

SCHEDA DI SINTESI DELLA TESI “USE OF RNAI TO DEVELOP NEW BIOTECHNOLOGIES FOR INSECT CONTROL”

Il controllo degli insetti dannosi in agricoltura è ancora in gran parte attuato con principi attivi di sintesi. L'ampio impiego di pesticidi è notoriamente associato a numerosi problemi, quali sviluppo di resistenza negli insetti bersaglio, contaminazione ambientale, tossicità per organismi non-bersaglio, uomo incluso, e perdita di biodiversità. La ricerca di metodi di lotta alternativi ha portato allo sviluppo di nuove tecniche di natura biologica e al loro inserimento in strategie di controllo integrato (Integrated Pest Management, IPM), opzione fortemente promossa dalla direttiva europea 2009/128/EC sull'uso sostenibile dei pesticidi.

Il controllo biologico è basato sull'utilizzo di antagonisti naturali, ma questa definizione classica viene spesso ampliata, includendo anche l'uso di molecole e geni derivanti da antagonisti naturali o da essi modulati.

Lo studio funzionale dei meccanismi molecolari mediati da nuovi bioinsetticidi derivati da agenti di biocontrollo e l'identificazione dei loro recettori offrono l'opportunità di sviluppare strategie di controllo dei parassiti “bio-ispirate” che imitano gli effetti negativi sugli insetti fitofagi da parte dei loro nemici naturali. Ciò può essere ottenuto utilizzando strumenti molecolari, come l'RNA interference (RNAi).

L'RNAi è un meccanismo di regolazione dell'espressione genica mediata da piccoli RNA a doppio filamento (double strand RNA – dsRNA) utile per il controllo degli artropodi dannosi. Rappresenta un'alternativa innovativa ai metodi tradizionali tramite molteplici applicazioni per il miglioramento delle piante sia in termini di qualità dei prodotti che di produttività con un impatto significativo sull'agricoltura, l'orticoltura e la silvicoltura.

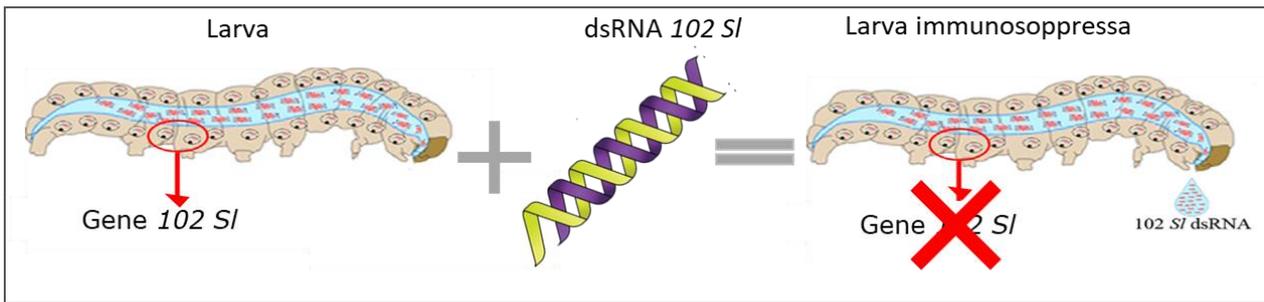
Fino a qualche anno fa, la pratica comune consisteva nel silenziamento di geni che regolano funzioni vitali degli insetti, al fine di indurre fenotipi letali. Questo approccio genera un'uccisione diretta il cui effetto, in termini di dinamica della popolazione dei parassiti bersaglio e dei nemici naturali associati, non è diverso da quello generato da un trattamento insetticida.

In questo elaborato di tesi, è stato proposto un approccio completamente diverso, basato sull'attività di soppressione indiretta dovuta ad una maggiore sensibilità agli antagonisti naturali. Tale sensibilità è stata indotta da una riduzione di immunocompetenza, che si ottiene dalla downregulation mediata dall'RNAi dei geni immunitari presi di mira da fattori di virulenza codificati da antagonisti naturali o dai loro simbionti associati. In altre parole, sono state riprodotte sindromi parassitarie, cioè l'inattivazione delle barriere di difesa degli insetti, attraverso strategie molecolari adottate dai loro agenti patogeni e parassiti, determinando così una riduzione della fitness (crescita, sviluppo, capacità di sopravvivenza).

