



Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO

Regione del Veneto

Giunta Regionale

Direzione Formazione e Istruzione

STORIA DI RICERCA

Vendramin Stefania

DGR n. 1463 del 08/10/2019

Cod. Ente: 2105 Rag. Sociale Università degli studi di Padova Asse Occupabilità

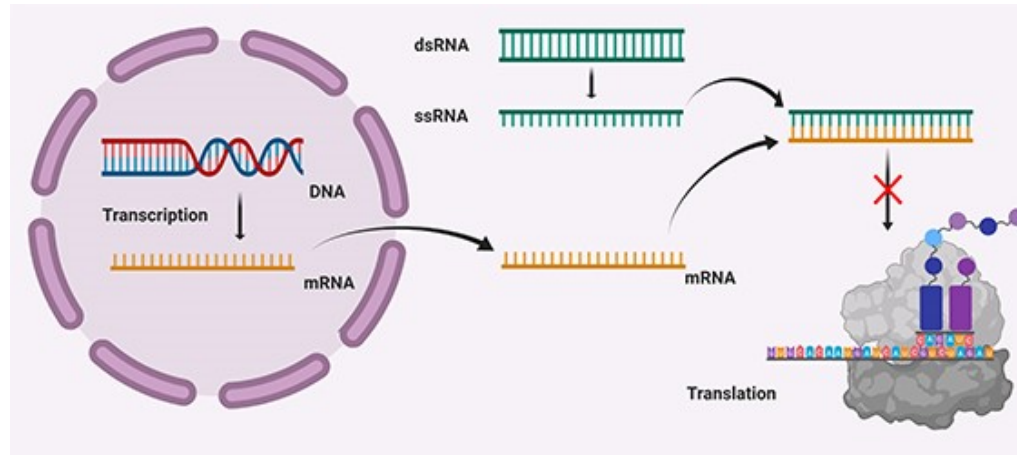
Cod. progetto: 2105-0061-1463-2019; Titolo: "ESCinterfere: vaccinazione della vite contro il mal dell'esca"

Cod. Intervento: 1; 2105/10259808-001/231/DEC/20; Edizione///; Titolo dell'intervento: "Produzione di molecole biologiche per la difesa fitosanitaria della vite"; Sede: Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente – DAFNAE, viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (Padova)

INTRODUZIONE

RNAi - RNA interference

Meccanismo mediante il quale frammenti di RNA, come gli RNA a doppio filamento o *double-stranded* (dsRNA), sono processati in molecole più piccole di RNA (sRNA) che vanno a interferire e conseguentemente spegnere l'espressione dei geni complementari a questa sequenza.



dsRNA: complementary strands (sense + antisense RNA)



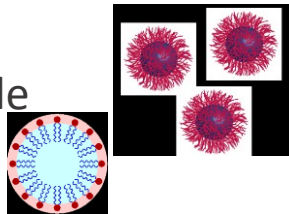
I dsRNA essendo in grado di modificare i livelli di RNA messaggero (mRNA) e delle risultanti proteine sia del genoma delle piante che dei relativi patogeni, può trovare diverse applicazioni come insetticida, fungicida o erbicida.

Struttura:

- dsRNA 
- siRNA 
- hpRNA 
- ssRNA 

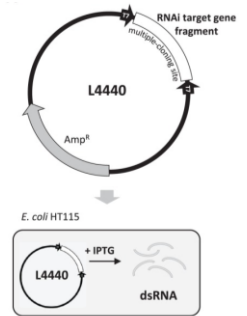
Stabilizzazione

- Nano particelle
- Surfattanti
- Base peptidica



Sintesi:

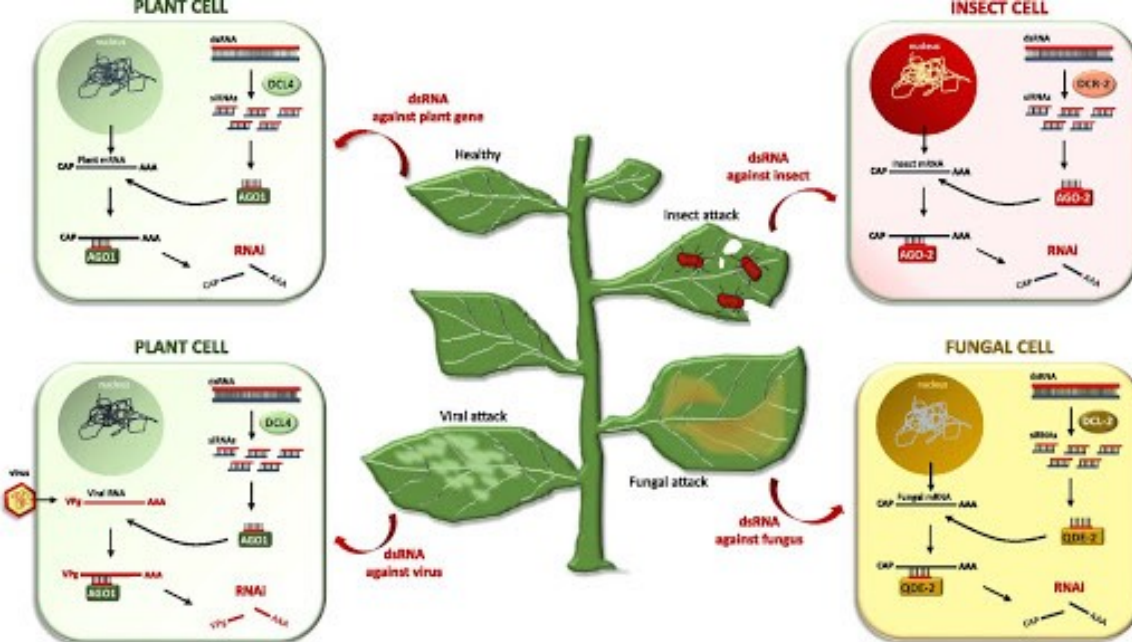
- Chimica 
- *Trascrizione In vitro* 
- Batterica (HT115 *E. coli*)



Applicazioni

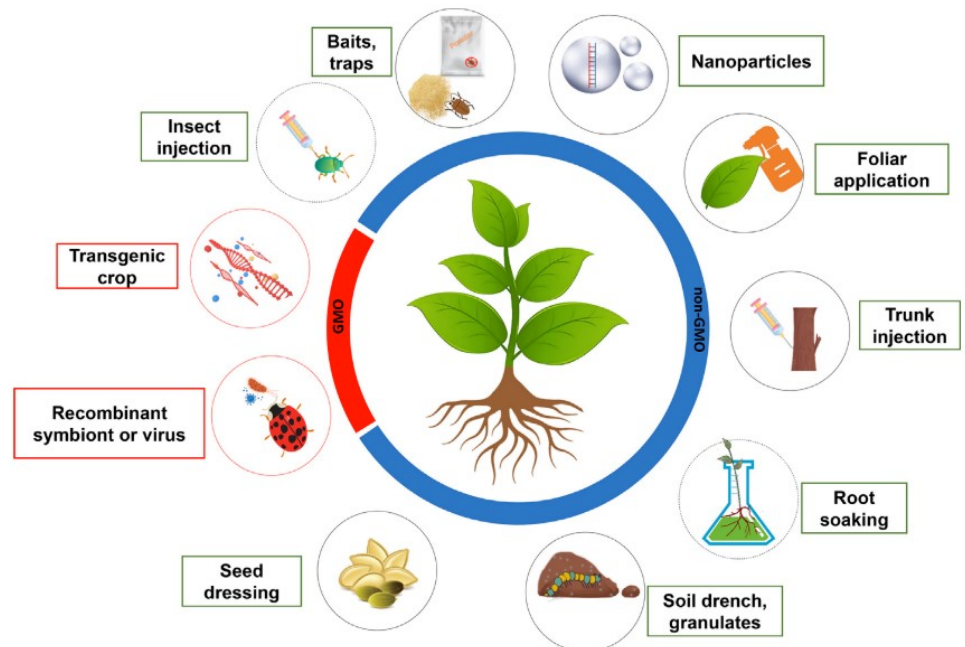
- Insetticida
- Fungicida
- Contro virus
- Ricerca
- Erbicida





APPLICAZIONI

SOMINISTRAZIONE



Per sintetizzare le molecole di dsRNA *in vitro* si usano degli enzimi, che leggendo la sequenza di DNA del gene *target*, producono la sequenza equivalente di singolo filamento di RNA (ssRNA). Due molecole di ssRNA poi essendo complementari formano una sola di dsRNA.

