


Fig. 15 – Trappola a feromoni sessuali (modella a delta).



Fig. 16 – Trappola luminosa “Ferolite” ad energia solare.

§ 3.2.2 – **Metodi biologici**

Nell'area di origine sono stati osservati diversi nemici naturali in grado di controllare le popolazioni di *T. absoluta* (LUNA ET AL., 2012). Nel Mediterraneo sono state ad oggi segnalate un numero di specie antagoniste sensibilmente inferiore rispetto a quelle già riportate in Sud America, che ammonterebbero a circa 50 parassitoidi e 40 predatori. Tuttavia è plausibile ipotizzare che la coorte degli antagonisti indigeni di *T. absoluta* aumenterà nei prossimi anni anche nelle aree di nuova colonizzazione. Qui, diversamente a quanto avviene in Sud America, dove i parassitoidi assumono maggiore significato, i predatori generalisti appaiono al momento gli entomofagi più diffusi, vista la loro grande capacità di adattamento alle cosiddette specie aliene (DESNEUX ET AL., 2010; LUNA ET AL., 2012; URBANEJA ET AL., 2012). Studi effettuati nel bacino del Mediterraneo successivamente all'introduzione del lepidottero in Europa hanno accertato la presenza di svariati limitatori anche nel continente europeo (RICIPUTI, 2011; MOLLA ET AL., 2010; URBANEJA ET AL., 2012; GABARRA ET AL., 2014). Alcuni di questi predatori e/o parassitoidi vengono oggi utilizzati con successo come mezzo di lotta sulle colture (DESNEUX ET AL., 2010; URBANEJA ET AL., 2012). Molte specie di predatori, quali *Macrolophus pygmaeus* (Rambur), *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Hemiptera: Miridae) e *Nabis pseudoferus* (Remane) (Hemiptera: Nabidae), sono stati osservati in attività su uova e larve di *T. absoluta* nell'area mediterranea

(CABELLO ET AL., 2009; DESNEUX ET AL., 2010; URBANEJA ET AL., 2012), In particolare i due miridi *M. pygmaeus* (**Fig. 17**) e *N. tenuis* (**Fig. 18**) sono attualmente fra i predatori maggiormente utilizzati contro il lepidottero esotico. Gli adulti di queste specie si sono rivelati voraci predatori di uova di *T. absoluta*, e di larve, specialmente quelle delle prima età (URBANEJA ET AL., 2012; CHAILLEUX ET AL., 2013). In condizioni di laboratorio è stata valutata la capacità di predazione di *M. pygmaeus* e *N. tenuis* nei confronti del lepidottero esotico; entrambe le specie sono risultate efficienti predatori di uova e di larve, con una preferenza per i primi stadi larvali (URBANEJA ET AL., 2009). Le dimensioni ridotte e la grande voracità di questi insetti permette loro di esplorare la parte aerea delle piante infestate alla ricerca di uova e primi stadi larvali, che vengono attaccati se sorpresi fuori dalle mine. *M. pygmaeus* viene allevato dalle biofabbriche ed è disponibile in commercio e largamente utilizzato negli impianti di pomodoro da prima della comparsa in Europa di *T. absoluta* in quanto è uno dei principali nemici naturali di aleirodidi (ARNÓ ET AL., 2010). Un altro miride dificino, prodotto dalle biofabbriche e posto in commercio, che può essere utilizzato per il controllo del lepidottero, è *N. tenuis*. La densità di rilascio, che si raccomanda per entrambe le specie nelle serre di pomodoro, è di 1-2 individui/ m² (URBANEJA ET AL., 2012). Attualmente ottimi risultati sono stati ottenuti anche tramite l'utilizzo del miride zoofitofago *Dicyphus errans* (Wolff) (**Fig. 19**) soprattutto

su uova del fillominatore in diversi ambienti serricoli del nord-est Italia ((INGEGNO, 2103). Dai recenti rilievi condotti in diverse regioni italiane (LONI ET AL., 2011; FERRACINI ET AL., 2012; ZAPPALÀ ET AL., 2013) si evidenzia che le specie generaliste ed idiobionti di parassitoidi indigeni ectofagi ed endofagi annoverati nel nostro paese appartengono a 13 generi e 6 famiglie (Ichneumonidae, Braconidae, Eulophidae, Elasmidae Pteromalidae e Trichogrammatidae). Diverse specie di Eulofidi, Ichneumonidi e Braconidi si sono prontamente adattate al nuovo ospite, sviluppandosi a carico delle larve. Il parassitoide di uova *Trichogramma achaeae* Nagaraja & Nagarkatti (*Hymenoptera: Trichogrammatidae*) (**Fig. 20**) è stato segnalato su *T. absoluta* (DESNEUX ET AL., 2010), ed è commercializzato da tempo dalle biofabbriche. La sua introduzione negli impianti italiani non è tuttavia così conveniente in quanto si tratta di una specie esotica ancora non presente in natura nel nostro Paese. L'immissione deliberata di un organismo esotico in un ambiente estraneo può infatti causare ripercussioni anche gravi sulla fauna e sulla flora autoctone (URBANEJA ET AL., 2012). Tra le diverse specie caratterizzate in questi anni (GIORGINI ET AL., 2012) quelle appartenenti al genere *Necremnus* (*Hymenoptera: Eulophidae*) come *N. propeartynes* (Walker) (**Fig. 21**) e *N. prope tidius* (Walker) hanno parassitizzato con successo il lepidottero in condizioni di laboratorio ed in serra nel Mediterraneo e in Italia (FERRACINI ET AL., 2012; CALVO ET AL., 2013; MOLLÀ ET AL., 2010, 2010;

GABARRA E ARNÒ, 2010; BELDA ET AL., 2011; DELVARE ET AL., 2011; FERRACINI ET AL., 2012; ZAPPALÀ ET AL., 2012) ma con scarse evidenze in pieno campo (CALVO ET AL., 2013). In Italia ne è stato preso in considerazione l'allevamento massale per effettuare rilasci inoculativi in colture protette dove può essere associato con l'impiego di miridi predatori e trattamenti microbiologici a base di *B. thuringiensis*, come già efficacemente applicato in Spagna (BELDA ET AL., 2011; URBANEJA ET AL., 2012). Prove di laboratorio hanno evidenziato che il parassitoide, grazie anche alla sua elevata attività di *host feeding*, può indurre mortalità a carico delle larve di prima e seconda età di *T. absoluta* superiori al 70% (FERRACINI ET AL., 2012), nonostante i modesti livelli di parassitizzazione rilevati, è stato spontaneamente ritrovato anche in serre di pomodoro sottoposte a trattamenti insetticidi (ZAPPALÀ ET AL., 2012a). Fra i braconidi presenti nel bacino del Mediterraneo, *Bracon nigricans* Szépligeti (**Fig. 22**) è stato ritrovato su *T. absoluta* in tre paesi: Spagna, Giordania e Italia (URBANEJA ET AL., 2012). Questa specie, largamente diffusa nella regione Palearctica, è in grado di svilupparsi a carico di diverse specie di lepidotteri, tra cui il gelechiidae *Phthorimaea operculella* (Zeller), la tignola della patata (ZAPPALÀ ET AL., 2012a). La sua biologia e comportamento, sono stati recentemente descritti in laboratorio e questa specie ha dimostrato di essere un ectoparassitoide gregario di larve mature di *T. absoluta* e di utilizzare le larve dell'ospite sia come substrato di ovideposizione

che come substrato di host-feeding. In una recente ricerca condotta in Toscana *Agathis fuscipennis* (Zetterstedt) (*Hymenoptera: Braconidae*) è stato ritrovato per la prima volta su larve di *T. absoluta*, a ulteriore dimostrazione di come una specie indigena si possa adattare alla comparsa di un fitofago esotico (LONI ET AL., 2011). Buoni risultati di protezione si stanno ottenendo anche con il parassitoide eulofide *Neochrysocharis formosa* (Westwood) (**Fig. 23**) capace di attaccare larve seconde e terze del lepidottero (ZAPPALÀ, 2013). Tra gli agenti entomopatogeni utilizzabili nella lotta contro *T. absoluta*, particolare significato applicativo assume il batterio *Bacillus thuringiensis* Berliner (Firmicutes: Bacillaceae) (GIUSTOLIN ET AL., 2001; NIEDMANN e MEZA-BASSO, 2006; GONZELEZ-CABRERA ET AL., 2011; ZAPPALÀ ET AL., 2012b). Formulazioni insetticide a base di questo agente microbico sono state utilizzate da decenni per controllare insetti, perché sono considerati ecosostenibili, innocui per gli esseri umani e altri vertebrati e altamente compatibili con l'uso di antagonisti naturali (MOLLÀ ET AL., 2011; BIONDI ET AL., 2012a, 2012b, 2013). Come è ben noto, si tratta di batteri sporigeni che agiscono solo per ingestione nei confronti delle larve di diversi fitofagi, principalmente lepidotteri, provocandone la morte nel giro di 3-4 giorni a seguito del disfacimento della parete mesenteriale provocata dal rilascio di specifiche endotossine (Δ -endotossine). Questi insetticidi, non avendo citotropicità ed essendo fotodegradabili, devono essere tempestivamente irrorati

sulla coltura contro i primi stadi larvali del fitofago. Inoltre, considerato il loro meccanismo d'azione selettivo e la loro rapida degradazione, sono consigliati in trattamenti pre-raccolta e per mitigare l'insorgenza di fenomeni di resistenza. In Italia, sono attualmente disponibili formulati commerciali a base delle sottospecie *aizawai* (ceppo GC91) e *kurstaki* (ceppo SA-12) autorizzati per trattamenti su coltura di pomodoro mentre i nuovi ceppi S1, HD1 e KS hanno rilevato risultati promettenti in condizioni di laboratorio (URBANEJA ET AL., 2010; JAMOUSSE ET AL., 2013). Nel caso di *T. absoluta*, queste formulazioni sono state inizialmente raccomandate nel bacino del Mediterraneo solo con modesti livelli di infestazione. Prove condotte in laboratorio e su colture di pomodoro in serra e in pieno campo in Spagna hanno recentemente dimostrato che queste formulazioni sono molto efficaci sulle larve e soprattutto sulle prime età, con una riduzione del danno prossima al 90%. L'efficacia di questi formulati varia in funzione della varietà usata, del ceppo ma anche della concentrazione di spore presente nel prodotto commerciale. Applicazioni a intervalli settimanali ad una concentrazione di 90,4 MUI/L di formulato hanno consentito il contenimento della tignola per tutta la stagione senza alcun trattamento aggiuntivo, anche a livelli elevati d'infestazione; inoltre, i trattamenti sono risultati pienamente compatibili con l'attività di miridi predatori (GONZALEZ-GABRERA ET AL., 2011). Infatti, è stato visto che trattamenti precoci non hanno interferito con l'inse-

diamento di *N. tenuis* che preferisce predare uova di *T. absoluta*; una volta che il miride si riproduce sulla coltura non sarebbero necessari altri trattamenti (URBANEJA ET AL., 2012). In uno studio condotto in Italia, è stata valutata in condizioni di laboratorio e di laboratorio esteso l'efficacia (in termini di tossicità acuta e riduzione di attività di alimentazione) di ceppi di *B. thuringiensis* disponibili in commercio, somministrati sia per ingestione che per contatto a giovani larve di *T. absoluta* (ZAPPALÀ ET AL., 2012b). In condizioni di laboratorio, la formulazione commerciale contenente il ceppo *kurstaki* SA12 è risultata la più efficace in termini di mortalità indotta e riduzione del danno. Questa tendenza è stata evidenziata anche nelle prove condotte in condizioni di laboratorio esteso; i dati ottenuti in queste prove trovano riscontro in studi condotti in Spagna (GONZALEZ-CABRERA ET AL., 2011) e validano l'inserimento di questi preparati commerciali nei programmi IPM anche in Italia. Molto importante fra i microrganismi entomopatogeni è anche il fungo ascomicete *Beauveria bassiana* (Balsamo), che è stato in grado di incrementare l'efficacia di *B. thuringiensis* nella lotta contro il fitofago (TORRES ET AL., 2009). Merita menzione anche il fungo entomopatogeno *Metharrhizium anisopliae* i cui conidi hanno manifestato una promettente patogenicità nei confronti delle uova e neolarve del lepidottero ma nessuna azione sugli adulti (CONTRERAS ET AL., 2014; SHALABY ET AL., 2013). Attualmente si stanno delineando ulteriori e valide alternative

di controllo riguardanti l'utilizzo di biopesticidi microbiologici contenenti isolati del granulovirus di *Phthorimea operculella* (PhopGV). Biosaggi di laboratorio eseguiti utilizzando l'isolato virale JLZ9f opportunamente stabilizzato in formulazioni polverulente contenenti substrati inerti come carbonato di calcio combinati con diversi coadiuvanti come magnesio cloruro e lecitina di soia hanno determinato il 98% di mortalità della popolazione larvale testata (CARPIO ET AL., 2013). Anche alcuni nematodi entomopatogeni appartenenti ai generi *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) sono stati saggiati con successo contro il lepidottero in condizioni di laboratorio (URBANEJA ET AL., 2012). In prove condotte in Spagna con i nematodi entomopatogeni *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Nematoda: Steinernematidae), *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae), sia in condizioni di laboratorio che in campo (BATALLA-CARRERA ET AL., 2010), sono stati osservati livelli di mortalità larvale fino al 100% con tassi di parassitizzazione a carico di larve endofitiche di *T. absoluta* variabili dal 77 al 92%; questi dati hanno dimostrato che questo approccio microbiologico è in grado di proteggere in modo soddisfacente la coltura, riducendo l'infestazione dell'87-95%. In altri saggi di valutazione di efficacia è stato anche osservato che il trattamento con nematodi entomopatogeni non solo ha un'efficacia paragonabile a

quella di un bioinsetticida usato anche in agricoltura biologica, quale lo spinosad, ma si è anche stimato che i costi di trattamento sono stati simili per nematodi e spinosad (JACOBSON e MARTIN, 2011). Altri esperimenti condotti per valutare la compatibilità di questi nematodi con alcuni insetticidi comunemente impiegati nel bacino del Mediterraneo contro *T. absoluta* (flubendiamide, chlorantraniliprole e metaflumizone) hanno evidenziato un maggiore suscettibilità di *H. bacteriophora* mentre *S. feltiae* e *S. carpocapsae* hanno dimostrato di essere tolleranti ai trattamenti chimici facendo registrare tassi di sopravvivenza variabili dall'85,3 al 100% (GARCIA DEL PINO ET AL., 2013). Nel complesso, questi dati indicano che è possibile integrare efficacemente l'impiego di nematodi entomopatogeni con altre strategie di controllo.



Fig. 17 – Adulto di *Macrolophus pygmaeus* (Rambur).



Fig. 18 – Adulto di *Nesidiocoris tenuis* (Reuter).



Fig. 19 – Adulto di *Diciphus errans* (Wolff).



Fig. 20 – Adulto di *Trichogramma acheae* Nagaraja & Nagarkatti .



Fig. 21 – Adulto di *Necremnus propeartynes* (Walker).



Fig. 22 – Adulto di *Bracon nigricans* Szèpligeti.



Fig. 23 – Adulto di *Neochrysocharis formosa* (Weestwood).

§ 3.2.3 – Metodi chimici

Generalità

La lotta chimica ha rappresentato storicamente il principale metodo di contenimento di questo fitofago nell'area di origine (LIETTI ET AL., 2005). I fosfororganici furono utilizzati inizialmente, per poi essere soppiantati dai piretroidi nei primi anni settanta. All'inizio degli anni ottanta la nuova molecola cartap fu impiegata in alternanza con piretroidi e tiociclam manifestando un'elevata efficacia (LIETTI ET AL., 2005). Fra le nuove molecole insetticide sintetizzate a partire dagli anni novanta, abamectina, acilurea, spinosad, tebufenozide hanno manifestato un'elevata efficacia (LIETTI ET AL., 2005). Fra le nuove molecole insetticide sintetizzate a partire dagli anni novanta, abamectina, acilurea, spinosad, tebufenozide e clorfenapyr furono utilizzati con successo contro *T. absoluta*. In alcuni casi la percentuale di mortalità delle larve sottoposte al trattamento raggiunse il 100% (SILVÉRIO ET AL., 2009). Attualmente in Italia contro questa avversità è stato autorizzato l'uso di diverse molecole insetticide quali azadiractina (azadiractina A e B – tetranortriterpenoide) con l'impiego su pomodoro solo in fertirrigazione, preferibilmente già in fase di trapianto della coltura, anche in regime di agricoltura biologica; chlorantraniliprole (noto anche come rynaxypyr – antranilammide) normalmente già disponibile in miscela con il piretroide lambda-cialotrina, ma solo per trattamenti su coltura in pieno campo; emamectina benzoato (gruppo

delle avermectine); indoxacarb (ossadiazine); metaflumizone (semicarbazoni); spinosad (spinosoidi–spinosina A e D con l'autorizzazione dell'uso anche in agricoltura biologica (**Tab. 1**). Allo stato attuale l'applicazione della lotta chimica è in gran parte basata sulla valutazione di soglie d'intervento, che possono essere determinate in diversi modi. Uno dei più diffusi è il conteggio degli esemplari catturati nelle trappole per il monitoraggio (BENVENGA ET AL., 2007); il numero di adulti presenti nelle trappole può poi essere correlato con quello di larve sulla pianta o con la percentuale di prodotto danneggiato, come è già stato effettuato per altri lepidotteri di interesse economico.

La lotta con gli insetticidi si basa su interventi mirati e tempestivi indirizzati agli stadi larvali sia in fase endofitica che in fase vagante. Considerando che per coprire l'intero ciclo di produzione, che può estendersi per gran parte dell'anno si intuisce come sia opportuno per ritardare l'acquisizione delle resistenze, alternare l'insetticida più efficiente con altre sostanze attive. L'abitudine delle larve di avere, in determinate fasi del ciclo, un'attività esterna, le rende suscettibili anche a sostanze non dotate di capacità di penetrazione come i formulati microbiologici. Questi prodotti che presentano una spiccata azione ovo-larvicida vanno anch'essi impiegati in miscela o in rotazione con gli insetticidi di sintesi chimica, per salvaguardare l'attività dei nemici naturali, contenere i livelli di residui nel prodotto e applicare misure antiresistenza.

Fenomeni di resistenza

In America Latina e, oramai in diversi areali del bacino del Mediterraneo, si trovano comunemente popolazioni di campo di *T. absoluta* con livelli elevati di resistenza ad insetticidi fosfororganici e spinosoidi (REYES ET AL., 2012) (gruppo MoA 1B, inibitori e regolatori dell'acetil-colinesterasi), piretroidi di sintesi (gruppo MoA3 B, modulatore dei canali sodici) e benzoiluree (gruppo MoA 15, inibitori della biosintesi della chitina). Recentemente sono stati ottenuti risultati incoraggianti con un nuovo metodo standard di biosaggio per immersione fogliare (leaf-dip-bioassay) validato in tre diversi laboratori europei (NAGREF in Grecia, UC in Italia e UPCT in Spagna) per l'accurata determinazione dell'efficacia dell'effetto insetticida su larve di seconda età di *T. absoluta* mediante metodo IRAC numero 022 utilizzando in modo particolare un insetticida antagonista dei canali sodio (indoxacarb) ed un modulatore dei recettori rianodinici (chlorantraniliprole) (RODITAKIS ET AL., 2013). Scopo principale di questi biosaggi è di fissare il livello iniziale di sensibilità (baseline) del lepidottero ai prodotti larvicidi per poter rilevare eventuali cali di sensibilità nel tempo in un determinato areale (susceptibility shift). Per un controllo efficace e sostenibile di *T. absoluta* è necessario integrare le misure preventive di sanitizzazione con i mezzi agronomico-colturali, semiochimici e chimici disponibili. L'uso degli insetticidi dovrebbe essere fatto solo se necessario e sulla base di soglie d'intervento prestabilite,

alternando gli insetticidi efficaci e i diversi modi di azione disponibili in modo tale da non esporre due generazioni consecutive del fitofago allo stesso modo d'azione. L'alternanza razionale dei MoA si può attuare suddividendo il programma di difesa della solanacea in finestre di intervento. L'IRAC ha esemplificato tale strategia prendendo a modello un ciclo colturale di pomodoro di cinque mesi e supponendo la disponibilità di tre insetticidi con diversa modalità di azione (**Tab. 2**). Gli stessi criteri si possono applicare a cicli colturali del pomodoro di qualsiasi durata.

Attuali sperimentazioni

Le attuali sperimentazioni di lotta chimica sono sempre più tese a valutare l'efficacia e l'eventuale sinergia della combinazione di estratti vegetali con insetticidi di sintesi. È stato infatti recentemente dimostrato che molti estratti vegetali presentano gli stessi effetti dei limonoidi tetraterpenici quali l'azadiractina (TOMÈ ET AL., 2013) nella deterrenza all'ovideposizione e nella inibizione della schiusa delle uova; tra questi estratti si segnalano prodotti a base di *Artemisia cina*, *Citrus aurantium* (LAARIF ET AL., 2013), *Lonchocarpus guaricensis* (CAJIAS ET AL., 2013) e *Dictamnus dasycarpus* ((MIN LU ET AL., 2013) che combinati con alcuni insetticidi come indoxacarb e imidacloprid hanno incrementato e potenziato l'efficienza di trattamento condotta con i soli insetticidi di sintesi (DERBALAH ET AL., 2013;). Oli monoter-

penici commerciali come eugenolo, isoeugenolo e cineolo sono stati testati su diversi stadi larvali del lepidottero e hanno elicito importanti effetti istologici a carico dell'esoscheletro (SAWSAN ET. AL., 2013).

Molecola	Gruppo chimico	Meccanismo d'azione
Emamectina benzoato	Avermectine	attivatori del canale cloro
Metaflumizone	Semicarbazone	inibitori del canale sodio
Lambda cialotrina	Piretroidi	regolatori del canale sodio
Rynaxypyr	Antranilamidi	attivatore dei recettori della rianodina
Spinosad	Spinosine	regolatori dei recettori dell'acetilcolina
Metomil	Carbammati	inibitori dell'acetilcolinesterasi
Indoxacarb	Diazine	inibitori del canale sodio
Azadiractina	derivati terpenici	meccanismo d'azione plurimo
Diflubenzuron	benzoliuree	chitino-inibitori
Clorpirifos	Organofosfati	inibitori dell'acetil- colinesterasi
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-----	distruttore delle membrane intestinali e tossine microbiche correlate
Tebufenozide	Diacil-idrazione	analoghi dell'ecdisone

Tab. 1 – Modalità di azione (MoA) degli insetticidi attualmente disponibili per il controllo di *Tuta absoluta* (SIAN 2013).

1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese
MoA insetticida x	No MoA x	No MoA y	MoA insetticida x	No MoA x
No MoA y	MoA insetticida y	No MoA y	No MoA y	MoA insetticida y
No MoA z	No Moa z	Moa insetticida z	No Moa z	No Moa z

Tab. 2 – Esempio di strategie IRM a finestre d'intervento (nel primo mese si useranno solo insetticidi con MoA x; nel secondo, solo insetticidi con MoA y; nel terzo, solo insetticidi con MoA z; nel quarto potranno tornare ad usarsi quelli con MoA x; nel quinto quelli con MoA y, e così via).

§ 4 – *Prospettive di controllo innovative*

§ 4.1 – **RNA interference: meccanismo molecolare**

Il silenziamento genico post-trascrizionale mediato da dsRNA, definito anche come RNA interference (RNAi), descrive la capacità da parte di una molecola di RNA a doppio filamento, di inibire l'espressione del gene omologo a livello di RNA. In generale RNAi è un meccanismo di controllo molecolare che determina la degradazione di un RNA messaggero target. Le due maggiori classi di RNAi sono gli small interfering RNA o siRNA ed i micro interfering RNA o miRNA. Entrambe richiedono il taglio di lunghi RNA a doppio filamento (dsRNA) in frammenti di 20-30 paia di basi, e sono caratterizzate da 2 nucleotidi (nt) protrusi al terminale 3'. I siRNA sono generati dal taglio di dsRNA precursori ad opera di Dicer, una RNase di tipo III, presente nel citoplasma; mentre la via che conduce ai miRNA inizia nel nucleo, dove i pri-miRNA sono processati da un complesso costituito da Drosha, un'altra RNase III, e DGCR8 per produrre i pre-miRNA di circa 70 nucleotidi. Questi ultimi sono trasportati nel citoplasma dove sono tagliati da Dicer in miRNA maturi. Un filamento dei corti dsRNA così prodotti, chiamato filamento guida, viene incorporato in un complesso multiproteico chiamato "RNA induced silencing complex" (RISC) nel quale le proteine Argonaute inducono l'appaiamento del filamento guida con l'mRNA omologo in modo sequenza-specifico. L'appaiamento tra il filamento dell'siRNA e l'mRNA induce la degradazione di

quest'ultimo (**Fig. 24 a-b**). Nei miRNA invece tale appaiamento porta ad una inibizione della trascrizione. In entrambe i casi si ha l'inibizione della sintesi proteica (**Fig. 24 c**). Gli RNA attivi nell'RNAi possono essere classificati in famiglie:

- *Small interfering RNA o siRNA*: sono corti filamenti di dsRNA di circa 19-23 nt omologhi ad un RNA messaggero. Hanno una distinta polarità, essenziale per lo svolgimento della loro funzione. siRNA efficienti devono possedere un gruppo ossidrilico e 2 nucleotidi protrusi al 3', ed un gruppo fosfato al 5'. I siRNA possono derivare da virus a RNA, elementi trasponibili o essere prodotti sinteticamente.
- *Micro interfering RNA o miRNA*: sono oligomeri di 21 nt che si legano al 3' UTR dell'RNA messaggero specifico inibendone la traduzione. I miRNA derivano da precursori primari endogeni chiamati pri-miRNA che vengono tagliati da un'enzima della famiglia delle RNaseIII chiamata Drosha originando i pre-miRNA di circa 70 nt che vengono trasportati nel citosol dove le Dicer provvedono a tagliarli in miRNA maturi analoghi ai siRNA e processati in modo analogo.
- *Tiny non-coding RNA o tncRNA*: sono simili ai miRNA in quanto anch'essi nel genoma sono localizzati al di fuori delle sequenze codificanti proteiche, sono composti da circa 20-22 nt e mostrano un pattern di espressione temporale ben definito durante lo svi-

luppo, ma si distinguono dai miRNA poiché i precursori non presentano strutture secondarie stem loop come i miRNA. La funzione dei tncRNA non è ancora chiara.

Iniziali studi su estratti embrionali di *D. melanogaster* rivelarono la presenza di un'attività capace di degradare lunghi dsRNA in frammenti di 21-25 nt chiamati small interfering RNA (siRNA) (ZAMORE ET AL., 2000). L'analisi di questi RNA mostrò che erano RNA a doppio filamento contenenti un gruppo fosfato al 5' (ELBASHIR ET AL., 2001). L'enzima che inizia la via dell'RNAi appartiene alla famiglia delle RNaseIII, enzimi che mostrano specificità per i dsRNA. Gli enzimi delle RNaseIII si dividono in tre classi:

- RNaseIII batterici contenenti un singolo dominio catalitico e un dominio di dsRNA binding (dsRBD).
- la famiglia delle Drosha contenente 2 domini catalitici 38
- la terza famiglia contiene, oltre ai due domini catalitici, anche un dominio elicastico ed un motivo PAZ. Membri della terza classe sono stati correlati con il processamento del dsRNA in siRNA all'inizio dell'RNAi (BERNSTEIN ET AL., 2001). Questa famiglia di proteine, chiamata Dicer, possiede dei componenti evolutivamente conservati. Proteine Dicer ottenute da *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, eucarioti superiori e *Neurospora* sp. hanno mostrato la capacità di riconoscere e processare i dsRNA in siRNA di dimensioni caratteristiche della specie. Dicer è tipicamente compo-

sto da un dominio DExH/DEAH RNA elicasi N-terminale, un dominio PAZ, due domini RNaseIII ed un dominio dsRNA-binding (dsRBD). I domini DExH/DEAH sono RNA elicasi responsabili dell'assemblamento dei siRNA nel complesso RISC (FILIPOWICZ ET AL., 2005; CARMELL ET AL., 2002; Meister e Tuschl, 2004). Il dominio PAZ (piwi argonaute zwiille), presente in Dicer, è costituito da circa 130 residui amminoacidici e può legare sia il 3' dei ssRNA oppure i 2 nt protrusi al 3' dei dsRNA. Il dominio dsRBD è presente in molte proteine coinvolte nella trascrizione, nel processamento dell'RNA, localizzazione e traduzione degli mRNA. Questo dominio riconosce e lega i dsRNA aspecificamente, agevolando probabilmente il legame del dsRNA con il dominio PAZ (HANNON, 2002). Funzionalmente i due domini RNaseIII di Dicer si associano a formare un pseudodimero intramolecolare, creando così un sito attivo in cui ogni dominio idrolizza un singolo filamento dell'RNA duplex, generando un nuovo terminale. Il prodotto di Dicer è un RNA 21 nucleotidi. Il numero di nucleotidi del siRNA deriva dalla distanza tra il terminale neoformato sull'RNA duplex che legherà PAZ, ed il sito attivo dell'RNaseIII. Funzionalmente i due domini RNaseIII di Dicer si associano a formare un pseudodimero intramolecolare, creando così un sito attivo in cui ogni dominio idrolizza un singolo filamento dell'RNA duplex, generando un nuovo terminale. Il prodotto di Dicer è un RNA 21 nucleotidi.

tidi. Il numero di nucleotidi del siRNA deriva dalla distanza tra il terminale neoformato sull'RNA duplex che legherà PAZ, ed il sito attivo dell'RNaseIII (Figura 4). Il processo di RNAi viene portato a termine da RISC che riconosce e degrada l'mRNA target.

Le proteine chiave del RISC sono le proteine Argonaute, inizialmente identificate in mutanti di *A. thaliana* le cui foglie portavano un'alterata morfologia. Le Argonaute costituiscono una famiglia evolutivamente conservata presente in molti eucarioti e sono proteine ubiquitarie in animali e piante, funghi, protisti e archea. La famiglia di Ago eucariotiche sono classificate in 3 classi principali: il gruppo più grande è chiamato Argonaute (ci si riferisce a questa classe come Ago), e di questo gruppo fanno parte le Ago-1 di *Arabidopsis*. A livello cellulare le Ago si localizzano principalmente nel citoplasma e nel nucleo. Il secondo gruppo è Piwi (P-element Induced Wimpy Testis), molto abbondanti in cellule della linea germinale dove agiscono per silenziare i trasposoni. Nel genoma umano ci sono 4 copie sia di Ago che di Piwi. La terza classe comprende geni Argonaute specifici dei nematodi, chiamati WAGO. Nel gruppo Ago i siRNA sono prodotti da Dicer nel citoplasma, mentre nel gruppo Piwi il filamento guida si forma attraverso un meccanismo nel quale l'RNA target è tagliato da una proteina Piwi diventando il filamento guida di un'altra Piwi. Questa cascata è generalmente iniziata da piRNA (piwi interacting RNA) ereditati per via materna. Le Argonaute della terza classe ottengono il

filamento guida mediante il clivaggio di lunghi dsRNA esogeni o endogeni ad opera di Dicer. Strutturalmente le proteine Argonaute sono composte da 4 domini: un dominio Nterminale, un dominio PAZ, un dominio centrale Mid, ed il dominio PIWI. I domini N-terminale, Mid e PAZ si dispongono a formare un incavo in cui si trova il dominio PIWI. Il dominio PIWI si ripiega in modo simile alle RNaseH, un endonucleasi che taglia l'RNA ibridi RNA/DNA. Il lobo N-terminale contiene un dominio Paz, il quale lega il 3' finale del DNA guida, mentre il lobo C-terminale contiene il dominio centrale Mid che lega il 5' fosfato del DNA guida e il dominio PIWI, il cui gruppo carbossiterminale interagisce con il gruppo fosfato al 5' del filamento guida. Il 5' fosfato del DNA guida è tenuto in una tasca tra il dominio Mid e Piwi, i quali agiscono come punto di ancoraggio per il DNA nella proteina. Le 2 basi protruse al 3' sono invece legate al dominio PAZ mentre il resto della molecola è relativamente libera, in modo da accomodarsi nell'incavo dell'Argonaute, permettendo così la sistemazione anche di filamenti di differenti lunghezze. Dopo il legame con l'RNA target, i domini di legame dell'Argonaute si aprono in modo da far appoggiare il filamento target ed il filamento guida. I due filamenti sono uniti nei nucleotidi da 2 a 8 mediante appaiamento di Watson-Crick. Le basi da 2 a 6 del filamento guida si trovano esposte nella parte esterna del complesso e questo è molto importante in quanto sono le responsabili del riconoscimento della sequenza target. Questa porzione del fila-

mento guida viene chiamata “seed region”. Tale modello spiegherebbe anche l'elevata efficienza con cui RISC localizza i messaggeri target. Il riconoscimento dell'mRNA target da parte del complesso RISC-filamento guida è l'idrolisi del mRNA, o “slicing”.

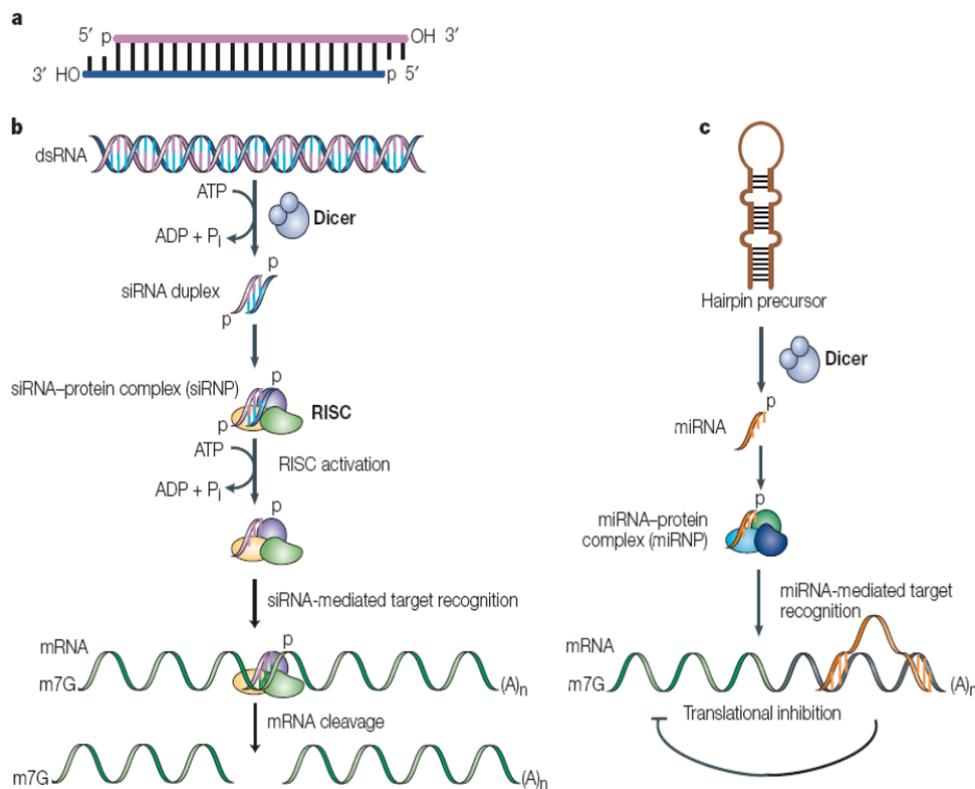


Fig. 24 – a- Small interfering (si)RNA. Le caratteristiche molecolari dei siRNA comprendono: il terminale 5' fosforilato, una regione duplex di 19 nucleotidi (nt), e 2 nt protrusi e non fosforilati al terminale 3' che sono caratteristici dei prodotti di taglio delle RNaseIII; **b- Meccanismo di silenziamento mediato da siRNA.** I lunghi double strand (ds)RNA sono tagliati ad opera di un membro della famiglia delle RNaseIII, Dicer, in siRNA in modo ATP dipendente. Questi siRNA sono incorporati nell'RNA-inducing silencing complex (RISC). Sebbene la formazione del complesso RISC-siRNA sia ATP indipendente, l'apertura del siRNA duplex richiede ATP. Una volta svolto, il filamento antisense guida RISC sull'RNA messaggero con sequenza complementare, portando al taglio endonucleolitico dell'mRNA target.; **c- Meccanismo di silenziamento mediato da micro (mi)RNA.** Sebbene originariamente sia stato identificato sulla base della sua capacità di processare lunghi dsRNA, Dicer può tagliare anche RNA hairpin di circa 70 nt, precursori dei miRNA.

Le due caratteristiche necessarie per lo slicing sono la presenza di proteine Ago cataliticamente attive, ed un appaiamento quasi perfetto tra filamento guida e RNA target, per assicurare che solo il messaggero specifico sia degradato. L'attività RNasica del dominio Piwi di Argonaute catalizza la reazione di taglio dell'RNA target mediante idrolisi, e il conseguente silenziamento dell'espressione della proteina **(Fig. 25)**.

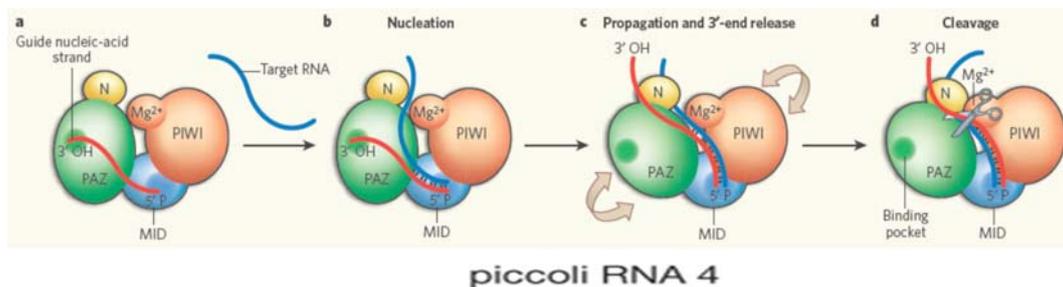


Fig. 25 – **a.** –Le proteine Argonaute possiedono quattro domini: il dominio amminoterminale (N), PA, MID e PIWI. Ogni proteina Argonaute lega una corta molecola di RNA (in rosso), la quale funziona da template per il legame con l'RNA target (in blu). Il terminale 5' fosfato (5'P) dell'RNA è ancorato al dominio MID, mentre il terminale 3' ossidrilico (3'OH) si trova ancorato al dominio PAZ. **b.** – Studi strutturali di Wang e colleghi mostrano che il complesso Argonaute lega l'RNA target, iniziando con la formazione di una doppia elica derivante dall'appaiamento del filamento guida con l'RNA target. **c.** – Il movimento necessario di Argonaute permette l'estensione delle doppia elica mentre il l'RNA guida è ancorato in entrambe le estremità. Il 3'OH del filamento guida è rilasciato dal dominio PAZ permettendo la rotazione. **d.** – Tale cambio conformazionale favorisce l'esatto posizionamento del sito di taglio dell'RNA target in prossimità del dominio PIWI. Gli ioni magnesio facilitano la precisionedi taglio nell'RNA target.

§ 4.2 – Meccanismi di assorbimento cellulare del dsRNA

WHANGBO e HUNTER (2008) hanno definito differenti meccanismi d'assorbimento del dsRNA, delineando due tipi di RNAi: cellula-indipendente (*cell-autonomous RNAi*) e cellula-dipendente (*noncell-autonomous RNAi*). HUVENNE e SMAGGHE (2010) hanno recentemente rivisto la letteratura relativa a questi due meccanismi e ai tipi di diffusione del dsRNA negli insetti (**Fig. 26**).

§ 4.2.1 – Il meccanismo di assorbimento mediato da recettori trans-membrana

Diversi studi suggeriscono che i geni *sid-1* e *sid-2*, che nel nematode *Caenorhabditis elegans* codificano per proteine trans-membrana che mediano rispettivamente l'effetto sistemico dell'RNAi (FEINBERG e HUNTER, 2003) e l'RNAi di tipo ambientale (Winston *et al.*, 2007), non sono essenziali perché in alcuni insetti abbia luogo l'assorbimento del dsRNA e l'RNAi sistemico (ROIGNANT ET AL., 2003; GORDON e WATERHOUSE, 2007; MILLER ET AL., 2008, Feinberg e HUNTER, 2003; PARRISH ET AL., 2000; TOMOYASU ET AL., 2008). Quasi tutte le specie di insetti posseggono ortologhi di *sid-1* (fatta eccezione per i ditteri) ma non di *sid-2*. Omologhi del gene *sid-1* sono stati identificati in alcuni insetti come *Tribolium castaneum*, *Bombix mori* (Tomoyasu *et al.*, 2008) e *Apis mellifera* (Aronstein *et al.*, 2006), ma non nel genoma di *Drosophila* (WINSTON ET AL., 2007). Questo suggerisce che negli insetti esiste

un sistema di assorbimento del dsRNA alternativo, considerato che l'RNAi sistemico è molto forte in *T. castaneum* (TOMOYASU ET AL., 2008), anche dopo il silenziamento dei tre omologhi di *sid-1* individuati in questa specie. L'ipotesi è ulteriormente supportata dal fatto che, nonostante la presenza di tre omologhi di *sid-1*, in *B. mori* l'RNAi sistemico è un evento raro, e dal fatto che esso sia stato invece osservato in alcune specie di zanzara (ZHU ET AL., 2003; BOISSON ET AL., 2006; VOLZ ET AL., 2006; TOMOYASU ET AL., 2008).