Nel settore entomologico, in particolar modo nei lepidotteri, l'efficienza della risposta dell'RNAi varia notevolmente tra le specie e dipende dalla modalità di somministrazione. Di conseguenza, restano da sviluppare adeguate strategie di rilascio ambientale di molecole di dsRNA per limitarne la loro degradazione.

In tale contesto si inserisce il presente studio, il cui scopo ultimo è stato quello di sviluppare metodi sostenibili di rilascio ambientale di dsRNA, attraverso batteri ricombinanti e piante geneticamente trasformate, e di valutarne il loro effetto sull'efficacia insetticida di un bioformulato a base di *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (*Bt*), lo Xentari™, su larve di lepidotteri. Prove preliminari sono state condotte per identificare la dose subletale senza quindi effetto letale sulle larve. Nello specifico,

l'insetto target è *Spodoptera littoralis*, un notturne dannoso a numerose colture a livello mondiale, mentre come bersaglio è stato scelto il gene *102 Sl* coinvolto nella risposta immunitaria del fitofago.



Biosaggio su larve di *S. littoralis* con:

sospensione di batteri ricombinanti esprimanti dsRNA

piante transgeniche esprimanti dsRNA



iniezione nella cavità orale

applicazione su dieta artificiale

larve alimentate con foglie di tabacco

È stato testato anche il dsRNA prodotto *in vitro*
Le larve per il controllo negativo sono state trattate in modo simile con dsRNA *GFP*

Biosaggio per valutare la suscettibilità al *Bacillus thuringiensis* (Xentari™) delle larve immunosopresse

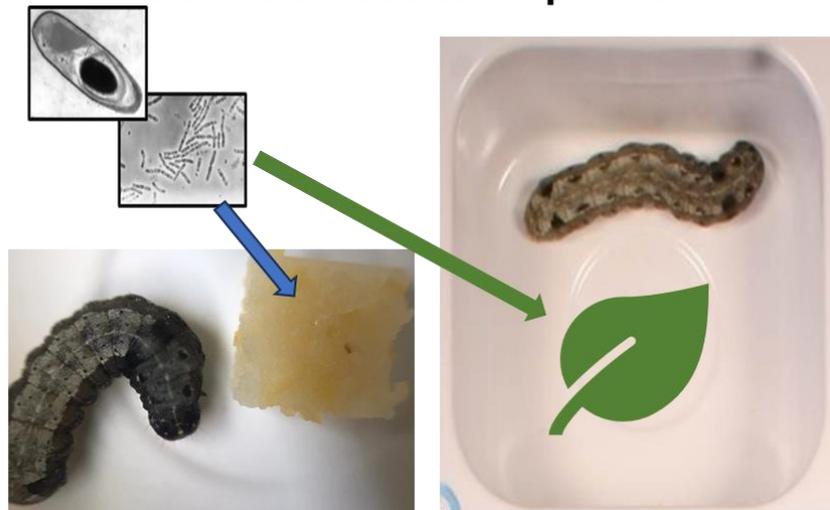


Figura 1 Materiali e metodi

I risultati della tesi riportano che l'ingestione di batteri e di tessuti vegetali transgenici, che esprimono molecole di dsRNA mirate a silenziare un gene immunitario nelle larve di *S. littoralis*, innesca una risposta sistemica RNAi e una conseguente soppressione immunitaria.

Risultati su larve di *S. littoralis* trattate con batteri ricombinanti esprimenti dsRNA e Xentari™