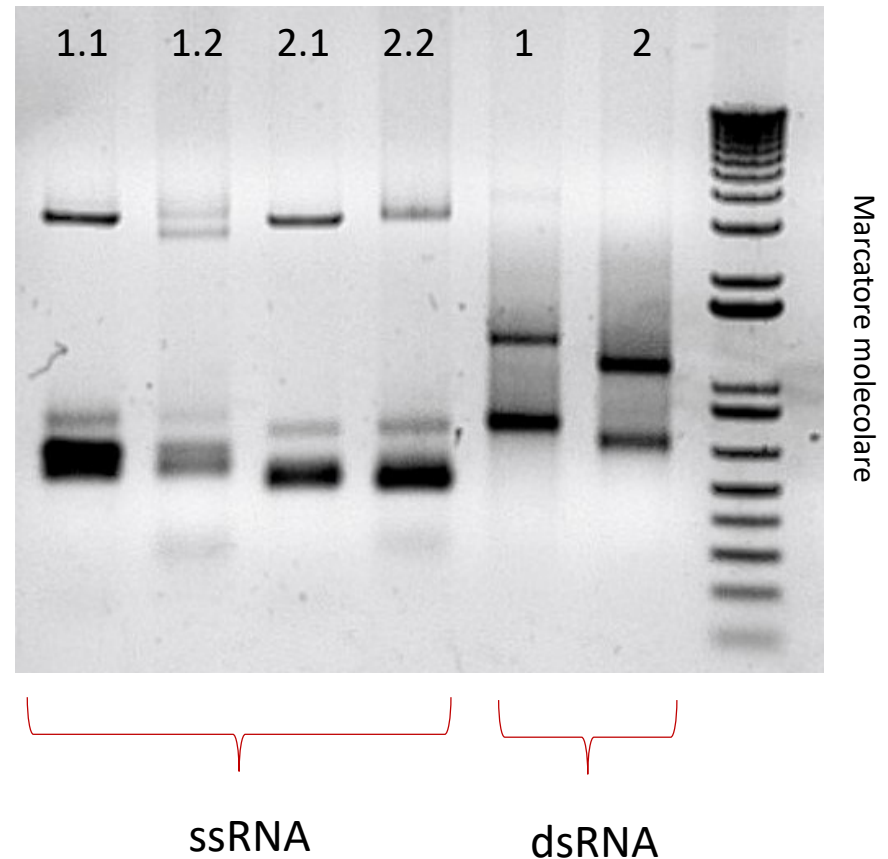
Obiettivo #1:

Produzione di molecole di dsRNA target *in vitro* o via sintesi batterica

Risultato:

La produzione di dsRNA *in vitro* tramite kit commerciale è in grado di fornire rese de gran lunga superiore (fino a 10 volte in più) di molecole molto più pure.

La comparazione dei diversi sistemi di produzione di dsRNA *in vitro* ha permesso di valutare l'efficienza di trascrizione in termini di resa, riproducibilità e tempo.





Halymorpha halys (Stål) o cimice asiatica è un insetto infestante altamente polifago che causa danni alla frutticoltura e all'orticoltura. Perfora i tegumenti della pianta ospite con l'apparato boccale provocando la formazione di aree necrotiche sulla superficie dei frutti, la punteggiatura della foglia, la perdita dei semi e la trasmissione di fitopatogeni.

Obiettivo #2:

Identificare geni target che siano vitali in *H. halys* per lo sviluppo di un bioinsetticida basato sul RNAi.