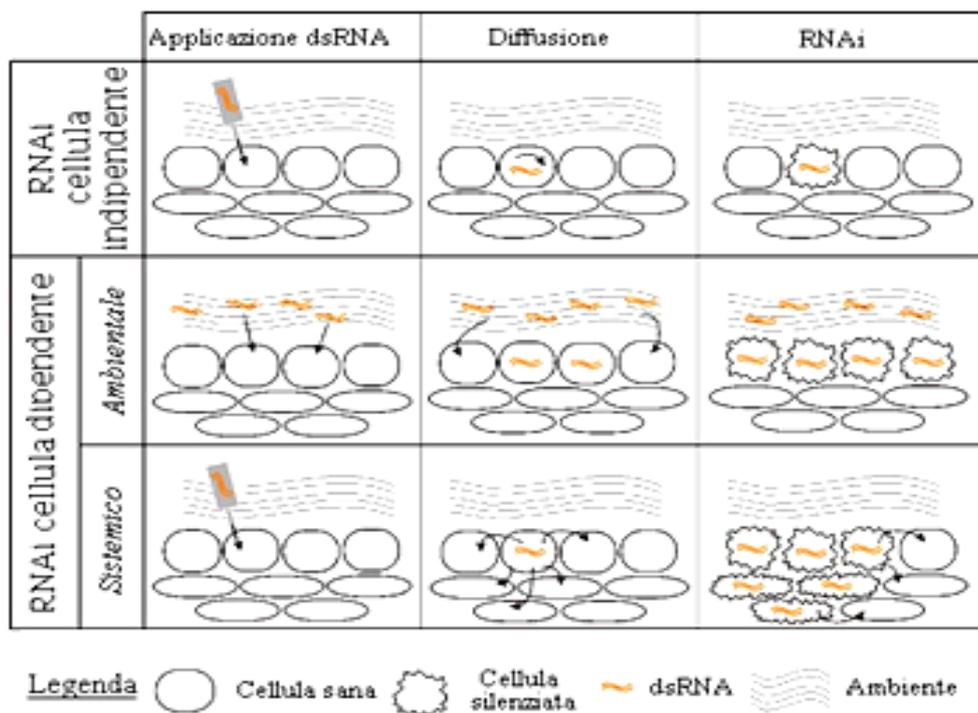


Fig. 26 – Rappresentazione schematica di diversi tipi di RNAi, spiegati attraverso l'effetto di silenziamento di un gene necessario per la vitalità cellulare. Nell'RNAi cellula-indipendente il silenziamento genico è limitato alla cellula in cui il dsRNA è applicato o espresso. Nel caso dell'RNAi ambientale, il dsRNA viene assorbito dall'ambiente cellulare, ed il silenziamento genico è osservato in tutte le cellule che possono assorbire dsRNA. Questo può avvenire in organismi unicellulari e pluricellulari. L'RNAi sistemico include tutti i processi in cui il segnale di silenziamento è trasportato dalla cellula nella quale il dsRNA è espresso o applicato ad altri tessuti, nei quali avverrà il silenziamento (HUVENNE e SMAGGHE, 2010).

§ 4.2.2 – **Il meccanismo di assorbimento mediato da endocitosi**

In *D. melanogaster* non sono stati individuati ortologi dei geni *sid*, tuttavia è presente un meccanismo RNAi cellula indipendente e gli emociti sono in grado di rispondere all'RNAi ambientale (ROIGNANT ET AL., 2003; GORDON e WATERHOUSE, 2007; MILLER ET AL., 2008). Recenti studi hanno evidenziato che, in colture di cellule S2 (Schneider 2) di *Drosophila*, l'assorbimento del dsRNA ha luogo grazie ad endocitosi mediata da recettori (SALEH ET AL., 2006; ULVILA ET AL., 2006), in quanto l'inibizione farmacologica dell'endocitosi inibisce anche l'effetto dell'RNAi. In totale sono stati individuati 23 geni coinvolti nell'assorbimento e nel processamento del dsRNA, tutti coinvolti, direttamente od indirettamente, nel pathway endocitico (Saleh *et al.*, 2006). È stato inoltre dimostrato che l'endocitosi mediata da recettori è un meccanismo di assorbimento del dsRNA necessario anche in *C. elegans*, esso è pertanto diffuso ed è evolutivamente ben conservato (SALEH ET AL., 2006). Tuttavia non è ancora chiaro come il dsRNA possa essere riconosciuto e localizzato in maniera adeguata nella cellula dall'endocitosi, sicuramente in tale processo sono coinvolti una combinazione di recettori "scavenger" (SALEH ET AL., 2006). È già noto, infatti, che tali recettori giocano un ruolo importante nella fagocitosi di batteri patogeni (ERTURK-HASDEMIR e SILVERMAN, 2005; KOCKS ET AL., 2005). Due recettori scavenger di *D. melanogaster*, SR-CI e Eater, sono re-

sposabili di più del 90% dell'assorbimento del dsRNA da parte delle cellule S2 (ULVILA ET AL., 2006). Entrambi giocano un ruolo fondamentale nella fagocitosi mediata da recettori dei batteri (PEARSON ET AL., 1995; RAMET ET AL., 2001; KOCKS ET AL., 2005). Non si può comunque escludere che il dsRNA abbia trovato un modo di deviare il normale pathway di trasporto delle vescicole e di entrare nel citoplasma della cellula (SALEH ET AL., 2006).

§ 4.3 – **Considerazioni sull'uso dell'RNAi negli insetti**

§ 4.3.1 – **Preparazione dei costrutti (dsRNAs) per l'interferenza**

dsRNAs sintetizzati in vitro

Nella maggior parte degli studi entomologici di laboratorio, il dsRNA utilizzato è prodotto utilizzando kit di trascrizione *in vitro* commerciali. Il principio generale è il seguente. Il template per la trascrizione *in vitro* è preparato tramite PCR, utilizzando primers gene-specifici con la sequenza promotrice T7 alla terminazione 5'. La reazione viene incubata alcune ore (da 4 a 8) a 37°C con la polimerasi T7, trattata con DNAsi e purificata.

dsRNAs prodotti in batteri

Il dsRNA può essere sintetizzato nei batteri oltre che *in vitro*. Colonie di *Escherichia coli* trasformate per esprimere molecole di

dsRNA attive nei confronti di geni di *C. elegans* sono state utilizzate per ottenere la soppressione dell'espressione del gene corrispondente (TIMMONS e FIRE, 1998). Da allora, l'RNAi mediata da batteri è stato applicato con successo ad altri organismi, tra cui la planaria *Schmidtea mediterranea* (NEWMARK ET AL., 2003) e il lepidottero *Spodoptera exigua* (TIAN ET AL., 2009). Un vantaggio potenziale di questo approccio è che il dsRNA prodotto continuamente nei batteri è più stabile del dsRNA trascritto *in vitro* quando viene addizionato ad una dieta artificiale (WHYARD ET AL., 2009). Inoltre, l'RNAi mediata da batteri è molto utile nello screening su ampia scala di nuovi geni target. Grande interesse suscita anche la produzione di molecole di dsRNAs nei batteri simbiotici di insetti. Secondo una stima recente, il 20% degli insetti sono associati in maniera obbligata a microrganismi simbiotici, dei quali utilizzano i prodotti (FELDHAAR e GROSS, 2009). Questa simbiosi mutualistica obbligata offre l'opportunità di ingegnerizzare il batterio simbiote per la produzione di molecole di dsRNA che abbiano come bersaglio geni fondamentali per lo sviluppo dell'ospite.

dsRNAs espressi in pianta

Per poter applicare la strategia dell'RNAi al controllo dei fitofagi in campo, la produzione di dsRNA in pianta offre notevoli potenzialità. Le piante possono produrre e accumulare considerevoli quantità di dsRNA, a costi molto bassi, attraverso le più svariate strategie di

espressione, sia utilizzando promotori specifici, sia direzionando l'espressione in cloroplasto (MCBRIDE ET AL., 1995). Quest'ultima strategia offre il vantaggio aggiuntivo dato dal fatto che i tratti codificati da cloroplasto sono, nella maggior parte delle piante, prevalentemente a trasmissione materna, e, pertanto, la probabilità che il transgene sia trasmesso a piante non transgeniche è più bassa. Con il raggiungimento di una trasformazione stabile del genoma dei cloroplasti nelle piante verdi (DUFOURMANTEL ET AL., 2004; HOU ET AL., 2003; KUMAR ET AL., 2004; LIU ET AL., 2010; OKUMURA ET AL., 2006; RUF ET AL., 2001; SIDOROV ET AL., 1999), questa tecnica presenterebbe un enorme potenziale per la protezione delle colture contro i parassiti.

Produzione di dsRNAs attraverso il sistema VIGS

L'introduzione di geni virali nelle piante può condurre all'ottenimento di piante transgeniche resistenti al virus anche senza la produzione di proteine transgeniche (LINDBO e DOUGHERTY, 1992). Il fattore alla base di questa resistenza ai virus è la degradazione sequenza-specifica dell'RNA (WATERHOUSE ET AL., 1998). Sulla base di questo principio, i ricercatori hanno sfruttato il silenziamento genico indotto da virus (VIGS), basato sul meccanismo del sistema di difesa antivirale delle piante, come un potente strumento di genetica inversa nei vegetali. Vettori contenenti la sequenza del genoma di un virus combinato con geni dell'ospite sono state inoculate in pianta, inducendo la perdita di

funzione dei geni corrispondenti attraverso la produzione di dsRNA (PURKAYASTHA e DASGUPTA, 2009). Può essere possibile imitare l'attività VIGS in pianta sostituendo i geni dell'ospite con i geni dei parassiti.

§ 4.4 – **Modalità di somministrazione del dsRNA negli insetti**

Il meccanismo di diffusione del dsRNA negli insetti e la scelta della modalità di somministrazione influenzano fortemente l'efficienza del silenziamento genico e le sue potenzialità come agente di controllo dei fitofagi (TERENIUS ET AL., 2011). Gli insetti possono assumere autonomamente il dsRNA diretto verso uno specifico gene target attraverso l'alimentazione; perché il silenziamento abbia luogo, il dsRNA deve essere assorbito dalle cellule del mesentero (RNAi ambientale), mentre, se il gene target è espresso in un tessuto diverso dall'intestino, il segnale di silenziamento deve diffondersi al tessuto bersaglio (RNAi sistemico) (HUVENNE e SMAGGHE, 2010). Il mesentero è potenzialmente la struttura migliore per l'assorbimento del dsRNA, in quanto dotato di microvilli ricchi di canali ed apparati coinvolti in fenomeni di assorbimento ed endocitosi (Hakim *et al.*, 2010). Tuttavia, per quanto concerne la ricerca di base in campo entomologico, esistono diverse tecniche per somministrare il dsRNA agli insetti. Tra i possibili metodi di somministrazione vanno anche annoverate l'iniezione, l'immersione, le infezioni virali e l'alimentazione, anche attraverso piante transgeniche (GUANG ET AL., 2011).

§ 4.4.1 – **Microiniezioni**

Con il termine “microiniezione” si vuole indicare l’iniezione diretta del dsRNA nella cavità emocelica dell’insetto. Tale tipo di somministrazione è il più efficiente per l’RNAi di tipo sistemico. Con questo sistema, il successo maggiore nel silenziamento genico è stato ottenuto con l’utilizzo di molecole di dsRNA corte (Siomi e Siomi, 2009). Iniezioni di dsRNA sono state condotte con successo in *D. melanogaster* (KENNERDELL e CARTHEW, 2000) e in *T. castaneum* (BROWN ET AL., 1999; TOMOYASU e DENELL, 2004; TOMOYASU ET AL., 2008, BUCHER ET AL., 2002), nonché in studi di analisi comparativa della funzione di geni ortologhi in embrioni di insetti evolutivamente distanti (BROWN ET AL., 1999, HUGHES e KAUFMAN, 2000). Uno studio effettuato su *Plodia interpunctella* riporta la possibilità di iniettare il dsRNA anche nelle uova (FABRICK ET AL., 2004). Attualmente, la somministrazione del dsRNA attraverso microiniezione è un potente mezzo per lo studio della funzione genica in diverse specie d’insetti (ALJAMALI ET AL., 2002; BOWMAN ET AL., 1997; ISOE ET AL., 2009; JAUBERT-POSSAMAI *et al.*, 2007; LIU ET AL., 2010a, b; MALESZKA ET AL., 2007; NARASIMHAN ET AL., 2004; VALLIER ET AL., 2009). Il vantaggio dell’iniezione del dsRNA è l’elevata efficienza di inibizione dell’espressione genica. Il metodo presenta, tuttavia, alcune limitazioni, quali i costi relativamente elevati della sintesi *in vitro* e dello stoccaggio del dsRNA ed il fatto che l’iniezione, in sè, genera un inevitabile effetto sugli in-

setti di stimolazione del sistema immunitario. In ogni caso, a livello pratico, il metodo non è applicabile al controllo degli insetti.

§ 4.4.2 – **Immersione**

La tecnica dell'immersione in soluzioni contenenti dsRNA si è rivelata efficace nell'inibire l'espressione genica in embrioni e cellule di *D. melanogaster* (EATON ET AL., 2002; MARCH AND BENTLEY, 2007). L'efficienza del metodo è paragonabile a quella ottenuta con la microiniezione, ma richiede una concentrazione inferiore di dsRNA. L'immersione è però utilizzabile solo per alcune cellule ed alcuni tessuti di insetti, ed esclusivamente in stadi di sviluppo che possono assorbire il dsRNA da una soluzione.

§ 4.4.3 – **Alimentazione**

Comparato con altri metodi di somministrazione del dsRNA, questo risulta sicuramente il più interessante, in quanto non solo costituisce il metodo più naturale per somministrare il dsRNA all'insetto, ma permette di farlo senza causare danni. Il metodo risulta anche conveniente e di facile manipolazione (CHEN ET AL., 2010) e permette di applicare l'RNAi ad un ampio numero di individui, nonché a insetti di ridotte dimensioni, per i quali è difficile utilizzare il metodo della microiniezione. Anche se il metodo non risulta applicabile per quegli insetti che hanno abitudini alimentari specifiche, esso è in generale

applicabile a diverse specie di insetti (HUVENNE e SMAGGHE, 2010). I primi studi effettuati addizionando il dsRNA su dieta artificiale sono stati I primi studi effettuati addizionando il dsRNA su dieta artificiale sono stati scoraggianti; ad esempio in *Spodoptera litura* l'iniezione di dsRNA silenziava il gene *slapn*, che codificava per un aminopeptidasi intestinale, ma alimentando le larve con dsRNA non si otteneva RNAi (RAJAGOPAL ET AL., 2002). Fortunatamente, altri studi mostrano che la somministrazione del dsRNA attraverso l'alimentazione si può utilizzare con successo per studiare l'RNAi negli insetti. Il metodo si è dimostrato efficace in larve di *Epiphyas postvittana* (TURNER ET AL., 2006), *Rhodnius prolixus* (Araujo et al., 2006), nel coleottero *Phyllotreta striolata*, nella termite *Reticulitermes flavine* (ZHOU ET AL., 2008) e nel lepidottero *Plutella xylostella* (BAUTISTA ET AL., 2009). In letteratura non vi sono dati relativi alla somministrazione di dsRNAs con l'alimentazione in *T. castaneum*, probabilmente a causa del successo degli esperimenti di iniezione. Interessante è la presenza di cinque esperimenti di successo con diverse specie di lepidotteri, in quanto si presume che sia molto difficile effettuare l'RNAi in questo ordine (TERENIUS ET AL., 2011). Per contro, in alcuni esperimenti di alimentazione si riesce ad ottenere l'RNAi ambientale ma non RNAi sistemico (WALSHE ET AL., 2009) e in altri esperimenti con l'iniezione del dsRNA si è riuscito ad ottenere il silenziamento del gene target che non si era riuscito a silenziare con esperimenti di alimentazione

(Rajagopal *et al.*, 2002). Quanto detto dimostra che il mancato silenziamento osservato somministrando il dsRNA attraverso l'alimentazione è dovuto a fattori dipendenti dal meccanismo di assorbimento di diversi tipi di cellule, ma non all'insensibilità del bersaglio. Una modifica dei protocolli di alimentazione normalmente utilizzati consiste nell'ottenimento di molecole di dsRNAs incapsulate nei lipidi. È stato dimostrato che la coniugazione con molecole lipofile (colesterolo, acidi biliari e acidi grassi a catena lunga) aumenta l'assorbimento dei siRNAs nelle cellule, migliorando il silenziamento genico nei topi (WOLFRUM ET AL., 2007). L'efficienza e l'assorbimento selettivo di questi lipidi associati ai siRNAs dipende dall'interazione tra le particelle di lipoproteine, i recettori di lipoproteine e le proteine transmembrana. Whyard e colleghi (2009) hanno dimostrato che molecole di dsRNA integrate in liposomi innescano in larve di *D. melanogaster* una risposta RNAi più efficiente. Un'altra strategia per aumentare l'efficienza dell'assorbimento del dsRNA potrebbe essere la sua co-espressione con proteine "effettrici" come proteasi e chitinasi che potrebbero favorirne il passaggio dal mesentero all'emolinfa (PENNACCHIO ET AL., 2012). Un approccio differente potrebbe essere quello di legare il dsRNA a molecole che riescono a attraversare la matrice peritrofica (MP) con maggiore facilità, e che fungerebbero così da trasportatori, come le lectine vegetali (FITCHES ET AL, 2001; OHIZUMI ET AL., 2009). I dsRNAs incorporati nelle diete artificiali sono stati principalmente

sintetizzati *in vitro*. Un'alternativa potrebbe essere produrre dsRNA derivati da geni di insetti in un organismo ingegnerizzato, usando la strategia dell'RNAi mediata da batteri esprimenti il dsRNA ed addizionati alla dieta artificiale (TIMMONS ET AL., 2001, TIMMONS e FIRE, 1998; NEWMARK ET AL., 2003, TIAN ET AL., 2009). Il problema principale del metodo di somministrazione descritto è il bisogno di grandi quantità di dsRNA perchè il silenziamento non risulti incompleto (CHEN ET AL., 2010). Inoltre, bisogna considerare che differenti specie di insetti presentano una sensibilità differente alle molecole di dsRNA somministrate oralmente (WALSHE ET AL., 2009). Un altro svantaggio del metodo è la difficoltà di misurare o controllare precisamente la quantità di dsRNA ingerito o comunque assorbito nel mesentero. Un altro metodo di somministrare dsRNA attraverso l'alimentazione è l'uso di piante transgeniche che producono dsRNA. Queste ultime presentano il grande vantaggio di generare in maniera continua e stabile il dsRNA. Recentemente sono stati effettuati studi in cui sono state create piante transgeniche in grado di produrre dsRNA diretto contro specifici geni di insetti. Queste piante hanno mostrato un incremento della resistenza a fitofagi economicamente importanti come il lepidottero *Helicoverpa armigera* (MAO ET AL., 2007) ed il coleottero *Diabrotica virgifera virgifera* (BAUM ET AL., 2007). Perché tale strategia possa avere successo è necessaria l'identificazione di specifici target (effettuare lo screening preventivo di librerie di cDNA e

individuando geni fondamentali per lo sviluppo e la sopravvivenza dell'insetto) e la somministrazione di adeguate quantità di dsRNA. Inoltre, è importante considerare la specificità dell'RNAi quando si vuole utilizzare tale strategia in applicazioni pratiche, anche per minimizzare l'effetto insetticida sugli insetti non-bersaglio.

§ 4.4.4 – Sviluppo di insetti transgenici

Il vantaggio di utilizzare insetti transgenici che esprimono il dsRNA è l'ottenimento di un'espressione ereditabile, stabile e continua. La tecnica è stata proposta per aiutare sia a ridurre la popolazione attraverso l'introduzione di insetti sterili, sia per sostituire una popolazione. I test sono stati condotti su diverse specie con risultati promettenti ma, come affermato da SCOLARI ET AL., 2011, vi è la necessità di comprendere le influenze ambientali e genetiche quando si valuta il potenziale uso di tali organismi transgenici. Il metodo transgenico è utilizzato per studi funzionali in *D. melanogaster* (WAKIYAMA ET AL., 2005; SANDRELLI ET AL., 2007), *Aedes aegypti* (TRAVANTY ET AL., 2004) ed in *B. mori* (SANDRELLI ET AL., 2007; DAI ET AL., 2008; KANGI-NAKUDRU ET AL., 2007).

§ 4.4.5. – RNAi mediata da virus

L'RNAi mediato da virus è ottenuto attraverso l'infezione dell'ospite con virus che trasportano dsRNA, formati durante la replica-

zione virale, rivolti verso un gene di interesse nell'insetto ospite. La tecnica è stata utilizzata in *B. mori* (UHLIROVA ET AL., 2003). Gli studi condotti utilizzando l'RNAi mediata da virus sono ancora rari, nonostante le ottime potenzialità del metodo che sfrutta l'infezione e la capacità del virus di diffondersi rapidamente nell'ospite.

§ 4.5 – **Fattori che influenzano l'RNAi negli insetti**

Basandosi sulla letteratura esistente, HUEVENNE e SMAGGHE (2010) hanno definito cinque fattori importanti che influenzano in maniera determinante l'effetto di silenziamento e di conseguenza l'efficienza dell'RNAi come tecnica per il controllo degli insetti fitofagi:

La concentrazione del dsRNA: per ogni gene target e per ogni organismo occorre determinare una concentrazione ottimale per ottenere l'effetto di silenziamento. Il superamento di questa concentrazione ottimale non necessariamente fa ottenere un silenziamento maggiore (MEYERING-VOS e MULLER, 2007; SHAKESBY ET AL., 2009).

La sequenza nucleotidica utilizzata, che potrebbe determinare possibili effetti off-target nell'organismo bersaglio, ma anche effetti di silenziamento in altri insetti.

La lunghezza del frammento di dsRNA: è un fattore determinante per l'assorbimento e l'efficienza del silenziamento (MAO ET AL., 2007; SALEH ET AL., 2006).

Persistenza dell'effetto di silenziamento: l'effetto del silenziamento

mento potrebbe essere transitorio (SHAKESBY ET AL., 2009; TURNER ET AL., 2006) in funzione del tasso di turnover della proteina bersaglio.

Stadio dell'organismo bersaglio: anche se gli stadi più avanzati sono più semplici da manipolare per la somministrazione del dsRNA, gli stadi più giovani spesso mostrano maggiore sensibilità all'RNAi (ARAUJO ET AL., 2006; GRIEBLER ET AL., 2008).

§ 4.6 – **Controllo dei fitofagi mediato da RNAi: presupposti biotecnologici e potenzialità applicative in entomologia ed in agricoltura**

In *campo entomologico* il silenziamento genico mediato da dsRNAs ha rivoluzionato lo studio della funzione genica nell'insetto modello *D. melanogaster* (KENNERDELL e CARTHEW, 1998, 2000; ROIGNANT ET AL., 2003; BISCHOFF ET AL., 2006; MILLER ET AL., 2008), in *Tribolium castaneum* (TOMOYASU e DENELL, 2004; FUJITA ET AL., 2006; ARAKANE ET AL., 2008; KONOPOVA e JINDRA, 2008; MINAKUCHI ET AL., 2009; PARTHASARATHY E PALLI, 2009) e in *Bombyx mori* (QUAN ET AL., 2002; OHNISHI ET AL., 2006; HOSSAIN ET AL., 2008). Il silenziamento genico mediato da RNAi è stato riportato in diversi ordini di insetti, tra cui Ditteri (MISQUITTA e PATERSON, 1999; DZITOEVA ET AL., 2001), Coleotteri (TOMOYASU e DENELL, 2004; BUCHER ET AL., 2002; TOMOYASU ET AL., 2008), Imenotteri (AMDAM, ET AL., 2003), Ortotteri (DONG e FRIEDRICH, 2005), Blattodei (CRUZ ET AL., 2006; MARTIN ET

AL., 2006), Lepidotteri (RAJAGOPAL ET AL., 2002; TURNER ET AL., 2006) e Emitteri (MUTTI ET AL., 2006; JAUBERT-POSSAMAI ET AL., 2007; ARAUJO, ET AL. 2006). *In_agricoltura*, e, più in particolare, nell'ambito delle biotecnologie per il controllo degli insetti dannosi alle colture, l'RNAi mostra enormi potenzialità legate all'elevata specificità di azione che la caratterizza (BOROVSKY, 2005; GORDON e WATERHOUSE, 2007; PRICE e GATEHOUSE, 2008). Ovviamente, per ottenere un efficiente sistema di controllo degli insetti, occorre che essi siano in grado di assumere il dsRNA con il cibo e di assorbirlo a livello intestinale. Pertanto, lo sviluppo di efficienti strategie di somministrazione orale del dsRNA e la comprensione dei meccanismi di assorbimento di questa macromolecola sono un prerequisito fondamentale per l'uso dell'RNAi nella difesa delle piante. Questo innovativo approccio biotecnologico permette di sfruttare una vasta gamma di potenziali bersagli per la soppressione dell'espressione genica negli insetti e potrebbe offrire un'alternativa all'uso di piante transgeniche esprimenti la tossina bt del *Bacillus thuringiensis*. L'RNAi potrebbe anche essere utilizzato per integrare le strategie di controllo già esistenti. Per esempio, potrebbe essere utilizzato per ridurre il rischio di insorgenza di resistenza alla tossina Bt, sia interferendo con l'espressione di geni coinvolti in tali risposte, sia attraverso il piramidaggio di costrutti in grado di colpire più bersagli molecolari (XUE-YI XUE ET AL., 2012; BAUM ET AL., 2007; MAO ET AL., 2007). Ottenere piante in grado di esprime-

re una combinazione di dsRNAs altamente efficaci contro gli insetti bersaglio offre ampie potenzialità applicative che devono essere, però, attentamente valutate anche dal punto di vista del rischio. Uno dei problemi posti dalle tecnologie basate sull'RNAi è l'effetto indesiderato che un dsRNA può avere su geni "off-target" che condividono parti di sequenza con il gene bersaglio. Effetti off-target possono verificarsi sia per diversi geni all'interno delle specie o tra specie diverse. Tuttavia, l'attenta scelta di sequenze geniche poco conservate limita notevolmente questa possibilità. Alcuni ricercatori, per limitare tale rischio, suggeriscono di scegliere, per la progettazione del dsRNA da somministrare, le sequenze geniche meno conservate, come ad esempio la regione 3'UTR (WHYARD ET AL., 2009). In tale ottica, l'uso dei geni housekeeping, benché possano fornire risultati molto efficaci, deve essere limitato o realizzato con particolare attenzione a questi aspetti. La crescente disponibilità di dati sui genomi di numerose specie di insetti rende questo compito di scelta delle sequenze bersaglio molto più affidabile. In definitiva, l'aspetto più delicato per l'applicazione dell'RNAi al controllo degli insetti è quello di un'oculata scelta dei geni bersaglio, in quanto da questo dipende il successo della tecnica e la sua sicurezza. In relazione al complesso ed efficiente meccanismo molecolare dell'RNA interference, le attuali strategie di controllo applicativo stanno cercando di sfruttare le proprietà elettrochimiche di questo costrutto incorporandolo in nanomeri copoli-

merici inerti di oro, silice colloidale, chitosano, liposomi ricombinanti, agriperlite mediante interazioni elettrostatiche, forze di adsorbimento e/o forze di tensione superficiale (ZHANG ET AL., 2010; ELEK ET AL., 2010; BHATTACHARYYA ET AL., 2010). Il dsRNA così preparato potrà essere impiegato in nanoformulati altamente bio-compatibili e selettivi. Prima di realizzare queste formulazioni innovative sarà necessario avviare un accurato e lungo programma di screening del costrutto finalizzato ad accertarne la stabilizzazione ed il tempo di residenza in opportuni tamponi e/o coformulanti nonché il livello di fotossidazione nell'ambiente, nelle acque e la capacità di degradazione nel suolo.

§ 4.7 – **Resistenza vegetale**

I processi coevolutivi hanno generato una grande complessità e diversità dei meccanismi molecolari nell'interazione pianta-insetto fitofago (WALLING, 2000) che possono essere suddivisi in due meccanismi difensivi attivati dall'instaurarsi di un danno fogliare: difesa diretta e difesa indiretta.

§ 4.7.1 – **Meccanismi di difesa diretta**

La strategia della difesa diretta attua meccanismi che hanno lo scopo di contrastare il normale svolgimento del ciclo biologico dell'insetto e che influenzano negativamente la sua performance, inducendo

geni i cui prodotti sono sostanze che hanno un'azione direttamente tossica sull'insetto in quanto interferiscono con l'alimentazione, il metabolismo, la crescita e la riproduzione dei fitofagi. Tali meccanismi comprendono sia le difese anatomiche pre-esistenti, che la produzione di composti chimici *ex novo*. I meccanismi di difesa diretta possono pertanto essere espressi sia in maniera costitutiva che inducibile, cioè in seguito a stress. Le risposte inducibili hanno un costo maggiore per le piante in termini di riduzione di crescita, respirazione, biosintesi e crescita rispetto a quelle costitutive (D. CIPOLLINI ET AL., 2003; ZANGERL, R.A., 2003). Questa teoria è stata confermata da esperimenti in cui è stata osservata una riduzione di fitness delle piante esprimenti questi meccanismi inducibili in assenza di stress biotici (D. CIPOLLINI ET AL., 2003; REDMAN ET AL., 2001). Per tanto le piante nel corso dell'evoluzione hanno acquisito sistemi, come l'induzione genica, per attivare queste risposte solo quando sono necessarie e per ridurre i costi della difesa (HEIL AND BALDWIN, 2002). La difesa diretta è una strategia che si esplica costitutivamente con la presenza di barriere fisiche che impediscono l'accesso alle sostanze nutritive e la colonizzazione dell'insetto (antixenosi). Alcuni esempi di antixenosi sono: la presenza e lo spessore della cuticola, la presenza di spine e tricomi che impediscono l'accesso ai tessuti, la presenza sulla propria superficie di peli ghiandolari la cui rottura da parte dell'insetto determina la liberazione di sostanze tossiche, la deposi-

zione di strati di lignina che determinano l'indurimento della parete cellulare, o di cutina e cere che rendono gli strati epidermici resistenti alle abrasioni, inclusioni cristalline di silicio nella parete vegetale che danneggiano gli apparati boccali masticatori, dotti latticiferi che circondano le cellule e producono sostanze che imbrattano gli insetti rallentandone i movimenti. L'antixenosi costituisce per la pianta una difesa costitutiva, sempre presente e attiva, una risposta che anticipa l'attacco degli insetti ed è perciò considerata il primo sistema di difesa attuato dalle piante contro gli erbivori. Oltre ad attuare un meccanismo di difesa costitutivo come l'antixenosi, che è considerato appunto la prima strategia di difesa innescata in risposta all'attacco di insetti, la pianta può adottare un'altra tipologia di difesa diretta che porta a morte l'insetto e prende il nome di antibiosi, caratterizzata dalla produzione sostanze tossiche che agiscono in maniera diretta ed in vario modo sul ciclo biologico dell'insetto. In letteratura gran parte dei lavori riguardanti i meccanismi di resistenza di accessioni di pomodoro a *T. absoluta* sono collegati a risposte di difesa diretta come l'antibiosi (MALUF ET AL., 2010; RESENDE ET AL., 2006; AZEVEDO ET AL., 2003). Tali autori dimostrano infatti che i peli e i trichomi ghiandolari presenti nelle foglie di accessioni selvatiche di pomodoro pomodoro testate (*Lycopersicon hirsutum*, *L. peruvianum* e *L. pennellii*) producono acilzuccheri (MALUF ET AL., 2010; DIAS ET AL., 2014), metil-chetoni complessi (tridecan-2-one, 1-undecan-2-one, 3-

pentecan-2-one) (GHAREKANI e SALEK-EBRAHIMI, 2013) ed idrocarburi (esadecano, triacontano, octacosano) (OLIVEIRA ET AL., 2009) capaci di inibire sensibilmente l'ovideposizione e l'attività trofica larvale del filominatore. Queste sostanze possono essere prodotte in seguito all'attacco degli insetti o sono metaboliti già presenti nei tessuti vegetali e sono generalmente raggruppate in base al loro meccanismo d'azione in antinutritivi e antidigestivi (DUFFEY e STOUT 1996). Gli antinutritivi sono sostanze che impediscono o rallentano il processo di alimentazione dell'insetto rallentandone contemporaneamente la crescita e lo sviluppo. Antinutritivi indotti da ferita e da insetti sono le polifenolossidasi (PPO), enzimi che catalizzano l'ossidazione di composti fenolici in chinoni altamente reattivi che legandosi ai gruppi sulfidrilici di alcuni amminoacidi riducono la disponibilità di proteine vegetali per l'alimentazione degli insetti. Altri composti antinutritivi sono: le lectine, proteine presenti nei tessuti di accumulo, che si legano ai carboidrati riducendone la disponibilità per l'alimentazione degli insetti; metaboliti secondari come i tannini presenti nella parete cellulare, alcuni composti alcaloidi come la nicotina prodotta nelle radici e trasportata attraverso lo xilema nelle foglie dove esplica un'azione tossica ed il gossipolo che, conservato in ghiandole fogliari, si lega alle proteine rendendole indisponibili per la digestione da parte dell'insetto (DUFFEY e STOUT, 1996). La più importante classe di proteine antidigestive è, invece, costituita dagli inibitori di proteasi

(PI). Tali proteine, tipicamente prodotte dal danno meccanico in seguito all'attacco da parte dell'erbivoro, accumulandosi nei tessuti vegetali, si legano alle proteasi digestive presenti nel suo intestino. L'inibizione dei principali enzimi coinvolti nella digestione degli insetti fitofagi, riduce sensibilmente l'assimilazione degli aminoacidi essenziali per gli insetti e, quindi, il rallentamento della crescita (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002). In letteratura sono riportati moltissimi esempi della sovraespressione locale e sistemica di inibitori di proteasi in seguito a ferita e all'attacco di insetti (GATEHOUSE, 2002) e dell'utilizzo dei geni codificanti tali inibitori per l'ottenimento di piante transgeniche resistenti ad insetti.

§ 4.7.2 – **Meccanismi di difesa indiretta**

Oltre ai meccanismi di difesa diretta sviluppati nel corso dell'evoluzione, le piante possono adottare strategie difensive indirette senza svolgere la loro azione antiparassitaria direttamente sull'attività dei fitofagi, ma coinvolgendo un terzo livello trofico costituito dai nemici naturali degli insetti dannosi, parassitoidi e predatori che sono attratti e indotti alla predazione dalle piante, in modo da tenere sotto controllo la popolazione degli insetti dannosi (KARBAN e BALDWIN, 1997). La difesa indiretta della pianta comporta infatti la produzione, in risposta all'attacco dei fitofagi, di composti organici volatili volatili (VOC), che risultano attrattivi per i nemici naturali del fito-

fago, artropodi predatori e parassitoidi, sia da esperimenti condotti in laboratorio (DICKE and VAN LOON, 2000), che in condizioni naturali (KESSLER and BALDWIN, 2001). La pianta in seguito all'attacco di erbivori produce sostanze volatili come etilene, fenilpropanoidi, metiljasmonato (MeJA), composti a sei atomi di carbonio (detti volatili C6) (PARÉ e TURLINSON, 1999), terpenoidi (SCHMELZ ET AL., 2001) ed in alcuni casi (ad esempio per i membri della famiglia delle *Brassicaceae* glucosinolati (HALKIER e DU, 1997). Tutti questi composti volatili vengono generalmente definiti come VOC (Volatile Organic Compounds), emessi da una pianta sana o infestata vengono utilizzati dagli erbivori per discriminare tra piante ospiti e non-ospiti e per valutare la densità degli insetti in alimentazione presenti sulla pianta (BOLTER ET AL. 1997; QUIROZ ET AL. 1997), ma il loro rilascio da parte della pianta attaccata è importante soprattutto perché la pianta svolge la sua azione antiparassitaria coinvolgendo un terzo livello trofico costituito dai nemici naturali degli erbivori. La difesa indiretta della pianta comporta infatti la produzione, in risposta all'attacco dei fitofagi ma anche di patogeni, di specifici metaboliti volatili (VOC), che risultano attrattivi per i nemici naturali del fitofago (THROWBRIDGE, 2013; SONG e MIN-RYU 2013; PIESIK ET AL., 2103). La conoscenza a livello molecolare di queste interazioni multitrofiche apre nuove opportunità di protezione delle piante mediante controllo biologico, che sarà tanto più efficace quanto più forte risulterà l'attrattività verso gli antagonisti na-

turali entomofagi. La risposta ai VOC del terzo livello trofico è altamente specifica, infatti gli imenotteri parassitoidi attratti dall'emissione di questi volatili riescono a localizzare insetti o larve loro ospiti (BABIKOVA ET AL., 2103;), e analogamente anche alcuni predatori vengono attratti da questi composti (KESSLER e BALDWIN, 2001). I predatori generalisti sono di solito attratti da un solo composto presente nelle miscele dei volatili che sono comunemente emessi in seguito all'attacco da parte di varie specie di erbivori (DE MORAES ET AL., 2001). È stato inoltre dimostrato che la pianta in risposta all'attacco di erbivori innesca i suoi arsenali di difesa, non solo producendo sostanze volatili ma aumentando anche la produzione di nettare extraflorale ad alto contenuto di zuccheri e amminoacidi (AGRAWAL e RUTTER, 1998) per attirare insetti parassitoidi e predatori ed incoraggiarne così la predazione nelle vicinanze delle parti della pianta in cui viene prodotto (HEIL ET AL. 2001).

2.

Scopo della tesi

In suddetta tesi di dottorato è stata valutata la possibilità di indagare su approcci alternativi di controllo del dannoso lepidottero come il silenziamento genico post-trascrizionale mediato da dsRNA (RNA interference) e la valutazione di fonti di tolleranza/resistenza in germoplasma di pomodoro.

Le attività e i principali scopi della ricerca sono state articolate secondo le tematiche di seguito riportate.

Sviluppo di misure di controllo innovative, basate sull'uso del silenziamento genico post-trascrizionale mediato da dsRNA (RNA interference)

In generale lo sviluppo di strategie biotecnologiche innovative richiede innanzitutto l'identificazione di bersagli molecolari specifici e ben caratterizzati. A tal scopo è stato preso in considerazione come target molecolare da silenziare un gene (gene 102), molto conservato, codificante una proteina che genera amiloidi funzionali, coinvolti nella risposta immunitaria di incapsulamento e melanizzazione (FALABELLA ET AL., 2012). Queste prime sperimentazioni di silenziamento condotte attraverso la tecnica RNAi su lepidotteri nottuidi ha mostrato la presenza di interessanti fenotipi letali, associati ad evidenti sintomi di immunosoppressione. Pertanto, si è ritenuto opportuno procedere all'isolamento dell'ortologo 102 anche in *T. absoluta*, al fine di procedere alla sua caratterizzazione funzionale e ad esperimenti di

interferenza gene-specifica. Dopo aver preparato il costrutto (dsRNA) per interferenza sul gene 102, sono state valutate le diverse modalità di somministrazione del medesimo (DI LELIO, 2013; TURNER, 2006).

Valutazione di eventuali livelli misurabili di resistenza e/o tolleranza in pomodoro

I biosaggi di laboratorio e di campo sono stati effettuati con il fine e tentativo di standardizzare una serie di parametri utili a discriminare, in maniera differenziale-comparativa, i livelli di resistenza e/o tolleranza di linee commerciali di pomodoro al lepidottero correlandoli con il tasso di ovideposizione e il tipo di sviluppo larvale (OLIVEIRA ET AL., 2009). L'attività trofica larvale è stata esaminata facendo riferimento a sistemi di valutazione biotrofica del danno (*score systems*) presenti in letteratura (MALUF ET AL., 2010; RESENDE ET AL., 2006). Tali sistemi di valutazione sono stati integrati anche con determinazioni ponderali di materiale biologico prelevato dalle piante infestate come larve mature e crisalidi. I dati ottenuti dai biosaggi sono stati poi utilizzati per ricostruire la bio-fenologia del lepidottero sulle diverse linee esaminate.

3.