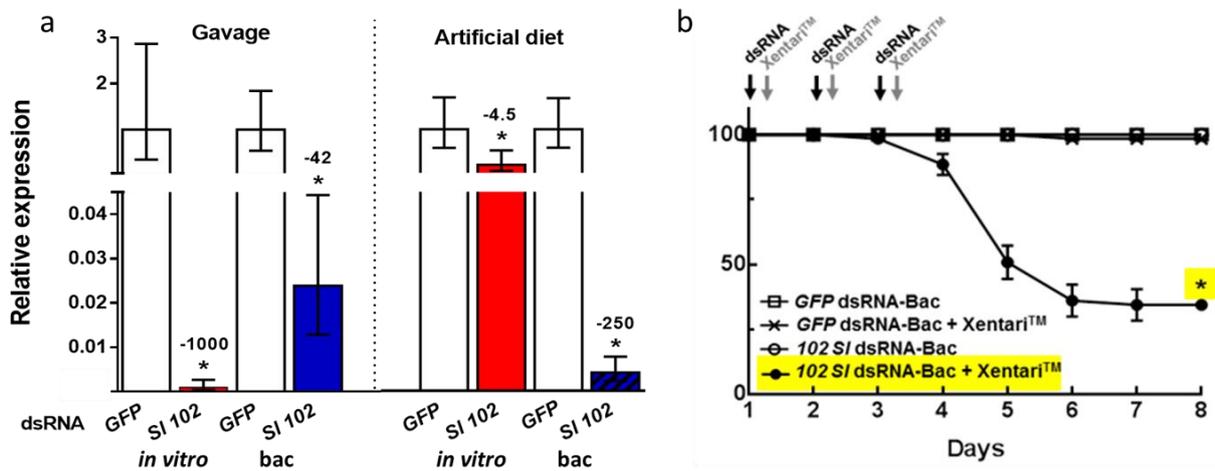


Figura 2 a) Livelli di trascrizione del gene *SI 102* nelle larve di *S. littoralis* trattate per via orale con dsRNA *SI 102*. Negli esperimenti di controllo sono stati utilizzati il dsRNA *GFP* sintetizzato in vitro e i batteri che esprimono il dsRNA *GFP* (* $P < 0.0001$, Student's t test). b) Saggi biologici con larve di *S. littoralis* esposte simultaneamente a dsRNA *SI 102* e *Bt*. Le larve sono state trattate per 3 giorni con una dieta artificiale ricoperta con batteri ricombinanti esprimenti dsRNA *SI 102* e con dosi sub-letali di Xentari™. I batteri che esprimono il dsRNA *GFP* sono stati utilizzati negli esperimenti di controllo. La tempistica dei trattamenti è indicata dalle frecce. I valori riportati sono la media \pm errori standard (* $P < 0,0001$ basato sul test dei ranghi logaritmici).

Risultati su larve di *S. littoralis* trattate con piante transgeniche esprimenti dsRNA e Xentari™

