

Controllo biotecnologico della cimice asiatica: il ruolo chiave dell'RNAi

Giovanni Bernacchia, Davide Boscolo, Riccardo Osti, Lorenzo Benetti, Morena De Bastiani, Stefano Civolani



**Università
degli Studi
di Ferrara**

Attività realizzata nell'ambito della Legge regionale 27 ottobre 2022 N.17 "Interventi urgenti a sostegno del settore agricolo, agroalimentare, ittico e delle bonifiche" - Art.1 "Interventi per l'innovazione del settore agricolo ed agroalimentare" - Progetto "INTEGR.HALYS - Integrazione di tecniche innovative per la gestione sostenibile della cimice asiatica"

OBIETTIVO

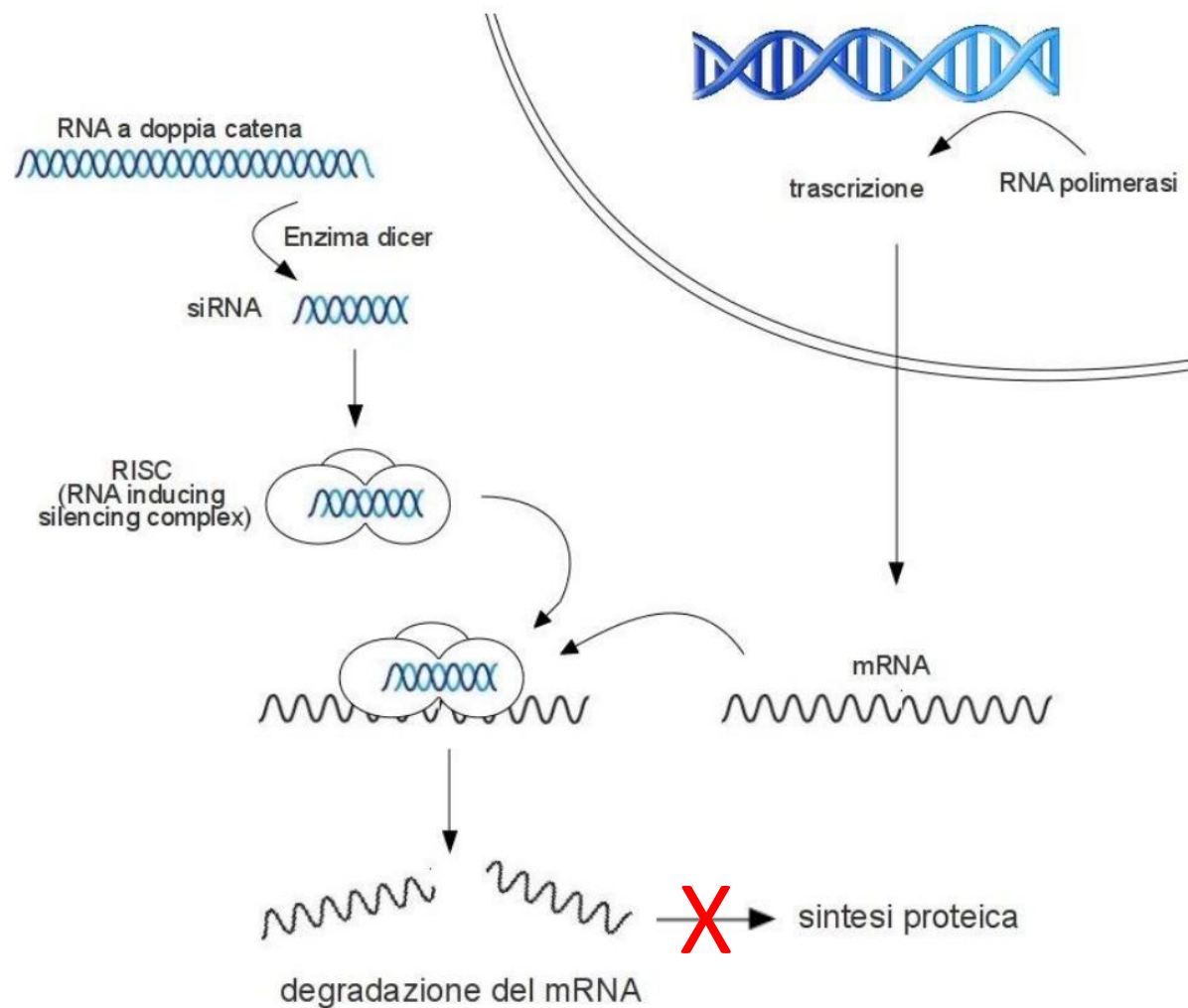
Valutare l'efficacia e l'applicabilità di tecniche di silenziamento genico basate sull'RNAi per il controllo di *Halyomorpha halys*.