Materiali e metodi

§ 1 – Allevamento di *Tuta absoluta*

Allo scopo di ottenere materiale biologico da utilizzare nelle sperimentazioni, l'allevamento del lepidottero è stato allestito sistemando piante di pomodoro cv. "San Marzano", "Corbarino" ed "Incas" in isolatori di legno con pareti rivestite da microrete in nylon in camera climatizzata a temperatura controllata di 26 °C, UR 60 % e fotoperiodo lungo (16:8). Dopo il sessaggio su crisalidi effettuato osservando mediante stereoscopio la diversa localizzazione dell'apertura genitale a livello urosternale (VIII urosternite nelle femmine e IX urosternite nei maschi) (**Fig. 27**), sono state infestate in ogni isolatore 10 piante liberando 10 coppie di *T. absoluta* per l'ovideposizione. Le piante così infestate sono state impiegate sia per l'isolamento delle larve, utilizzate in prove sperimentali, che per il mantenimento dell'allevamento massale messo a regime.

L'isolamento di larve mature è stato effettuato in piastre Petri, in vista dell'incrisalidamento, per l'ottenimento e il successivo recupero degli adulti. Per favorire l'evoluzione controllata delle larve intermedie nelle rispettive mine fogliari, e procedere al recupero solo di determinati stadi, le foglie infestate sono state trasferite in contenitori di plastica con i piccioli sistemati in appositi microfalcon contenenti acqua distillata.

Gli adulti non utilizzati per le infestazioni in allevamento ma impiegati in prove di laboratorio e biosaggio successive sono stati in-

seriti in provettoni tappati con cotone idrofilo imbevuto di soluzione di melassa al 10%. Questi ultimi sono stati mantenuti a 20 ° C con U.R del 60 %.

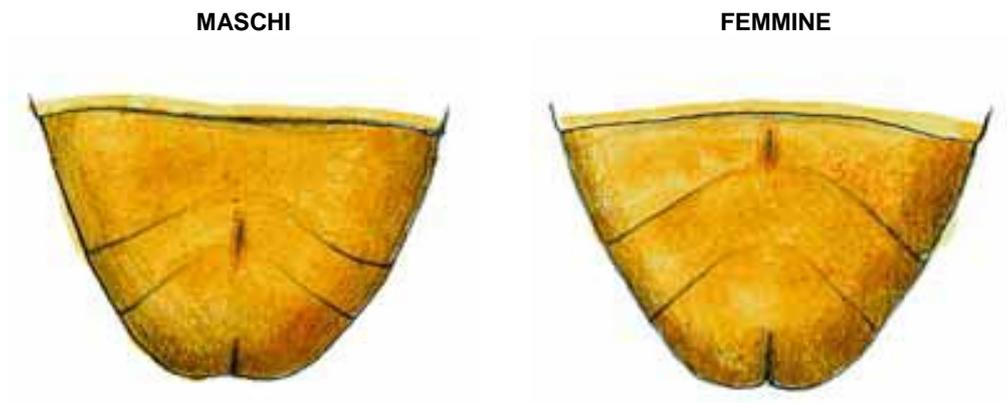


Fig. 27 – Differenza tra i sessi della crisalide di *T. absoluta* in base alla localizzazione dell'apertura genitale sugli urosterniti.

§ 2 – Isolamento del gene ortologo 102 in *T. absoluta*

§ 2.1 – Estrazione RNA totale

Per ottimizzare le rese di estrazione sono state pesate 6 larve mature IV età su di una bilancia analitica ad alta precisione tipo Sartorius TE1502S. Le larve sono state accuratamente pestellate e omogeneizzate in 100 μ l di Triazol Reagent (Invitrogen) costituito da guanidina tiocianato e fenolo.

Dopo aver vortexato per 1', il campione è stato incubato a temperatura ambiente per 5'. Alla sospensione sono stati aggiunti 20 μ l di cloroformio ed il tutto è stato vortexato per 50" ed incubato a temperatura ambiente per 3'. È stata effettuata una centrifugata a 10000 rpm per 10' a 4 °C. Sono stati prelevati 60 μ l del sovrinatante (fase incolore acquosa) e successivamente il volume totale è stato trasferito in una nuova eppendorf. L'RNA nella fase acquosa è stato precipitato con 50 μ l di isopropanolo, incubato 10' a temperatura ambiente e centrifugato a 12000 rpm per 15'.

Il pellet di RNA così ottenuto è stato lavato con 200 μ l di etanolo 75 % e centrifugato a 10000 rpm per 5'. Una volta eliminato il sovrinatante, il pellet fatto asciugare, è stato risospeso in 30 μ l di acqua DEPC (diethylpirocarbonato) allo 0,01%. La concentrazione dell'RNA è stata determinata in spettrofotometria UV a 260 nm e la qualità valutata con l'elettroforesi su gel d'agarosio all'1% pesando 0,5 g di agarosio in 50 ml di TAE 10X.

§ 2.2 – Reazioni di RT-PCR sugli estratti ottenuti

Sugli estratti sono state effettuate reazioni di retrotrascrizione (RT-PCR) con il kit Retroscript (Ambion). I cDNA sono stati retrotrascritti a partire da 1 μg di RNA totale, 2 μl di oligo (dT), 2 μl di deca-meri random e 5 μl di H₂O milliQ. Le reazioni sono state allestite separatamente in 2 eppendorf. Dopo aver miscelato e spinnato, le due reazioni sono state messe in termomix a 85 °C per 3'. Dopo aver messo i campioni in ghiaccio e spinnato, è stata assemblata un'altra reazione utilizzando 2 μl di RT 10x buffer, 4 μl di dNTP mix, 1 μl di RNasi inhibitor ed 1 μl di retrotrascrittasi (MMLV-RT). I campioni sono stati lasciati 1 h a 42 °C nel bagnetto termostatico e mantenuti 10' a 92 °C nel termomix per disattivare l'enzima. Le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume finale di 25 μl con i seguenti componenti: 2,5 μl di PCR buffer 1x [50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 2.0 mM MgCl e 0,01% di gelatina], 1,25 μl di dNTP, 1,25 μl di oligo Forward concentrato (10 μM), 1,25 μl di oligo Reverse concentrato (10 μM), 2 μl di SuperscriptII reverse transcriptase (Invitrogen) con una concentrazione di 0,5 u/ μl , 1 μl di RT reaction e 15,25 μl di H₂O sterile. I parametri dei cicli di amplificazione vengono qui di seguito riportati.

- 1) **Denaturazione** a 94°C per 2'.
- 2) **Amplificazione**, ripetuta per 40 cicli
94°C per 30"
temperatura di annealing 55 °C per 30"
72°C per 1'
- 3) **Polimerizzazione** a 72°C per 5'.

Gli amplificati così ottenuti sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% e sottoposti ad elettroforesi in un buffer TAE 10X [1mM di Tris base, 1 mM di acido acetico glaciale, 0,5 M di NaEDTA] in presenza di 0,2 $\mu\text{g/ml}$ di etidio bromuro.

§ 2.3 – Scelta degli oligo utilizzati in reazioni di PCR

Visto che non erano disponibili sequenze di *T. absoluta* in banca dati si è deciso di utilizzare, in reazioni PCR descritte sopra, oligodegenerati disegnati sul dittero *Drosophila melanogaster* e sul lepidottero *Spodoptera littoralis* nonché un oligo specifico 102 disegnato sulla regione più conservate del gene 102 del lepidottero nottuidae *Heliothis virescens* lunga 580 bp.

Nome oligo	Sequenza	Valore degeneraz.	Tm (°C)
Dros1 Forw	5'-GTBAACTNCARGGHAARACN-3'	1152	33.0
Dros1 Rev	3'-YTCBGGSGANGTDCCVACRAA-5'	864	61.2
Dros2 Forw	5'-GTBAACTTGCARGGHAARACN-3'	288	47.5
Dros2 Rev	3'-YTCBGGRCTNGTDCCVACRAA-5'	864	52.3
Spod1 Forw	5'-GTNAACTNCARGGHAARACN-3'	1536	33.0
Spod1 Rev	3'-YTCNCGGVGANGTDCCNACRAA-5'	2304	86.7
Spod2 Forw	5'-GTNAACTTRCARGGHAARACN-3'	768	38.9
Spod2 Rev	3'-YCTNCGRCTNGTDCCNACRAA-5'	1536	46.7
HelS2 Forw	5'-TACATCCAAGTTAATCTGCAAGGC-3'	-----	66
HelS2 Rev	3'-GAGGTGACCATGTTCTGGGCA-5'	-----	70

Tab. 3 – Oligo utilizzati in reazioni PCR finalizzate all'isolamento del putativo gene ortologo 102 in *T. absoluta*.

Da studi bioinformatici risulta che il gene 102 è conservato in molti ordini di insetti compresi i lepidotteri (DI LELIO, 2013; FALABELLA, 2012); quindi se tale gene fosse conservato anche in questo gelechide ci sarebbe stata una buona possibilità di ottenere l'amplificato specifico in questione. Gli oligo utilizzati sono stati elencati in **Tab. 3**.

§ 2.4 – **Ottimizzazione delle reazioni di PCR**

Per ottimizzare le reazioni di PCR e ottenere bande di amplificato nette e di intensità rappresentativa sono stati utilizzati oligo specifici disegnati sulle regioni più conservati del cDNA 102 di *Sp. littoralis* lungo 1317 bp (**Tab. 4**). Tali oligo presentano poche basi di differenza con gli oligo HelS2 (**Tab. 5**) e sono più conservati nel 102. Sono state inoltre utilizzate coppie di oligo Spod FR e Spod RR scelti su una regione più esterna a quella amplificata dagli oligo Spod FE e Spod RE.

Le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume finale di 25 μl con i seguenti componenti: 2,5 μl di PCR buffer 1x, 1,25 μl di dNTP mix, 1,25 μl di oligo forward concentrato (10 μM), 1,25 μl di oligo reverse concentrato (10 μM), 2 μl di GoTaq (Promega) concentrata 0,5 u/ μl , 1 μl di RT reaction e 15,75 μl di H₂O sterile. I parametri dei cicli di amplificazione vengono qui di seguito riportati.

- 1) **Denaturazione** a 95°C per 5'.
- 2) **Amplificazione**, ripetuta per 35 cicli
 - 94°C per 30"
 - temperatura di annealing** 60 °C per 30"
 - 72°C per 1'
- 3) **Polimerizzazione** a 72°C per 10'.

Gli amplificati così ottenuti sono stati fatti correre su gel di agarosio all'0,8% e sottoposti ad elettroforesi in un buffer TAE 10X in presenza di 0,2 µg/ml di etidio bromuro.

Successivamente si è deciso di ottimizzare ulteriormente la PCR raddoppiando il volume di reazione e assemblando i componenti in 50 µl finali.

Nome oligo	Sequenza	Tm (°C)
Spod FE	5'-TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGC-3'	66
Spod RE	5'-GAGGTGACAATGTTCGTGGGCC-3'	70
Spod FR	5'-GGCGGTGTCGTCGATTATG-3'	62
Spod RR	3'-GAGCGAGGAAATGTTCAAT-5'	70

Tab. 4 – Oligo utilizzati in reazioni PCR finalizzate all'isolamento del putativo gene ortologo 102 in *T. absoluta*.

Nome oligo	Sequenza
Spod FE	5'-TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGC-3'
HelS2 For	5'-TACATCCAAGTTAATCTGCAAGGC-3'
Spod RE	3'-GAGGTGACAATGTTCGTGGGCC-5'
HelS2 Rev	3'-GAGGTGACCATGTTCGTGGGCA-5'

Tab. 5 – Confronto tra oligo Hel-S2 e oligo Spod-FE/RE disegnati su regioni più conservate del 102 di *H. virescens* e *S. littoralis*. Le differenze nucleotidiche sono segnate in rosso.

§ 2.5 – Clonaggio amplificato del putativo gene ortologo 102

Prima del clonaggio le bande di amplificato ottenute con gli oligo FE-RE sono state escisse da gel, pesate su bilancia analitica e purificate con l'ausilio del kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen). Ad un eppendorf contenente la porzione di agarosio escissa sono stati aggiunti 900 μ l di buffer di lisi, si è lasciato nel termo mix 15' a 50 °C agitando l'eppendorf ogni 2-3 minuti. Dopo aver controllato la completa dissoluzione dell'agarosio, l'eppendorf è stata tenuta altri 5' a 50 °C. Il volume totale ottenuto è stato trasferito in una colonnina sistemata in un washing tube e recante al centro un filtrino capace di trattenere il cDNA. Dopo aver centrifugato 1' a 12000 g, lo scarto liquido nella colonnina è stato eliminato e sono stati aggiunti 500 μ l di washing buffer contenente etanolo. Dopo incubazione 1' a temperatura ambiente e ulteriore centrifugazione, lo scarto del buffer è stato eliminato (la medesima operazione è stata ripetuta per 3 volte). Dopo aver sistemato la colonnina in un recovery tube, sono stati aggiunti 50 μ l di buffer di eluizione preriscaldato a 65 °C nel termomix. Dopo aver incubato 1' a temperatura ambiente e centrifugato 2' a 12000 g, il cDNA eluito e purificato è stato stoccato a - 20 °C. I prodotti di amplificato purificati e precipitati sono stati clonati con il Kit TopoCloning TA (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. L'estrazione del plasmide contenente il putativo inserto è stata eseguita seguendo il protocollo di lisi alcalina e la reazione di digestione è stata assem-

blata in 15 μ l totali con le seguenti componenti: 1,5 μ l di buffer mix SH, 1 μ l di enzima EcoRI, 1 μ l di RNasi e 5 μ l di DNA. I prodotti di digestione sono stati fatti correre su gel di agarosio all' 0,7% e sottoposti ad elettroforesi in un buffer TAE 10X in presenza di 0,2 μ g/ml di etidio bromuro dopo 1,5 h di incubazione a 37 °C.

§ 2.6 – Sequenziamento dei putativi inserti clonati e analisi bioinformatiche

Il sequenziamento è stato effettuato con l'ausilio della Primm Technologies mediante utilizzo di sequenziatori automatici tipo ABI PRISM® 3730. Per ottenere la putativa sequenza isolata sono stati utilizzati oligo M13 Forward e M13 Reverse disegnati all'interno del gene Plac lacZ α localizzato nel polylinker del plasmide PCR 2.1-TOPO lungo 3.9 kb (**Fig. 28**).

L'omologo del gene 102 in *T. absoluta* è stato identificato mediante confronti con la sequenza del cDNA 102 di *S. littoralis* e di *H. virescens* (accession number: FR751090) presente in banca dati utilizzando l'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL ET AL., 1990; GISH e STATES, 1993) accessibile al sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. La sequenza amminoacidica, tradotta dal cDNA 102, è stata individuata utilizzando il programma di predizione genica GENSCAN (http://genes.mit.edu/cgi-bin/genescanw_py.cgi). Le regioni più conservate a livello amminoacidico so-

no state evidenziate e confrontate utilizzando l'allineamento multiplo ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

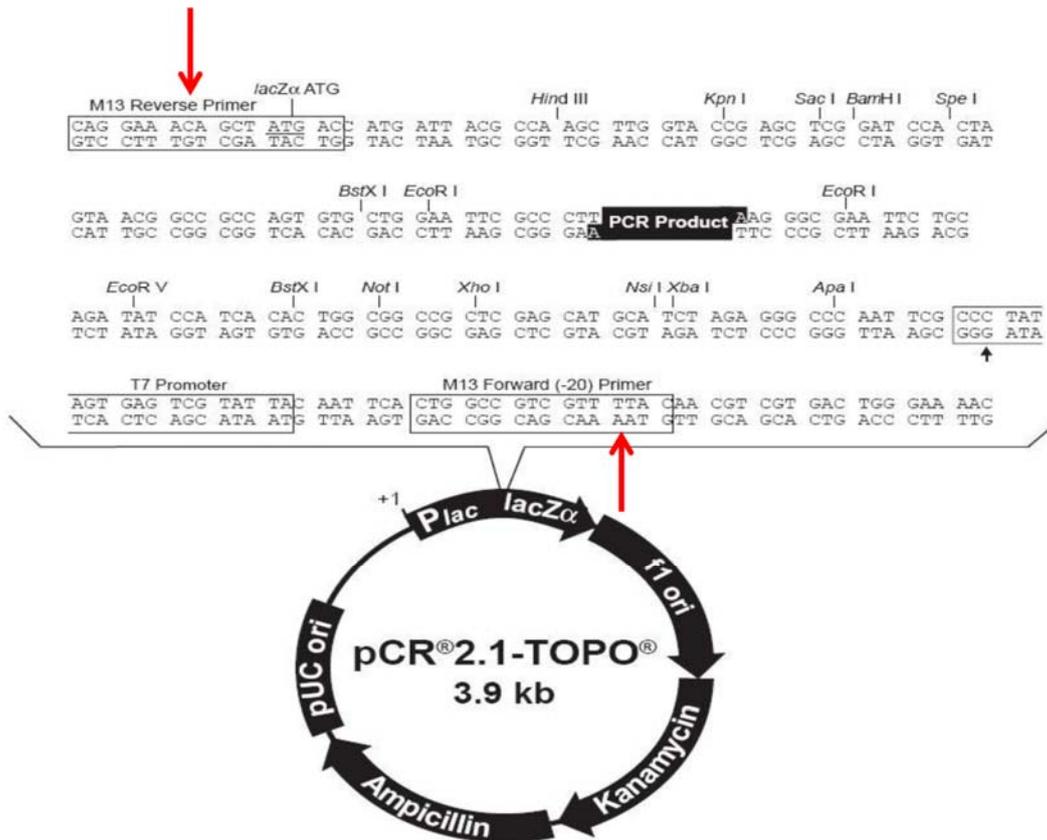


Fig. 28 – Mappa completa del pCR2.1-TOPO vector. Le frecce in rosso indicano gli oligo utilizzati durante il sequenziamento.

§ 3 – Caratterizzazione strutturale dell'ortologo 102

In generale lo sviluppo di strategie biotecnologiche innovative richiede innanzitutto l'identificazione di bersagli molecolari specifici e ben caratterizzati per procedere ad indagini funzionali mirate. A tal scopo negli studi di caratterizzazione genica sono stati avviati esperimenti finalizzati all'allungamento del frammento di sequenza isolato del cDNA 102 di *T. absoluta* all'estremità 5' e 3' mediante tecnica RACE (rapid amplification of cDNA ends).

§ 3.1 – RACE 5': Sintesi della prima elica del cDNA

I campioni di RNA estratti da larve mature stoccati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantenuti in precipitazione sono stati centrifugati a 12000 g per $15'$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il pellet ottenuto è stato lavato con 1 ml di EtOH 70% in acqua DEPC e dopo centrifuga è stato asciugato e risospeso. La reazione di RT-PCR è stata allestita con le seguenti componenti in un volume totale di $25\text{ }\mu\text{l}$: $2,5\text{ }\mu\text{l}$ di oligo GSP1 concentrato $1\text{ }\mu\text{M}$, $5\text{ }\mu\text{l}$ di RNA concentrato $5\text{ }\mu\text{g}$ e $8\text{ }\mu\text{l}$ di acqua DEPC. La mix è stata incubata $10'$ a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nel termomix per denaturare l' RNA. Dopo aver tenuto $1'$ in ghiaccio e dopo rapida spinnata la reazione è stata assemblata nei seguenti componenti. : $2,5\text{ }\mu\text{l}$ di PCR buffer 10x, $2,5\text{ }\mu\text{l}$ di MgCl_2 , $1\text{ }\mu\text{l}$ di dNTP mix e $2,5\text{ }\mu\text{l}$ di DTT. Dopo spinnata i campioni sono stati incubati $1'$ a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. È stato aggiunto $1\text{ }\mu\text{l}$ di SuperScript II RT (Invitrogen) ed il tutto è stato incubato $50'$ a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Per arrestare la rea-

zione i campioni sono stati incubati 15' a 70 °C e dopo spinnata e ulteriore incubazione a temperatura ambiente per 2' è stato aggiunto 1 μ l di RNasi mix. Dopo incubazione per 30' a temperatura ambiente, i campioni sono stati spinnati leggermente e conservato a - 20 °C.

§ 3.2 – TdT Tailing e PCR del cDNA dC-tailed

Nel TdT Tailing viene assemblata una reazione in cui viene aggiunto un'enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) che aggiunge una coda di citosine omopolimeriche all'estremità 3' del cDNA (FROMHMAN, 1988; OHARA; 1989). È stata preparata una mix in un volume totale di 24 μ l con le seguenti componenti: 5 μ l di 5X tailing buffer, 2,5 μ l di CTP, 10 μ l di cDNA purificato e 6,5 μ l di H₂O DEPC. La mix è stata incubata 3' a 94 °C nel termociclatore e tenuta 1' in ghiaccio. Dopo rapida spinnata è stato aggiunto 1 μ l di TdT con incubazione a temperatura ambiente per 10'. La reazione è stata disattivata a 65 °C per 10'. Nella PCR successiva tale costrutto serve da innesco per l'oligo universale AAP (Anchor Abridged Primer) che reca al 3' un poliG. Al 5' del cDNA si ibridizza l'oligo GSP2 (**Tab. 6**). La reazione è stata assemblata in un volume totale di 50 μ l con le seguenti componenti: 5 μ l di 10X PCR buffer, 3 μ l di MgCl₂, 1 μ l di dNTP mix, 2 μ l di oligo GSP2 concentrato (10 μ M), 2 μ l di oligo universale AAP concentrato (10 μ M), 0,5 μ l di AmpliTaq 360 (Invitrogen) concentrata 2 u/ μ l, 5 μ l di cDNA purificato e 31,5 μ l di H₂O DEPC. I parametri dei cicli di amplificazione

vengono qui di seguito riportati.

- 1) **Denaturazione** a 94°C per 2'.
- 2) **Amplificazione**, ripetuta per 35 cicli

94°C per 1'

temperatura di annealing 55 °C per 30"

72°C per 2'

- 3) **Polimerizzazione** a 72°C per 7'.

Gli amplificati così ottenuti sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% e sottoposti ad elettroforesi in un buffer TAE 10X in presenza di 0,2 µg/ml di etidio bromuro.

Nome oligo	Sequenza	Tm (°C)
AAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGG-3'	55
GSP2	3'- TGCAACTGCTGAAGAAGA-5'	59
GSP1	3'-GATCTGGTTCACAAAGTAC-5'	58

Tab. 6 – Oligo utilizzati in reazioni PCR del RACE 5'.

§ 3.3 – RACE 3': Prove di PCR

La prima reazione di PCR è stata assemblata in 50 µl totali con le seguenti componenti: 5 µl di PCR buffer 10X, 3 µl di MgCl₂, 1 µl di dNTP mix, 1 µl di oligo GSP 3' RACE, 1 µl di oligo AUAP (**tab. 7**), 0,5 µl di AmpliTaq 360 (Invitrogen) concentrata 2 u/ µl, 0,5 µl di cDNA template e 38 µl di H₂O autoclavata. I parametri dei cicli di amplificazione vengono qui di seguito riportati.

- 1) **Denaturazione** a 95°C per 5'.
- 2) **Amplificazione**, ripetuta per 35 cicli
94°C per 30"
temperatura di annealing 61 °C per 30"
72°C per 1'
- 3) **Polimerizzazione** a 72°C per 10'.

I prodotti di amplificazione sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% e sottoposti ad elettroforesi in un buffer TAE 10X in presenza di 0,2 µg/ml di etidio bromuro.

Le bande di amplificato così ottenute sono state recuperate da gel, eluite in buffer E5 [10 mM Tris-HCl, pH 8.5], e conservate in precipitazione a -20 °C con 5µl di NaAc (0,3 M) + 110 µl di EtOH assoluto.

Dopo centrifuga per 15' a 4 °C a 12000 g, lavaggio pellet in EtOH 75% e ulteriore centrifuga a freddo per 10' a 12000 g, il pellet è stato risospeso. Il templatò risospeso è stato riamplicato e contestualmente sono state avviate reazioni di nested PCR. La nested PCR è stata assemblata in 50 µl totali con le stesse condizioni delle PCR primaria utilizzando oligo GSP nested 3' RACE. I prodotti RACE sono stati clonati con il kit TopoCloning TA (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. Sono state avviate due reazioni di digestione in 15 µl totali utilizzando enzimi di restrizione EcoRI, BamH1+EcoRV. I prodotti di digestione sono stati fatti correre su gel di agarosio

all'0,7% e sottoposti ad elettroforesi in un buffer TAE 10X in presenza di 0,2 $\mu\text{g/ml}$ di etidio bromuro dopo 1,5 h di incubazione a 37 °C.

Mix EcoRI

Plasmide	3 μl
Buffer SX	1,5 μl
EcoRI	0,05 μl
RNasi A	0,5 μl
Acqua	<u>9,95 μl</u>
	15 μl

Mix BamH1+EcoRV

Plasmide	3 μl
Buffer SB	1,5 μl
EcoRV	0,05 μl
BamH1	0,05 μl
RNasi A	0,5 μl
Acqua	<u>9,95 μl</u>
	15 μl

Nome oligo	Sequenza	Tm (°C)
GSP RACE 3'	5'-GGACTCCACAGTTGGCTGTTC-3'	63
GSP nested	3'-CTGGATCTCTCTGGGAAAGG-5'	64
AUAP	3'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-5'	62

Tab. 7 – Oligo utilizzati in reazioni di PCR del RACE 3'.

§ 3.4 – Prove tecniche di PCR con oligo di controllo

Sono state eseguite prove tecniche di PCR con oligo GSP RACE 3' e Spod RE (**Tab. 8**) come controllo positivo finalizzato ad accertare la presenza degli inserti clonati. La reazione è stata assemblata in 50 μ l totali con le stesse condizioni sperimentali delle prove di amplificazione precedenti. Nei cicli di amplificazione la temperatura di annealing era uguale a 61 °C.

Nome oligo	Sequenza	Tm (°C)
GSP RACE 3'	5'-GGACTCCACAGTTGGCTGTTC-3'	63
Spod RE	3'-GAGGTGACAATGTTCGTGGGCC-5'	70

Tab. 8 – Oligo di controllo utilizzati in prove tecniche di PCR del RACE 3' per validare la presenza degli inseri clonati.

§ 4 – Sintesi dell'RNA double stranded (dsRNA) omologo al gene 102

Gli RNA senso e antisenso sono stati trascritti a partire da cDNA 102 clonato con l'ausilio di oligo gene-specifici recanti il promotore T7 aggiunto all'estremità 5' (**Tab. 9**). Le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume finale di 50 μ l con i seguenti componenti: 5 μ l di PCR buffer 1X, 2,5 μ l di dNTP mix, 2,5 μ l di oligo Spod T7 forward concentrato (10 μ M), 2,5 μ l di oligo Spod T7 reverse concentrato (10 μ M) e 2 μ l di Platinum Taq DNA polymerase ((Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) concentrata 1 u/ μ l, 1 μ l di DNA templato e 34,5 μ l di H₂O sterile.

I parametri dei cicli di amplificazione vengono qui di seguito riportati.

- 1) **Denaturazione** a 95°C per 5'.
- 2) **Amplificazione**, ripetuta per 35 cicli
94°C per 30"
temperatura di annealing 60 °C per 30"
72°C per 1'
- 3) **Polimerizzazione** a 72°C per 10'.

Gli amplificati così ottenuti sono stati fatti correre su gel di agarosio all'1% e sottoposti ad elettroforesi in un buffer TAE 10X in presenza di 0,2 μ g/ml di etidio bromuro al fine di controllare lunghezza ed intensità dell'amplificato.

I prodotti di amplificazione sono stati purificati e concentrati utilizzando il kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore.

Per sintetizzare il dsRNA 102, è stato utilizzato 1 μg di prodotto PCR come template insieme a 7.5 mM di ATP, CTP, UTP, GTP, 20 unità di T7 polimerasi e il buffer di reazione T7 contenente 40 mM di Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl_2 , 2 mM spermidine, 10 mM DTT (MegaScript RNAi kit). I prodotti della reazione di trascrizione in vitro sono stati incubati a 37 °C per 4 h e poi incubati 5' a 75 °C. Nella reazione di digestione la DNasi I è stata utilizzata per degradare il rimanente trascritto secondo le istruzioni del produttore. La prima e seconda eluzione di dsRNA 102 purificato ottenute sono state lette al Biophotometer (Eppendorf) per valutarne la concentrazione.

Nome oligo	Sequenza
Spod FE T7	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> AACCTCCTGAGCGTGCCTG-3'
Spod RE T7	3'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> GGAGTGCTGCTTCAGAATCAT-5'

Tab. 9 – Oligo con promotore T7 utilizzati per sintetizzare gli RNA senso e antisense. La sequenza in grassetto sottolineato corrisponde a quella del promotore T7.

§ 5 – Prove di interferenza gene specifica: biosaggi di dsRNA 102 delivery

Dopo aver preparato il costrutto di interferenza gene-specifica (dsRNA 102) sono state valutate le diverse modalità di somministrazione del medesimo mediante microiniezione orale, microiniezioni in cavo emocelico, microinfiltrazione fogliare (BAUM ET AL., 2007; ARAUJO ET AL., 2006; TERENIUS ET AL., 2011) e trattamenti sulle uova (KARIM ET AL., 2010). Le microiniezioni orali, protoraciche e intraddominali non hanno trovato un riscontro applicativo pratico sul gelechide per la ridotta dimensione delle larve mature (6 mm) e l'estrema delicatezza alla manipolazione e alla iniezione così come le iniezioni intraddominali su adulti (DZITOYEVA ET AL., 2001) che ne compromettevano la vitalità.

§ 5.1 – Biosaggi di microinfiltrazione fogliare

In questi biosaggi veniva scelta una pianta di pomodoro innestata vigorosa e con 3-4 palchi ben affrancati. L'infiltrazione veniva praticata con un ago di una siringa da 1 ml su foglie grandi resistenti e coriacee. Per ottimizzare l'infiltrazione e rendere ben coriaceo e resistente il tessuto fogliare si manteneva la pianta-saggio in asciutto per almeno 3 giorni.

Per facilitare la diffusione della dsRNA-solution nella foglia, in particolare nel mesofillo e parenchima, si effettuava la puntura in

maniera da intaccare solo cuticola ed epidermide superiore del tessuto adiacente alla mina contenente larve in attività trofica (**Fig. 29**). L'applicazione veniva realizzata infiltrando 30 μl totali di soluzione stabilizzati in tampone soaking buffer 5x (UODOME e SUGIMOTO, 2003) suddivisi in 30 applicazioni da 1 μl (3 μl di soluzione/ mina) con l'ausilio di una pipetta P10 modello Eppendorf. Dopo trattamento si aveva attenzione di controllare la formazione di un alone sub-rotondeggiante per confermare l'avvenuta microinfiltrazione.

È stata eseguita la prova sperimentale considerando 2 diverse concentrazioni della 102 dsRNA solution (1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 2,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), sei repliche per ciascuna concentrazione incluso il controllo, 10 larve terza età primo giorno a replica e come controlli si utilizzavano soluzioni di dsRNA GFP alla stessa concentrazione dei trattati. Dopo l'infiltrazione, le foglie con le larve trattate venivano staccate dalla pianta e sistemate in Petri con il picciolo inserito in Eppendorf contenente acqua distillata per evitarne il disseccamento. Si è avuta cura di controllare ogni 2 giorni l'attività e l'evoluzione larvale durante le mute, l'eventuale incrisalidamento e sfarfallamento degli adulti.

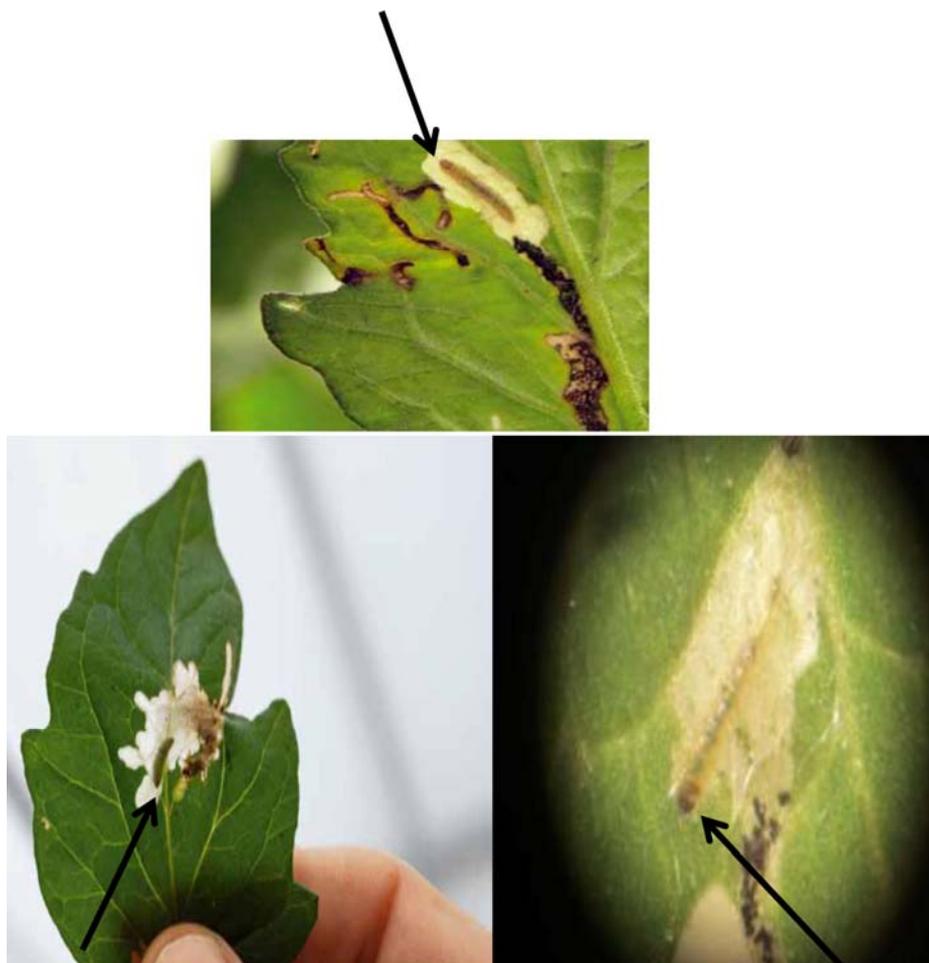


Fig. 29 – Siti di microinfiltrazione della soluzione di dsRNA 102 in mina.

§ 5.2 – Trattamenti sulle uova

In letteratura sono presenti diversi lavori e protocolli che usano diverse soluzioni (ipoclorito sodico), detergenti e surfattanti (saponi organiche) utili a permeabilizzare e/o rimuovere strati idrofobici e cerosi come corion e membrana vitellina (JAMUR and OLIVER 2010) (**Fig. 30**). Nelle prove sperimentali sono stati applicati questi protocolli al fine di facilitare un'eventuale internalizzazione della dsRNA

102 solution nelle uova valutando possibili effetti di interferenza su embrioni e/o neolarve visto che in alcuni lavori (DI LELIO I, 2013; FALABELLA ET AL. 2012) è stato dimostrato che il gene 102 gioca un ruolo importante durante lo sviluppo embrionale e il suo silenziamento interferisce con la regolare schiusa, che, quando avviene, dà origine a larve caratterizzate da minore capacità di sopravvivenza.

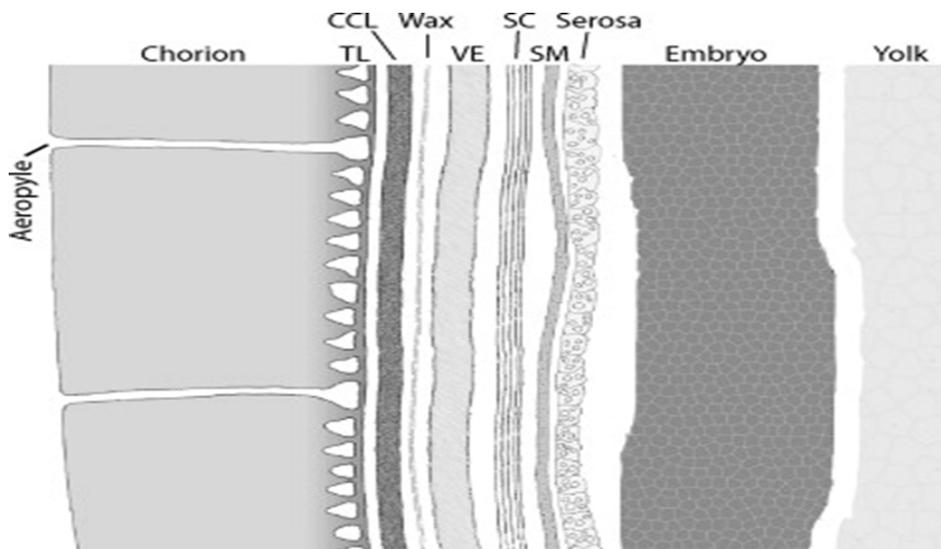


Fig. 30 – Rappresentazione schematica degli invogli extraembrionali interessati dal decoronamento in un uovo di lepidottero (KIEHART *et al.*, 2000).

L'ipotesi è che esso sia presumibilmente coinvolto nei processi di formazione di diversi tessuti nell'embrione e nella giovane larva, entrando nella costituzione delle membrane basali, come suggerito da FALABELLA ET AL. (2012), in quanto sia la sintesi delle fibre amiloidi funzionali nei processi di incapsulamento durante la risposta immunitaria che la tannizzazione della cuticolina nella tegumento-genesi

sono derivate dalla polimerizzazione di chinoni e dalla deposizione di melanina. Il silenziamento di suddetto gene nelle uova andrebbe quindi a inibire lo stesso processo biochimico legato in quest'ultimo caso alla sintesi dei precursori chinonici della sclerotina nell'esocuticola del tegumento con problemi nella tannizzazione e melanogenesi dello stesso durante lo sviluppo embrionale e la muta larvale con effetti fenotipici letali.

Allo scopo da piante di pomodoro cv "Inca" presenti in isolatori di legno, precedentemente infestate con 10 coppie di adulti, sono state isolate, dopo 3 giorni per ogni replica, 80 uova embrionate in seguito disposte su foglie di pomodoro sistemate con il picciolo su agar in piastre Petri. Per ridurre il livello di condensa ed evitare l'inumidimento eccessivo del substrato vegetale sono stati praticati dei piccoli fori con spilli roventi sul coperchio superiore e sui bordi laterali della Petri. Ogni uovo è stato trattato con 1 μ l di soluzione opportunamente stabilizzata in soaking buffer 5x. Sono state strutturate 6 repliche per ogni condizione sperimentale atta a valutare i probabili effetti connessi alla presenza o assenza del pretrattamento decorionante con ipoclorito sodico al 5% (Chlorox) e al tempo di permanenza della dsRNA solution rispettivamente di 24 e 48 ore. Per il decorionamento le uova sono state prima chiarificate in una miscela alogenica di Halocarbon oil 27 (Sigma Aldrich) al 2% per 1' e poi trattate singolarmente con 1 μ l di ipoclorito sodico (Chlorox) al 5%. Dopo

1' e 15" le uova sono state accuratamente asciugate con una striscetta di carta da filtro autoclavata, lavate per 3 volte in acqua deionizzata e poi lasciate asciugare per 15' (KIEHART ET AL., 2000) prima del trattamento con la dsRNA 102 solution (**Fig. 31**).