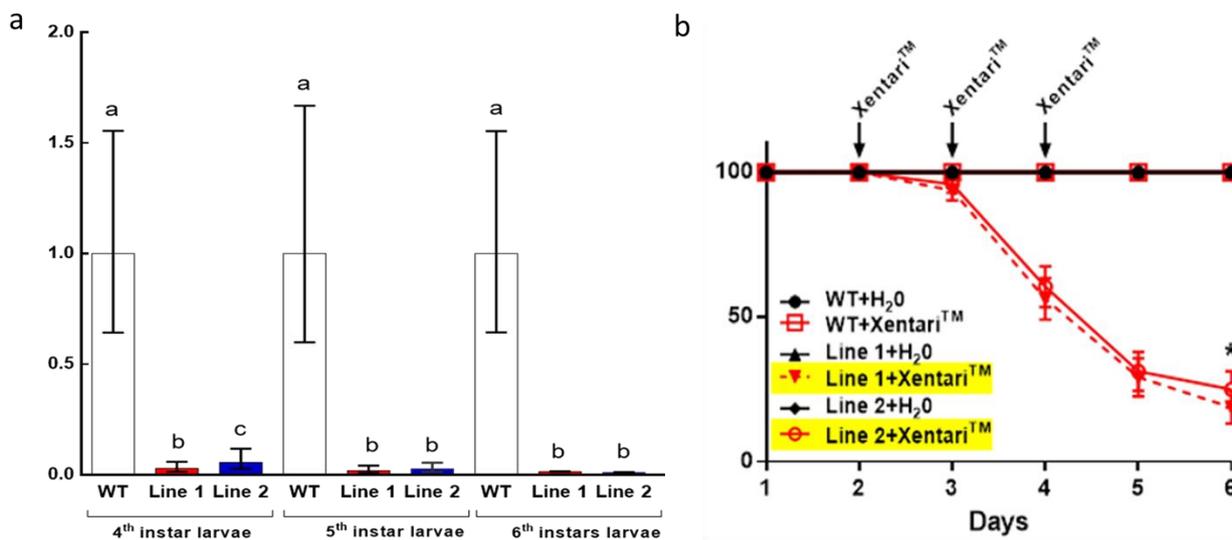


Figura 3 a) Silenziamento genico nelle larve di *S. littoralis* allevate su foglie di piante di tabacco wild type (WT) (controlli) o che esprimono dsRNA *SI 102* (Linea 1 e Linea 2). Il confronto dei valori medi viene eseguito all'interno di ciascun stadio di sviluppo e i valori statisticamente diversi sono indicati con lettere diverse ($P < 0,0001$, One Way ANOVA). Le barre di errore rappresentano la deviazione standard della media. b) Saggio biologico con larve di *S. littoralis* esposte contemporaneamente a dsRNA *SI 102* e *Bt*. Le larve sono state alimentate per 3 giorni con dischi fogliari spruzzati con dosi sub-letali di Xentari™. Le foglie sperimentali spruzzate con acqua sono state utilizzate come controllo. La tempistica dei trattamenti è indicata dalle frecce. I valori riportati sono la media \pm errori standard: in (a) l'asterisco indica una differenza statistica ($P < 0,0001$, test Log-rank di Mantel-Cox).

Dai risultati ottenuti si è evinto che:

- il gene *Sl 102* risulta down-regolato in seguito all'ingestione di dsRNA *Sl 102* somministrato mediante siringa, sia nel caso di dsRNA sintetizzato *in vitro* (dsRNA *Sl 102-in vitro*) che di sospensioni di batteri che esprimono dsRNA *Sl 102* (dsRNA *Sl 102-bac*) (Figura 2.a);
- la somministrazione orale combinata con la dieta artificiale di batteri esprimenti dsRNA e del bioinsetticida determina un notevole aumento della letalità del *Bt* (testato a dosi sub-letali) (Figura 2.b);
- il livello del trascritto del *gene 102* nelle larve alimentate con foglie di tabacco transgeniche è risultato ridotto significativamente rispetto ai controlli alimentati con foglie di tabacco non transgeniche (WT) (Figura 3.a);
- il fenotipo immunosoppresso delle larve alimentate su piante transgeniche esprimenti dsRNA *Sl 102* mostra un'elevata mortalità quando esposto a dosi sub-letali di XentariTM (Figura 3.b);
- in entrambi i casi livelli di silenziamento genico sono stati più elevati rispetto a quelli ottenuti con molecole di dsRNA nude prodotte *in vitro*, in quanto più esposte alla degradazione ambientale e nel lume intestinale.

La tecnica di silenziamento mediata da RNAi si è mostrata un potente strumento di silenziamento sistemico del gene bersaglio prescelto, *102 Sl*.

I risultati ottenuti pongono le basi per un possibile uso futuro di queste strategie di somministrazione orale, perché permettono di indurre negli insetti dannosi un'ipersensibilità agli antagonisti naturali potenzialmente presenti nell'ambiente. Allo stesso tempo la loro somministrazione in combinazione con composti ad attività bioinsetticida (tossine del *Bt*) aumenta notevolmente l'efficacia dei bioinsetticidi, per aumentare l'efficacia degli Agenti di Controllo Microbici (MCA) nei confronti di fitofagi scarsamente sensibili, rappresentando così una componente significativa nelle future strategie di IPM.

L'utilizzo combinato di batteri ricombinanti e piante transgeniche per l'RNAi promette di rivoluzionare il settore agricolo, migliorando la produttività delle coltivazioni in modo più efficiente ed ecologico.

Pertanto, l'originalità e innovatività della ricerca risiede principalmente nell'utilizzo di dsRNA immunosoppressivi veicolati tramite batteri, che emerge come un elemento sinergico in nuovi spray a base di *Bt*. Questa approfondita integrazione consente l'applicazione di dosi di bioinsetticida inferiori, offrendo così un contributo altamente significativo alla prevenzione dell'insorgenza di fenomeni di resistenza nei fitofagi.