- Trovare mortalità provocata dalla riduzione dell'espressione di questi geni *target*





Obiettivo #3:

Somministrazione dei dsRNA prodotti
tramite diverse metodologie:

Metodologia 1:

Mediante l'uso di un compressore e
pistola ad alta pressione nella pagina
inferiore della foglia





Le piante di pomodoro sono state trattate con molecole di dsRNA in diverse fasi di crescita e messe a contatto con individui di cimice asiatica dopo 24 ore.







Video di *H. halys* dentro l'ambiente
controllato post-trattamento*

La mortalità di *H.
halys* è stata
monitorata per 14
giorni durante
ogni esperimento.



Obiettivo #3:

Metodologia 2:

L'effetto dei dsRNA è stato testato direttamente in *H. halys* mediante l'uso di microiniezioni.

Le cimici sono state monitorate per una settimana e la mortalità è stata registrata per ulteriori analisi statistiche.

Risultati:

L'esperimento di somministrazione diretta delle molecole di dsRNA nelle cimici asiatiche ha rilevato una mortalità media del 70% utilizzando il trattamento di dsRNA con entrambi i geni target.



*Video di *H. halys* durante la microiniezione toracica*



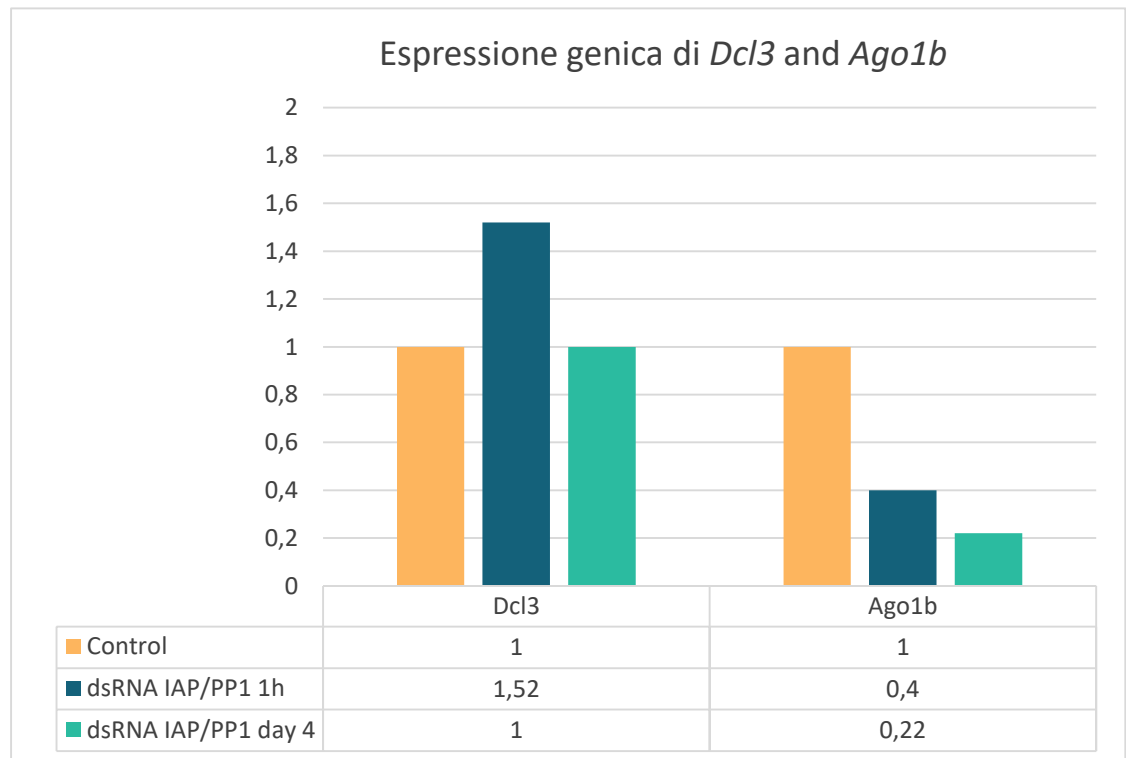
Obiettivo #4:

Misurare l'espressione genica di componenti delle vie di silenziamento in pomodoro in risposta all'inserimento delle molecole di dsRNA.