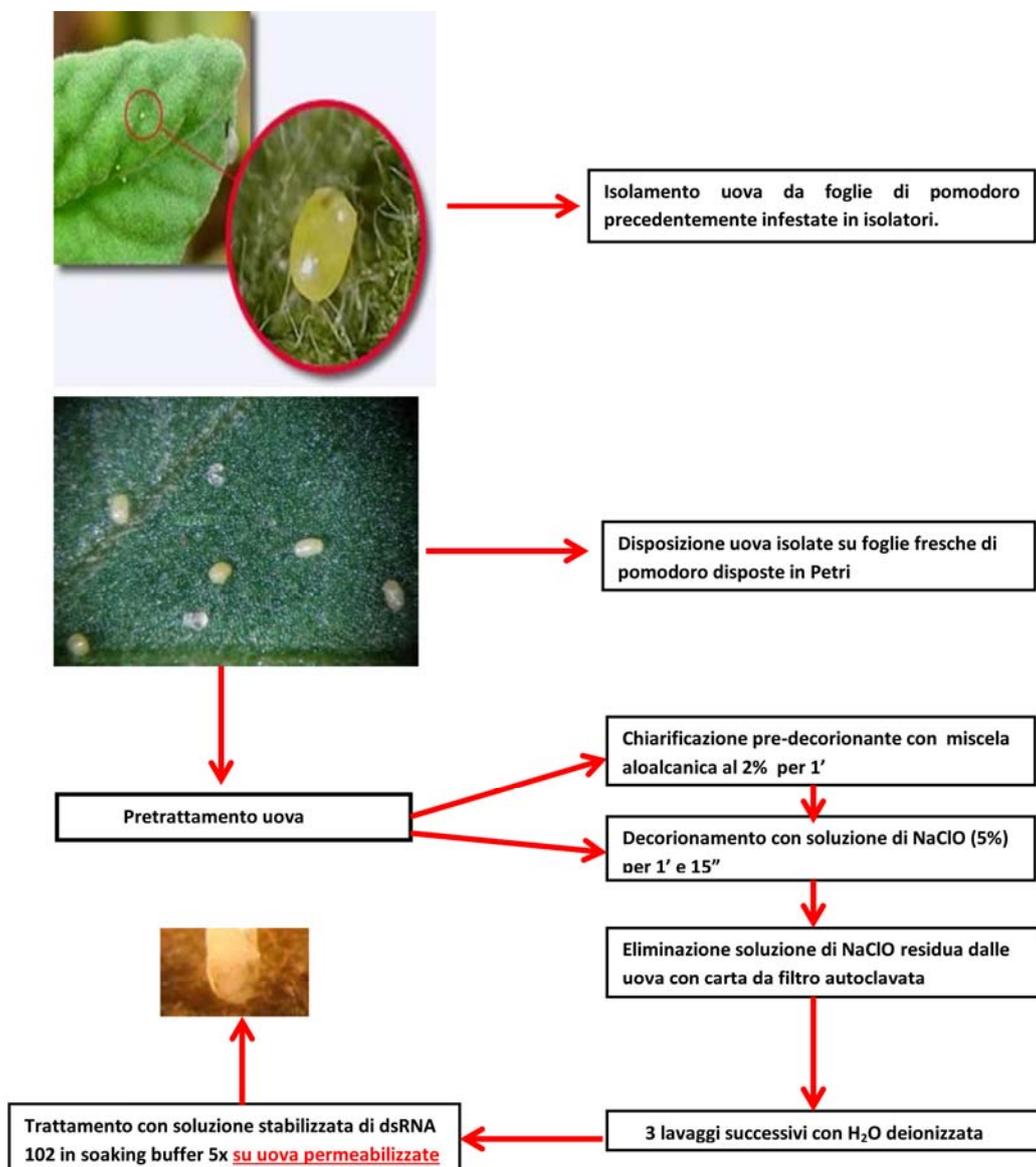


Fig. 31– Protocollo sperimentale utilizzato nei biosaggi di interferenza su uova di *T. absoluta* con soluzioni stabilizzate di dsRNA 102 (adattato da KIEHART *et al.*, 2000).

In ogni tesi sono state trattate 20 uova con la 102 dsRNA solution a 3 diverse concentrazioni (2000 ng/u, 200 ng/u e 20 ng/u). Nel controllo, invece, le 20 uova sono state trattate con dsRNA GFP solution (200 ng/u). Ogni 2 giorni è stato accertato il livello di schiusa delle uova, lo sviluppo e mortalità larvale. Quotidianamente sono stati effettuati controlli sul substrato vegetale per evitare contaminazioni dell'agar derivanti dall'attività trofica e dalla produzione di escrementi da parte delle larve; con molta attenzione queste ultime sono state escisse dalle mine con l'ausilio di uno spillo entomologico ultrasottile e disposte su foglie fresche.

§ 6 – **Valutazione di livelli misurabili di resistenza e/o tolleranza in pomodoro**

I biosaggi sono stati effettuati con il fine e tentativo di standardizzare una serie di parametri utili a discriminare, in maniera differenziale-comparativa, i livelli di resistenza e/o tolleranza di genotipi coltivati di pomodoro al lepidottero correlandoli con il tasso di ovi-deposizione e il tipo di sviluppo larvale (OLIVEIRA ET AL., 2009). L'attività trofica larvale è stata esaminata facendo riferimento a sistemi di valutazione del danno (score systems) (**Tab. 10**) presenti in letteratura (MALUF ET AL., 2010; RESENDE ET AL., 2006; AZEVEDO ET AL., 2003). Tali sistemi di valutazione sono stati integrati anche con determinazioni ponderali di materiale biologico prelevato dalle piante infestate come larve mature e crisalidi. I dati ottenuti dai biosaggi sono stati poi utilizzati per ricostruire la bio-fenologia del lepidottero sulle diverse linee esaminate. Sono stati inoltre osservati altri fattori sperimentali utili a valutare lo sviluppo delle infestazioni tra le diverse linee saggiate come densità distributiva delle mine su foglie, numero, aspetto, forma e dimensione di mine su foglie, fusti e bacche nonché il numero di fori a bacca.

Tipo di mine su foglie -LLT (= Leaflet Lesion Type)-:

- 0 = nessuna lesione.
- 1 = piccole lesioni, rare.
- 2 = piccole e medie lesioni, di solito localizzate lungo i bordi fogliari.
- 3 = medie e grandi lesioni, coalescenti; bordi fogliari deformati.
- 4 = grandi lesioni, coalescenti; foglie deformate.
- 5 = tutta la superficie fogliare minata.

Superficie fogliare minata -OPD (= Overall Plant Damage)-:

- 0 = nessun danno fogliare.
- 1 = 5% della superficie fogliare minata; mine piccole* e non coalescenti.
- 2 = > dal 5% al 20% della superficie fogliare minata; mine piccole e non coalescenti.
- 3 = > dal 20% al 50% della superficie fogliare minata; mine di medie e grandi** dimensioni.
- 4 = > dal 50% al 80% della superficie fogliare minata; numerose mine large e coalescenti.
- 5 = > Dall'80% al 100% della superficie fogliare minata.

Percentuale di foglioline minate -PLA (= Percent Leaflets Attacked)-:

- 0 = nessuna fogliolina minata.
- 1 = 5% di foglioline minate.
- 2 = dal 5% al 20% di foglioline minate.
- 3 = dal 20% al 50% di foglioline minate..
- 4 = dal 50% all'80% di foglioline minate.
- 5 = dall'80% al 100% di foglioline minate.

Tab. 10 – Scoring systems utilizzati nelle valutazioni biotrofiche delle foglioline attaccate da larve di *T. absoluta* come riportato da MALUF ET AL. 2010; Resende *et al.*, 2006; AZEVEDO ET AL., 2003 e OLIVEIRA ET AL., 2009 (* mine con $\varnothing < 0,05$ cm; ** mine con $\varnothing > 0,05$ cm).

§ 6.1 – Biosaggi in serra

Nell'aprile del 2012 a Portici in serra fredda con copertura in vetro sono state liberate 42 coppie di *T. absoluta* a 3 settimane dal trapianto delle piante di pomodoro (**Fig. 32**). Sono state saggiate, secondo un modello sperimentale di randomizzazione completa in cui le piante delle varie linee erano sistemate a caso all'interno della serra, 8 linee ed un testimone poco suscettibile (ecotipo vesuviano) (**Tab. 11**). Per ogni linea, sono state organizzate 12 repliche per un totale di 108 piante, su cui sono stati eseguiti controlli dell'andamento dell'infestazione a carico di foglie e frutti. La conta delle uova sugli organi vegetali (foglie, fusti e bacche) è stata strutturata secondo quanto indicato da MALUF ET AL., 2010; RESENDE ET AL., 2006; AZEVEDO ET AL., 2003. La valutazione delle foglie minate è stata determinata 11 giorni dopo l'infestazione e ripetuta ogni 5 giorni fino a 21 giorni dalle ovideposizioni. L'osservazione delle bacche infestate è stata eseguita 62 giorni dopo le infestazioni. L'analisi statistica è stata condotta, mediante programma Statgraphics Plus, con controllo della distribuzione normale dei dati. All'occorrenza, per soddisfare i requisiti di normalità ed omoschedasticità, è stata effettuata la trasformata logaritmica dei dati rilevati. Per l'analisi della varianza è stato utilizzato il test ANOVA mentre per il confronto multiplo delle medie il test Tukey's HSD.



Fig. 32 – Sistemazione a caso delle piante delle varie linee all'interno della serra (randomizzazione completa 12 repliche).

Linee saggiate	Tipo di accrescimento e di sviluppo
RED MAGIC	indeterminato
RED MAGIC (666)	indeterminato
FARAORO	indeterminato
BILIARDINO ALTO*	indeterminato
BUONO PEEL	determinato
BABY DOC	determinato
CERASELLA*	determinato
BILIARDINO NANO*	determinato
ECOTIPO VESUVIANO**	indeterminato

Tab. 11 –Linee saggiate nei biosaggi in serra e loro tipo di accrescimento e sviluppo (* pomodorini; **linea controllo).

§ 6.2 – Biosaggi in campo

Nella prova *in pieno campo* condotta a Sarno (azienda Faraò) nel maggio 2012 è stato applicato un modello sperimentale blocco randomizzato con 3 repliche, dove le stesse linee testate in serra erano disposte casualmente all'interno di ogni replica e lasciate all'infestazione naturale degli adulti (**Fig. 33**). Sono state saggiate 7 linee di pomodoro ed un testimone (San Marzano 100%) suscettibile (**Tab. 12**). Ogni parcella era costituita da 15 linee per un totale di 240 piante (4 file da 60 piante). Sulle linee sono stati eseguiti controlli dell'andamento dell'infestazione a carico di foglie e frutti. La valutazione delle foglie minate è stata strutturata in 6 punti campionari; le prime osservazioni sono state fatte dopo 28 giorni dal trapianto e le cinque successive ripetute ogni 8 giorni fino a fine agosto. L'osservazione delle bacche infestate è stata strutturata in 4 punti campionari; le prime osservazioni sono state realizzate 75 giorni dal trapianto e le tre successive ripetute ogni 10 giorni fino a fine agosto. L'analisi statistica è stata condotta, mediante programma Statgraphics Plus, con controllo della distribuzione normale dei dati. All'occorrenza, per soddisfare i requisiti di normalità ed omoschedasticità, è stata effettuata la trasformata logaritmica dei dati rilevati. Per l'analisi della varianza è stato utilizzato il test ANOVA mentre per il confronto multiplo delle medie il test Tukey's HSD.



Fig. 33 – Sistemazione a caso in pieno campo delle varie linee all'interno di ogni replica (blocco random 3 repliche).

Linee saggiate	Tipo di accrescimento e di sviluppo
RED MAGIC	indeterminato
RED MAGIC (666)	indeterminato
FARAORO**	indeterminato
BILIARDINO ALTO*	indeterminato
BUONO PEEL	determinato
BABY DOC	determinato
CERASELLA*	determinato
BILIARDINO NANO*	determinato

Tab. 12 –Linee saggiate nei biosaggi in serra e loro tipo di accrescimento e sviluppo (*pomodorini; **linea controllo).

§ 6.3 – Biosaggi in tunnel-serra: studi genetici con analisi RNA-Seq

Nel maggio 2013 nell'azienda Farao-Mennella sita a Scafati (SA) 5 linee di pomodoro [Biliardino nano, Pizzaiola, Cerasella (ibrido F1), Pixel e Cirio 3] sono state sistemate in tunnel-serra secondo un modello sperimentale di randomizzazione completa (**Fig. 34**) e infestate con 20 coppie di *T. absoluta*. Per evitare il volo e la successiva dispersione degli adulti dalle piante trattato alle piante controllo, il tunnel-serra è stato opportunamente separato da un setto costituito da microrete in tela. Ogni linea era costituita da 20 repliche per un totale di 200 piante (100 trattato + 100 controllo). La verifica delle avvenute ovideposizioni è stata effettuata 4 giorni dopo l'infestazione.



Fig. 34– Sistemazione randomizzata delle piante delle varie linee all'interno del tunnel-serra (randomizzazione completa 20 repliche). A destra sono visibili le piante tesi mentre a sinistra le piante controllo.

Il prelievo del materiale vegetale infestato e di controllo, finalizzato all'estrazione dell'RNA totale e ad analisi trascrittomiche di tipo RNA-seq, è stato effettuato 12 giorni dopo l'infestazione. Tale analisi è stata adottata allo scopo di valutare eventuali differenze nell'assetto trascrittomico complessivo delle piante controllo e trattato ed a individuare putativi geni candidati di suscettibilità, tolleranza e/o resistenza.

§ 6.4 – **Biosaggi in camera climatica**

Nel **2013** sono stati effettuati, in via preliminare, biosaggi differenziali-comparativi finalizzati a confermare la presunta bassa suscettibilità delle linee a bacca tonda Biliardino nano, Biliardino alto e Cerasella evidenziata dai biosaggi precedenti. Allo scopo in camera climatica con temperatura di 26 °C, umidità relativa del 60%, condizioni luce/buio 16:8 sono state sistemate separatamente in ogni isolatore di legno, dotato di microrete in nylon, 4 linee di pomodoro [Biliardino nano, Pizzaiola, Cerasella, Cirio (controllo)]. Sono state predisposte 5 repliche per linea e in ogni isolatore sono stati inseriti 8 coppie di adulti.

Il rilievo delle ovideposizioni è stato effettuato dopo 3 giorni dalle infestazioni con conteggio delle uova ogni 2 giorni fino a 11 giorni dall'accoppiamento degli adulti. I rilievi riguardanti le foglie minate e le bacche infestate sono state effettuate rispettivamente 11 e 16 giorni dopo le infestazioni. La valutazione ponderale delle larve mature di IV età III giorno è stata effettuata 13 giorni dopo le infestazioni e struttu-

rata in 3 punti campionari; venivano pesati su bilancia analitica, tipo Sartorius TE1502S, gruppi di 3 larve prelevate da 3 repliche delle 4 linee per un totale di 12 gruppi costituiti da 36 larve totali.

La valutazione ponderale delle crisalidi è stata effettuata 18 giorni dopo le infestazioni e strutturata in 3 punti campionari; le pesate erano costituite da gruppi di 5 crisalidi prelevate da 3 repliche delle 4 linee per un totale di 12 gruppi di 60 crisalidi totali.

Successivamente sono stati effettuati **ulteriori biosaggi** realizzati analizzando 5 linee di pomodoro (Biliardino nano, Pizzaiola, Cerasella (ibrido F1), Biliardino alto e San Marzano). Per ogni linea sono state predisposte 15 repliche per un totale di 75 piante. Ogni isolatore è stato allestito con 3 repliche di ogni linea per un totale di 15 piante ad isolatore secondo un sistema di randomizzazione completa. Per le infestazioni controllate sono state utilizzate 8 coppie di adulti ad isolatore. I fattori sperimentali rilevati sono qui di seguito riportati.

§ 6.4.1 – Osservazioni biotrofiche

A) Valutazione ovideposizioni

Le uova sono state rilevate 3 giorni dopo le infestazioni; le osservazioni sono state effettuate ogni 2 giorni fino a 11 giorni dall'accoppiamento degli adulti. Contestualmente è stata valutata anche la localizzazione delle medesime sui diversi palchi nonché la loro densità di distribuzione per cm² di foglia.

B) Valutazione foglie minate

Il rilievo sulla percentuale delle foglie minate è stata rilevata 10 giorni dopo le infestazioni e strutturato in 3 punti campionari distanziati di 6 giorni; l'ultima osservazione è stata effettuata 21 giorni dopo l'infestazione. Contestualmente a queste osservazioni le mine fogliari sono state tipizzate secondo forma, aspetto e dimensione. Nella tipizzazione è stata valutata l'eventuale presenza di mine sinuose non coalescenti a sviluppo isodiametrico (**Fig. 35**), di mine coalescenti-vescicolose slargate a sviluppo radiale (**Fig. 36**) derivanti dalla fusione di due o più mine, di mine coalescenti vescicolose (**Fig. 37a**) e digitiformi (**Fig. 37b**) secondo quanto descritto da MALUF ET AL., 2010; RESENDE ET AL., 2006; AZEVEDO ET AL., 2003; LEITE ET AL., 2012; OLIVEIRA ET AL., 2009. Contestualmente è stata anche rilevata la larghezza della camera vescicolosa in mine coalescenti.



Fig. 35 – Mina a sviluppo isodiametrico non coalescente



Fig. 36 – Tipica mina colaescente a sviluppo radiale

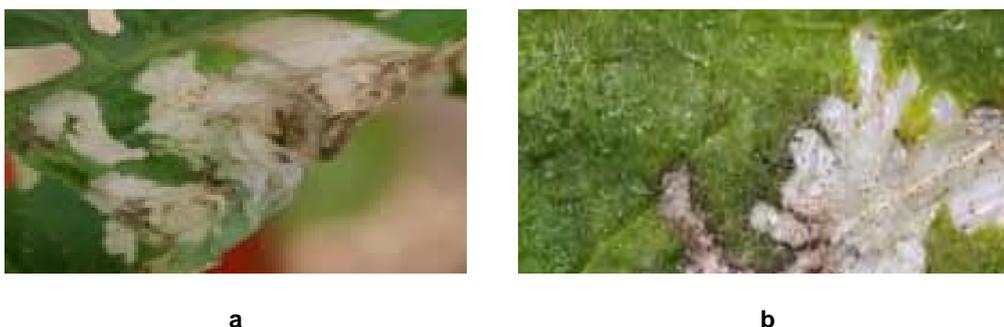


Fig. 37 – Tipica mina coalescente vescicolosa (a) e con espansioni digitiformi (b).

C) Valutazione numero mine fogliari totali a pianta

Tale rilievo è stato effettuato contestualmente alle osservazioni fatte sulle foglie minate.

D) Percentuale superficie fogliare minata

Questo fattore sperimentale è stato ottenuto mettendo in proporzione le aree superficiali delle mine e delle foglie mediante ap-

prossimazione regolare elaborata con la seconda regola di Simpson. L'area superficiale della foglia è stata approssimata a quella di un triangolo isoscele mentre quella della mina ad un rettangolo. Il rilievo è stato effettuato 15 giorni dopo le infestazioni e strutturato in 4 punti campionari distanziati di 5 giorni; l'ultima osservazione è stata eseguita 35 giorni dopo le infestazioni. Sono stati elaborati i valori medi ottenuti da 6 foglie raccolte per singola replica delle diverse linee.

E) Densità distributiva mine per cm² di foglia

Tale fattore sperimentale è stato determinato dal rapporto tra numero totale di mine a foglia e l'area superficiale della foglia approssimata a quella di un triangolo isoscele ed espresso come numero totale di mine per cm² di foglia. Il rilievo è stato effettuato 31 giorni dopo l'infestazione e strutturato in 3 punti campionari distanziati di 4 giorni: l'ultima osservazione è stata effettuata 38 giorni dopo le infestazioni. Sono stati raccolti i valori medi ottenuti da 6 foglie raccolte per singola replica.

F) Numero mine su fusto

Il numero e i tipi di mine su fusto sono stati rilevati 57 giorni dopo le infestazioni contestualmente ai rilievi effettuati sulle bacche. Anche per la tipizzazione di mine caulinarie è stata valutata l'eventuale presenza di mine non coalescenti (**Fig. 38a**) e coalescenti (**Fig. 38b**).



Fig. 38 – Mine non coalescenti (a) e coalescenti su fusti (b).

G) Valutazione bacche infestate

Il rilievo riguardante la percentuale di infestazione su bacche è stato effettuato 57 giorni dopo le infestazioni e strutturato in 3 punti campionari distanziati di 6 giorni; l'ultima osservazione è stata effettuata 69 giorni dopo le infestazioni. Contestualmente sono stati rilevati anche il numero di fori a bacca, il numero ed il tipo di mine a bacca. Anche per la tipizzazione di mine su bacca è stata valutata l'eventuale presenza di mine non coalescenti (**Fig. 39a**) e coalescenti (**Fig. 39b**).



Fig. 39 – Mine non coalescenti (a) e coalescenti (b) su bacche.

§ 6.4.2 – Osservazioni biometriche

A) Valutazioni ponderali larve

Le valutazioni ponderali sono state effettuate su larve di III età I giorno dopo 16 giorni dalle infestazioni e sono state strutturate in 3 punti campionari. Le larve venivano accuratamente escisse dalle mine con l'ausilio di uno spillo entomologico e pesate su bilancia analitica tipo Sartorius TE1502S; il materiale biologico utilizzato nelle pesate, una volta escisso dalle mine, veniva mantenuto su foglie di pomodoro fresche sistemate in piastre Petri con il picciolo in eppendorf contenente H₂O distillata per evitarne il disseccamento.

Ogni gruppo di pesata era costituito da 3 larve prelevate da 6 repliche delle 5 linee per un totale di 30 gruppi costituiti da 90 larve totali.

B) Valutazioni ponderali crisalidi

Tale valutazione è stata effettuata 24 giorni dopo le infestazioni e strutturata in 3 punti campionari. Le crisalidi venivano accuratamente escisse dalle mine con l'ausilio di uno spillo entomologico e pesate su bilancia analitica tipo Sartorius TE1502S; il materiale biologico utilizzato nelle pesate, una volta escisso dalle mine, veniva mantenuto su carta da filtro autoclavata adagiata sul fondo di piastre Petri. Ogni gruppo di pesata era costituito da 3 crisalidi prelevati da 6 repliche delle 5 linee per un totale di 30 gruppi costituiti da 90 crisalidi totali.

C) Valutazione durata embriogenesi

La valutazione della durata dell'embriogenesi è stata determinata contestualmente al rilievo delle ovideposizioni effettuato durante i biosaggi.

D) Valutazione durata ciclo larvale

Per poter valutare con precisione la durata del ciclo larvale, sono state stadiate le larve di IV età III giorno osservando caratteri distintivi morfometrici quali: lunghezza totale del corpo, larghezza della capsula cefalica, colore del capo, colore della placca protoracica e prominenze delle corone ambulacrali, come riportato da Sannino et Espinosa., 2010b (**Tab. 13**), per distinguerle dalle eopupe I giorno.

Caratteri distintivi larve IV età III giorno	Caratteristiche morfometriche e cromatiche
Lunghezza massima corpo	7-8 mm
Larghezza capsula cefalica	0,55-0,60 mm
Colore capo	giallo, anneriti ai lati e posteriormente, fino all'angolo epicraniale
Colore placca protoracica	giallognola col budo posteriore castano-nericcio
Caratteristiche corone ambulacrali	aperte sul lato esterno per almeno ¼ della loro ampiezza

Tab. 13 – Caratteri morfometrici distintivi di larve mature di *T. absoluta* come descritto da SANNINO e ESPINOSA 2010b.

E) Valutazione durata ninfosi

Prima delle osservazioni le eopupe di II giorno sono state accura-

tamente escisse e prelevate dalle mine e disposte in capsule Petri per l'ottenimento delle crisalidi di cui è stata seguita l'evoluzione fenologica.

§ 6.4.3 – Osservazioni sul potenziale biotico

Fecondità femmine

Per determinare la fecondità delle femmine espressa come numero medio di uova/femmina, una volta ottenute le crisalidi, queste sono state sessate e inserite singolarmente in eppendorf da 1 ml fino alla sfarfallamento degli adulti. Successivamente ogni femmina neosfarfallata è stata fatta accoppiare con 2 maschi in un piccolo isolatore di plastica contenente 3 foglioline di pomodoro raccolte da 5 repliche di ogni linea e mantenute su di una spugna idrofila. Le femmine (n= 65) durante l'ovideposizione sono state alimentate su un batuffolo di cotone imbevuto con una soluzione di melassa al 10%. Le osservazioni sono state effettuate dopo 30 ore dall'accoppiamento (**Fig. 40**).



Fig. 40 – Femmina di *T. absoluta* durante l'ovideposizione.

4.

Risultati

§ 1 – Isolamento del gene ortologo 102 in *Tuta absoluta*

§ 1.1 – Reazioni di RT-PCR sugli estratti e ottenimento del cDNA

Nelle reazioni di PCR,effettuate sugli estratti ottenuti (**Fig. 41**), con gli oligodegenerati Dros1- Dros2 e Spod1-Spod2 non è stata ottenuta nessuna banda di amplicato. Con gli oligo Hels2, disegnati sulla regione più conservata del cDNA 102 di *H. virescens*, è stata ottenuta una banda di amplicato di bassa intensità e corrispondente alla lunghezza attesa di 580 bp. Sono state ottenute le stesse bande utilizzando sia oligo-dT che decameri random (**Fig. 42**).

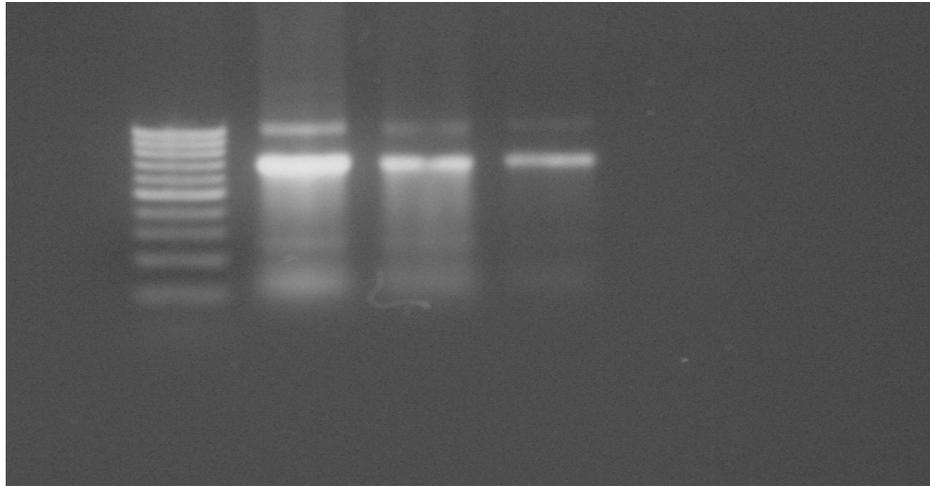


Fig. 41 – Estratti di RNA totale ottenuti da 6 larve di IV età III giorno di *T. absoluta*.

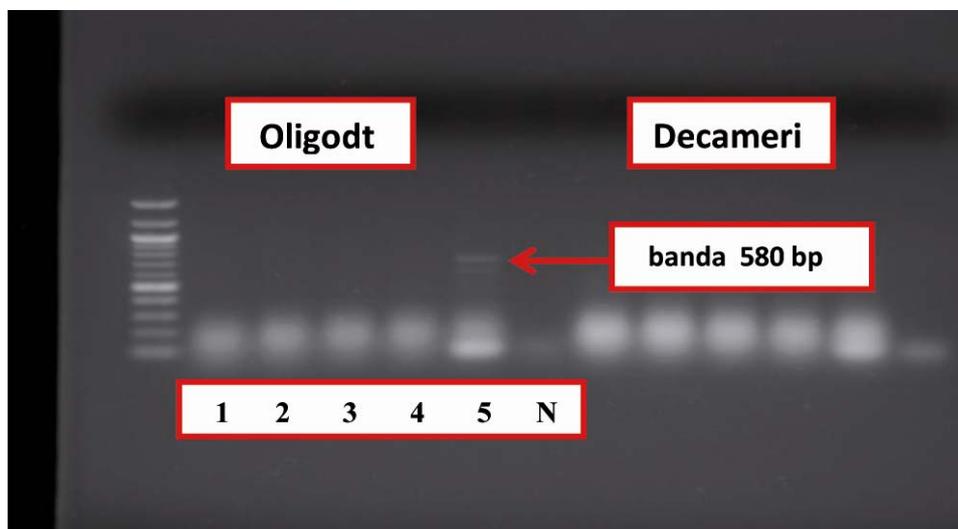


Fig. 42 – Reazioni di RT-PCR sugli estratti e ottenimento della banda di amplificato pari alla lunghezza attesa di 580 bp (banda 5). 1. Dros1; 2. Dros2; 3. Spod1; 4. Spod2; 5. HelS2; N. Negativo

§ 1.2 – **Ottimizzazione delle reazioni di PCR: scelta oligo Spod FE e Spod RE**

Per ottimizzare le rese di amplificazione, sono stati utilizzati gli oligo FE (forward esterno) ed RE (reverse esterno) disegnati sulle regioni più conservate del 102 cDNA di *S. littoralis*.

Con suddetti oligo sono stati ottenuti prodotti PCR della stessa lunghezza attesa (580 bp) di quelli amplificati nel nottuide.

Nell'amplificazione sono stati utilizzati anche altri oligo (coppia FR-RR) disegnati su una regione più esterna rispetto a quella amplificata dagli oligo FE e RE normalmente meno conservata nel 102.

Il prodotto PCR ottenuto con questi ultimi oligo, di lunghezza pari a 111 bp, non è stato utilizzato in prove successive in quanto di

bassa intensità e poco rappresentativo (**Fig. 43**). Sono state riamplicate, in reazioni PCR di 50 μ l, solo bande ottenute con le coppie di oligo Spod FE-Spod RE (**Fig. 44**).

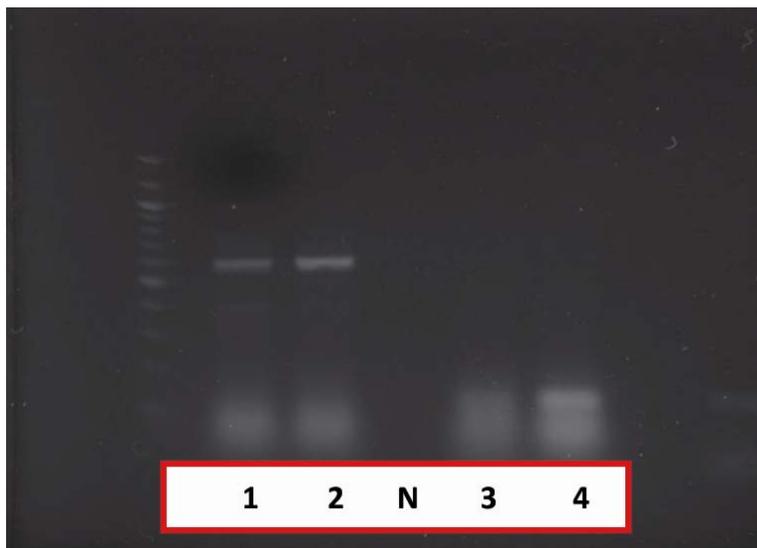


Fig. 43 – 1. amplificato (oligodT) 580 bp con oligo FE/RE; 2. amplificato (decameri) 580 bp con oligo FE/RE; 3. amplificato (oligodT) 111 bp con oligo FR/RR 4. amplificato (decameri) 111 bp con oligo FR/RR.



Fig. 44 – PCR sui cDNA con soli oligo Spod FE-Spod RE. 1-2-3-4. amplificati (oligodT) 580 bp; N. Negativo.

§ 1.3 – Clonaggio amplificato del putativo gene ortologo 102

Dopo minipreparazione del DNA plasmidico e reazione di digestione con enzima EcoRI sono stati sequenziati i putativi cloni 102 (campioni 1-2-3-4) di corrispondenza prossima alla banda di amplificato della lunghezza attesa di 580 bp. Il clone 4 è stato considerato l'unico altamente putativo in quanto esattamente corrispondente alla lunghezza attesa dell'amplificato di 580 bp (**Fig. 45**).

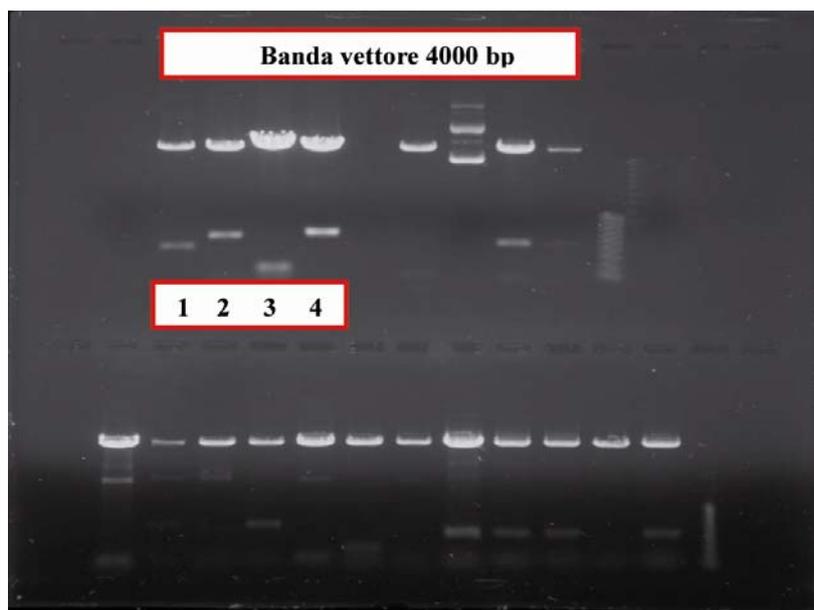


Fig. 45 – Digestione degli inserti con enzima EcoRI e visualizzazione dei putativi cloni 102 (campioni 1-2-3-4) su gel di agarosio.

§ 1.4 – Sequenziamento dei putativi inserti clonati e analisi bioinformatiche

In seguito a sequenziamento sono state effettuate delle analisi bioinformatiche BLAST e multiallineamenti ClustalW al fine di con-

frontare le sequenze clonate con quelle del gene 102 di *H. virescens* e di *S. littoralis*.

I risultati di quest'attività sono riassunti di seguito. La sequenza del gene putativo ortologo 102 isolata da *T. absoluta* presenta un'identità del 99% rispetto a quella di *S. littoralis* (**Fig. 46**); vi è invece una identità dell'88% con quella di *H. virescens* (**Fig. 47**). Similmente dall'allineamento tra la proteina di *S. littoralis* e quello di *T. absoluta* vi è una identità del 98% (**Fig. 48**), mentre tra la proteina di *H. virescens* e quella del gelechide il grado di identità è più basso (96%) (**Fig. 49**). Le sequenze lette con gli elettroferogrammi ottenuti utilizzando oligo M13 For e M13 Rev hanno evidenziato che la parte di sequenza pulita, caratterizzata da picchi di altezza e larghezza netti, corrisponde esattamente alla banda di lunghezza attesa isolata pari a 580 bp. Infatti la parte di sequenza oggetto di studio è quella compresa tra il nucleotide 86 ed il nucleotide 665 (**Fig. 50**).

I livelli di identità ritrovati mediante queste analisi bionformatiche evidenziano che le bande clonate ottenute corrispondono alla sequenza più conservata del gene ortologo 102 di *T. absoluta*.

```

lcl|29083.4.tuta_f_M13uni.580bp (sequenza Tuta/spodoptera)
Length=580

Score = 1055 bits (571), Expect = 0.0
Identities = 578/581 (99%), Gaps = 2/581 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGCCAAACCAGCGCTCTGTGCGAAGGACGACAAAGCACCG 60
      |||
Sbjct 1 TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGCCAAACCAGCGCTCTGTGCGAAGGACGACAAAGCACCG 60

Query 61 TCAAACCTCCTGAGCGTGCCTGAGAATGTGTGGAATGGTCCAACAATCAGGCCTTTTGCT 120
      |||
Sbjct 61 TCAAACCTCCTGAGCGTGCCTGAGAATGTGTGGAATGGTCCAACAATCAGGCCTTTTGCT 120

Query 121 GCCCTCTTCGACAACCTACCACAAAAACGTGATAAGGCCAGAATTTGTCACACCTAATGAG 180
      |||
Sbjct 121 GCCCTCTTCGACAACCTACCACAAAAACGTGATAAGGCCAGAATTTGTCACACCTAATGAG 180

Query 181 GAAACGGAACAAGTCACCTTTATAAACACAATCCTCGCGACCGGCCAGTCAGGAGTCTA 240
      |||
Sbjct 181 GAAACGGAACAAGTCACCTTTATAAACACAATCCTCGCGACCGGCCAGTCAGGAGTCTA 240

Query 241 ATGAACTTTTGGTCAGCAAAGGTTTGACTCAGATGAATGAATACAATGAGCAAGTGCAA 300
      |||
Sbjct 241 ATGAACTTTTGGTCAGCAAAGGTTTGACTCAGATGAATGAATACAATGAGCAAGTGCAA 300

Query 301 CTGCTGAAGAAGATCTGGTTCACAAAGTACGCGCGCCACTGGACCGGCCTCTGCAAGTGC 360
      |||
Sbjct 301 CTGCTGAAGAAGATCTGGTTCACAAAGTACGCGCGCCACTGGACCGGCCTCTGCAAGTGC 360

Query 361 AGCTGCGCCTTCGAGAACATTTTCATGGCCGAACCTAAGTCCAACGACGACTTGGACTC 420
      |||
Sbjct 361 AGCTGCGCCTTCGAGAACATTTTCATGGCCGAACCTAAGTCCAACGACGACTTGGACTC 420

Query 421 CACAGTTGGCTGTTCTTCGCCAAGCGTGAACAAGATCGCAAAGCCAATTACTTGGGCTAC 480
      |||
Sbjct 421 CACAGTTGGCTGTTCTTCGCCAAGCGTGAACAAGATCGCAAAGCCAATTACTTGGGCTAC 480

Query 481 ATAGACAACTGGATCTCTCTGGGAAAAGAATGATTCTGAAGCAGCACTCCGTTTGGAGT 540
      |||
Sbjct 481 ATAGACAACTGGATCTCTCTGGGAAAAGAATGATTCTGAAGCAGCACTCCGTTTGGAGT 540

Query 541 GACACTAAAGGAC-CCCCGGAGGTGACATGTTTCGTGGGCC 580
      |||
Sbjct 541 GACACTAA-GGACGCCCGGAGGTGACAATGTTTCGTGGGCC 580

```

Fig. 46 – Allineamento sequenza nucleotidica Tuta/Spodoptera. Le frecce in rosso indicano l'unica differenza nucleotidica mentre quelle in blu le delezioni di base. Grado di identità: 99%

```

lcl|1185 4 tuta_f_M13uni 580bp
Length=580 (allineamento sequenza conservata Tuta/Heliothis)

Score = 682 bits (369), Expect = 0.0
Identities = 515/585 (88%), Gaps = 12/585 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

The figure displays a sequence alignment between a query sequence (Tuta) and a subject sequence (Heliothis). The alignment is shown in a standard format with 'Query' and 'Sbjct' lines. Red arrows point to nucleotide differences between the two sequences. Blue arrows point to gaps in the subject sequence, indicating base deletions. The alignment starts at position 355 for the query and 1 for the subject, ending at 933 for the query and 579 for the subject. The overall identity is 88% (515/585) with 2% gaps (12/585).

```

Query 355 TACATCCAAGTTAATCTGCAAGG-CAAGACCAGCCCACTATCGAAGGATGACAAAGCGCC 413
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 1   TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGCCAA-ACCAGCGCTCTGTGCAAGGACCACAAAGCACC 59
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 414 AG-CCAACCTCCTGAGCGTGCCTGAAAACGTGTGGAATGGTCCAACAATAAGGCCATTG 472
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 60  -GTCAAACCTCCTGAGCGTGCCTGAGAATGTGTGGAATGGTCCAACAATCAGGSCCTTTG 118
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 473 CTGCACCTTCGACAATTACCACAAAAACGTGATAAGACCAGAATTCGTCACGCCCAATG 532
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 119 CTGCCCTTCGACAATTACCACAAAAACGTGATAAGCCAGAATTTGTCACACCTAATG 178
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 533 AGGAAACGGAACAAGTCACTTTTATAAACACAATCCTTGCGACCGGACCAATTAGGAGTC 592
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 179 AGGAAACGGAACAAGTCACTTTTATAAACACAATCCTTGCGACCGGGCCAGTCAGGAGTC 238
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 593 TGATGAACTTTTGGTTAGCAAAGGCCTT-ACCCAAATGAACGAGTACAACGAGCAGGTA 651
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 239 TAATGAACTTTTGGTCAGCAAAGGT-TTGACTCAGATGAATGAATACAATGAGCAAGT- 296
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 652 G-AGCTGCTGAAGAAGATCTGGTTCACGAAGTACGCGCGCCACTGGACCGGGCTGTGCAA 710
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 297 GCAACTGCTGAAGAAGATCTGGTTCACAAAGTACGCGCGCCACTGGACCGGCTCTGCAA 356
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 711 GTGCAGCTGCGCCTTCGAGAACATCTTCATGGCTGAGCTCAAGTCCAACGACGTGCTCGG 770
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 357 GTGCAGCTGCGCCTTCGAGAACATTTTCATGGCCGAACCTAAGTCCAACGACGTACTTGG 416
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 771 CCTCCACAGCTGGTTGTTCTTCGCTAAGCGGAACAAGATCGCAAGGCCAATTACTTGGG 830
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 417 ACTCCACAGTTGGCTGTTCTTCGCCAAGCGTGAACAAGATCGCAAAGCCAATTACTTGGG 476
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 831 CTACTTGATAAACTAGATCTGTCCGGGAAAGGAATGATCCTGAAGCAGCACTC-GATTC 889
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 477 CTACATAGACAAACTGGATCTCTCTGGGAAAGGAATGATTCTGAAGCAGCACTCCGTTT- 535
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Query 890 TGAGTGAGACCAAGGACGCGCCCG-AGGTGACCATGTTTCGTGGGC 933
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 536 TGAGTGACACTAAGGACGC-CCCGGAGGTGACAATGTTTCGTGGGC 579
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

```

Fig. 47 – Allineamento sequenza nucleotidica *Tuta/Heliothis*. Identità: 88%. Le frecce in rosso indicano le differenze nucleotidiche mentre quelle in blu le delezioni di base.