→ Come funziona il silenziamento genico con RNA a doppia elica (dsRNA), chiamato anche RNA interference (RNAi)?

RNA interference (RNAi)

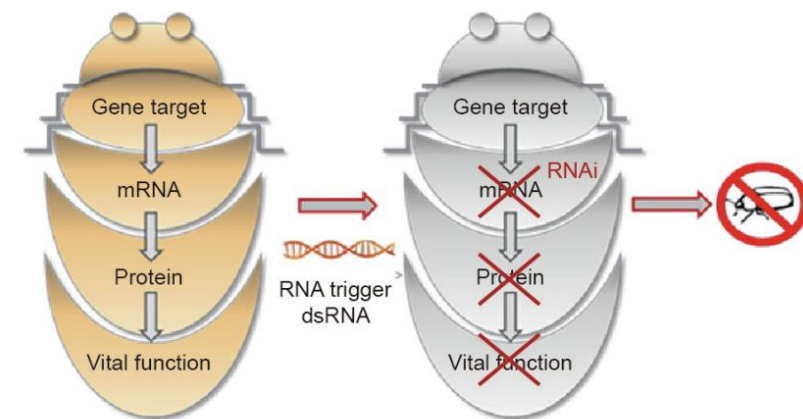
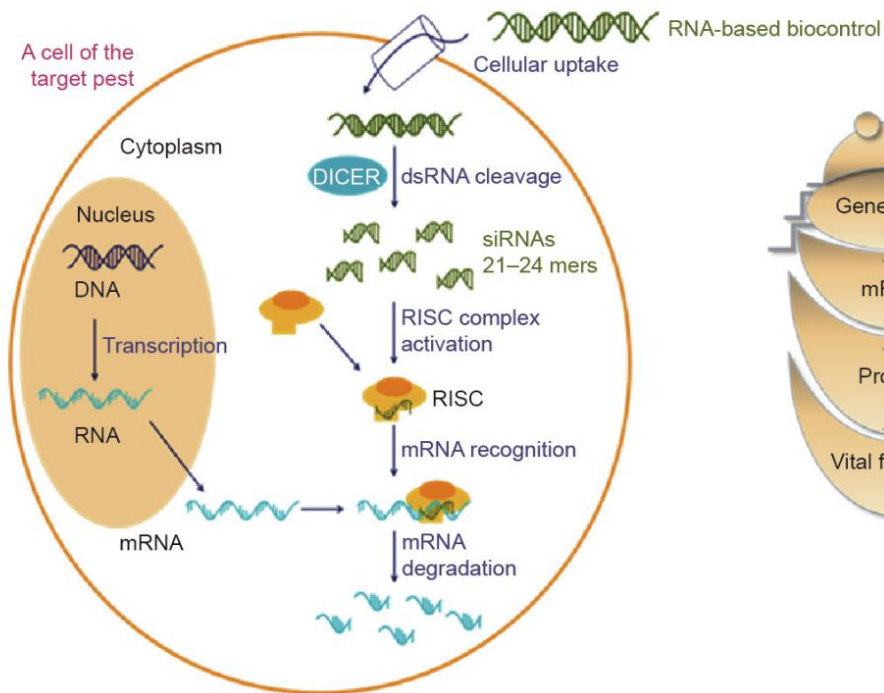
E' un meccanismo che permette di spegnere (silenziare) un gene dell'insetto bloccando la produzione della proteina corrispondente:

- è innescato da una molecola di RNA a doppia elica
- non modifica il DNA
- è molto specifico per la specie di insetto che si vuole colpire.