Risultati:

Dicer-like 3 (Dcl3) e *Argonaute1b (Ago1b)* hanno presentato una differenza di espressione genica tra piante trattate e non trattate. La proteina DCL3 è putativamente responsabile della degradazione dei dsRNA in siRNA, che interagendo con AGO1B, induce il silenziamento genico.



I risultati del progetto sono stati divulgati al Web Workshop “Young Scientists for Plant Health” 2020 organizzato dalla Società di Genetica Agraria (SIGA), di Biologia Vegetale (SIBV), di Entomologia (SEI) e di Patologia Vegetale (SIPaV) dove è stato presentato un poster informativo.

Proceedings of the SIGA-SEI-SIBV-SIPaV Web Workshop “Young Scientists for Plant Health”
16 December, 2020
ISBN 978-88-944843-1-1

Poster Communication Abstract – PH.60

EXOGENOUS DSRNA APPLICATION IN TOMATO PLANTS TARGETING ESSENTIAL GENES IN HALYOMORPHA HALYS

VENDRAMIN S.*, SCACCINI D.*, CHAMA A.*, NERVA L.***, CHITARRA W.***,
POZZEBON A.*, VAROTTO S.*

*) Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment, University of Padua (Italy)

**) Council for Agricultural Research and Economics – Research Centre for Viticulture and Enology (CREA-VE), Conegliano (Italy)

tomato, Halyomorpha halys, dsRNA, biopesticide, RNA interference

The brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae) is a highly polyphagous insect native to Asia that currently causes severe crop loss worldwide. In Italy, *H. halys* has damaged fruit orchards, row crops, vegetables, and ornamentals for almost 10 years. One of the recent pest management practices involves the use of RNA-interference (RNAi), a highly specific gene silencing mechanism in which the introduction of double-stranded RNA (dsRNA) and the production of small interfering RNAs (siRNAs) post-transcriptionally targets complementary mRNAs inhibiting their translation. Spray-induced gene silencing (SIGS) is a potential agricultural pest management strategy where the dsRNA-sprayed plant is consumed by the pest resulting in gene silencing-induced insect mortality. Previous studies have shown an increase in mortality in *H. halys* using dsRNAs targeting IAP and PP1 genes, which are involved in apoptosis and other cellular processes. Tomato plants were treated with sequence-specific dsRNA targeting the IAP and PP1 genes through SIGS and feeding assays in the greenhouse. Insect mortality was monitored for two weeks and plant gene expression changes were assessed through qRT-PCR. *Halyomorpha halys* mortality differed between treatments, and expression changes of some genes involved in plant RNAi were detected. Our results suggest the use of SIGS for *H. halys* pest control as well as an initial understanding of the effect of foreign dsRNAs in the plant at the molecular level. The use of dsRNA in plants targeting essential pest genes might represent a new generation of environmentally friendly biopesticides.

Exogenous dsRNA application in tomato plants targeting essential genes in *Halyomorpha halys*

Vendramin Stefania^a, Scaccini Davide^a, Chama Anjali^a, Nerva Luca^b, Chitarra Walter^b, Pozzebon Alberto^a, Varotto Serena^a

^a Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment, University of Padua

^b Council for Agricultural Research and Economics – Research Centre for Viticulture and Enology (CREA-VE), Conegliano, Veneto



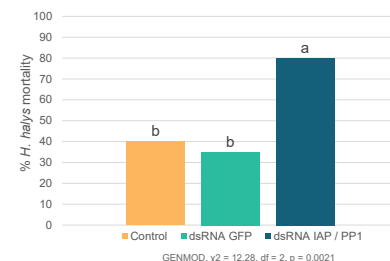
Background

Materials & Methods

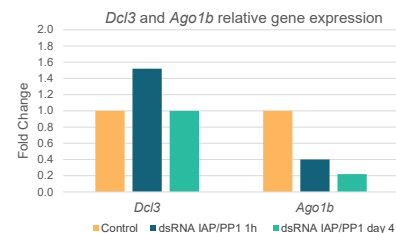
SIGS of dsRNAs against IAP and PP1 genes in *H. halys*