```

Score = 397 bits (1020), Expect = 6e-116, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 190/193 (98%), Positives = 190/193 (98%), Gaps = 0/193 (0%)
-----
Query 1  YIQVNLQGQTSALS KDDKAPSNLLSVPENVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNE 60
          YIQVNLQGQTSALS KDDKAPSNLLSVPENVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNE
Sbjct 1  YIQVNLQGQTSALS KDDKAPSNLLSVPENVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNE 60

Query 61  ETEQVTFINTILATGPVRS LMNFLVSKGLTQMNEYNEQVQLLKKIWFTKYARHWTGLCKC 120
          ETEQVTFINTILATGPVRS LMNFLVSKGLTQMNEYNEQVQLLKKIWFTKYARHWTGLCKC
Sbjct 61  ETEQVTFINTILATGPVRS LMNFLVSKGLTQMNEYNEQVQLLKKIWFTKYARHWTGLCKC 120

Query 121 SCAFENIFMAELKSNDV LGLHSWLF FAKREQDRKANYLGYIDKLDLSGKGMILKQHSVLS 180
          SCAFENIFMAELKSNDV LGLHSWLF FAKREQDRKANYLGYIDKLDLSGK MILKQHSVLS
Sbjct 121 SCAFENIFMAELKSNDV LGLHSWLF FAKREQDRKANYLGYIDKLDLSGKRMILKQHSVLS 180
          ↓
Query 181 DTKDAPEVTMFVG 193
          DTK PEVTMFVG
Sbjct 181 DTKGPPEVTMFVG 193
          ↑

```

Fig. 48 – Allineamento sequenza amminoacidica *Tuta/Spodoptera*. Le differenze sono evidenziate dalle frecce in rosso. Identità: 98%.

```

Score = 399 bits (1026), Expect = 3e-116, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 185/193 (96%), Positives = 192/193 (99%), Gaps = 0/193 (0%)
-----
Query 119 YIQVNLQGKTSPLSKDDKAPANLLSVPENVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNE 178
          YIQVNLQG+TS LSKDDKAP+NLLSVPENVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNE
Sbjct 1  YIQVNLQGQTSALS KDDKAPSNLLSVPENVWNGPTIRPFAALFDNYHKNVIRPEFVTPNE 60

Query 179 ETEQVTFINTILATGP+RSLMNFLVSKGLTQMNEYNEQV+LLKKIWFTKYARHWTGLCKC 238
          ETEQVTFINTILATGP+RSLMNFLVSKGLTQMNEYNEQV+LLKKIWFTKYARHWTGLCKC
Sbjct 61  ETEQVTFINTILATGPVRS LMNFLVSKGLTQMNEYNEQVQLLKKIWFTKYARHWTGLCKC 120

Query 239 SCAFENIFMAELKSNDV LGLHSWLF FAKREQDRKANYLGYLDKLDLSGKGMILKQHSVLS 298
          SCAFENIFMAELKSNDV LGLHSWLF FAKREQDRKANYLGY+DKLDLSGKGMILKQHS+LS
Sbjct 121 SCAFENIFMAELKSNDV LGLHSWLF FAKREQDRKANYLGYIDKLDLSGKGMILKQHSVLS 180
          ↓
Query 299 ETKDAPEVTMFVG 311
          +TKDAPEVTMFVG
Sbjct 181 DTKDAPEVTMFVG 193
          ↓

```

Fig. 49 – Allineamento sequenza amminoacidica *Tuta/Heliothis*. Le differenze sono indicate dalle frecce in rosso. Identità: 96%.



Fig. 50 – Elettroferogramma clone 4 102. I picchi netti e di intensità più rappresentativa interessano la parte di sequenza corrispondente alla lunghezza attesa di 580 bp che va dal nucleotide 86 al nucleotide 666. La parte di sequenza che precede il nt 74 fa parte del polylinker del vettore.

§ 2 – Caratterizzazione strutturale gene ortologo 102

§ 2.1 – RACE 5'

Nel RACE 5' il numero di basi da allungare sono state ipoteticamente stimate effettuando confronti con il cDNA 102 completo di *S. littoralis* lungo 1317 bp. Da questi confronti risulta che la sequenza da allungare a suddetta estremità corrisponderebbe ad un valore compreso tra 400 e 500 bp. Mediante prove di amplificazione con oligo GSP2 specifico e oligo AAP universale è stata ottenuta una banda lunga 180 bp endogena alla sequenza conservata (**Fig. 51**). L'amplificato del prodotto 5' RACE (dCtailed cDNA) non corrisponde alla lunghezza attesa e stimata mediante confronto con il cDNA 102 di *S. littoralis*.

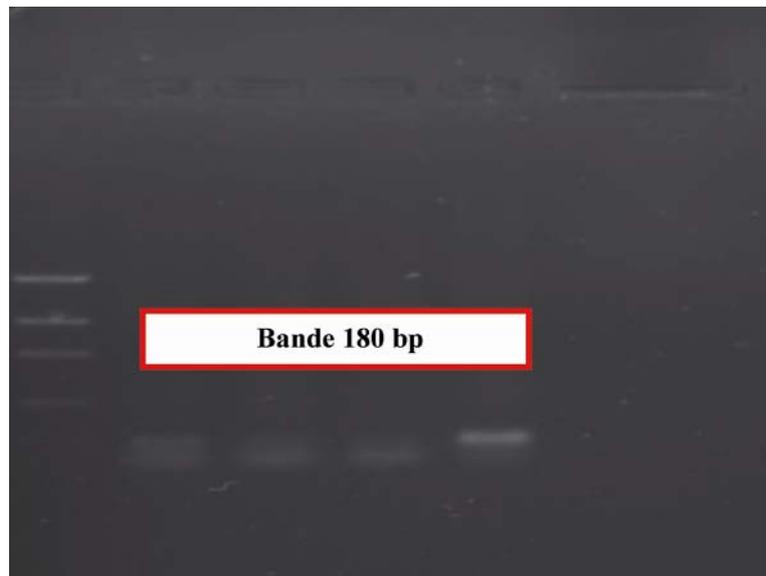


Fig. 51 – La banda del prodotto RACE 5' è lunga 180 bp ed è endogena alla sequenza isolata del cDNA 102 di *T. absoluta*. Il dCtailed cDNA ottenuto non corrisponde quindi alla lunghezza stimata mediante confronto con il cDNA 102 di *S. littoralis*.

§ 2.2 – RACE 3'

Dai confronti effettuati con il cDNA 102 di *S. littoralis* risulta che la sequenza da allungare a suddetta estremità corrisponderebbe a circa 500 bp. Mediante prime prove di amplificazione con oligo GSP specifico e oligo AUAP universale sono state ottenute bande della lunghezza attesa di 496 bp (**Fig. 52**). Dopo clonaggio, sono state eseguite prove tecniche di PCR con oligo GSP RACE 3' Tuta forward e Spod RE come controllo positivo finalizzato ad accertare la presenza degli inserti clonati (**Fig. 53**). Tali primers di controllo, capaci di amplificare parte dell'inserto, hanno fornito una banda di amplificato della lunghezza attesa di 166 bp (**Fig. 54**).

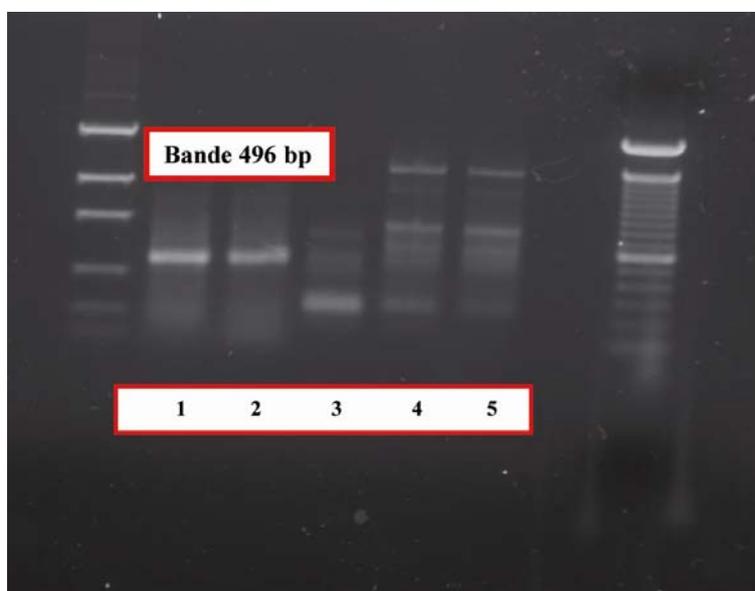


Fig. 52 – Mediante prime prove di amplificazione con oligo GSP specifico e oligo AUAP universale sono state ottenute bande della lunghezza attesa di 496 bp ottenute mediante confronto con la sequenza più conservata del cDNA 102 di *S. littoralis*. 1. PCR primaria cDNA 6 larve; 2. PCR primaria 12 larve; 3. Controllo RACE 3'; 4. PCR nested 6 larve; 5. PCR nested 12 larve.

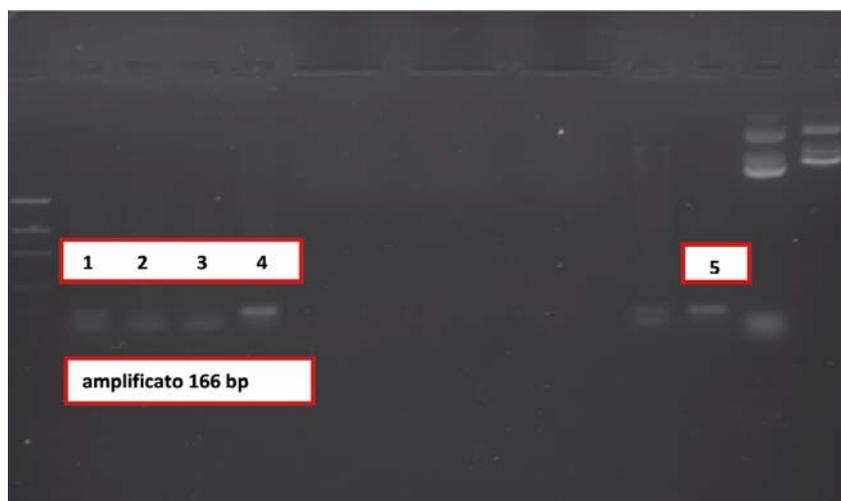


Fig. 53 – Prove tecniche di PCR con oligo GSP RACE 3' Tuta forward e Spod RE utilizzati come controllo positivo finalizzato ad accertare la presenza degli inserti clonati. Tali primers di controllo, capaci di amplificare parte dell'inserto, hanno fornito una banda di amplificato della lunghezza attesa di 166 bp. 1.amplificato MP 2; 2. amplificato MP 3; 3. amplificato MP 6; 4. amplificato MP 8; 5. amplificato MP 9.