RNA interference (RNAi) come insetticida

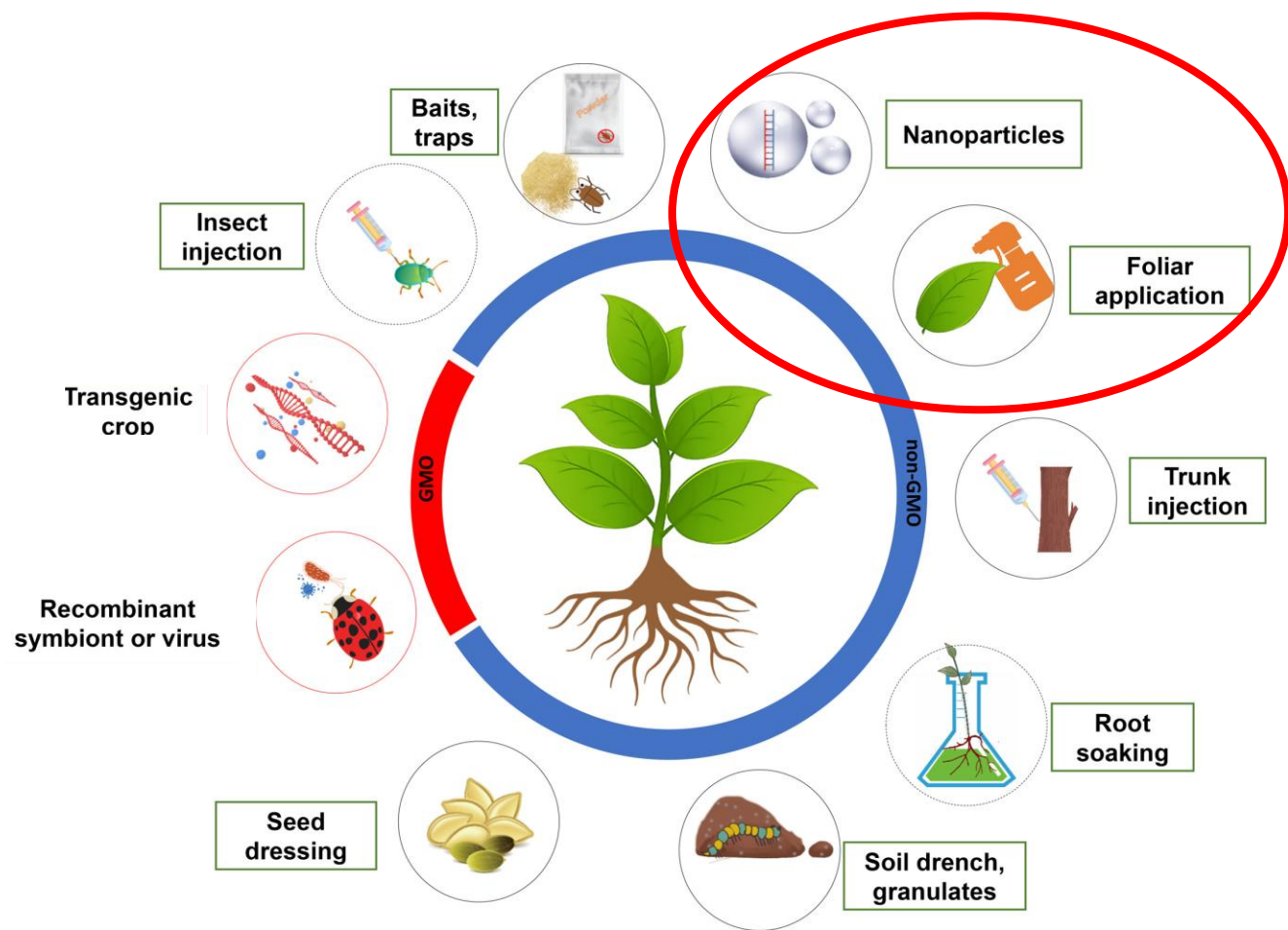
Il silenziamento genico, causato dall'RNA a doppia elica, bloccando la produzione della proteina nell'insetto:



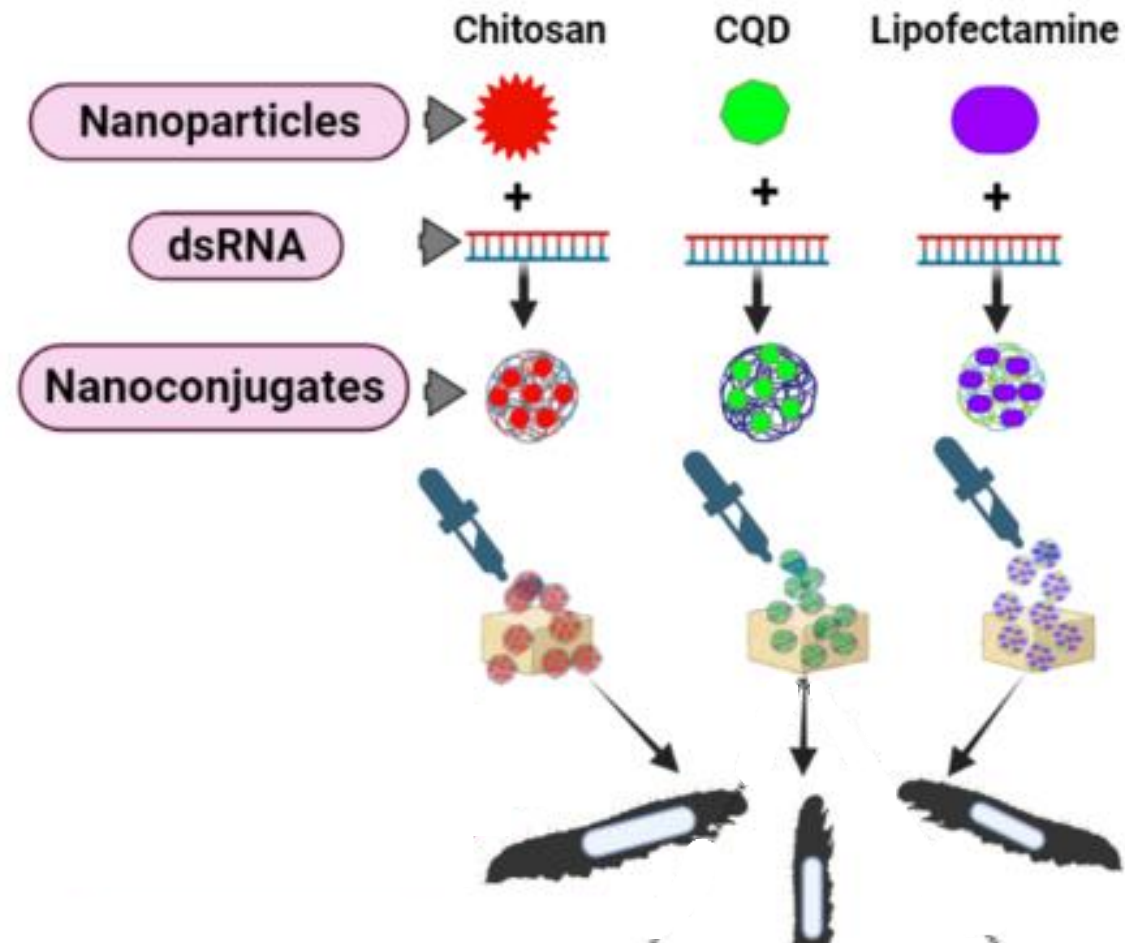
- può determinare dei danni al metabolismo ed al ciclo vitale del fitopatogeno
- può funzionare come insetticida specie-specifico.

Esistono diversi metodi per introdurre il dsRNA negli insetti:

il metodo più indicato per le applicazioni in campo è la distribuzione topica su foglie o su insetti (Spray-induced gene silencing, SIGS).