In aggiunta, i risultati ottenuti aprono la strada alla progettazione di nuove piante transgeniche, mirate a potenziare e prolungare l'efficacia insetticida delle tossine *Bt*. Questo approccio innovativo si propone di massimizzare quindi l'impatto a lungo termine delle piante transgeniche, ottimizzando la loro capacità di contrastare gli insetti nocivi.

La sostenibilità dell'approccio proposto, basato sulla "uccisione indiretta", è ulteriormente supportata dai suoi potenziali impatti positivi sugli insetti antagonisti naturali. Dal punto di vista teorico, l'induzione di una ridotta competenza immunitaria nel parassita bersaglio, rispetto ad altre strategie di controllo basate su RNAi, sembra essere ecologicamente più sostenibile. Questo miglioramento della competenza immunitaria favorisce i servizi ecologici forniti dagli antagonisti naturali.

In effetti, un approccio come quello proposto può incentivare la creazione e la diffusione di agenti di controllo biologico, anziché favorirne la dispersione come conseguenza diretta di un trattamento che elimina direttamente l'organismo nocivo bersaglio, riducendone la densità.

La tecnologia dell' RNAi offre un approccio più efficiente, sostenibile ed economicamente vantaggioso per il controllo degli insetti in agricoltura in quanto contribuisce:

- ✓ a ridurre i costi di produzione in agricoltura. Innanzitutto, l'RNAi consente una gestione più mirata degli insetti dannosi alle coltivazioni, riducendo la necessità di utilizzare quantità massicce di pesticidi chimici. Questo non solo comporta un risparmio sui costi dei prodotti chimici stessi, ma anche sulla manodopera necessaria per applicarli;
- ✓ a migliorare la resa delle coltivazioni, riducendo le perdite causate dagli attacchi degli insetti. Una produzione agricola più efficiente e resistente agli insetti si traduce in una maggiore quantità di raccolto, aumentando la produttività, compensando ulteriormente i costi iniziali associati alla tecnologia dell'RNAi;
- ✓ ad ottenere una gestione sostenibile delle colture, perché, riducendo la dipendenza dai pesticidi tradizionali, contribuisce a preservare la biodiversità e a mantenere l'equilibrio ecologico negli ecosistemi agricoli.

Principale bibliografia:

Burke GR and Strand MR (2012). Polydnviruses of parasitic wasps: domestication of viruses to act as gene delivery vectors. *Insects* 3: 91–119.

Caccia S, Astarita F, Barra E, Di Lelio I, Varricchio P and Pennacchio F (2020). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity by feeding *Spodoptera littoralis* larvae with bacteria expressing immune suppressive dsRNA. *Journal of Pest Science* <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01140-6>.

Caccia S, Di Lelio I, La Stora A, Marinelli A, Varricchio P, Franzetti E, Banyuls N, Tettamanti G, Casartelli M, Giordana B, Ferré J, Gigliotti S, Ercolini D and Pennacchio F (2016) Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:9486-9491.

Christiaens O, Whyard S, Vélez AM and Smagghe G (2020) Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Frontiers in Plant Science* 11:451.

Li, Yunhe, Yulin Gao, and Kongming Wu (2017) "Function and effectiveness of natural refuge in IRM strategies for *Bt* crops." *Current opinion in insect science* 21:1-6.

Li X, Miyamoto K, Takasu Y, Wada S, Iizuka T, Adegawa S, Sato R and Watanabe K (2020). ATP-binding cassette subfamily a member 2 is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxins in *Bombyx mori*, but not for Cry1A, Cry1C, Cry1D, Cry1F, or Cry9A toxins. *Toxins* 12: 104.

Strand MR and Burke GR (2015). "Polydnviruses: from discovery to current insights." *Virology* 479: 393-402.

Whitten MM, Facey PD, Del Sol R, Fernandez-Martinez LT, Evans MC, Mitchell JJ, Bodger OG and Dyson PJ (2016). Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proceedin*

Zhu JQ, Liu S, Ma Y, Zhang JQ, Qi HS, Wei ZJ, Yao Q, Zhang WQ and Li S (2012). Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR. *PloS one* 7(6): e38572.

Zotti M, dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT and Smagghe G (2018). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*. 74:1239–1250.

Elvira Barra