```
TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGCCAAACCAGCGCTCTGTCTGAAGGACGACAAAGCACCGT
CAAACCTCCTGAGCGTGCCTGAGAATGTGTGGAATGGTCCAACAATCAGGCCTTTTGCTGC
CCTCTTCGACAACCTACCACAAAAACGTGATAAGGCCAGAATTTGTCACACCTAATGAGGAA
ACGGAACAAGTCACTTTTATAAACACAATCCTCGCGACCGGGCCAGTCAGGAGTCTAATGA
ACTTTTTGGTCAGCAAAGGTTTGACTCAGATGAATGAATACAATGAGCAAGTGCAACTGCT
GAAGAAGATCTGGTTCACAAAGTACGCGGCCACTGGACCGGCCTCTGCAAGTGCAGCTGC
GCCTTCGAGAACATTTTCATGGCCGAACCTAAGTCCAACGACGTACTTGGACTCCACAGTT
GGCTGTTCTTCGCCAAGCGTGAACAAGATCGCAAAGCCAATTACTTGGGCTACATAGACAA
ACTGGATCTCTCTGGGAAAGGAATGATTCTGAAGCAGCACTCCGTTTTGAGTGACACTAAG
GACGCCCCGGAGGTGACAATGTTTCGTGGGCC
```

Fig. 54 – Prove PCR di controllo per validare la presenza degli inserti clonati (**controllo su sequenza**). In rosso sono riportati gli oligo GSP specifico e l'oligo Spod RE. La parte di sequenza sottolineata in grigio indica l'amplificato di controllo lungo 166 bp.

§ 3 – Prove di interferenza gene specifica

§ 3.1 – Biosaggi di microinfiltrazione fogliare

Nella microinfiltrazione fogliare non vi era nessuna differenza significativa nel numero di adulti sfarfallati tra controllo e trattato ad entrambe le concentrazioni di dsRNA solutions microinfiltrate (1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 2,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in parenchima fogliare (**Fig. 55**). È stato inoltre osservato che l'effetto non è stato concentrazione-dipendente.

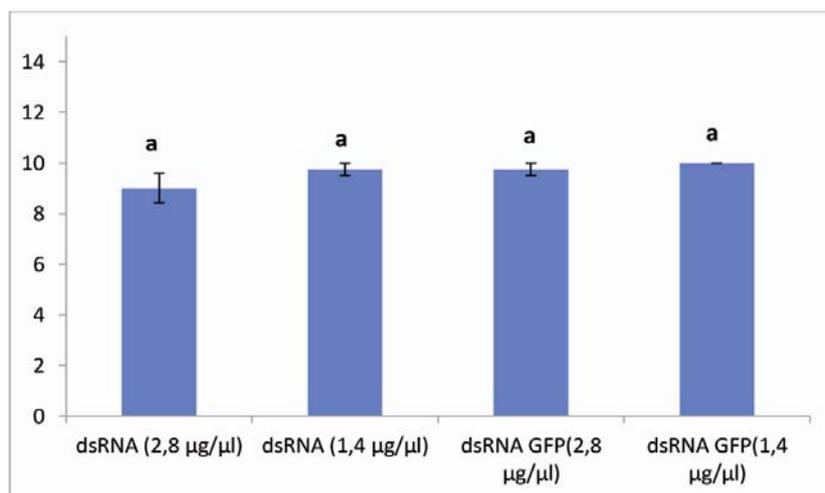


Fig. 55 – Percentuale dello sfarfallamento degli adulti derivante da larve sviluppate in mine microinfiltrate con soluzioni stabilizzate di dsRNA 102 e di dsRNA GFP. Non sono state osservate differenze significative tra tesi trattato e tesi controllo (df = 2; MS = 0,625; $P \geq 0,05$).

§ 3.2 – Trattamenti sulle uova

§ 3.2.1 – Trattamenti non decorionanti

Valutando l'assenza del pretrattamento decorionante e il tempo di residenza della dsRNA solution di 24 ore, per le tre tesi trattato di 2000 ng/u, 200 ng/u e 20 ng/u, è stata rilevata una percentuale di

schiusa rispettivamente di 82,5%, 80% e 89%; nel controllo (dsRNA GFP) è stata osservata una percentuale di schiusa dell'89%. Non è stato osservato nessun effetto concentrazione-dipendente per il fattore sperimentale rilevato (**Fig. 56**).

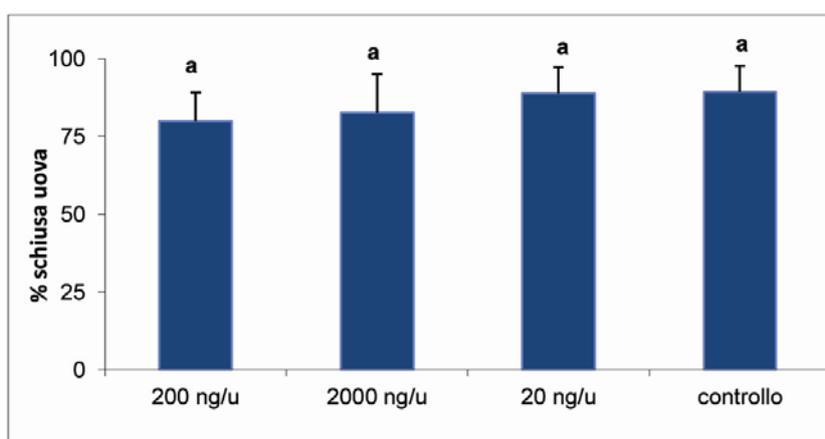


Fig. 56 – a) Nessun pretrattamento; b) Tempo di residenza della dsRNA solution di 24 ore. Il trattamento con dsRNA 102 non riduce in maniera significativa la schiusa delle uova (df = 3, MS = 4,885; $P \geq 0,05$)

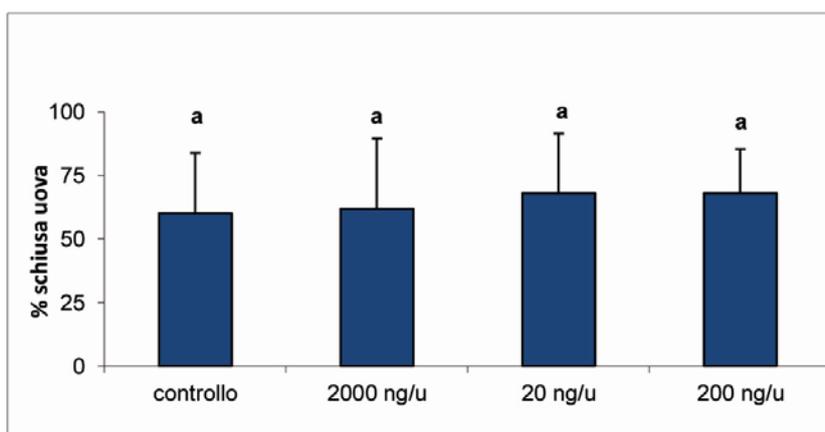


Fig. 57 – a) Nessun pretrattamento; b) Tempo di residenza della dsRNA solution di 24 ore. Il trattamento con dsRNA 102 non riduce in maniera significativa la schiusa delle uova (df = 3, MS = 393,756; $P \geq 0,05$).

Valutando il tempo di residenza della dsRNA solution di 48 ore, i valori associati alla percentuale di schiusa risultano essere più bassi e approssimabili al 68% per le tesi di 200 ng/u e 20 ng/u e di 62% per la tesi di 2000 ng/u. Nel controllo è stato riscontrato un valore di schiusa pari al 60% (**Fig. 57**).

§ 3.2.2 – Trattamenti decorionanti

Valutando l'assenza del pretrattamento decorionante e il tempo di residenza della dsRNA solution di 24 ore, per le tre tesi trattato di 2000 ng/u, 200 ng/u e 20 ng/u, è stata rilevata una percentuale di schiusa approssimabile all'88%; nel controllo (dsRNA GFP) è stata osservata una percentuale di schiusa del 92%.

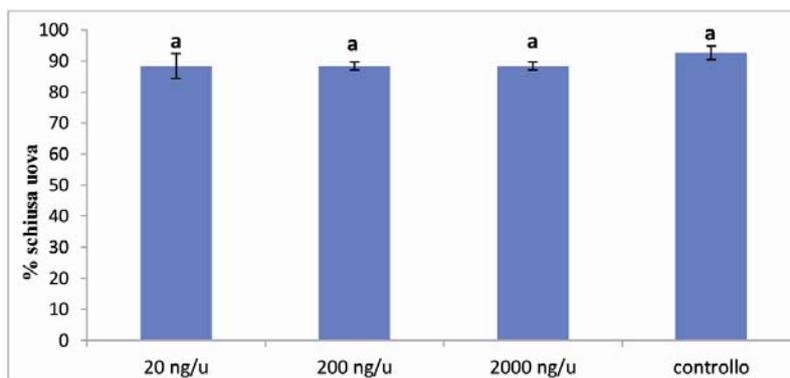


Fig. 58 – a) pretrattamento decorionante con Chorox al 5%; b) tempo di residenza della dsRNA solution di 24 ore. Il trattamento con dsRNA 102 non riduce in maniera significativa la schiusa delle uova (df = 3; MS = 456,786; $P \geq 0,05$)

L'effetto del pretrattamento decorionante con candeggina non ha inibito significativamente la schiusa rispetto al trattamento eseguito

con la sola dsRNA solution e non è stato osservato nessun effetto concentrazione-dipendente (**Fig. 58**).

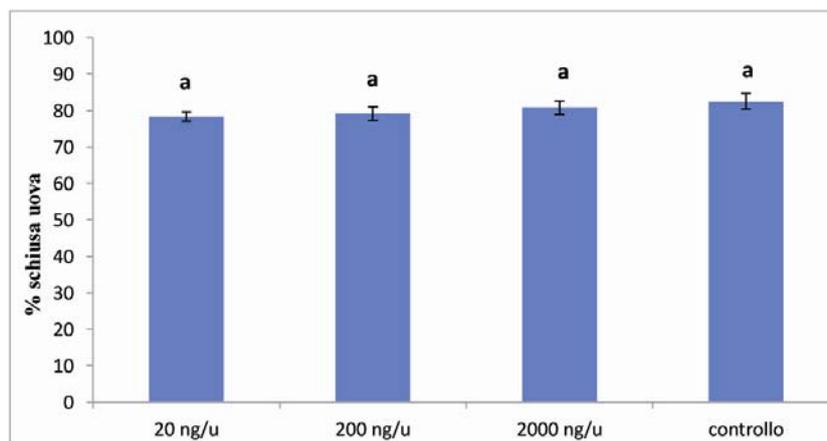


Fig. 59 – a) pretrattamento decorionante con Chorox al 5%; b) tempo di residenza della dsRNA solution di 48 ore. Il trattamento con dsRNA 102 non riduce in maniera significativa la schiusa delle uova ($df = 3$; $MS = 567,712$; $P \geq 0,05$).

Valutando il tempo di residenza della dsRNA solution di 48 ore, i valori associati alla percentuale di schiusa risultano essere più bassi e approssimabili al 78% per tutte le tesi trattate. Per il controllo è stato riscontrato un valore di schiusa pari al 82,5% (**Fig. 59**).

§ 3.2.3 – Trattamenti non decorionanti: rilievi sulla sopravvivenza larvale

Valutando la sopravvivenza di larve derivanti da uova non decorionate e trattate con tempo di residenza della dsRNA solution di 24 ore, per le tre tesi trattate di 2000 ng/u, 200 ng/u e 20 ng/u, sono stati rilevati valori percentuali rispettivamente di 81%, 79% e 78%; nel

controllo sono state valutate percentuali di sopravvivenza pari a 82,5%. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra tesi trattato e controllo (**Fig. 60**).

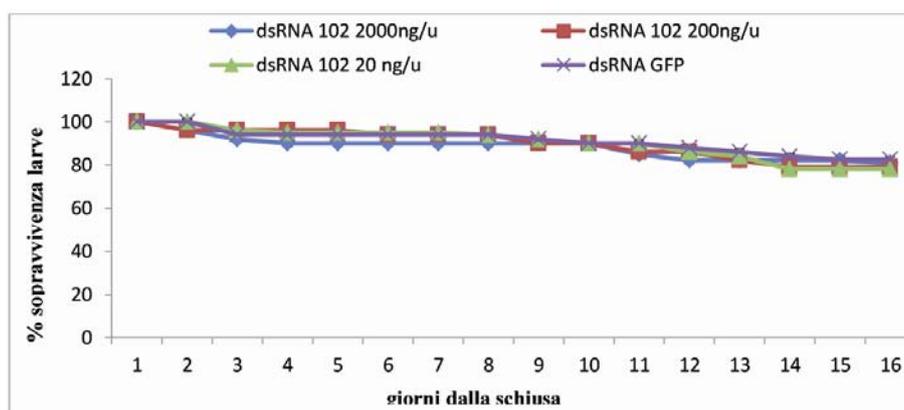


Fig. 60 – a) tempo di permanenza dsRNA 102 solution su uova 24 ore. b) Le larve ottenute dalle uova trattate non hanno mostrato un riduzione del tasso di sopravvivenza statisticamente significativa ($df=4$; $MS=347,785$; $P \geq 0,05$).

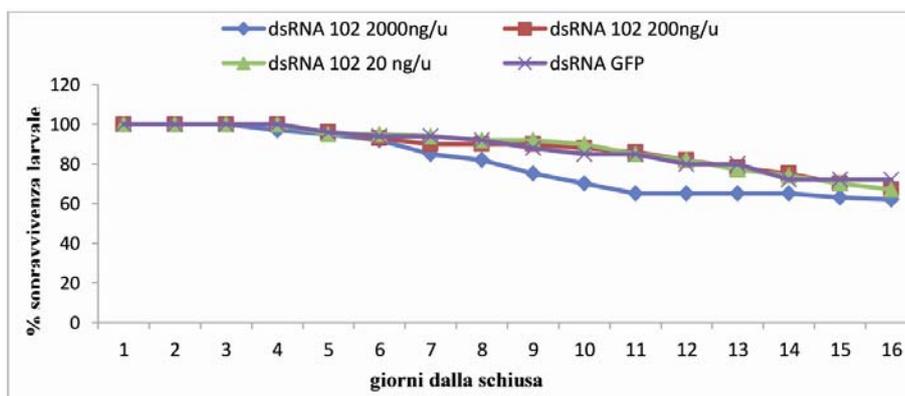


Fig. 61 – a) tempo di permanenza dsRNA 102 solution su uova 48 ore. b) Le larve ottenute dalle uova trattate non hanno mostrato un riduzione del tasso di sopravvivenza statisticamente significativa ($df=4$; $MS=356,663$; $P \geq 0,05$).

Valutando la sopravvivenza di larve derivanti da uova non deco- rionate e trattate con tempo di residenza della dsRNA solution di 48

ore, si evidenzia che i valori rilevati risultano essere più bassi e approssimabili al 67% per le tesi di 200 ng/u e 20 ng/u e di 62% per la tesi di 2000 ng/u. Per il controllo è stato riscontrato un valore di sopravvivenza pari al 72%. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra tesi trattato e controllo (**Fig. 61**).

§ 3.2.4. – **Trattamenti decorionanti: rilievi sulla sopravvivenza larvale**

Valutando la sopravvivenza di larve derivanti da uova decorionate e trattate con tempo di residenza della dsRNA solution di 24 ore, per le tre tesi trattato di 2000 ng/u, 200 ng/u e 20 ng/u, sono stati rilevati valori percentuali approssimabili al 90%; nel controllo sono state valutate percentuali di sopravvivenza pari a 93%. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra tesi trattato e controllo (**Fig. 62**). Valutando la sopravvivenza di larve derivanti da uova decorionate e trattate con tempo di residenza della dsRNA solution di 48 ore si evidenzia che i valori associati alla sopravvivenza risultano essere più bassi e approssimabili al 74% per le tesi di 200 ng/u e 20 ng/u e di 77% per la tesi di 2000 ng/u. Per il controllo è stato riscontrato un valore di sopravvivenza pari al 79%. Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra tesi trattato e controllo (**Fig. 63**).

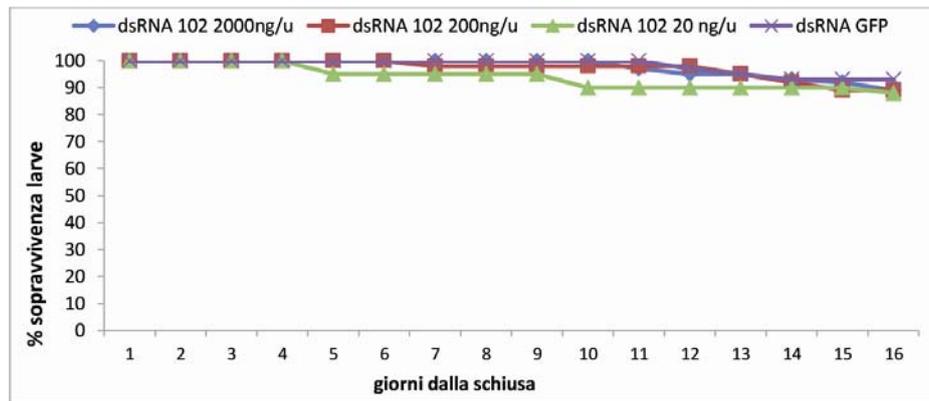


Fig. 62 – a) Tempo di permanenza dsRNA 102 solution su uova 24 ore. b) Le larve ottenute dalle uova trattate non hanno mostrato una riduzione del tasso di sopravvivenza statisticamente significativa ($df=4$; $MS=405,765$; $P \geq 0,05$).

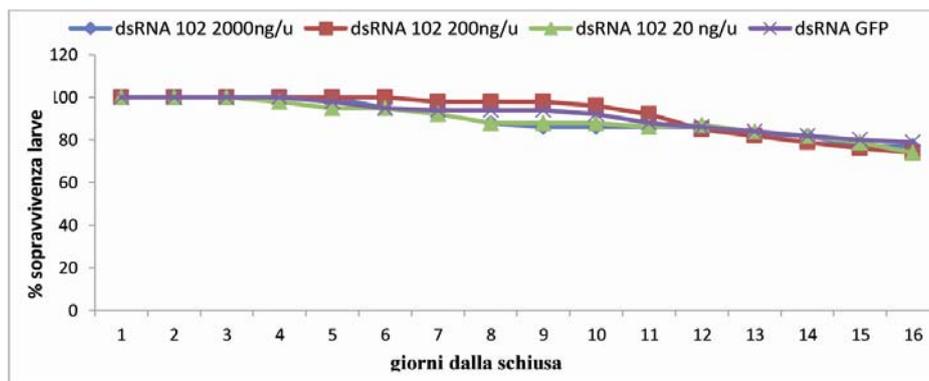


Fig. 63 – a) Tempo di permanenza dsRNA 102 solution su uova 48 ore. b) Le larve ottenute dalle uova trattate non hanno mostrato un riduzione del tasso di sopravvivenza statisticamente significativa ($df=4$; $MS=347,626$; $P \geq 0,05$).

§ 4 – Valutazione di livelli misurabili di resistenza e/o tolleranza in pomodoro

§ 4.1 – Biosaggi in serra

Nella prova in serra l'unico parametro differenziale significativo riscontrato dall'analisi dei dati sperimentali è risultato essere la percentuale di infestazione a carico delle bacche. La linea con la minore percentuale di bacche infestate è stata la cv Cerasella (circa il 12 %), mentre la più suscettibile è stata la cv Red Magic (circa il 40%). Sulle linee Faraoro, Baby Doc e Red Magic (666) sono stati rilevati valori medio-alti di infestazione pari rispettivamente al 33,6%, al 34,5 % e al 38,7 % di bacche infestate mentre il testimone ha presentato un valore medio di infestazione del 27 % (**Fig. 64**).

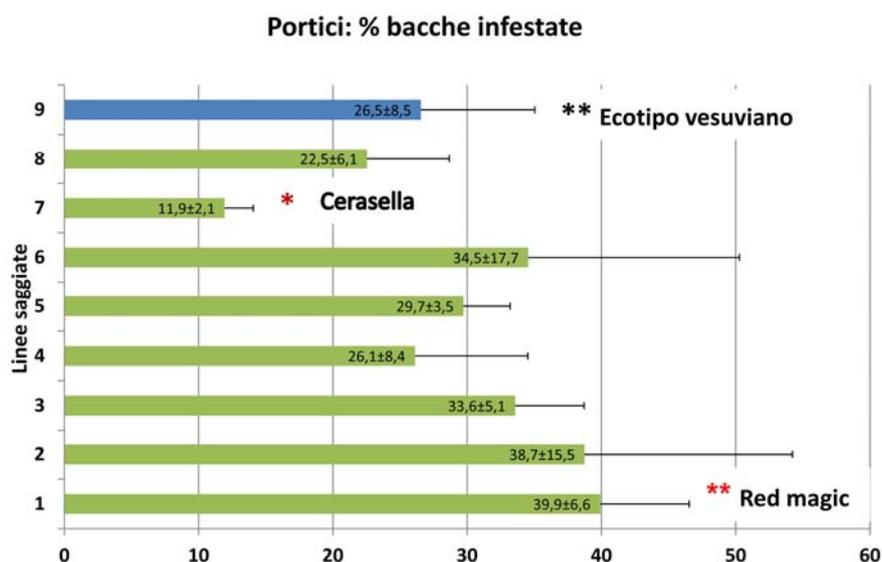


Fig. 64 – Percentuale delle bacche infestate rilevate a Portici nell'estate del 2012. La linea con la minore percentuale di bacche infestate è stata la cv **Cerasella** (circa il 12 %), mentre la più suscettibile è stata la cv **Red Magic** (circa il 40%). Il testimone (**ecotipo vesuviano**) ha presentato un valore medio di infestazione del 27 %.

Anche i risultati rilevati per singola replica hanno confermato le osservazioni evidenziate per singola linea (**Fig. 65**).

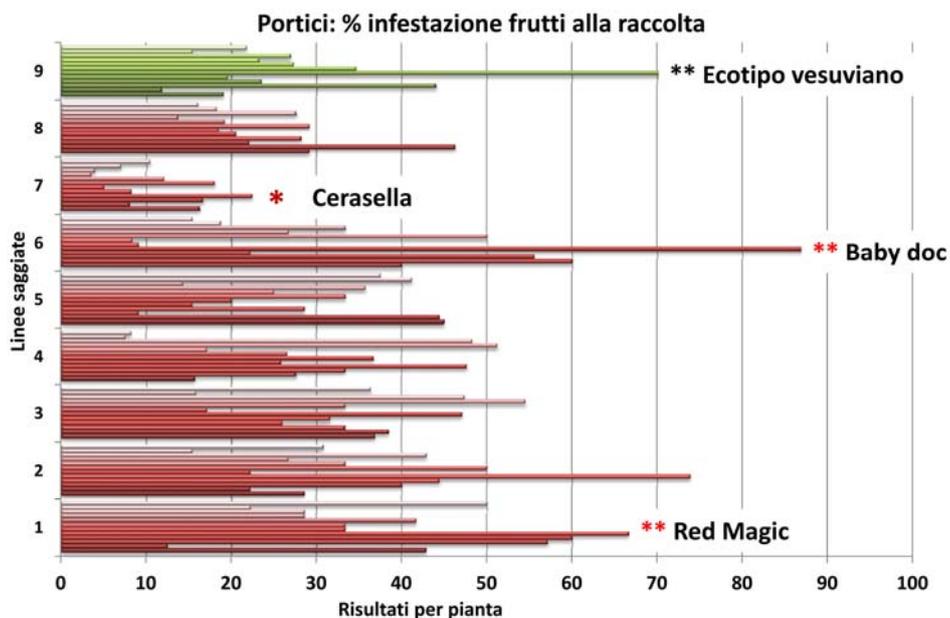


Fig. 65 – I risultati rilevati per singola replica confermano quelli osservati in precedenza per singola linea.

§ 4.2 – Biosaggi in pieno campo

Foglioline minate

Valutando globalmente l'andamento delle infestazioni a carico delle foglioline (**Fig. 66**) si evidenzia che la linea 7 (**Cerasella**) è risultata essere quello meno suscettibile di tutte con il 33 % di infestazione; la linea 4 (**Biliardino alto**) e la linea 8 (**Biliardino nano**) hanno presentato percentuale di attacco leggermente più alte e pari al 44% e al 48% mentre la linea più suscettibile in assoluto, con una percentuale di attacco pari al 71%, è risultata essere la **Red Magic**. L'attacco

della linea controllo ha evidenziato una percentuale di foglioline minate pari al 55%. Occorre inoltre evidenziare che le tre linee meno suscettibili agli attacchi di *T. absoluta* sono tutti pomodorini; di queste tre la linea 4 e la linea 8 sono ad accrescimento determinato mentre la linea 4 è ad accrescimento indeterminato.

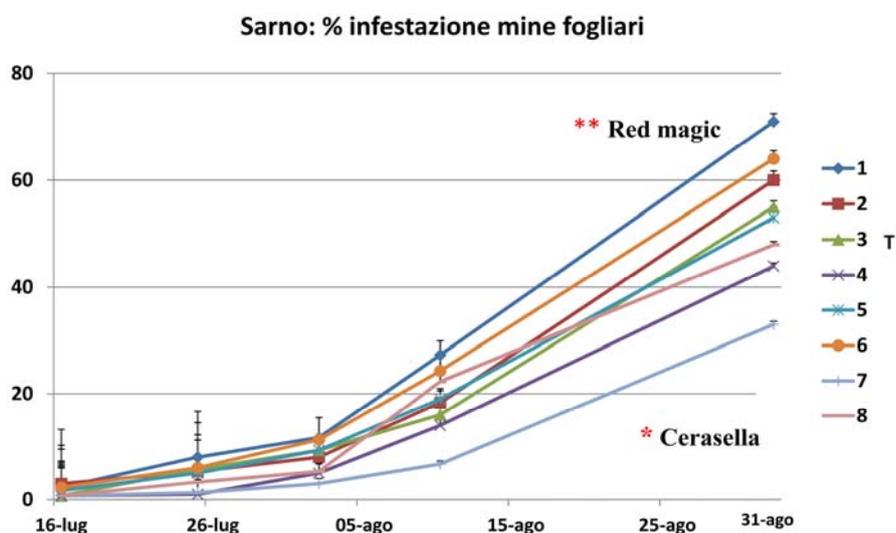


Fig. 66 – Andamento globale delle infestazioni nel bimestre luglio-agosto 2012. La linea 7 (**Cerasella**) è risultata essere quello meno suscettibile di tutte con il 33 % di infestazione mentre quella più suscettibile è risultata essere la **Red Magic** con il 71% foglioline minate. L'attacco della linea controllo 3 (**San Marzano**) ha evidenziato una percentuale di foglioline minate pari al 55%.

Bacche infestate

Valutando globalmente l'andamento delle infestazioni a carico delle bacche (**Fig. 67**) si evidenzia che la linea 7 (**Cerasella**) è risultata essere quello meno suscettibile di tutte con il 14 % di infestazione; la linea 4 (**Biliardino alto**) e la linea 8 (**Biliardino nano**) hanno presentato percentuale di attacco pari al 23% e al 31% mentre la linea

più suscettibile in assoluto, con percentuale di attacco pari al 61%, a differenza di quanto rilevato per le foglioline, è risultata essere la **666 sister Line RM**. L'attacco della linea controllo San Marzano ha evidenziato una percentuale di foglioline minate pari al 53%.

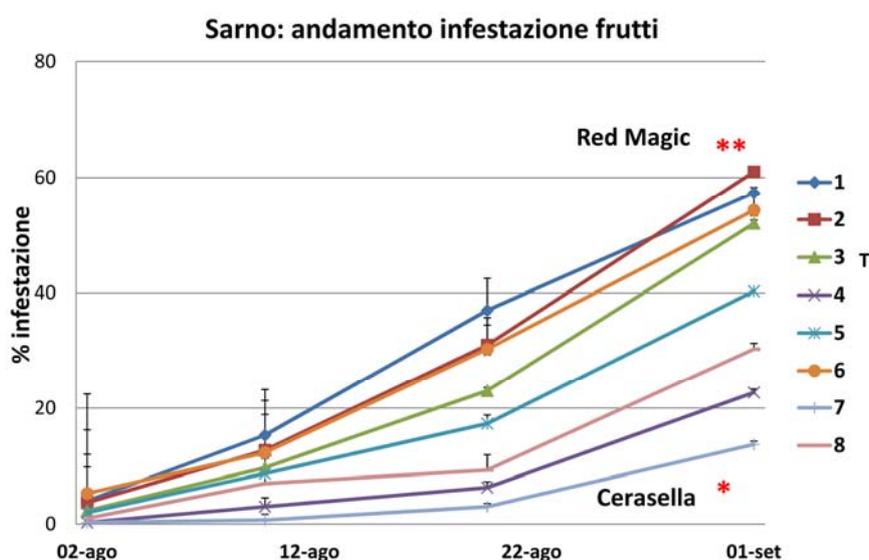


Fig. 67 – Andamento globale delle infestazioni nel mese di agosto 2012. Dai rilievi è stato osservato che le linee meno suscettibili (Biliardino nano, Biliardino alto e Cerasella) presentavano rispettivamente il 30%, il 23 % e 14 % delle bacche infestate. L'attacco sulla linea San Marzano ha evidenziato una percentuale di foglioline minate pari al 53%.

§ 4.3 – Biosaggi in tunnel-serra

I risultati inerenti alle analisi trascrittomiche tipo RNA-seq eseguite su materiale vegetale prelevato dalle linee tesi e controllo esaminate sono ancora in corso di elaborazione. Scopo di questa indagine è quella di individuare eventuali geni candidati utilizzabili in programmi di selezione per putative linee resistenti e/o tolleranti.

§ 4.4 – Biosaggi in camera climatica

§ 4.4.1 – Prove sperimentali (I)

Numero uova deposte

Per quanto concerne questo fattore sperimentale risulta che il maggior numero di uova deposte è stato rilevato sulla linea controllo Cirio con un valore medio pari a 24; il valore più basso (10 uova) è stato rilevato sulla linea Pizzaiola. Sono state deposte rispettivamente 11 e 15 uova sulla linea Biliardino nano e Cerasella (**Fig. 68**).

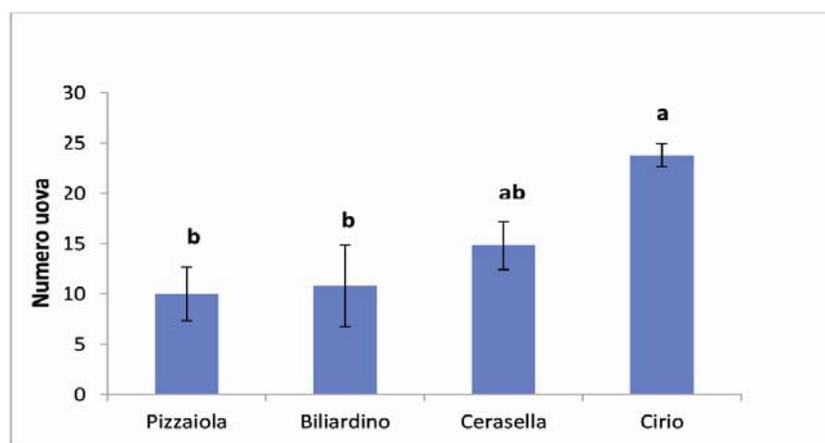


Fig. 68 – Il numero di uova deposte più elevato, pari a 23,8, è stato rilevato sulla linea Cirio mentre quello più basso, pari a 10, sulla linea Pizzaiola. La barra indica l'errore standard. Diverse lettere indicano diversi valori di significatività statistica ($df=3; MS=200,05; P \leq 0,01$).

Foglioline minate

Per quanto concerne questo fattore sperimentale risulta che il valore più elevato è stato rilevato sulla linea Pizzaiola con il 25,4% delle foglioline minate; sulla linea Biliardino nano sono stati registrati i valori di infestazione più bassi pari all'8,4%. Sulla linea Cerasella e

Cirio controllo sono stati osservati rispettivamente valori medi di 20,8% e 25%. (**Fig. 69**). Dal confronto multiplo delle medie si evince che esistono differenze statisticamente significative tra le linee esaminate ($df=3;MS=315,533; P\leq 0,05$).

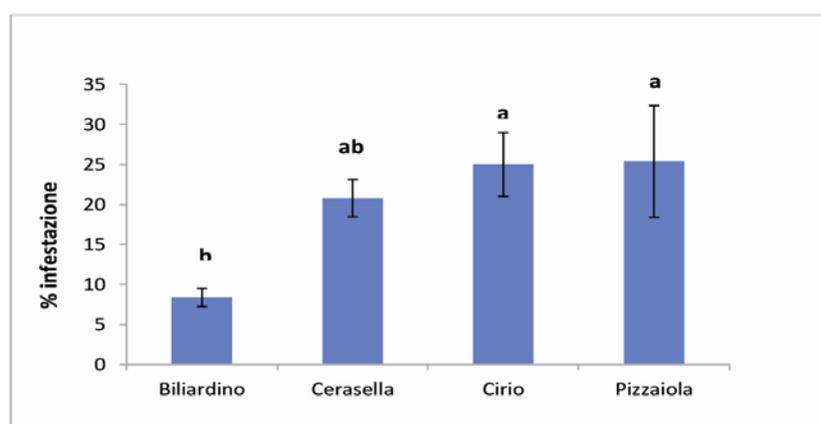


Fig. 69 – Il valore percentuale più alto, pari a 25,4, è stato rilevato sulla linea Pizzaiola mentre quello più basso, pari a 8,4, è stato rilevato sulla linea Biliardino. La barra indica l'errore standard. Diverse lettere indicano diversi valori di significatività statistica ($df=3; MS=315,533; P\leq 0,05$).

Bacche infestate

Per quanto concerne questo fattore sperimentale risulta che il valore più elevato è stato rilevato sulla linea Cirio controllo con il 54% delle bacche infestate; sulla linea Biliardino nano sono stati registrati i valori di infestazione più bassi pari all'6,4%. Sulla linea Cerasella e Pizzaiola sono stati osservati rispettivamente valori medi di 9,4% e 24,6%. (**Fig. 70**). Dal confronto multiplo delle medie si evince che esistono differenze statisticamente significative tra le linee esaminate ($df=3;MS=2371,067; P\leq 0,05; P\leq 0,001$).

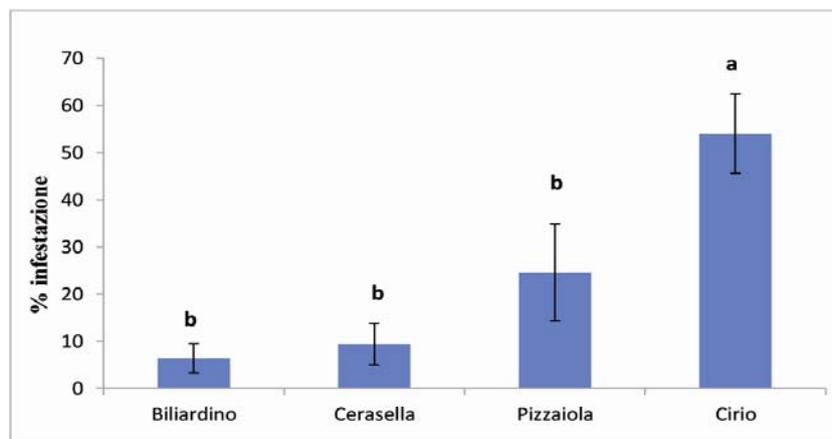


Fig. 70 – Il valore percentuale più elevato, pari a 54, è stato rilevato sulla linea Cirio mentre quello più basso, pari a 6,4, sulla linea Biliardino. La barra indica l'errore standard. Diverse lettere indicano diversi valori di significatività statistica ($df=3$; $MS=2371,067$; $P\leq 0,05$; $P\leq 0,001$).

Valutazioni ponderali larve

L'accrescimento ponderale larvale più marcato nei tre momenti campionari è stato rilevato sulla linea controllo Cirio dove sono stati raggiunti anche i valori massimi più elevati e uguali a 0,1008 g; sulla linea Biliardino nano sono stati registrati valori massimi di 0,1003 g e l'andamento dell'accrescimento risulta essere meno marcato rispetto a quello rilevato per la linea Cirio. Su Cerasella sono stati rilevati i valori di accrescimento meno marcati tra le linee con valori massimi corrispondenti a 0,1001g mentre sulla linea Pizzaiola sono stati osservati valori di crescita più rappresentativi rispetto a Cerasella soprattutto tra secondo e terzo periodo campionario (**Fig. 71**). Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le linee osservate ($df=4$; $MS=1,57E-05$; $P\geq 0,05$).

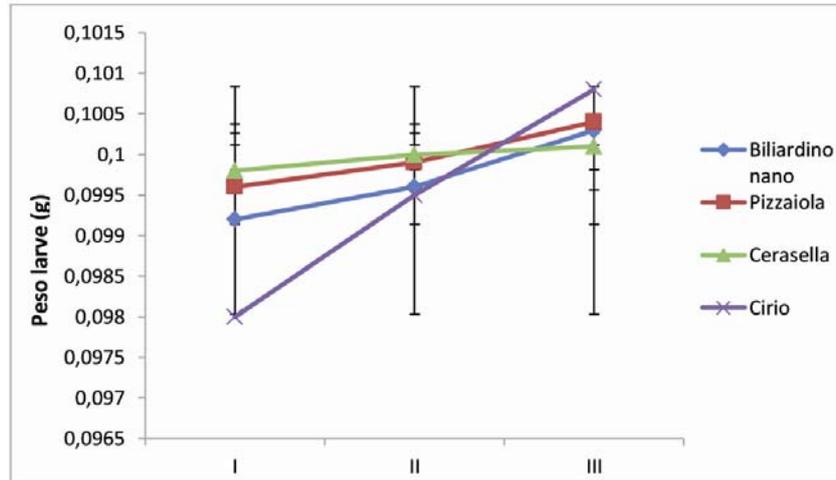


Fig. 71 – Andamento delle curve di accrescimento larvale nei 3 periodi campionari. Il valore di accrescimento ponderale massimo più rappresentativo, pari a 0,1008 g, è stato rilevato sulla linea Cirio mentre quello meno rappresentativo, pari a 0,1001 g, sulla linea Cerasella (df=4; MS=1,57E-05; $P \geq 0,05$).

Valutazione ponderali crisalidi

Le curve di accrescimento ponderale più rappresentative sono state rilevate per la linea Cirio e la linea Cerasella soprattutto tra secondo e terzo punto campionario con valori massimi rispettivi di 0,0710 g e 0,0696 g. L'andamento globale di sviluppo per la linea Biliardino nano e la linea Pizzaiola è stato meno marcato rispetto alle altre due linee e ha raggiunto rispettivamente valori di 0,0699 g e 0,0694 g con un accrescimento più marcato per Biliardino nano tra primo e secondo periodo campionario (**Fig. 72**). Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le tesi osservate (df=4; MS= 7,140E-05; $P \geq 0,05$).

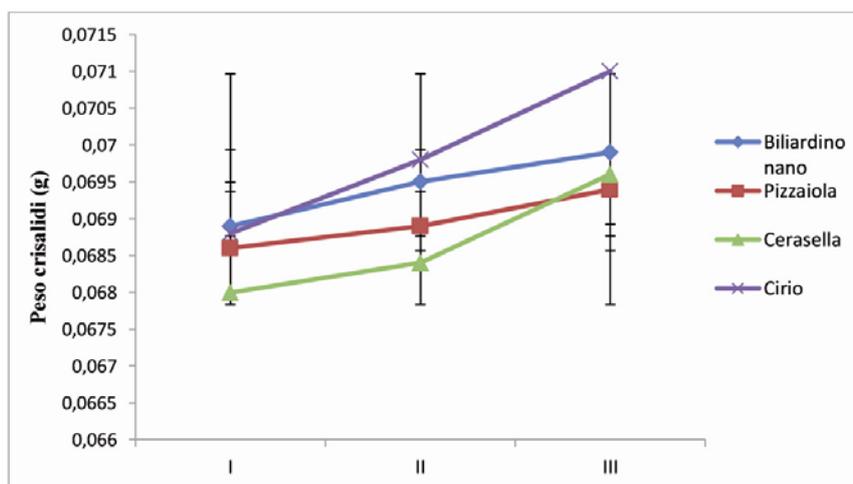


Fig. 72 – Andamento delle curve di accrescimento delle crisalidi nei 3 periodi campionari. Il valore di accrescimento ponderale massimo più rappresentativo, pari a 0,071 g, è stato rilevato sulla linea Cirio mentre quelli meno rappresentativi, pari rispettivamente a 0,0694 g e 0,0696, sulle linee Pizzaiola e Cerasella (df=4; MS= 7,140E-05; $P \geq 0,05$).

Evoluzione biofenologica

Nell'evoluzione biofenologica del lepidottero sulle diverse linee esaminate sono state osservate differenze statisticamente significative per i valori riguardanti il ciclo larvale ed il ciclo completo. È stato infatti rilevato che sulla linea Biliardino nano la durata del ciclo larvale ha assunto un valore di $13,8 \pm 0,45$ giorni (**Fig. 73; Tab.13**); da tale risultato si evince che su quest'ultima linea tale ciclo si è allungato di $1,6 \pm 0,45$ giorni rispetto alla linea Pizzaiola, di $1,1 \pm 0,67$ giorni rispetto alla linea Cerasella e di $1,4 \pm 0,55$ giorni rispetto alla linea controllo Cirio. Conseguenzialmente si può osservare che il ciclo completo del lepidottero raggiunge la sua massima durata sulla linea meno suscettibile Biliardino nano con valore pari a 24,3 giorni; i valori più bassi, pari a 21,5 e 21,8 giorni, vengono invece rilevati rispettivamente

per la linee Pizzaiola e Cirio. I risultati ottenuti con l'osservazione dei parametri differenziali-comparativi rilevati precedentemente trovano dunque una valida conferma anche su base biofenologica.

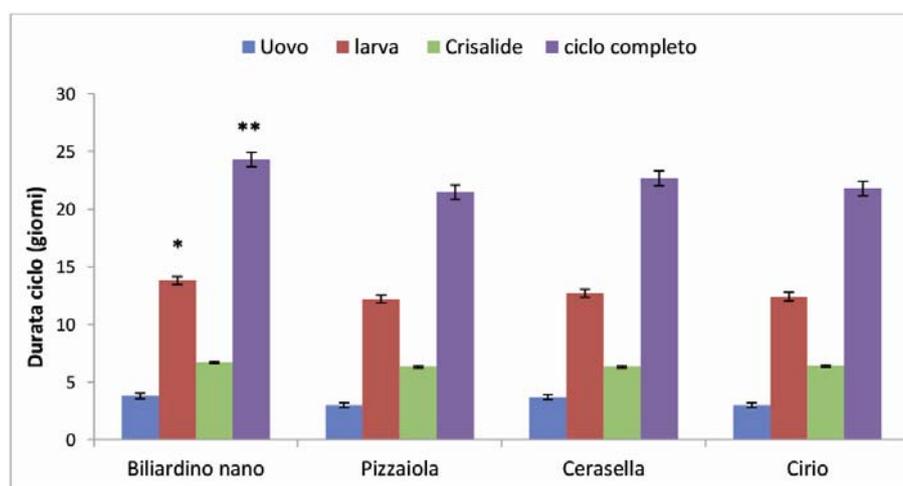


Fig. 73 – Evoluzione biofenologica di *T. absoluta* sulle diverse linee esaminate. Sulla linea Biliardino nano il ciclo completo, pari a 24,3 giorni, si è allungato di $2,5 \pm 0,55$ giorni rispetto alla linea Cirio e $2,8 \pm 0,45$ giorni rispetto alla linea Pizzaiola. Le barre indicano l'errore standard. L'asterisco (*) indica la significatività statistica ($df=4; MS=1,91; *P \leq 0,01; df=4; MS=3,87; **P \leq 0,001$).

				
	Uovo	Larva	Crisalide	Durata ciclo (gg)
Pizzaiola	3	$12,2 \pm 0,45$	$6,3 \pm 0,45$	21,5
Biliardino nano	$3,8 \pm 0,27$	$13,8 \pm 0,45$	$6,7 \pm 0,45$	24,3
Cerasella	$3,7 \pm 0,45$	$12,7 \pm 0,67$	$6,3 \pm 0,45$	22,7
Cirio	3	$12,4 \pm 0,55$	$6,4 \pm 0,55$	21,8

Tab. 13 – Valutazione globale sull'evoluzione biofenologica di *T. absoluta* rilevata sulle diverse linee esaminate.

§ 4.4.2 – Prove sperimentali (II)

Numero uova deposte

Per quanto concerne questo fattore sperimentale risulta che il maggior numero di uova deposte è stato rilevato sulla linea Cerasella con un valore medio pari a 25; il valore più basso (5,7 uova) è stato rilevato sulla linea Biliardino nano. Sono state deposte rispettivamente 13, 14 e 17 uova sulle linee Pizzaiola, Biliardino alto e San Marzano (**Fig. 74**) Dal confronto effettuato tra le linee si evidenziano risultati statisticamente significativi ($dF=4$; $MS=742,017$; $P\leq 0,01$).

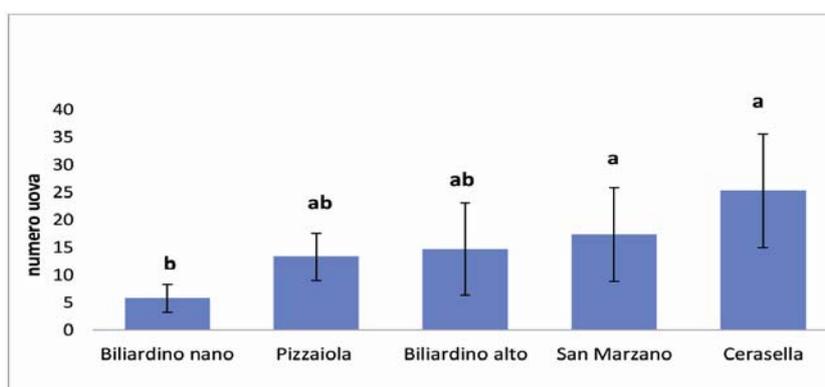


Fig. 74 – Il numero di uova deposto più elevato, pari a 25,3, è stato rilevato sulla linea Cerasella mentre quello più basso, pari a 5,7, sulla linea Biliardino nano. La barra indica l'errore standard. Lettere diverse indicano differenti valori di significatività ($dF=4$; $MS=742,017$; $P\leq 0,01$).

Localizzazione uova su palchi fogliari

Dai risultati si evidenzia che il maggior numero di uova deposte è stato rilevato sui palchi apicali come riportato da RESENDE ET AL., 2006; CELY ET AL., 2010. Dal confronto effettuato tra le linee si evidenziano differenze statisticamente significative solo nelle ovideposi-

zioni riguardanti il I palco tra la linea Biliardino nano e la linea Cerasella (**Fig. 75**) ($df=4$; $MS=1230,983$; $P\leq 0,001$).

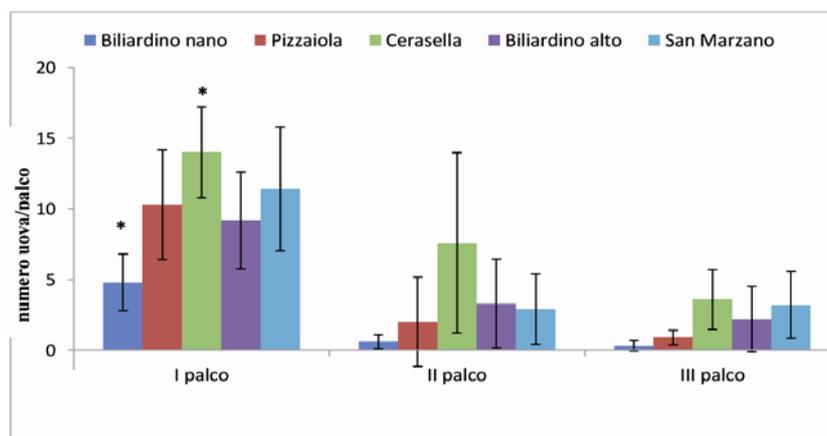


Fig. 75 – Si evidenziano differenze statisticamente significative tra le linee Biliardino nano e Cerasella nelle ovideposizioni su I palco. Le barre indicano la deviazione standard e l'asterisco la significatività statistica ($df=4$; $MS=1230,983$; $P\leq 0,001$).

Densità distributiva delle uova (numero di uova per cm^2 di foglia)

Valutando l'andamento generale delle infestazioni (**Fig. 76**) è possibile evidenziare che in tutti i tre punti campionari la linea che dimostra essere la meno suscettibile è la linea Biliardino nano con valori massimi di infestazione pari a $1,1$ uova/ cm^2 di foglia mentre quella più suscettibile è la linea controllo San Marzano con valore massimo di infestazione pari all' $3,3$ uova/ cm^2 di foglia. A fine periodo campionario le linee Pizzaiola, Biliardino alto e Cerasella hanno rilevato livelli di attacco pari rispettivamente al $1,9$, $2,3$ e $2,8$ uova/ cm^2 di foglia. Dai confronti effettuati tra le linee risultano differenze statisticamente significative ($df=4$; $MS=5,37$; $P\leq 0,001$; $P\leq 0,01$).

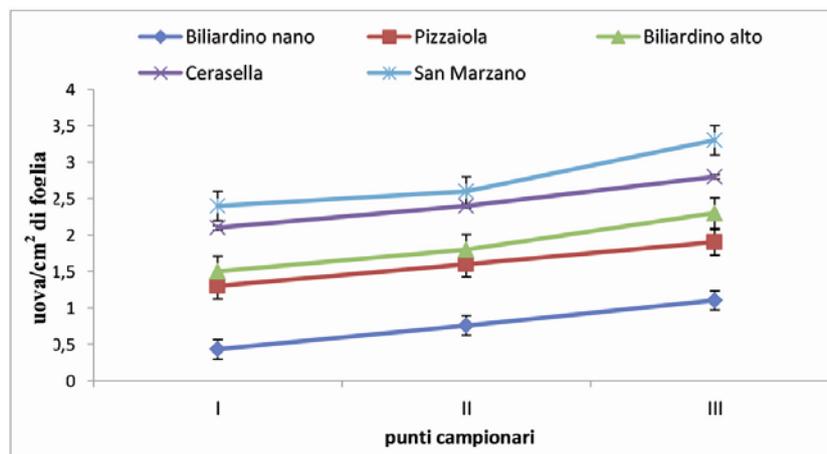


Fig. 76 – Andamento generale delle infestazioni riguardanti la densità distributiva di uova su foglie. Il valore più alto, pari a 3,3 uova /cm², è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 1,1 uova /cm², sulla linea Biliardino nano (df=4; MS=5,37; P≤0,001;P≤0,01).

Percentuale foglioline minate

Valutando l'andamento generale delle infestazioni (**Fig. 77**) è possibile evidenziare che in tutti i quattro punti campionari la linea che dimostra essere la meno suscettibile è la linea Biliardino nano con valori massimi di infestazione pari al 28% mentre quella più suscettibile è la linea controllo San Marzano con valore medio di infestazione pari al 68%. A fine periodo campionario la linea Pizzaiola ha rilevato livelli di infestazione medio-bassi pari al 42% mentre sulle linee Cerasella e Biliardino alto sono stati osservati valori percentuali di attacco medio-alti rispettivamente pari a 49% e 57% (**Graf. 20d**). Dal confronto tra le linee risultano differenze statisticamente significative (df=4; MS=5941,859; P≤0,05).

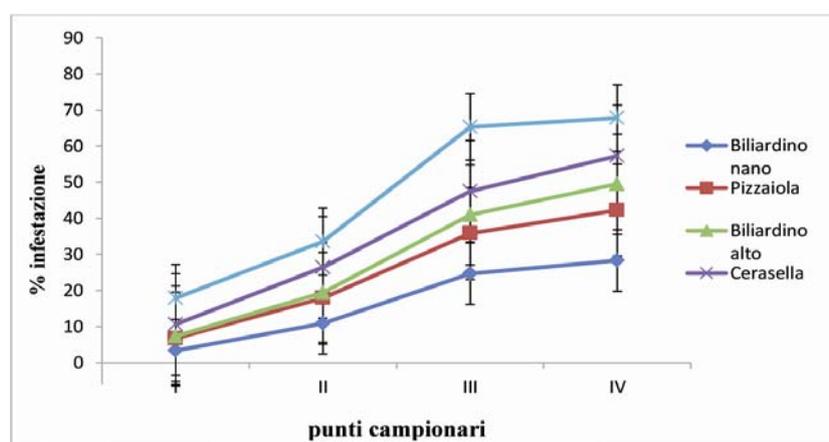


Fig. 77 – Andamento generale delle infestazioni riguardante la percentuale delle foglioline minate. Il valore più elevato, pari al 68%, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari al 28%, sulla linea Biliardino nano ($df=4$; $MS=5941,859$; $P\leq 0,05$).

Numero mine fogliari totali a pianta

Valutando l'andamento generale delle infestazioni (**Fig. 78**) è possibile evidenziare che in tutti i due punti campionari la linea che dimostra essere la meno suscettibile è la linea Biliardino nano con valori massimi di infestazione pari a 8,5 mine fogliari totali mentre quella più suscettibile è la linea controllo San Marzano con valore massimo di infestazione pari al 38 mine. A fine periodo campionario la linea Pizzaiola ha rilevato livelli di attacco medio-bassi pari a 14 mine fogliari totali mentre sulle linee Cerasella e Biliardino alto sono stati osservati valori di attacco medio-alti rispettivamente pari a 25 mine totali. Dal confronto tra le linee esaminate si rilevano differenze statisticamente significative ($df=4$; $MS=1750,694$; $P\leq 0,05$; $P\leq 0,001$)

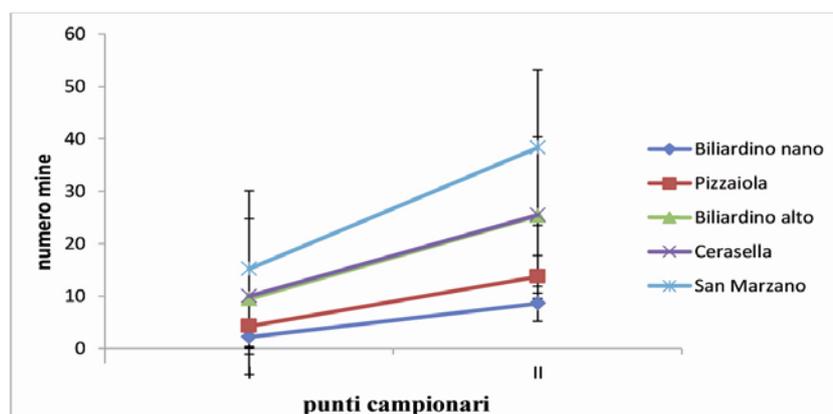


Fig. 78 – Andamento generale delle infestazioni riguardante il numero totali di mine fogliari. Il valore più alto, pari a 38 mine, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 8,5 mine, sulla linea Biliardino nano ($df=4$; $MS = 1750,694$; $P \leq 0,05$; $P \leq 0,001$; $P \leq 0,01$).

Superficie fogliare minata

Valutando l'andamento generale delle infestazioni (**Fig. 79**) è possibile evidenziare che in tutti i quattro punti campionari la linea che dimostra essere la meno suscettibile è la linea Biliardino nano con valori massimi di infestazione pari a 37,5% della superficie fogliare minata mentre quella più suscettibile è la linea controllo San Marzano con valore massimo di infestazione pari all'83%. A fine periodo campionario le linee Pizzaiola, Biliardino alto e Cerasella hanno rilevato livelli di attacco medio-bassi pari rispettivamente al 49%, 50% e 53%. Dai confronti effettuati tra le linee risultano differenze statisticamente significative ($df=4$; $MS=220,355$; $P \leq 0,001$; $P \leq 0,01$).

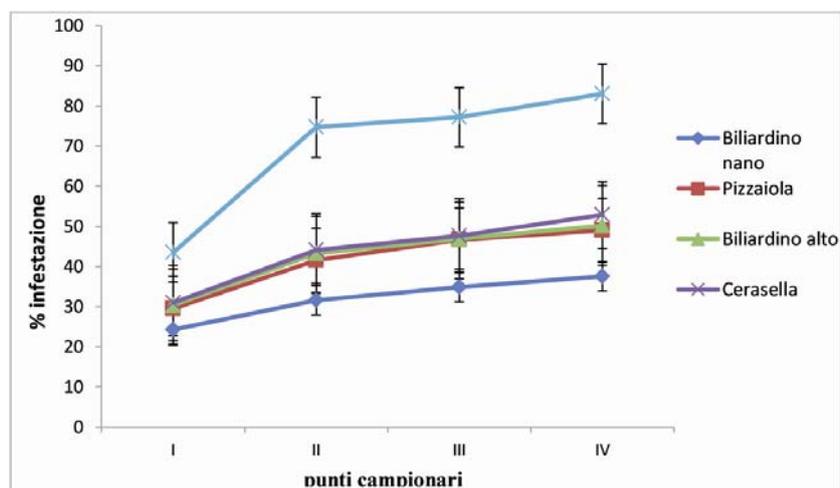


Fig. 79 – Andamento generale delle infestazioni riguardante la percentuale della superficie fogliare minata. Il valore più elevato, pari all'83%, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari al 37,5%, sulla linea Biliardino nano (df=4; MS=220,355; $P \leq 0,001$; $P \leq 0,01$).

Densità distributiva delle mine (numero di mine per cm² di foglia)

Valutando l'andamento generale delle infestazioni (**Fig. 80**) è possibile evidenziare che in tutti i tre punti campionari la linea che dimostra essere la meno suscettibile è la linea Biliardino nano con valori massimi di infestazione pari a 0,20 mine/cm² di foglia mentre quella più suscettibile è la linea controllo San Marzano con valore massimo di infestazione pari all'1,53 mine/ cm² di foglia. A fine periodo campionario le linee Pizzaiola, Biliardino alto e Cerasella hanno rilevato livelli di attacco pari rispettivamente al 0,27, 0,42 e 0,70 mine/cm² di foglia. Dai confronti effettuati tra le linee risultano differenze statisticamente significative (df=4; MS=220,355; $P \leq 0,01$).

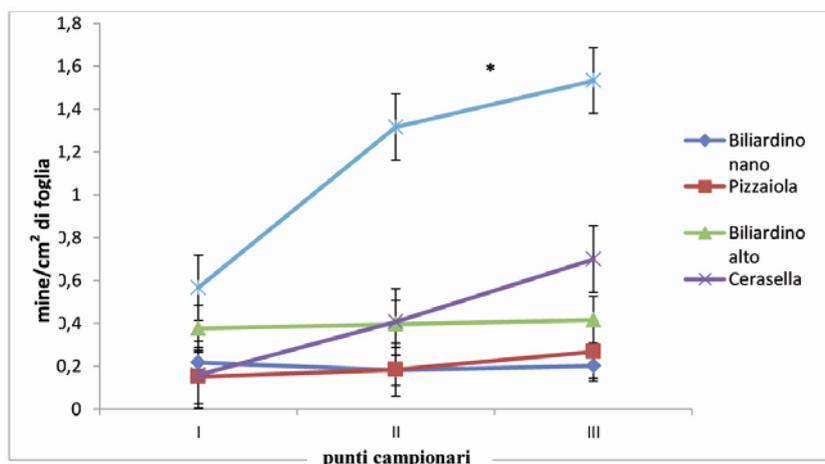


Fig. 80 – Andamento generale delle infestazioni riguardante la densità distributiva delle mine su foglie. Il valore più alto e statisticamente significativo (*), pari a 1,53 mine/cm², è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 0,20 mine/cm², è stato rilevato sulla linea Biliardino nano (df=4;MS=220,355;P≤0,05; P≤0,01; *P≤0,001).

Tipizzazione mine fogliari

Mine sinuose non coalescenti e mine coalescenti

Come si può osservare in **Fig. 81** tra tutte le mine fogliari caratterizzate e tipizzate risulta che sulla linea Biliardino nano vi è la prevalenza netta di mine non coalescenti (88%) mentre sulle linee controllo San Marzano e Cerasella vi è distribuzione pressocchè uniforme delle due tipologie di mine con valori prossimi al 50%. La presenza predominante di mine non coalescenti è stata anche osservata sulle linee Pizzaiola e Biliardino alto con valori percentuali rispettivamente pari al 67% e 79%.

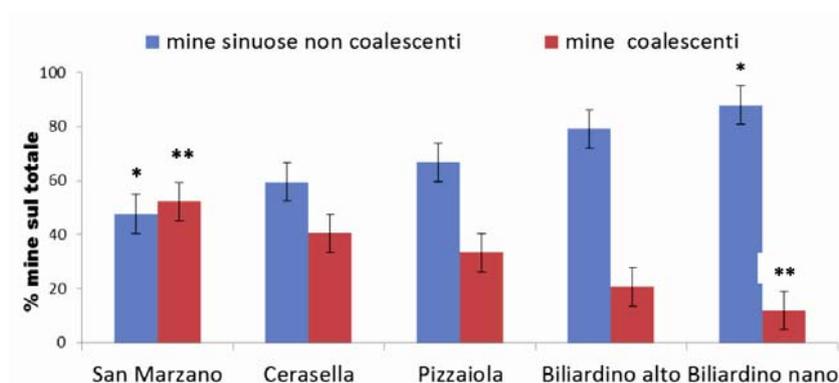


Fig. 81 – Tipizzazione di mine coalescenti e non coalescenti fogliari sulle linee esaminate. Sulla linea Biliardino nano vi è una prevalenza netta di mine non coalescenti, pari all'88%, mentre sulla linea San Marzano vi è una distribuzione uniforme di entrambe le tipologie di mine. La barra indica l'errore standard mentre l'asterisco la significatività statistica (df=4; MS=3222,318; *P<0,01; df=4; MS=4144,069; **P<0,001).

Mine coalescenti digitiformi e vescicolose

Come si osserva in **Fig. 82** sulla linea Biliardino nano e Pizzaiola sono presenti solo mine coalescenti digitiformi. È stata rilevata una presenza netta di mine digitiformi sulla linea Biliardino alto e Cerasella con valori rispettivi del 95% e 72% mentre sulla linea San Marzano vi è una distribuzione uniforme di entrambe le tipologie di mine.

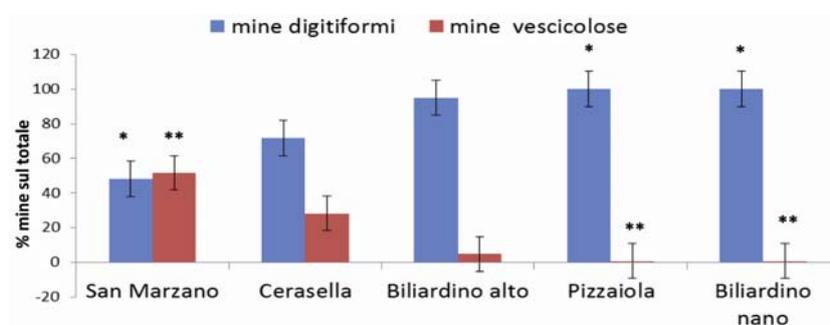


Fig. 82 – Tipizzazione di mine coalescenti digitiformi e vescicolose sulle linee esaminate. Sulla linea San Marzano è stata osservata una distribuzione uniforme di entrambe le tipologie di mine mentre sulle linee Pizzaiola e Biliardino nano sono state osservate solo mine digitiformi. La barra indica l'errore standard mentre l'asterisco la significatività statistica (df=4; MS=400,918; *P<0,01; df=4; MS=92,330; **P<0,001).

Larghezza camera vescicolosa

La tipizzazione delle mine fogliari è stata ultimata con la determinazione della larghezza della camera vescicolosa tipica di mine coalescenti a piazzola che si differenziano nelle ultime fasi dell'infestazione a seguito dell'attività trofica delle larve mature. Dal rilievo effettuato sulle linee Biliardino alto, Cerasella e San Marzano si osservano valori corrispondenti a 0,3 cm², 0,6 cm² e 1,6 cm² (**Fig. 83**). Sono stati rilevati risultati statisticamente significativi tra le linee esaminate (df=4;MS= 4,933;P≤0,001).

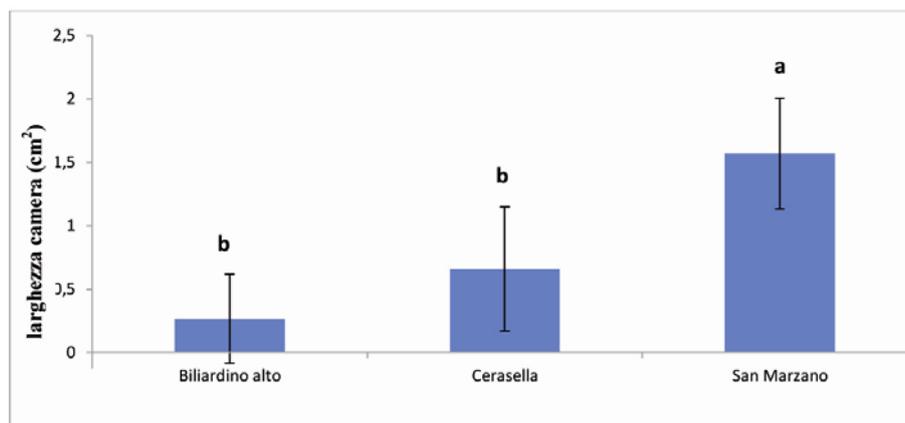


Fig. 83 – Il valore più elevato, pari a 1,57 cm², è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 0,3 cm², sulla linea Biliardino alto. Le barre indicano l'errore standard. Diverse lettere indicano diversi valori di significatività (df=4;MS= 4,933;P≤0,001).

Numero mine totali su fusto

Dai rilievi effettuati risulta che sulla linea Biliardino nano non sono state osservate mine; il numero di mine più alto su fusto, pari a 3,8, è stato osservato sulla linea controllo San Marzano; il valore più

basso, pari a 0,83, è stato osservato sulla linea Biliardino alto mentre sulle linee Pizzaiola e Cerasella sono stati osservati valori di mine totali pari rispettivamente a 2 e a 3 (**Fig. 84**). Sono stati rilevati risultati statisticamente significativi tra le linee esaminate (df = 4; MS = 14,711; $P \leq 0,05$).

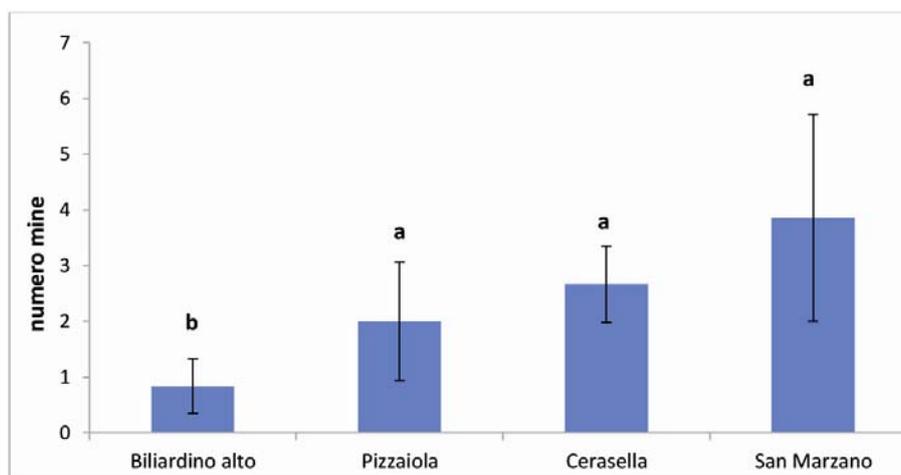


Fig. 84 – Numero totale di mine su fusto. Il valore più alto, pari a 3,8 mine, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 0,83 mine, sulla linea Biliardino alto. Le barre indicano l'errore standard. Diverse lettere indicano diversi livelli di significatività (df = 4; MS = 14,711; $P \leq 0,05$).

Tipizzazione mine su fusto

Come si può osservare in **Fig. 85** non sono state osservate mine caulinari sulla linea Biliardino nano. Tra tutte le mine caratterizzate e tipizzate risulta che sulla linea Cerasella vi è presenza netta di mine sinuose non coalescenti (73%), mentre sulle linee Biliardino alto e Pizzaiola vi è una distribuzione tendenzialmente più alta di mine coalescenti con valori prossimi al 60%. Per la linea controllo San Marza-

no è stata valutata una distribuzione pressochè uniforme delle due tipologie di mine con valori prossimi al 50%.

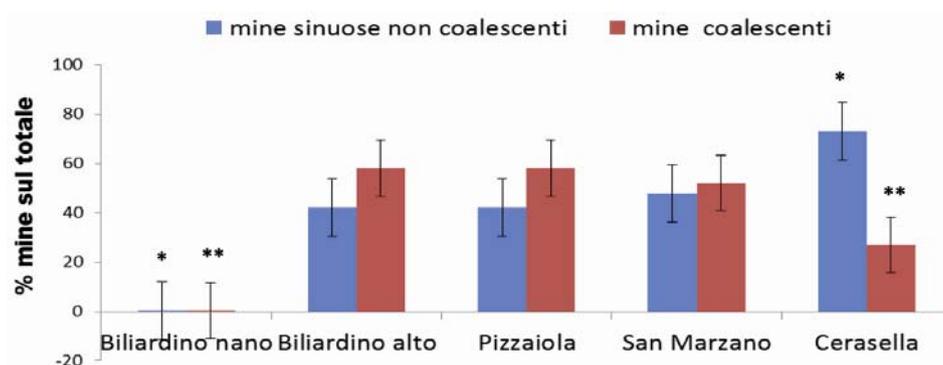


Fig. 85 – Sulla linea Cerasella è stata rilevata una prevalenza netta di mine non coalescenti pari al 73% mentre sulla linea Biliardino nano non sono state osservate mine. Sulla linea San Marzano è stata osservata una distribuzione uniforme di entrambe le tipologie di mine. La barra indica l'errore standard mentre l'asterisco la significatività statistica (df = 3; MS = 2130,862; *P ≤ 0,01 df = 4; MS = 4132,611; **P ≤ 0,01).

Percentuale bacche infestate

Valutando l'andamento generale delle infestazioni (**Fig. 86**) è possibile evidenziare che in tutti i punti campionari la linea che dimostra essere la meno suscettibile è la linea Biliardino nano con valori massimi di infestazione pari al 6% mentre quella più suscettibile è la linea controllo San Marzano con valore massimo di attacco pari al 52%. A fine periodo campionario le linee Pizzaiola, Cerasella e Biliardino alto hanno rilevato livelli di infestazione pari rispettivamente al 19%, 23% e 34%. Dal confronto tra le diverse linee si evidenziano differenze statisticamente significative (df=4; MS=8317,562; P≤0,001).

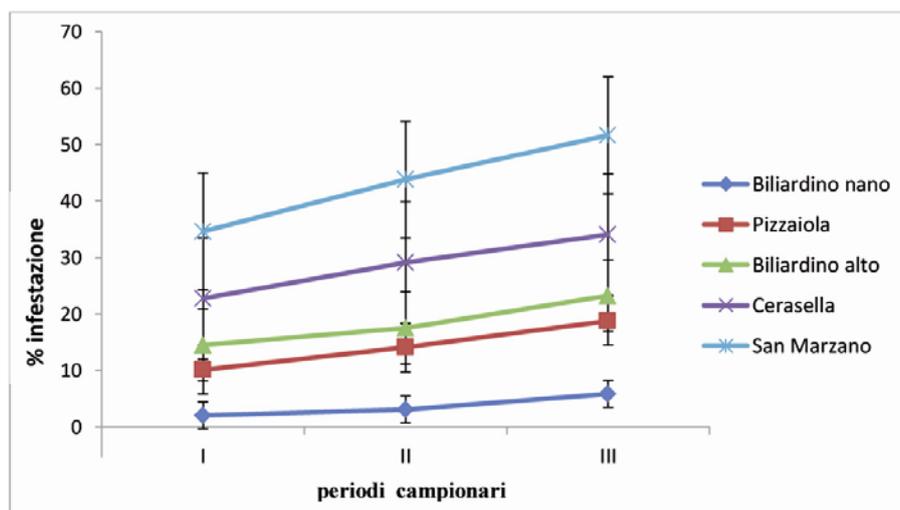


Fig. 86 – Andamento generale delle infestazioni riguardante la percentuale delle bacche infestate. Il valore più alto, pari al 52%, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari al 6%, è stato rilevato sulla linea Biliardino nano (df = 4; MS = 8317, 562; $P \leq 0,001$).

Numero mine a bacca