Results

- A higher mortality of *H. halys* was observed when compared to the dsRNA GFP-treated or H₂O-treated control plants

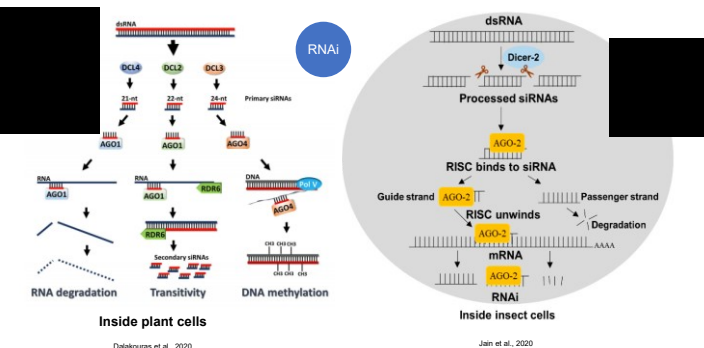


- Dcl3* and *Ago1b*, RNAi-related genes, present gene expression changes in response to treatment with dsRNA IAP and PP1



References

- Dalalouras, A., Jarausch, W., Buchholz, G., Bessler, A., Braun, M., Manthey, T., ... Wassmeyer, M. (2018). Delivery of hairpin RNAs and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. *Frontiers in Plant Science*, 9(9), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01728>
- Gogoi, A., Samrahi, N., Kallia, A., Perdikis, D., & Voloudakis, A. (2017). Plant insects and mites uptake double-stranded RNA upon its exogenous application on tomato leaves. *Planta*, 246(6), 1233–1241. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2776-7>
- Jain, R. G., Robinson, K. E., Fleischer, S. J., & Miller, N. (2020). RNAi-based functional genomics in Hemiptera. *Insects*, 11(9), 1–22. <https://doi.org/10.3390/insects1109092>
- Mogilicherla, K., Howell, J. L., & Potts, S. R. (2018). Improving RNAi in the Brown Marmorated Stink Bug: Identification of target genes and reference genes for RT-qPCR. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22035-z>
- Song, X.-G., Gu, K. X., Duan, X. X., Xiao, X. M., Hou, Y. P., Chuan, Y. B., ... Zhou, M. G. (2018). Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. *Molecular Plant Pathology*, 19(12), 2543–2560. <https://doi.org/10.1111/mpi.12728>



- Feeding of IAP (Inhibitor of apoptosis) and PP1 (Protein phosphatase 1) dsRNA to *Halyomorpha halys* nymphs caused 70% mortality due to target gene knockdown (Mogilicherla et al., 2018)
- dsRNAs and siRNAs were detected on aphids, mites, and tomato after dsRNA rubbing on previously carborundum-dusted leaves (Gogoi et al., 2017)
- Spray-induced gene silencing (SIGS) in wheat leads to the production of siRNAs and an increase in some RNAi components (Song et al., 2018)

Objectives

Development of an efficient and sustainable management RNAi-based strategy for *H. halys* control

1. Production of dsRNA targeting the identified insect genes
2. Identification of best delivery method of dsRNAs to insects
3. Demonstration of insect target gene knockdown and mortality, with no impact on plant, fruit quality, or the environment

Conclusions

- H. halys* shows a higher mortality in response to IAP/PP1 dsRNA treatment compared to GFP and control
- Some plant RNAi-related genes present changes in gene expression indicating a plant response

Future work

- Quantification of IAP and PP1 dsRNA and corresponding siRNA in plant and insect samples
- Gene expression profile assessment of other plant RNAi components
- Assessment of alternative dsRNA delivery methods and dsRNA treatment in other important crop species

Young Scientists for Plant Health, December 16th, 2020

Mediante approcci integrati agronomici, metabolici e biotecnologici si è valutata l'efficacia di una possibile soluzione non convenzionale da poter inserire in strategie di difesa integrate per combattere malattie o patogeni vegetali diminuendo l'impatto economico che queste hanno su varietà agronomiche importanti di maniera sostenibile.