Dai biosaggi risulta che il numero di mine su bacca più alto rilevato, pari a 2,2, è stato osservato sulla linea controllo San Marzano; il valore più basso, pari a 0,2, è stato osservato sulla linea Biliardino nano (**Fig. 87**). Sulle linee Pizzaiola, Biliardino alto e Cerasella sono stati osservati valori intermedi di 1, 1,4 e 1,9 mine a bacca. Dai confronti risultano differenze statisticamente significative tra le linee esaminate (df=3; MS=3,9003; $P \leq 0,001$; $P \leq 0,001$).

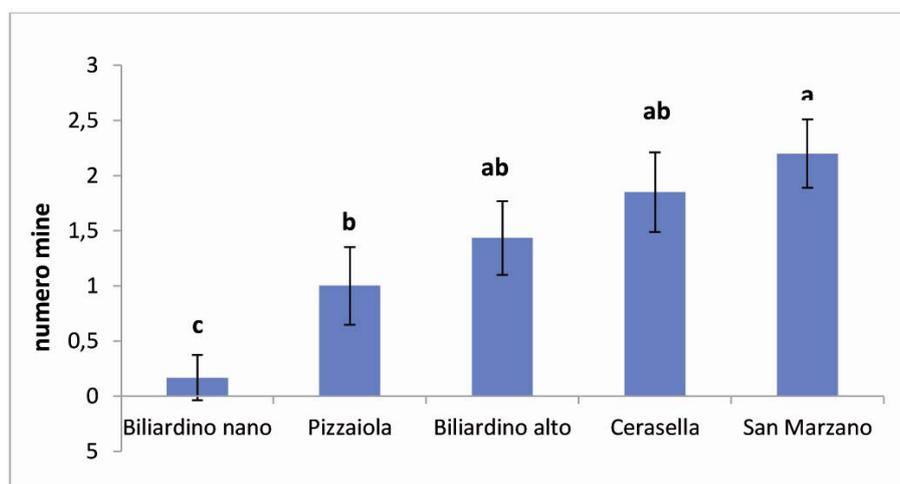


Fig. 87 – Il numero di mine più elevato, pari a 2,2, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 0,16, sulla linea Biliardino nano. La barra indica l'errore standard. Lettere diverse indicano differenti valori di significatività (df = 4; MS = 44,3477; $P \leq 0,001$).

Tipizzazione mine su bacche

Come si può osservare in **Fig. 88** sulle bacche della linea Biliardino nano non sono state rilevate mine mentre sulla linea Biliardino alto sono state osservate solo mine sinuose non coalescenti; sulle linee Pizzaiola e Cerasella vi è una presenza preponderante di mine non coalescenti (80%). Tra tutte le mine tipizzate sulla linea controllo San Marzano vi è una presenza prevalente di mine non coalescenti ma meno marcata rispetto alle altre due linee precedentemente menzionate con valori approssimabili al 60%.

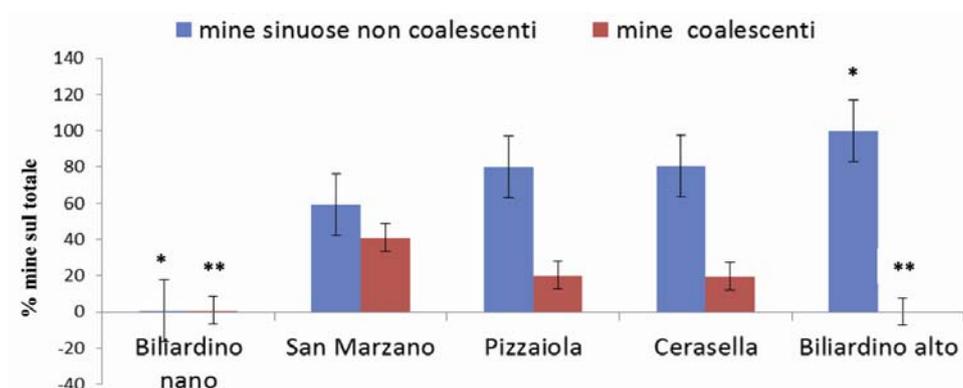


Fig. 88 – Mine non coalescenti e coalescenti osservate su bacche. Sulla linea Biliardino nano non sono state osservate mine mentre sulla linea San Marzano vi è una prevalenza di mine non coalescenti. Le barre indicano l'errore standard mentre l'asterisco la significatività statistica (df = 4; MS = 6017,605; *P ≤ 0,01; df = 4; MS = 2110,938; **P ≤ 0,001).

Numero fori a bacca

Dai rilievi risulta che il numero di fori a bacca più alto, pari a 6, è stato osservato sulla linea controllo San Marzano; il valore più basso, pari a 1,3, è stato osservato sulla linea Biliardino nano. Sulla linea Pizzaiola, Biliardino alto e Cerasella sono stati rilevati per questo fattore sperimentale rispettivamente valori di 3,1, 4,3 e 5,1 (**Fig. 89**). Dai confronti effettuati tra le linee esistono differenze statisticamente significative (df=4; MS=44,3477; P≤0,001).

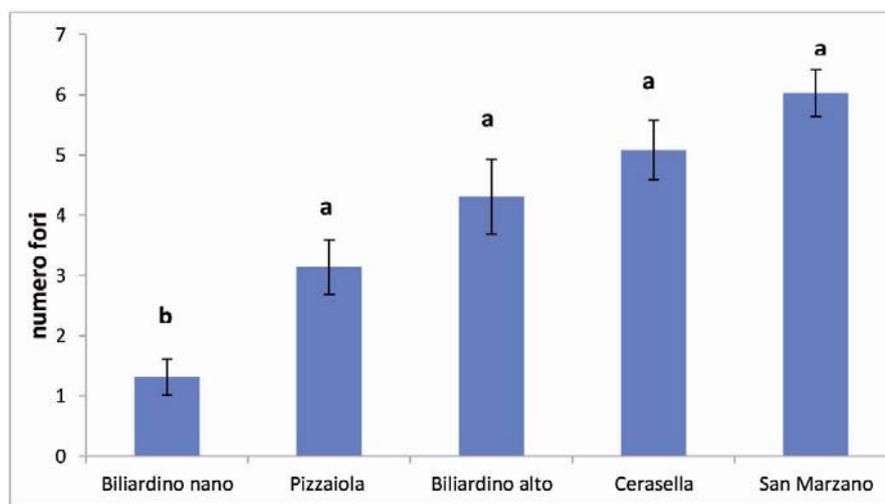


Fig. 89 – Il numero di fori a bacca più elevato, pari a 6, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 1,3, sulla linea Biliardino nano. La barra indica l'errore standard. Lettere diverse indicano differenti valori di significatività (df = 4; MS = 44,3477; $P \leq 0,001$).

Valutazioni ponderali larve

L'accrescimento ponderale più marcato nei tre momenti campionari è stato rilevato sulla linea controllo San Marzano dove sono stati raggiunti anche i valori massimi più elevati e uguali a 0,1006 g; sulla linea Biliardino nano sono stati registrati valori massimi di 0,0993 g e l'accrescimento è risultato essere più marcato rispetto a quello rilevato per la linea Pizzaiola dove sono stati osservati valori massimi di 0,0994 g. I saggi ponderali effettuati sulle linee Biliardino alto e Cerasella hanno rilevato un accrescimento più rappresentativo per la prima linea soprattutto tra prima e secondo periodo campionario (**Fig. 90**). Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le tesi osservate (df=4; MS=1,66E-05; $P \geq 0,05$).

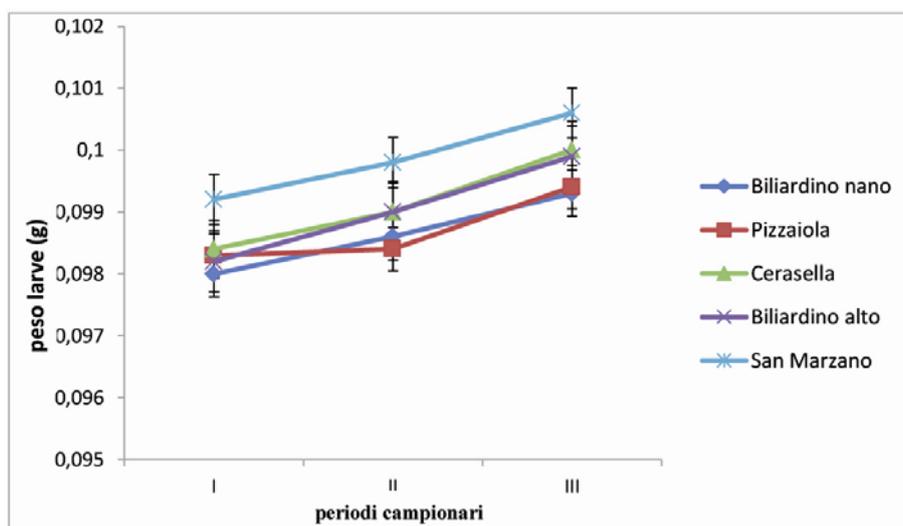


Fig. 90 – Andamento generale delle curve di accrescimento larvale. Il valore di accrescimento ponderale massimo più rappresentativo, pari a 0,1006 g, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quelli meno rappresentativi, pari rispettivamente a 0,0993 g e 0,0994 sulle linee Biliardino nano e Pizzaiola ($df = 4$; $MS = 1,66E-05$; $P \geq 0,05$).

Valutazioni ponderali crisalidi

Le curve di accrescimento ponderale più rilevanti sono state rilevate per la linea controllo San Marzano dove sono stati raggiunti valori massimi di 0,0704 g; sulla linea Biliardino alto l'accrescimento si presenta più marcato rispetto alla linea Cerasella solo tra primo e secondo periodo campionario. L'andamento di crescita per le linee Pizzaiola e Biliardino nano risulta essere lo stesso ma per la prima linea vengono rilevati i valori ponderali massimi più elevati e pari a 0,0682 g (**Fig. 91**). Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le tesi osservate ($df=4$; $MS= 8,18E-05$; $P \geq 0,05$).

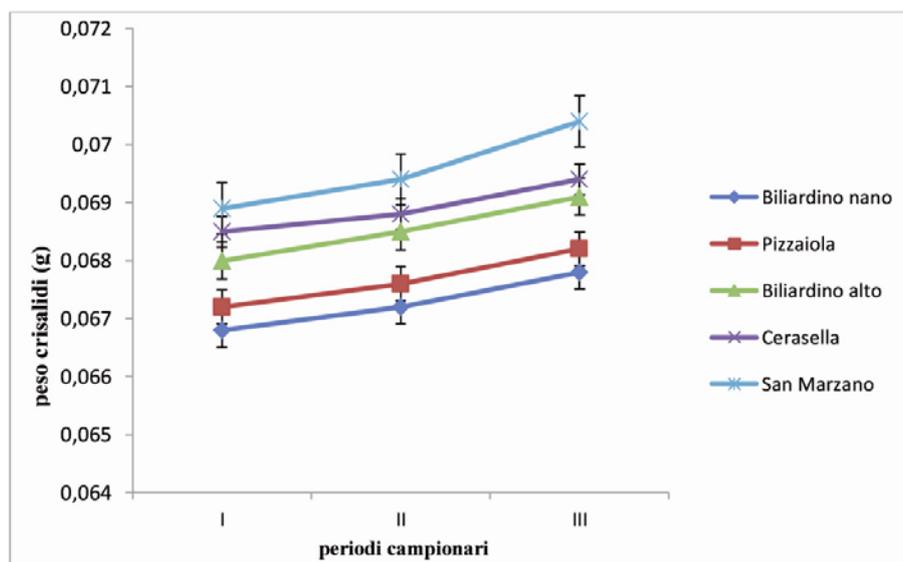


Fig. 91 – Andamento generale delle curve di accrescimento delle crisalidi. Il valore di accrescimento ponderale massimo più rappresentativo, pari a 0,0704 g, è stato rilevato sulla linea San Marzano mentre quello meno rappresentativo, pari a 0,0678 g sulla linea Biliardino nano ($df = 4$; $MS = 8,18E-05$; $P \geq 0,05$).

Osservazioni sul potenziale biotico: fecondità femmine

Il numero più basso di uova deposto per femmina è stato rilevato sulla linea Biliardino nano con un valore pari a 93; sulla linea San Marzano sono stati segnalati i valori di fecondità più elevati pari a 127 uova /femmina mentre sulle linee Pizzaiola, Biliardino alto e Cerasella sono stati rilevati valori rispettivamente di 94, 111 e 119 uova/femmina (**Fig. 92**). Dai confronti effettuati tra le linee risultano differenze statisticamente significative ($df=4$; $MS=680,597$; $P \leq 0,05$).

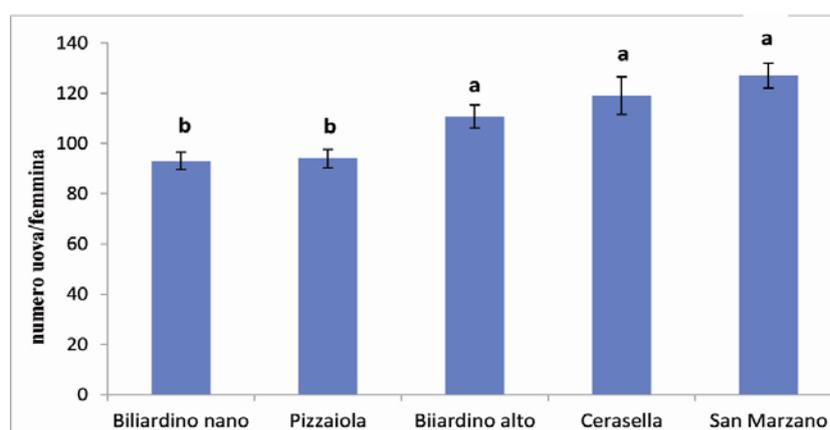


Fig. 92 – Il numero medio di uova/femmina più elevato, pari a 127, è stato osservato sulla linea San Marzano mentre quello più basso, pari a 93, sulla linea Biliardino nano. La barra indica l'errore standard. Lettere diverse indicano diversi valori di significatività (df = 4; MS = 680,597; $P \leq 0,05$).

Evoluzione biofenologica

Valutando l'evoluzione fenologica del lepidottero sulle diverse linee esaminate emergono differenze statisticamente significative per i valori riguardanti il ciclo larvale ed il ciclo completo. È stato infatti rilevato che sulla linea Biliardino nano la durata del ciclo larvale ha assunto un valore di $18,6 \pm 0,65$ giorni (**Fig. 93**; **Tab. 14**); da tale risultato si evince che su quest'ultima linea tale ciclo si è allungato di $2,3 \pm 0,45$ giorni rispetto alla linea Pizzaiola, di $1,8 \pm 0,50$ giorni rispetto alla linea Cerasella, di $2,1 \pm 0,50$ rispetto alla linea Biliardino alto e di $1,4 \pm 0,55$ giorni rispetto alla linea controllo San Marzano. Conseguenzialmente si può osservare che il ciclo completo del lepidottero raggiunge la sua massima durata sulla linea meno suscettibile Biliardino nano con valore pari a 29,3 giorni; i valori più bassi, pa-

ri rispettivamente a 26,2 e 26,1 giorni, sono stati invece rilevati per le linee Pizzaiola e San Marzano.

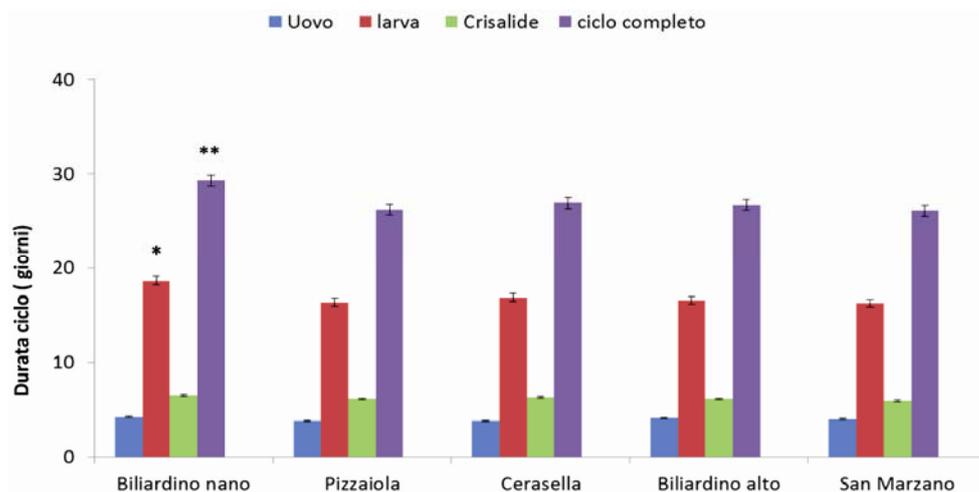


Fig. 93 – Evoluzione biofenologica di *T. absoluta* sulle diverse linee esaminate. Sulla linea Biliardino nano il ciclo completo, pari a 29,3 giorni, si è allungato di $3,2 \pm 0,45$ giorni rispetto alla linea San Marzano e $3,1 \pm 0,45$ giorni rispetto alla linea Pizzaiola. Le barre indicano l'errore standard. L'asterisco indica la significatività statistica (df = 4; MS = 4,885; *P ≤ 0,001; df = 4; MS = 5,667; **P ≤ 0,01).

				
	Uova	Larva	Crisalide	Durata ciclo (gg)
Pizzaiola	3,8 ± 0,45	16,3 ± 0,45	6,1 ± 0,22	26,2
Biliardino nano	4,2 ± 0,27	18,6 ± 0,65	6,5 ± 0,35	29,3
Biliardino alto	4,1 ± 0,22	16,5 ± 0,50	6,1 ± 0,22	26,7
Cerasella	3,8 ± 0,45	16,8 ± 0,57	6,3 ± 0,45	26,9
San Marzano	4,0	16,2 ± 0,45	5,9 ± 0,22	26,1

Tab. 14 – Valutazione globale dell'evoluzione biofenologica di *T. absoluta* rilevata sulle diverse linee esaminate.

5.

Discussioni e conclusioni

§ 1 – Isolamento gene ortologo 102 in *Tuta absoluta*

Vista la mancata disponibilità di sequenze di *T. absoluta* in banca dati, in suddetto lavoro di tesi, la parte di sequenza più conservata dell'ortologo 102 è stata isolata mediante utilizzo di oligo 102 specifici disegnati sulla sequenza più conservata del cDNA corrispondente di *S. littoralis* al fine di ottenere lo specifico costrutto (dsRNA 102) per il silenziamento genico post-trascrizionale. Valutando l'impiego di possibili strategie di controllo applicative, andrebbero quindi definite meglio le problematiche associate al targeting dell'ortologo 102 in esperimenti di interferenza gene-specifica mediante caratterizzazione strutturale completa del target ed indagini funzionali; infatti è stato ampiamente dimostrato in letteratura che l'RNA interference è un complesso ed efficiente meccanismo molecolare capace di alterare o inibire funzioni fisio-biologiche essenziali per la fitness di insetti masticatori e succhiatori (Borgio *et al.*, 2010) come la muta (FALABELLA ET AL., 2012), l'assorbimento e traslocazione mesenteriale (CASARTELLI, 2008; TURNER ET AL., 2006) e la vitellogenesi (MITCHELL ET AL., 2003) solo tramite targeting di bersagli molecolari endogeni specifici e ben caratterizzati. Allo stato attuale, in *T. absoluta*, non è possibile conoscere i meccanismi di modulazione melanogenetica della risposta immunitaria codificati del gene 102, in quanto è molto difficile indurre la melanizzazione in larve poco adatte ad essere manipolate e preparate per l'iniezione delle beads cromatografiche che devono in-

durre lo stimolo immunitario. I saggi di incapsulamento *in vivo* sono fondamentali per capire il ruolo funzionale di suddetto target nella risposta immunitaria in quanto la melanogenesi e la deposizione localizzata della melanina in specie di lepidotteri affini possono essere controllate da meccanismi differenti. Infatti il silenziamento del gene 102 in *S. littoralis* ha determinato, come in *H. virescens*, l'ottenimento di un fenotipo immunosoppresso in cui le beads cromatografiche iniettate non venivano incapsulate, tuttavia nelle larve interferite non è stata osservata, a differenza dell'altro nottuide, una reazione di melanizzazione sistemica e le larve sopravvivevano regolarmente (DI LELIO, 2013).

§ 2 – **Esperimenti di interferenza gene-specifica: dsRNA 102 delivery su uova**

A differenza di quanto dimostrato in *S. littoralis* (DI LELIO, 2013), i trattamenti con soluzioni di dsRNA 102 su uova di *T. absoluta* non hanno determinato una significativa diminuzione della percentuale di schiusa tra tesi trattato e controllo; inoltre anche il tasso di sopravvivenza larvale proveniente da uova trattate non ha rilevato valori di significatività statistica sia in presenza che in assenza di trattamento decorionante. In ogni modo resta da indagare quale sia la funzione del gene 102 nello sviluppo embrionale: l'ipotesi è che esso sia presumibilmente coinvolto in processi di formazione dei diversi tessuti embrionali e della neolarva, come suggerito da FALABELLA ET AL., 2012, in quanto sia la sintesi delle fibre amiloidi funzionali nei processi di incapsulamento durante la risposta immunitaria che la tannizzazione della cuticolina nella tegumento-genesi sono derivate dalla polimerizzazione di chinoni e dalla deposizione localizzata di melanina.

Il silenziamento di suddetto gene nelle uova andrebbe quindi a inibire lo stesso processo biochimico associato alla sintesi dei precursori chinonici della sclerotina nell'esocuticola del tegumento con problemi nella tannizzazione e melanogenesi dello stesso durante lo sviluppo embrionale e la muta larvale determinando effetti fenotipici letali. I risultati qui riportati non corroborano questa tesi la cui vali-

dità necessita comunque di essere approfondita con studi funzionali più mirati così come le metodiche adottate in questo approccio biotecnologico innovativo di silenziamento.

§ 3 – Biosaggi di suscettibilità in linee commerciali di pomodoro

Gran parte dei lavori disponibili in letteratura riguardano soltanto i meccanismi di resistenza di accessioni selvatiche e di ibridi derivanti da incroci tra genotipi selvatici e coltivati (SIMMONS e GURR, 2005) di pomodoro a *T. absoluta* ma non di linee commerciali; in particolare tali meccanismi sono collegati maggiormente a risposte di difesa diretta come l'antibiosi (MALUF ET AL., 2010; RESENDE ET AL., 2006; AZEVEDO ET AL., 2003; LEITE ET AL., 2012). Tali autori dimostrano infatti che i peli e i trichomi ghiandolari presenti nelle foglie delle accessioni di pomodoro testate (*Lycopersicon hirsutum*, *L. peruvianum* e *L. pennellii*, *L. pissisi*, *L. cheesmanii*, *L. glandulosum*) producono acilzuccheri (MALUF ET AL., 2010; DIAS ET AL., 2014), metil-chetoni complessi (tridecan-2-one, 1-undecan-2-one, 3-pentecan-2-one) (GHAREKANI e SALEK-EBRAHIMI, 2013), fitormoni (ERB ET AL., 2012) ed idrocarburi (esadecano, triacontano, octacosano) (OLIVEIRA ET AL., 2009) capaci di inibire sensibilmente l'ovideposizione e l'attività trofica larvale del fillominatore ma anche di altri insetti masticatori (lepidotteri nottuidi) (DIAS ET AL., 2014) e fitomizi (pentatomidi e aleirodidi) nonché di acari (OLIVEIRA ET AL., 2009; DEGUANG e TRUMBLE, 2004). Per questi motivi la selezione e l'identificazione di genotipi, accessioni, e linee commerciali di pomodoro tolleranti e/o resistenti al lepidottero rappresentano ulteriori presupposti vantaggiosi per potenziare le strategie di controllo. Per evidenziare quindi aspetti legati

a resistenza e/o tolleranza di linee commerciali di pomodoro al lepidottero sono stati effettuati biosaggi in serra, campo e camera climatica. Nei biosaggi di suscettibilità condotti in pieno campo e serra su 8 linee commerciali di pomodoro è stato osservato che alcune linee a bacca tonda (Biliardino alto, Biliardino nano e Cerasella) presentavano i valori di infestazione più bassi sia per la percentuale di foglioline minate che per la percentuale di bacche infestate. Le indagini in camera climatica sono stati effettuati al fine di evidenziare e confermare la presunta bassa suscettibilità delle linee a bacca tonda riscontrata nei biosaggi precedenti. Per i fattori biotrofici riguardanti il numero di uova deposte, la percentuale di foglioline minate, la percentuale di bacche minate, la superficie fogliare minata e la tipizzazione di mine osservate su fusti, foglie e bacche la linea Biliardino nano è risultata essere la meno suscettibile tra tutte quelle saggiate; i risultati osservati per i fattori biometrici (evoluzione biofenologica, saggi ponderali su larve e crisalidi) e per il potenziale biotico (fecondità femmine) attestavano le stesse evidenze osservate per le valutazioni biotrofiche. I bassi livelli di suscettibilità accertati per la linea Biliardino nano possono essere quindi valutati come strumenti funzionali atti ad inserire suddetta linea in programmi di selezione per putative linee resistenti e/o tolleranti. Questo risultato ottenuto è oggetto di studio e di ulteriore approfondimento in analisi trascrittomiche tipo RNA seq attualmente in corso finalizzate a determinare il completo assetto trascrit-

tomico di suddetta linea in assenza e presenza di infestazione e ad individuare eventuali geni candidati responsabili di questa bassa suscettibilità a *T. absoluta* potenzialmente utilizzabili in efficienti e proficui programmi di selezione e miglioramento genetico.

6.

Riferimenti bibliografici

- ALJAMALI, M., BOWMAN, A. S., DILLWITH, J. W., TUCKER, J. S., YATES, G. W., ESSENBERG, R. C. AND SAUER, J. R., 2002, *Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, Amblyomma americanum (L.)*, as assessed by radio-immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 331-341.
- ALTIERI M. A., NICHOLLS C. I., 2004, *Biodiversity and pest management in agroecosystems*, Second Ed. Hawthorn Press, New York.
- ALTSCHUL S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W. e LIPMAN, D. J., 1990, *Basic local alignment search tool*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- AL-ZAIDI S., 2011, *History and current IPM strategies for the management of Tuta absoluta in the Mediterranean region*, EPPO//IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of Tuta absoluta (Tomato borer), Agadir, Morocco, November 16-18, 2011; Book of abstract: 41, America North of Mexico, *Zootaxa*, 2231:1-39, Apollo Books, Verster Skerninge, Danimarca, 586 pp.
- AMDAM, G. V., SIMOES, Z. L., GUIDUGLI, K. R., NORBERG, K. AND OMHOLT, S. W., 2003, *Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA*, *BMC Biotechnol.* 3: 1.
- ARAKANE, Y., LI, B., MUTHUKRISHNAN, S., BEEMAN, R. W., KRAMER, K. J. AND PARK, Y., 2008, *Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, 139 CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, Tribolium castaneum*. *Mech. Dev.* 125: 984-995.
- 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 Biochem. Molec. Biol.* 36: 683-693.
- ARNÒ J., GABARRA R., 2010, *Controlling Tuta absoluta, a new invasive pest in Europe*, ENDURE training in integrated pest management, no. 5, pp. 1-8. ([http://www. Endure network.eu/about_endure/all_the_news/new_guide_tackling_tuta_absoluta](http://www.Endure_network.eu/about_endure/all_the_news/new_guide_tackling_tuta_absoluta)).

- ARONSTEIN, K., PANKIW, T., SALDIVAR, E., 2006, *SID-1 is implicated in systemic gene silencing in the honey bee*, J. Apicultural Res. 45: 20-24.
- AZEVEDO S. M., FARIA M. V., MALUF W. R., OLIVEIRA A. C. B., FREITAS J. A., 2003, *Zingiberene-mediated resistance to the South American tomato pinworm derived from *Lycopersicon hirsutum* var. *hirsutum*.*, Euphytica, 134:347-351.
- BABIKOVA Z., GILBERT L., BRUCE J. A., BIRKETT M., CAULFIELD J. C, WOODCOCK C., PICKETT J. A., DAVID JOHNSON D., 2013, *Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack*, Economic letters, 16: 835-843.
- BARRIENTOS Z. R., APABLAZA H. J., NORERO S. A., ESTAY P. P., 1998, *Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae)*, Ciencia y Investigación Agraria, 25(3): 133-137.
- BATALLA-CARRERA L., MORTON A., GARCÍA DEL PINO F., 2010, *Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions*, BioControl, 55: 523-530.
- BAUM J. A., BOGAERT T., CLINTON W., HECK G. R., FELDMANN P., ILAGAN O., JOHNSON S., PLAETINCK G., MUNYIKWA T., PLEAU M., VAUGHN T., ROBERTS J., 2007, *Control of coleopteran insect pests through RNA interference*, Nat. Biotechnol., 25: 1322-1326.
- BAUTISTA M. A., MIYATA T., MIURA K., TANAKA T., 2009, *RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin*, Insect Biochem. Mol. Biol.. 39: 38-46.
- BELDA J.E., GIMÉNEZ A., JAVIER CALVO F., 2011, *Success and extension of biological control strategies for managing *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep. Gelechiidae) populations in the Mediterranean area*, EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (Tomato borer), Agadir, Morocco, November 16-18, 2011; Book of abstract: 28.

- BENTANCOURT C. M., SCATONI I. B., RODRIGUEZ J. J., 1996, *Influencia de la temperatura sobre la reproducción y el desarrollo de Scrobipalpusoides absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera, Gelechiidae), *Revista Brasileira de Biologia*, 56 (4): 661-670.
- BENVENGA S. R., FERNANDES O., GRAVENA S., 2007, *Tomada de decisão de controle da traçado- tomateiro através de armadilhas com feromônio sexual*, *Horticultura Brasileira*, 25(2): 164-169.
- BERNSTEIN E., CAUDY A. A., HAMMOND S. M. & HANNON G. J., 2001, *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*, *Nature* 409, 363-36640.
- BHATTACHARYYA A., BHAUMIK A., PATHIPATI USHA RANI U. P., MANDAL S, TIMOTHY T. E., 2010, *Nano-particles - A recent approach to insect pest control*, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9 (24), pp. 3489-3493.
- BIONDI A., DESNEUX N., AMIENS-DESNEUX E., SISCARO G., ZAPPALÀ L., 2013, *Biology and Developmental Strategies of the Palaearctic Parasitoid Bracon nigricans (Hymenoptera: Braconidae) on the Neotropical Moth Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), *Journal of Economic Entomology*, 1638-1647.
- BIONDI A., DESNAUX N., SISCARO G., TROPEA GARZIA G., AMIENS-DESNEUX E., ZAPPALÀ L., 2012b, *Side effects of bioinsecticides used to control Tuta absoluta*, *IOBCWPRS Bulletin.*, 80: 211-216.
- BIONDI A., DESNEUX N., SISCARO G., ZAPPALÀ L., 2012a, *Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator Orius laevigatus*, *Chemosphere*, 87 (7): 803-812.
- BISCHOFF V., VIGNAL C., DUVIC B., BONECA I. G., HOFFMANN J. A., ROYET J., 2006, *Down regulation of the Drosophila immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2*, *PLoS Pathogens*, 2: 139-147.
- 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.

- BOLTER C. J., DICKE M., VAN LOON J.J.A., VISSER J.H., POSTHUMUS M.A., 1997, *Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination*, J. Chem. Ecol. 23: 1003-1023.
- BORGIO J. F., 2010, *RNAi mediated gene knockdown in sucking and chewing insect pests*, Journal of biopesticides 3(1) (Special Issue): 386-393.
- BOROVSKY D., 2005, *Insect peptide hormones and RNA-mediated interference (RNAi): promising technologies for future plant protection*, Phytoparasitica 33: 109-112.
- BOWMAN A. S., COONS L. B., NEEDHAM G. R. AND SAUER J. R., 1997, *Tick saliva: recent advances and implications for vector competence*, Med. Vet. Entomol. 11: 277-285.
- BROWN S. J., MAHAFFEY J. P., LORENZEN M. D., DENELL R. E. AND MAHAFFEY J. W., 1999, *Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects*, Evol. Dev. 1: 11-15.
- BUCHER G., SCHOLTEN J. AND KLINGLER M., 2002, *Parental RNAi in Tribolium (Coleoptera)*, Curr. Biol. 12: 85-86.
- CABELLO T., GALLEGRO J.R., VILA E., SOLER A., DEL PINO M., CARNERO A., HERNANDEZ SUAREZ E., POLASZEK A., 2009, *Biological control of the South American tomato pinworm Tuta absoluta (Lep.: Gelechiidae), with release of Trichogramma acheae (Hym.: Trichogrammatidae) in tomato greenhouses of Spain*. IOBC/WPRS Bulletin, 49: 225-230.
- CAJIAS EVELYN A., HÈCTOR VARGAS C., FRANCISCA ESTEFANE D., DANTE BOBADILLA G., 2013, *Actividad biológica de Lonchocarpus guaricensis Pittier en el control de larvas de Tuta absoluta (Meyrick)*, Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Vol. 45 No. 1, pp. 117-125.
- CALVO F. J., LORENTE M.J., STANSLY P. A., BELDA E. J., 2012, *Preplant release of Nesidiocoris tenuis and supplementary tactics for control of Tuta absoluta and Bemisa tabaci in greenhouse tomato*, Entomologia experimentalis et applicata, 10:111-119.

- CALVO F. J., SORIANO J. D., BOLCKMANS K., BELDA J. E., 2013, *Host instar suitability and life-history parameters under different temperature regimes of *Necremnus artynes* on *Tuta absoluta**, *Biocontrol Science and Technology*, Volume 23, Issue 7, pp. 231-247.
- CAPARROS MEGIDO R., HAUBRUGE E., FRANÇOIS JEAN VERHEGGEN F. J., 2013, *Pheromone-based management strategies to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)*, A review, 2013 *Revue de Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*.
- CARMELL M. A., XUAN Z., ZHANG M. Q. & HANNON G. J., 2002, *The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis*, *Genes. Dev.*, 16: 2733-2742.
- CARPIO C., DANGES O., DUPAS S., LÈRY X., 2013, *Development of a viral biopesticide for the control of the Guatemala potato tuber moth *Tecia solanivora**, *Journal of invertebrate*, volume 112, issue 2, pp. 184-191.
- CASARTELLI M., CERMENATI G., RODIGHIERO S., PENNACCHIO F., GIORDANA B., 2008, *A megaline like-receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect (*Bombyx mori*:Lepidoptera)*, *Am. J Physiol.*, 295 (4): R1290:-1300.
- CELY L. P., FERNANDO CANTOR F., RODRÍGUEZ D., 2010, *Determination of levels of damage caused by different densities of *Tuta absoluta* populations (Lepidoptera: Gelechiidae) under greenhouse conditions*, *Agronomía Colombiana* 28(3), 401-411.
- CHAILLEUX A., BEAREZ P., PIZZOL J., AMIENS-DESNEAUX E., RAMIREZ-ROMERO R., DESNEAUX N., 2013, *Potential for combined use of parasitoids and generalist predators for biological control of the key invasive tomato pest *Tuta absoluta**, *Journal of pest science* volume 86, issue 3, pp. 533-541.
- CHEN J., ZHANG D., YAO Q., ZHANG J., DONG X., TIAN H. AND ZHANG W., 2010. *Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens**, *Insect Mol. Biol.* 19: 777-786.

- CHEN J., ZHANG D., YAO Q., ZHANG J., DONG X., TIAN H. AND ZHANG W., 2010, *Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, Nilaparvata lugens.*, *Insect Mol. Biol.* 19: 777-786.
- CHEOL SONG G., MIN RYU C., 2013, *Two Volatile Organic Compounds Trigger Plant Self-Defense against a Bacterial Pathogen and a Sucking Insect in Cucumber under Open Field Conditions*, *Journal of International Molecular Sciences* 14, 9803-9819.
- CIPOLLINI D., PURRINGTON C. B., BERGELSON J., 2003, *Costs of induced responses in plants*, *Basic and Applied Ecology*, 4:79-86.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2013, *Control of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique*, *Journal of Applied Entomology*, 2013, volume 137, issue 1-2, pp. 16-28.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2012b, *Control of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique*, *Journal of Applied Entomology*, DOI: 10.1111/j.1439-0418.2012.01735.x, pubblicazione on line.
- COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., 2012a, *Potential of mass trapping for Tuta absoluta management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps*, *IOBC/WPRS Bulletin*, 80: 319-324.
- CONTRERAS J., MENDOZA J. E., MARTÍNEZ-AGUIRRE M. R., GARCÍA-VIDAL L., IZQUIERDO J., BIELZA P., 2014, *Efficacy of Entomopathogenic Fungus Metarhizium anisopliae Against Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*, 107(1):121-124.
- CRUZ, J., MANÉ-PADRÓS, D., BELLÉS, X., MARTÍN, D., 2006, *Functions of the ecdysone receptor isoform-A in the hemimetabolous insect Blattella germanica revealed by systemic RNAi in vivo*, *Dev. Biol.*, 297: 158-171.
- DAI H., MA L., WANG J., JIANG R., WANG Z. AND FEI J., 2008, *Knockdown of ecdysis-triggering hormone gene with a binary UAS/GAL4 RNA interference system leads to lethal ecdysis deficiency in silkworm*, *Acta Biochim. Biophys., Sin.* 40: 790-795.

- DEGUANG L., TRUMBLE J. T., 2004, *Tomato Psyllid Behavioral Responses to Tomato Plant Lines and Interactions of Plant Lines with Insecticides*, *Journal of Economic Entomology*, 97(3):1078-1085. 2004.
- DELVARE G., LACORDAIRE A. I., RAMEL J. M., 2011 – *Necremnus artynes (Walker, 1839) (Eulophidae), a potential beneficial for the biological control of Tuta absoluta (Meyrick, 1917)*, -EPPO/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (Tomato borer), Agadir, Morocco, November 16-18, 2011; Book of abstract: 28.
- DERBALAH A. S., MORSEY S. Z., EL-SAMAHY M. 2013, *Some recent approaches to control Tuta absoluta in tomato under greenhouse conditions*, *African Entomology*, Volume 20, Issue 1, pp. 27-34.
- DESNEUX N., WAJNBERG E., WYCKHUYS K.A.G., BURGIO G., ARPAIA S., NARVÁEZ-VASQUEZ C.A., GONZÁLES-CABRERA J., CATALÁN RUESCAS D., TABONE E., FRANDON J., PIZZOL J., PONCET C., CABELLO T., 2010, *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control*, *Journal of Pest Science* 83: 197-215.
- DI LELIO I., 2013, *Usa di RNAi nel controllo degli insetti*, Tesi di dottorato, p. 176.
- DIAS D. M., RESENDE J. T. V., FARIA M. V., CAMARGO L. K. P., CHAGAS R. R., LIMA I. P., 2014, *Selection of processing tomato genotypes with high acyl sugar content that are resistant to the tomato pinworm*, *Genetics and Molecular Research* 12 (1): 381-389.
- DICKE M. AND VAN LOON J.J.A., 2000, *Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context*, *Entomol. Exp. Appl.*, 97: 237-24.
- DONG Y. AND FRIEDRICH M., 2005, *Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper*, *BMC Biotechnol.*, 5: 25.
- DUFFEY S. S. AND STOUT M. J., 1996, *Antinutritive and toxic components of plant defense against insects*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 3-38.

- DUFOURMANTEL N., PELISSIER B., GARCON F., PELTIER G., FERULLO J. M. AND TISSOT G., 2004, *Generation of fertile transplastomic soybean*, Plant Mol. Biol., 55: 479489.
- DZITOYEVA S., DIMITRIJEVIC N., MANEV H., 2001, *Intra-abdominal injection of doublestranded 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. Ecology, geographic expansion and prospects for biological control*, Journal of Pest, 34(5): 729-741.
- ELBASHIR S. M., MARTINEZ J., PATKANIOWSKA A., LENDECKEL W. & TUSCHL T., 2001, *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*, EMBO J, 20, 6877-6888.
- ELEK N., HOFFMAN R., RAVIV U., RESH R., ISHAAYA I., MAGDASSI SH., 2010, *Novaluron nanoparticles: Formation and potential use in controlling agricultural insect pests*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, (372)66-72.
- ERB M., MELDAU S., HOWE A. G., 2012, *Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. Trends in Plant Science*, volume 17, Issue 5; 250-259.
- ERTURK-HASDEMIR D., SILVERMAN N., 2005, *Eater: a big bite into phagocytosis*, Cell 123: 190-192.
- FABRICK J. A., KANOST M. R., BAKER J. E., 2004, *RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the Pyralid moth, Plodia interpunctella*, J. Insect Sci, 4:15.
- FALABELLA P., RIVIELLO L., PASCALE M., DI LELIO I., TETTAMONTI G., GRIMALDI A., IANNONE C., MONTI M., PUCCI P., TAMBURRO A. M., DE EGUILEOR M., GIGLIOTTI S., PENNACCHIO F., 2012, *Functional amyloids in insect immune response*, Insect Molecular Biology, 42: 203-211.
- FEINBERG E., HUNTER C., 2003, *Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1*, Science 301: 1545-1547.

- FELDHAAAR H. AND GROSS R., 2009, *Insects as hosts for mutualistic bacteria*, Int. J. Med. Microbiol., 299: 1-8.
- FERRACINI C., INGEGNO B.L., NAVONE P., FERRARI E., MOSTI M., TAVELLA L., ALMA A., 2012, *Adaptation of indigenous larval parasitoids to Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) in Italy*, Journal of Economic Entomology, 105(4): 1311-1319.
- FILHO M.M., VILELA E. F., ATTYGALLE A. B., MEINWALD J., SVATOS A., JHAM G. N., 2000, *Field trapping of tomato moth, Tuta absoluta with pheromone traps*, Journal of Chemical Ecology, 26 (4): 875-881.
- FILIPOWICZ, W., 2005, *RNAi: The nuts and bolts of the RISC machine*, Cell 122-17-20.
- FITCHES E., WOODHOUSE S. D., EDWARDS J. P. AND GATEHOUSE J. A., 2001, *In vitro and in vivo binding of snowdrop (Galanthus nivalis agglutinin, GNA) and jackbean (Canavalia ensiformis, Con A) lectins within tomato moth (Lacanobia oleracea) larvae, mechanisms of insecticidal action*, J. Insect Physiol., 47: 777-787.
- FRANK S. D., 2010, *Biological control of arthropod pests using banker plant systems: past progress and future directions*, Biological Control, 52(1): 8-16.
- FROHMAN M. A., DUSH M. K., AND MARTIN G. R., 1988, *A new technique for amplification of cDNA ends (RACE)* Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85, 8998.
- FUJITA K., SHIMOMURA K., YAMAMOTO K., YAMASHITA T., SUZUKI K., 2006, *A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle*, Biochem. Biophysic. Res. Com., 345: 502-507.
- GABARRA R., ARNÒ J., 2010, *Resultados de las experiencias de control biológico de la polilla del tomate en cultivo de invernadero y aire libre en Cataluña*, Phytoma España, 217: 66-68.
- GABARRA R., ARNÒ J., LARA L., VERDÚ M. J., RIBES A., BEITIA F., URBANEJA A., TERREZ M.M., MOLLÀ O., RIUDAVETS J., 2014, *Native parasitoids associated with Tuta absoluta in the tomato production areas of the Spanish Mediterranean Coast*, Biocontrol, 59:45-54.

- GARCIA DEL PINO F, ALABERN X., MORTON A., 2013, *Efficacy of soil treatments of entomopathogenic nematodes against the larvae, pupae and adults of Tuta absoluta and their interaction with the insecticides used against this insect*, Biocontrol, December 2013, Volume 58, Issue 6, pp 723-731.
- GARDINER M. M., LANDIS D. A., GRATTON C., DIFONZO C. D., O' NEAL M., CHACON J. M., WAYO M. T., SCHMIDT N. P., MUELLER E. E., HEIMPEL G. E., 2009, *Landscape diversity enhances biological control of an introduced crop pest in the north-central USA*, Ecological Applications, 19: 143-154.
- GATEHOUSE J. A., 2002, *Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction*, New Phytol., 156: 145-169.
- GHAREKHANI G. H., SALEK-EBRAHIMI H., 2013, *Evaluating the damage of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on some cultivars of tomato under greenhouse condition*, Archives Of Phytopathology And Plant Protection, Volume 47, Issue 4.
- GIORGINI M., BERNARDO U., PEDATA A. P., 2012, *Il complesso di parassitoidi di Tuta absoluta (Meyrick) in Italia*, Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Anno LX, 2012: 77-84.
- GISH, W. AND STATES, D. J., 1993, *Identification of protein coding regions by database similarity search*, Nat. Genet. 3: 266-272.
- GIUSTOLIN T. A., VENDRAMIM J. D., ALVES S. B., VIEIRA S. A., PEREIRA R. M., 2001, *Susceptibility of Tuta absoluta (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of Lycopersicon to Bacillus thuringiensis var. kurstaki*, Journal of Applied Entomology, 125: 551-556.
- GONZÀLES-CABRERA J., MOLLÀ O., MONTÒN H., URBANEJA A., 2011, *Efficacy of Bacillus thuringiensis (Berliner) in controlling the tomato borer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*, BioControl, 56: 71-80.
- GORDON K. H. J., WATERHOUSE P. M., 2007, *RNAi for insect-proof plants*. Nat. Biotechnol., 25: 1231-1232.
- GRIEBLER M., WESTERLUND S. A., HOFFMANN K. H., MEYERING-VOS M., 2008. *RNA interference with the allatoregulating neuropeptide genes from*

the fall armyworm Spodoptera frugiperda and its effects on the JH titer in the hemolymph, J. Insect Phys., 54: 997-1007.

GUANG YANG, MINSHENG YOU, LIETTE VASSEUR, YIYING ZHAO AND CHUNHUI LIU, 2011, *Development of RNAi in Insects and RNAi-Based Pest Control*, Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.).

HAKIM R. S., BALDWIN K., SMAGGHE G., 2010, *Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis*, Ann. Rev. Ent., 55: 593-608.

HALKIER B.A. AND DU L.C., 1997, *The biosynthesis of glucosinolates*, Trends Plant Sci.2: 425-431.

HANNON J., GREGORY A. 2002, *The phenomenon of RNA interference Nature*, 418, 244-25.

HEIL M. AND BALDWIN I. T., 2002, *Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept*, Plant Science 7: 61-67.

HOSSAIN M., SHIMIZU S., MATSUKI M., IMAMURA M., SAKURAI S., IWAMI M., 2008, *Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development*, Insect Biochem., Molec. Biol., 38: 1001-1007.

HOU B.-K., ZHOU Y.-H., WAN L.-H., ZHANG Z.-L., SHEN G.-F., CHEN Z.-H. AND HU Z.-M., 2003, *Chloroplast transformation in oilseed rape*, Trans. Res. 12: 111-114.

HUEMER P., KARSHOLT O., 2010, *Gelechiidae II (Gelechiinae: Gnorimoschemini)*, Volume II.

HUGHES C. L. AND KAUFMAN T. C., 2000, *RNAi analysis of Deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug Oncopeltus fasciatus: novel roles for Hox genes in the hemipteran head*, Development 127: 3683-3694.

HUGHES C. L. AND KAUFMAN T. C., 2000, *RNAi analysis of deformed, proboscipedia and Sex combs reduced in the milkweed bug Oncopeltus fasciatus: novel roles for Hox genes in the hemipteran head*, Development 127: 3683-3694.

- HUVENNE H., SMAGGHE G., 2010, *Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potentials of RNAi for pest control: a review*, J Insect Physiol, 56: 227-235.
- IMENES S. D. L., FERNANDES M. A. U., DE CAMPOS T. B., TAKEMATSU A. P. 1990, *Aspectos biológicos e comportamentais da traca do tomateiro Scrobipalpula absoluta (Meyrick, 1917), (Lepidoptera: Gelechiidae)*, Arquivos do Instituto Biológico, 57 (1/2): 63: 68.
- INGEGNO B. L., FERRACINI C., GALLINOTTI D., ALMA A., TAVELLA L., 2013, *Evaluation of the effectiveness of Dicyphus errans (Wolff) as predator of Tuta absoluta (Meyrick)*, Biological control, issue 2, pp. 246-252.
- ISOE J., RASCON A. A. JR., KUNZ S. AND MIESFELD R. L., 2009, *Molecular genetic analysis of midgut serine proteases in Aedes aegypti mosquitoes*, Insect Biochem. Mol. Biol., 39: 903-912.
- JACOBSON R., MARTIN G., 2011, *A potential role for entomopathogenic nematodes within IPM of Tuta absoluta (Meyrick) on organic tomato crops*, IOBC/WPRS Bulletin, 68: 79-83.
- JAMOUSSE K., SELAMI S., NASFI Z., KRICHEN-MAKNI S., TOUNSI S., 2013, *Efficiency and midgut histopathological effect of the newly isolated Bacillus thuringiensis KS δ -endotoxins on the emergent pest Tuta absoluta*, Journal of Microbiology and Biotechnology issue 23(8): 1099-1106.
- JAMUR M.C., OLIVIER C., 2010, *Permeabilization of cell membranes*, Methods in Molecular Biology, 588: 63-66.
- JAUBERT-POSSAMAI S., LE TRIONNAIRE G., BONHOMME J., CHRISTOPHIDES G., RISPE C. AND TAGU D., 2007, *Gene knockdown by RNAi in the pea aphid Acyrthosiphon pisum*, BMC Biotechnol., 7: 63.
- KANGINAKUDRU S., ROYER C., EDUPALLI S. V., JALABERT A., MAUCHAMP B., CHANDRASHEKARAI AH PRASAD S. V., CHAVANCY G., COUBLE P. AND NAGARAJU J., 2007, *Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms*, Insect Mol. Biol., 16: 635-644.

- KARBAN R., AND BALDWIN I. T., 1997, *Induced response to herbivory*, The University of Chicago Press, Chicago, 319.
- KARIM SH., TROIANO E., THOMAS N MATHER T. N., 2010, *Functional genomics tool: Gene silencing in Ixodes scapularis eggs and nymphs by electroporated dsRNA*, BMC biotechnology 10:1-9.
- KENNERDELL J. R., CARTHEW, R. W., 2000, *Heritable gene silencing in Drosophila using doublestranded RNA*, Nature Biotec., 18(8): 896-898.
- KESSLER A. AND BALDWIN I. T., 2001, *Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature*, Science 291: 2141-2144.
- KIEHART D. P., CRAWFORD J. M., MONTAGUE R. A., 2000, *Collection, Dechoriation, and Preparation of Drosophila Embryos for Quantitative Microinjection*, Drosophila Protocols, 18:1-12.
- KOCKS C., CHO J. H., NEHME N., ULVILA J., PEARSON A. M., MEISTER M., STROM C., CONTO S. L., HETRU C., STUART L. M., STEHLE T., HOFFMANN J. A., REICHHART J. M., FERRANDON D., RAMET M., EZEKOWITZ R. A. B., 2005, *Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in Drosophila*, Cell, 123: 335-346.
- KONOPOVA B., JINDRA M., 2008, *Broad-complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive Holometabolism metamorphosis*, Development 135: 559-568.
- KUMAR S., DHINGRA A. AND DANIELL H., 2004, *Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes*, Plant Mol. Biol. 56: 203-216.
- LAARIF A., ZARRAD K., TAYEB W., AYED A., SOUGUIR S., CHAIEB I., 2013, *Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from Citrus aurantium (Rutaceae) fruit peels against two greenhouse insects: Spodoptera littoralis (Noctuidae) and Tuta absoluta (Gelechiidae) Advances in Agriculture, Sciences and Engineering Research, Vol 3, No 5 (2013).*
- LAWRENCE P. K. AND KOUNDAL K. R., 2002, *Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects*, E.J.B., 5 (1)1-17.

- LEE S., HODGES W. R., BROWN R. L., 2009, *Checklist of Gelechiidae (Lepidoptera)*
- LEITE G. L. D., PICANCO M., GUEDES R. N. C., ZANUNCIO J. C., 2012, *Role of plant age in the resistance of Lycopersicon hirsutum f. glabratum to the tomato leafminer Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*, Scientia Horticulturae volume 89, issue 2: 103-113, 2012.
- LIETTI M. M. M., BOTTO E., ALZOGARAY R. A., 2005, *Insecticide resistance in Argentine populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*, Neotropical Entomology, 34:113-119.
- LINDBO J. A. AND DOUGHERTY W. G., 1992, *Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts*, Virology, 189: 725-733.
- LIU C., YAMAMOTO K., CHENG T. C., KADONO-OKUDA K., NARUKAWA J., LIU S. P., HAN Y., FUTAHASHI R., KIDOKORO K., NODA H., KOBAYASHI I. TAMURA T., ET AL., 2010a, *Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, Bombyx mori*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107: 12980-12988.
- LIU C., YAMAMOTO K., CHENG T. C., KADONO-OKUDA K., NARUKAWA J., LIU S. P., HAN Y., FUTAHASHI R., KIDOKORO K., NODA H., KOBAYASHI I. TAMURA T., ET AL., 2010, *Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, Bombyx mori*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107: 12980-12985.
- LIU S., DING Z., ZHANG C., YANG B. AND LIU Z., 2010b, *Gene knockdown by introthoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, Nilaparvatalugens*, Insect Biochem. Mol. Biol. 40: 666-671.
- LONI A., ROSSI E., VAN ACHTERBERG K., 2011, *First report of Agathis fuscipennis in Europe as parasitoid of the tomato leafminer Tuta absoluta*, Bulletin of Insectology, 64: 115-117.
- LUNA M. G., SÀNCHEZ N. E., PEREYRA P. C., NIEVES E., SAVINO V., LUFT E., VIRLA E., SPERANZA S., 2012, *Biological control of Tuta absoluta in Argentina and Italy: evaluation of indigenous insects as natural en-*

- emies*, -EPPO Bulletin, 42: 260-267.
- MALESZKA J., FORET S., SAINT R. AND MALESZKA R., 2007, *RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (Apis mellifera)*, Dev. Genes Evol., 217: 189-196.
- MALUF W. R., GOMES L. A. A., KNAPP M., 2010, *Broad-spectrum artropod resistance in hybrids with between high and low acylsugars tomato lines*, Crop Science, 50(2): 439-450.
- MAO Y. B., CAI W. J., WANG J. W., HONG G. J., TAO X. Y., WANG L. J., HUANG Y. P., CHEN X. Y., 2007, *Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol*, Nat. Biotechnol. 25: 1307-1313.
- MARCH J. C., BENTLEY W. E., 2007, *RNAi-based tuning of cell cycling in Drosophila S2 cells: Effects on recombinant protein yield*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 73(5):1128-1135.
- MARTÌ MARTÌ S., MUNOZ CELDRAN I., CASAGRANDE E., 2010, *El uso de feromonas para el control de Tuta absoluta: primeras experiencias en campo*, Phytoma España, 217: 35-40.
- MARTÍN D., MAESTRO O., CRUZ J., MANE-PADROS D., BELLÉS X., 2006, *RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach Blattella germanica*, J. Insect Physiol., 52: 410-416.
- MCBRIDE K. E., SVAB Z., SCHAAF D. J., HOGAN P. S., STALKER D. M. AND MALIGA P., 1995, *Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco*, Biotechnology (N.Y.) 13: 362-365.
- MEISTER G., TUSCHL T., 2004, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*, Nature, 431: 343-349.
- MEYERING-VOS M., MULLER A., 2007, *RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket Gryllus bimaculatus*, J. Insect Physiol., 53: 840-848.
- MILLER S. C., BROWN S. J., TOMOYASU Y., 2008, *Larval RNAi in Drosophila?*

- Dev. Genes Evol., 218: 505-510.
- MIN LÜ, WENJUN WU, HUIXIA LIU, 2013, *Insecticidal and Feeding Deterrent Effects of Fraxinellone from Dictamnus dasycarpus against, Four Major Pests Molecules*, 18, 2754-2762.
- MINAKUCHI C., NAMIKI T., SHINODA T., 2009, *Kruppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle Tribolium castaneum*, Develop. Biol., 325: 341-350.
- MIRANDA M. M. M., PICANÇO M. C., ZANUNCIO J. C., GUEDES R. N. C., 1998, *Ecological life table of Tuta absoluta (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae)*, Biocontrol Science and Technology, 8: 597-606.
- MISQUITTA L. AND PATERSON B. M., 1999, *Targeted disruption of gene function in Drosophila by RNA interference (RNAi): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96: 1451-1456.
- MITCHELL R., ROSS E., OSGOOD C., SONENSHINE D. E., DONOHUE K., KHALIL S. M., THOMPSON D., ROE R., 2007, *Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick*, Insect Biochemistry and molecular biology, volume 37, issue 4, 375-388.
- MOLLÀ O., ALONSO M., MONTON H., BEITIA F., VERDÙ, M.J., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2010, *Control biológico de Tuta absoluta. Catalogación de enemigos naturales y potencial de los míridos depredadores como agentes de control*, Phytoma España, 217: 42-46.
- MOLLÀ O., GONZÁLEZ-CABRERA J., URBANEJA A., 2011, *The combined use of Bacillus thuringiensis and Nesidiocoris tenuis against the tomato borer Tuta absoluta*, BioControl, 56: 883-891.
- MONSERRAT DELGADO A., 2009, *La polilla del tomate "Tuta absoluta" en la Región de Murcia: bases para su control*, Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Consejería de Agricultura y Agua – Serie Técnica y de Estudios, 34, 74 pp.
- MUTTI N. S., PARK Y., REESE J. C., REECK G. R., 2006, *RNAi knockdown of a*

- salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, Acyrtosiphon pisum. J. Ins. Sci. 6:38.*
- NARASIMHAN S., MONTGOMERY R. R., DEPONTE K., TSCHUDI C., MARCANTONIO N., ANDERSON J. F., SAUER J. R., CAPPELLO M., KANTOR F. S. AND FIKRIG E., 2004, *Disruption of Ixodes scapularis anticoagulation by using RNA interference*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101: 1141-1146.
- NAVARRO LOPIS V., ALFARO C., VACAS S., PRIMO J., 2010, *Application de la confusion sexual al control de la polilla del tomate Tuta absoluta Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae)*, Phytoma Españá, 217: 35-40.
- NEWMARK P. A., REDDIEN P. W., CEBRIA F. AND SANCHEZ ALVARADO A., 2003, *Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Suppl. 1: 11861-11865.
- NIEDMANN L. L., MEZA-BASSO L., 2006, *Evaluación de cepas nativas de Bacillus thuringiensis como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (Tuta absoluta Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile*, Agricultura Técnica, 66: 235-246.
- OHARA O., DORIT R. L. AND GILBERT W., 1989, *A new technique for amplification of cDNA ends (RACE)*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86, 5673.
- OHIZUMI Y., GAIDAMASHVILI M., OHWADA S., MATSUDA K., KOMINAMI J., NAKAMURA-TSURUTA S., HIRABAYASHI J., NAGANUMA T., OGAWA T. AND MURAMOTO K., 2009, *Mannose-binding lectin from yam (Dioscorea batatas) tubers with insecticidal properties against Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)*, J. Agric. Food Chem., 57: 2896-2902.
- OHNISHI A., HULL J. J., MATSUMOTO S., 2006, *Targeted disruption of genes in the Bombyx mori sex pheromone biosynthetic pathway*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103: 4398-4403.
- OKUMURA S., SAWADA M., PARK Y. W., HAYASHI T., SHIMAMURA M., TAKASE H. AND TOMIZAWA K., 2006, *Transformation of poplar (Populus alba) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts*, Transgenic Res., 15: 637-646.

- OLIVEIRA F. A., DA SILVA D. J. H., DEMOLIN G. L. L., GULAB NEWANDRAM G. J., PICANCO M., 2009, *Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*, *Scientia Horticulturae*, 119:182-187.
- PARÉ P.W. AND TUMLINSON J. H., 1999, *Plant volatiles as a defense against insect herbivores*, *Plant Physiol.*, 121: 325-331.
- PARRISH S., FLEENOR J., XU S., MELLO C. AND FIRE A., 2000, *Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference*, *Mol. Cell* 6: 1077-1087.
- PARTHASARATHY R., PALLI S. R., 2009, *Molecular analysis of juvenile hormone analog action in controlling the metamorphosis of the red flour beetle, *Tribolium castaneum**, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 70(1): 57-70. doi: 10.1002/arch.20288.
- PEARSON A., LUX A., KRIEGER M., 1995, *Expression cloning of DSR-CI, a class-C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 4056-4060.
- PENNACCHIO F., GIORDANA B., RAO R., 2012, *Applications of parasitoid virus and venom research in agriculture*, in *Beckage Nancy, Parasitoid 162 Viruses: Symbionts and Pathogens*. p. 269-283, Elsevier, ISBN: 9780123848581, doi: 10.1016/B978-0-12-384858-1.00022-9.
- PERDIKIS D., FANTINO A., LYKOURESSIS D., 2011, *Enhancing pest control in annual crops by conservation of predatory Heteroptera*, *Biological Control*, 59 (1): 13-21.
- PIESIK D., PAŃKA D., JESKE M., WENDA-PIESIK A., DELANEY K. J., WEAVER D. K., 2013, *Volatile induction of infected and neighbouring uninfected plants potentially influence attraction/repellence of a cereal herbivore*, *Journal of applied Entomology*, Vol. 137, issue 4, pp. 296-309.
- POTTING R., 2009, *Pest risk analysis, *Tuta absoluta*, tomato leaf miner moth*, Plant protection service of the Netherlands, pp. 24, www.minlnv.nl.
- PRICE D. R. G., GATEHOUSE J. A., 2008, *RNAi-mediated crop protection*

- against insects*, Trends Biotech., 26: 393-400.
- PURKAYASTHA A. AND DASGUPTA I., 2009, *Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants*, Plant Physiol. Biochem., 47:967-976.
- 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 silk-worm white gene*, Insect Molec. Biol., 11: 217-222.
- QUIROZ A., PETTERSON J., PICKETT J. A., WADHAMS L. J., NIEMEYER H. M., 1997, *Semiochemicals mediating specing behavior of bird-cherry-oat aphid, Rhopalosiphum padi, feeding on cereals*. J Chem Ecol 23:2599-2607.
- 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*, J. Biol. Chem., 277(49): 46849-46851.
- RAMET M., PEARSON A., MANFRUELLI P., LI X. H., KOZIEL H., GOBEL V., CHUNG E., KRIEGER M., EZEKOWITZ R. A. B., 2001, *Drosophila scavenger receptor Cl is a pattern recognition receptor for bacteria*, Immunity 15: 1027-1038.
- REDMAN A. M., DONALD F., CIPOLLINI JR., SCHULTZ J. C., 2001, *Fitness costs of jasmonic acid-induced defense in tomato, Lycopersicon esculentum*,. Oecologia 126:380-385.
- RESENDE J. T. V., MALUF W. R., FARIA M. V., ZAWADZKI P. A., ILDON R. D. N., 2006, *A cysl sugars in tomato leaflets confer resistance to the south american tomato pinworm Tuta absoluta Meyrick*, Ciencias Agricolas, vol. 63(1): 20-25.
- REYES M., M., ROCHA K., ALARCÒN L., SIEGWART M., SAUPHANOR B., 2012, *Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad: Pesticide Biochemistry and Phisiology*, 102:45-50.
- RICIPUTI C., 2011, *Pomodoro, contro la Tuta tre nuovi predatori naturali*.

Colture Protette, 40(3):32-34.

- RODITAKIS E., SKARMOUTSOU C., STAUERAKAKI M., MARTÌNEZ-AGIIRRE M. R., GARCÌA VIDAL L., BIELZA P., HADDI K., RAPISARDA C., RISON J., BASSI A., TEIXEIRA L., 2013, *Determination of baseline susceptibility of European populations of Tuta absoluta (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method*, Pest Management Science, 69, 217-227.
- ROIGNANT J. Y., CARRE C., MUGAT R., SZYMCZAK D., LEPESANT J. A., ANTONIEWSKI C., 2003, *Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoformspecific RNAi in Drosophila*, RNA 9: 299-308.
- RUF S., HERMANN M., BERGER I. J., CARRER H. AND BOCK R., 2001, *Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit*, Nat. Biotechnol., 19: 870-875.
- SALEH M. C., VAN RIJ R. P., HEKELE A., GILLIS A., FOLEY E., O'FARRELL P. H., ANDINO R., 2006, *The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing*, Nat. Cell Biol., 8: 793-802.
- SANDRELLI F., CAPPELLOZZA S., BENNA C., SAVIANE A., MASTELLA A., MAZZOTTA G. M., MOREAU S., PEGORARO M., PICCIN A., ZORDAN M. A., CAPPELLOZZA L., KYRIACOU C. P., COSTA R., 2007, *Phenotypic effects induced by knock-down of the period clock gene in Bombyx mori*, Genet. Res. 89(2): 73-84.
- SANNINO L., 2012, *Inquadramento sistematico e aspetti morfo-biologici di Tuta absoluta ((Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*, Atti Accademia Nazionale di Entomologia, Anno LX 2012: 67-75.
- SANNINO L., ESPINOSA B., 2010a, *Tuta absoluta. Guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa*, Edizioni L'Informatore Agrario, Verona. 113 pp. OEPP/EPP, 42 (2): 328-332.
- SANNINO L., ESPINOSA B., 2010b, *Incidenza di Tuta absoluta sulla produzione di pomodoro*, L'Informatore Agrario, 66 (10): 37-40.
- SAWSAN S., MOAWAD I., EBADAH M. A., MAHMOUD Y. A., 2013, *Biological and Histological studies on the efficacy of some Botanical and Commercial Oils on Tuta absoluta Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae)*, Egyptian

- Journal of Biological Pest Control. 2013, Vol. 23 Issue 2, pp. 301-308.
- SCHMELZ E. A., ALBORN H. T., TUMLINSON J. H., 2001, *The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid- induced sesquiterpene volatile release in Zea mays*, *Planta*, 214:171-179.
- SCOLARI F., SICILIANO P., GABRIELI P., GOMULSKI L. M., BONOMI A., GASPERI G., MALACRIDA A. R., 2011, *Safe and fit genetically modified insects for pest control: from lab to field applications*, *Genetica*, 139: 41-52.
- 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 Biochem. Mol. Biol.*, 39: 1-10.
- SHALABY H. H., FARAGALLA F. H., EL-SAADANY H.M. AND IBRAHIM A. A, 2013, *Efficacy of three entomopathogenic agents for control the tomato borer, Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*, *Nature and Science*, 11(7).
- SIAN, 2013, *Servizio Informativo Agricolo Nazionale, Banca Dati Agrofarmaci*, <http://www.sian.it/fitovis/> (ultima visita 19/11/2013).
- SIDOROV V. A., KASTEN D., PANG S. Z., HAJDUKIEWICZ P. T., STAUB J. M. AND NEHRA N. S., 1999, *Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker*, *Plant J.*, 19: 209-216.
- SILVÉRIO F. O., DE ALVARENGA E. S., MORENO S. C., PICANÇO M. C., 2009, *Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids*, *Pest Management Science*, 65: 900-905.
- SIMMONS A. T., GEOFF M. GURR G. M., 2005, *Trichomes of Lycopersicon species and their hybrids: effects on pests and natural enemies*, *Agricultural and forest Entomology*, Volume 7; issue 4; 265-276 2005.
- SIOMI H., SIOMI M. C., 2009, *On the road to reading the RNA interference code*, *Nature*, 457: 396-404
- SOLIMAN S. A., HEGAZI E. M., ATTAIA A. M., IMAM A. I., 2013, *Evaluating the role of sex pheromone in monitoring and controlling tomato leaf*

- miner, Tuta absoluta (Meyrick), under the Egyptian North Western coast conditions*, Egyptian Journal of Biological Pest Control, volume 23, numero 1, pp. 169-174.
- TERENIUS O., PAPANICOLAOU A., GARBUTT J. S., ELEFThERIANOS I., HUVENNE H., KANGINAKUDRU S., ALBRECHTSEN M., AN C., AYMERIC J. L., BARTHEL A., BEBAS P. BITRA K., ET AL., 2011, *RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design*, J. Insect Physiol, 57: 231-245.
- THROWBRIDGE A. M., STOY P. C., 2013, *BVOC-Mediated Plant-Herbivore Interactions. Biology, Control and Models of Tree volatile organic compounds emissions tree Physiology*, volume 5, 2013, pp. 21-46.
- TIAN H., PENG H., YAO Q., CHEN H., XIE Q., TANG B. AND ZHANG W., 2009, *Developmental control of a lepidopteran pest Spodoptera exigua by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene*, PLoS One, 4: e6225.
- TIMMONS L. AND FIRE A., 1998, *Specific interference by ingested dsRNA*, Nature, 395(6705): 854. 169
- TIMMONS L., COURT D. L. AND FIRE A., 2001, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*, Gene 263: 103-112.
- TOMÉ H. V.V., MARTINS J. C., CORRÊA A. S., GALDINO T. V. S., PICAÑO M. C., GUEDES R. N. C., 2013, *Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer Tuta absoluta*, Crop protection 43:63-69.
- TOMOYASU Y., DENELL R. E., 2004, *Larval RNAi in Tribolium (Coleoptera) for analyzing adult development*, Dev. Genes Evol., 214: 575-578.
- TOMOYASU Y., MILLER S. C., TOMITA S., SCHOPPMEIER M., GROSSMANN D. AND BUCHER G., 2008, *Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in Tribolium*, Genome, 9(1): R10.
- TORRES J. B., FARIA C. A., EVANGELISTA J. R., PRATISSOLI W. S., 2009, *Within-plant distribution of the leaf miner Tuta absoluta (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology*,

- International Journal of Pest Management, 47: 173-178.
- TORRES J. B., FARIA C. A., EVANGELISTA W. S., PRATISSOLI D., 2001, *Within plant distribution of leaf miner Tuta absoluta (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology*, International Journal of Pest Management, 47(3):173-178.
- TRAVANTY E. A., ADELMAN Z. N., FRANZ A. W. E., KEENE K. M., BEATY B. J., BLAIR C. D., JAMES A. A., OLSON K. E., 2004, *Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified Aedes aegypti*, Insect Biochem. Mol. Biol., 34(7): 607-613.
- TROPEA GARZIA G., SISCARO G., BIONDI A., ZAPPALÀ L., 2012, *Tuta absoluta, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage*, EPPO Bulletin, volume 42, issue 2, p. 205–210.
- TURNER C. T., DAVY M. W., MACDIARMID R. M., PLUMMER K. M., BIRCH N. P. AND NEWCOMB R. D., 2006, *RNA interference in the light brown apple moth, Epiphyaspostvittana (Walker) induced by double-stranded RNA feeding*, Insect Mol. Biol., 15: 383-391.
- UHLIROVA M., FOY B. D., BEATY B. J., OLSON K. E., RIDDIFORD L. M., JINDRA M., 2003, *se of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad Complex in insect metamorphosis*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 100(26): 15607-15612.
- ULVILA J., PARIKKA M., KLEINO A., SORMUNEN R., EZEKOWITZ R. A., KOCKS C. AND RAMET M., 2006, *Double-stranded RNA is internalized by 170 scavenger receptormediated endocytosis in Drosophila S2 cells*, J. Biol. Chem., 281: 14370-14375.
- UODOME K., SUGIMOTO K., 2003, *A new buffer for the stabilization of dsRNA solutions in delivery bioassays*, National Protocols Kyushu University (Japan), 34:1-4.
- URBANEJA A., 2010, *Biological invasion of European tomato crops by Tuta absoluta:ecology, geographic expansion and prospects for biological control*, Journal of Pest Science, 83: 197-215.
- URBANEJA A., GONZÁLEZ-CABRERA J., ARNÒ J., GABARRA R., 2012, *Prospects for the biological control of Tuta absoluta in tomatoes of the Medi-*

- terranean basin*, Pest Management Science, 68: 1215-1222.
- VACAS S., LÓPEZ J., PRIMO J., NAVARRO-LLOPIS V., 2013, *Response of Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) to Different Pheromone Emission Levels in Greenhouse Tomato Crops Environmental Entomology*, 42(5):1061-1068.
- VALLIER A., VINCENT-MONEGAT C., LAURENCON A. AND HEDDI A., 2009, *RNAi in the cereal weevil Sitophilus spp: systemic gene knockdown in the bacteriome tissue*, BMC Biotechnol., 9: 44.
- VOLZ J., MÜELLER H. M., ZDANOWICZ A., KAFATOS F. C., OSTA M. A., 2006, *A genetic module regulates the melanization response of Anopheles to Plasmodium*, Cell. Microbiol., 8: 1392-1405
- WAKIYAMA M., MATSUMOTO T., YOKOYAMA S., 2005, *Drosophila U6 promoter-driven short hairpin RNAs effectively induce RNA interference in Schneider 2 cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 331(4): 1163-1170.
- WALLING, L.L., 2000, *The Myriad Plant Responses to Herbivores*, J. Plant Growth Regul. 19:195-216.
- WALSHE D. P., LEHANE S. M., LEHANE M. J., HAINES L. R., 2009, *Prolonged gene knockdown in the tsetse fly Glossina by feeding double stranded RNA*, Insect Mol. Biol., 18(1): 11-19.
- WATERHOUSE P. M., GRAHAM M. W. AND WANG M. B., 1998, *Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 13959-13964.
- WHANGBO J. S., HUNTER C. P., 2008, *Environmental RNA interference*, Trends Gen., 24: 297-305.
- WHYARD S., SINGH A. D. AND WONG S., 2009, *Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides*, Insect Biochem. Mol. Biol., 39: 824-832.
- WINSTON W. M., MOLODOWITCH C., HUNTER C. P., 2002, *Systemic RNAi in C. elegans requires the putative transmembrane protein SID-1*, Sci-

ence, 295: 2456-2459.

- WOLFRUM C., SHI S., JAYAPRAKASH K. N., JAYARAMAN M., WANG G., PANDEY R. K., RAJEEV K. G., NAKAYAMA T., CHARRISE K., NDUNGO E. M., ZIMMERMANN T., KOTELIANSKY V., ET AL., 2007, *Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs*, Nat. Biotechnol., 25: 1149-1157.
- XUE-YI XUE, YING-BO MAO, XIAO-YUAN TAO, YONG-PING HUANG AND XIAO-YA CHEN, 2012, *New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference*, In: Adv. Insect Physiol; 42: 73-117.
- ZAMORE P. D., TUSCHL T., SHARP P. A. & BARTEL D. P., 2000, *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*, Cell 101, 25-33.
- ZANGERL A. R., 2003, *Evolution of induced plant responses to herbivores*, Basic and Appl. Ecol., 4: 91-103.
- ZAPPALÀ L., BERNARDO U., BIONDI A., COCCO A., DELIPERI S., DELRIO G., GIORGINI M., PEDATA P., RAPISARDA C., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012a, *Recruitment of native parasitoids by the exotic pest Tuta absoluta in Southern Italy*, Bulletin of Insectology, 65(1): 51-61.
- ZAPPALÀ L., BIONDI A., TROPEA GARZIA G., SISCARO G., 2012b, *Efficacy of commercial strains of Bacillus thuringiensis in controlling Tuta absoluta: laboratory tests*, IOBC/WPRS Bulletin, 80: 283-288.
- ZAPPALÀ L., BIONDI A., ALMA A., AL-JBOORY I. J., ARNO`J., BAYRAM A., CHAILLEUX A., EL-ARNAOUTY A., GERLING D., GUENAOUY Y., SHALTIEL-HARPAZ L., SISCARO G., STAVRINIDES M. • LUCIANA TAVELLA L., AZNAR R., URBANEJA A., DESNEUX N., 2013, *Natural enemies of the South American moth, Tuta absoluta, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies*, J Pest Sci (2013) 86:635-647.
- 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(5), 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): 805-815.
- ZHU J., CHEN, ., RAIKHEL A., 2003, *Posttranscriptional control of the competence factor beta FTZ-F1 by juvenile hormone in the mosquito Aedes aegypti*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 13338-13343.

Ringraziamenti

Ringrazio in primis il caro **prof. Antonio Pietro Garonna** per l'accurata valutazione e correzione di questo lavoro di tesi. Un ringraziamento particolare per essere stato un validissimo referente in tutte le situazioni e circostanze del mio percorso professionale soprattutto quelle più difficili e critiche.

Ringrazio il professore **Francesco Pennacchio** per i preziosissimi e fattivi consigli profusi nella realizzazione di alcune sperimentazioni del mio progetto di tesi.

Ringrazio le professoresse **Maria Cristina Digilio** e **Stefania Laudonia** per la proficua disponibilità profusa in questi tre anni di dottorato.

Ringrazio con affetto sincero le mie care colleghe di laboratorio **Adriana Fatima, Ilaria, Maddalena, Marina**, la simpatica-antipatica **Rosalba**, con cui ho potuto instaurare uno splendido rapporto di stima e fiducia reciproca. Ho avuto la fortuna di lavorare in un laboratorio dove la disponibilità ed il rispetto sono il collante principale dei rapporti inter-personali e di questo ne sono entusiasta; in questo bellissimo ambiente di lavoro ho avuto la possibilità di confrontarmi e di crescere non solo dal punto di vista formativo ma anche da un punto di vista personale, umano e morale; **ringrazio** anche **gli elementi di disturbo** perché anche loro mi hanno permesso di crescere e migliorare.

Ringrazio di cuore il dott. **Gennaro Di Prisco** e la dott. ssa **Paola Varricchio** per la loro preziosa supervisione nelle attività di laboratorio.

Ringrazio i miei cari colleghi della sezione di Patologia Vegetale (dott. **Giuliano Bonanomi**, dott. **Roberto Sorrentino**, dott. **Salvatore Gaglione**), nonché la cara professoressa **Daniela Alioto** per la loro preziosa e fattiva disponibilità.

Ringrazio ancora il caro Bruno Espinosa per il suo proficuo impegno tecnico-pratico impiegato a supporto delle mie attività di dottorato.

Ringrazio con immenso affetto la mia cara e adorata famiglia; mi hanno sempre supportato, hanno sempre creduto in me e mi hanno sempre aiutato a crescere e migliorare in tutte le situazioni. Un ringraziamento particolare lo rivolgo alla **mia cara mamma**, donna instancabile, amante del sacrificio e dell'impegno sempre disposta a sorreggermi, a darmi giusti consigli e soprattutto a preparare squisiti "manicaretti" ormai conosciuti e "testati" anche in laboratorio.

Ringrazio, non certo ultimo come importanza, il carissimo **Prof. Gennaro Viggiani**, mio referente e "faro intellettuale" per l'Entomologia nonché dispensatore di consigli di vita proficui e preziosi.

Sono entusiasta di aver terminato questo dottorato con un nuovo bagaglio di strumenti propositivi che sicuramente, o in un modo o in un altro, mi consentiranno di realizzare con successo tutte o al-

meno in parte le mie aspirazioni professionali. Chiudo questi ringraziamenti con una frase “naturalista” del filosofo greco Anassimandro che riassume la prima citazione fatta nella storia della letteratura sul concetto di “biocenosi” di un sistema naturale per me considerata molto emblematica.

“το πολύπλοκο φυσικό σύστημα το οποίο είναι κατασκευασμένο, το σύμπαν συνεχώς τροποποιήθηκε από τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των διαφόρων οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικά τροφικά δίκτυο.”

tratta dall’opera “φύση” “Natura” 12:3

«Il complesso sistema naturale di cui è fatto l'universo è continuamente modificato dalle complesse interazioni che si instaurano tra i diversi organismi afferenti a diverse rete trofiche».