Sono stati sviluppati numerosi sistemi per incapsulare l'RNA a doppia elica, per proteggerlo dall'ambiente, per aumentare la penetrazione nei tessuti e l'efficienza di silenziamento nell'insetto.



RNA interference (RNAi) come insetticida

The diagram illustrates the RNA interference process in four steps:

- 1 Spray Calantha™ on potato plants**: A beetle is shown on a potato leaf with a red droplet representing the spray.
- 2 Calantha™ is ingested by beetle**: The beetle is shown eating the leaf.
- 3 The process prevents the production of an essential CPB protein**: A circular inset shows the molecular mechanism: 'Ingestion of the active ingredient' leads to 'Passage into the gut', which causes 'Cleavage of specific mRNA', resulting in 'No protein production'. Labels include 'Insect gut', 'mRNA', and 'Protein'.
- 4 CPB stops feeding within ~3 days**: A leaf is shown with a red 'X' over it, indicating damage or death.

Below the diagram is the **Calantha** logo, which features a stylized leaf and the brand name.

Target gene	Species and reference
Registered products	
<i>Snf7</i> (SmartStax®PRO)	<i>D. virgifera virgifera</i> (Baum et al., 2007)
<i>Proteasome subunit beta type-5</i> (Calantha™)	<i>L. decemlineata</i> (Rodrigues et al., 2021)

Il primo prodotto topico autorizzato negli USA a base di dsRNA è Calantha, diretto contro la dorifora della patata.

OBIETTIVO

Valutare l'efficacia e l'applicabilità di tecniche di silenziamento genico basate sull'RNAi per il controllo di *Halyomorpha halys*.

- *Identificazione di possibili geni target*
- *Sintesi e applicazione topica di dsRNA (neanidi ed adulti)*
- *Valutazione del silenziamento genico, della mortalità e dell'alterazione dell'attività trofica*

Geni target testati per il silenziamento genico mediato da dsRNA in cimice asiatica

Mortalità

- Gene F
- Gene T
- Gene R
- Gene C
- Gene E

Alterazione dell'alimentazione

Gene codificante per un enzima presente nella saliva (**gene S**)

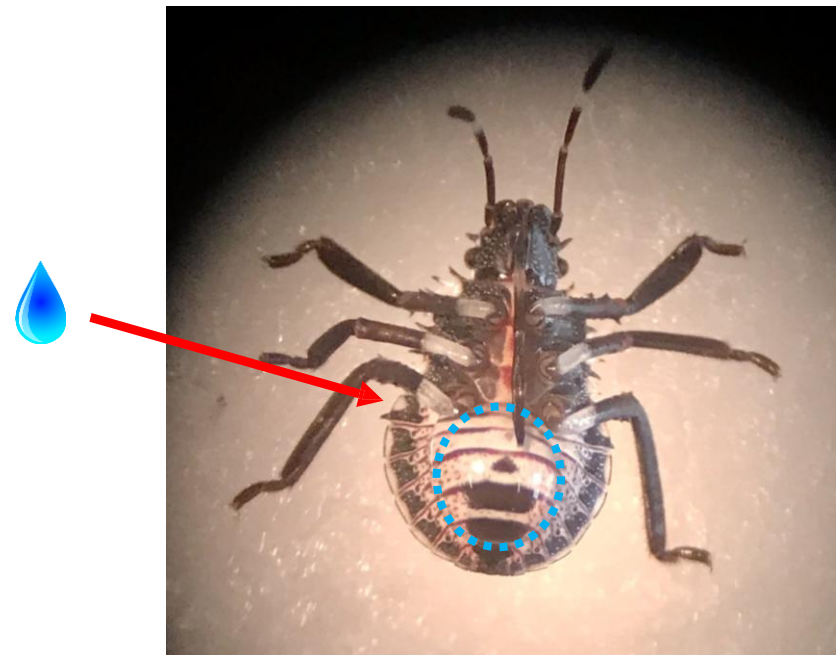
Gene di controllo, non presente in cimice, LacZ di *E. coli* (**gene LacZ**).

Silenziamento in neanidi

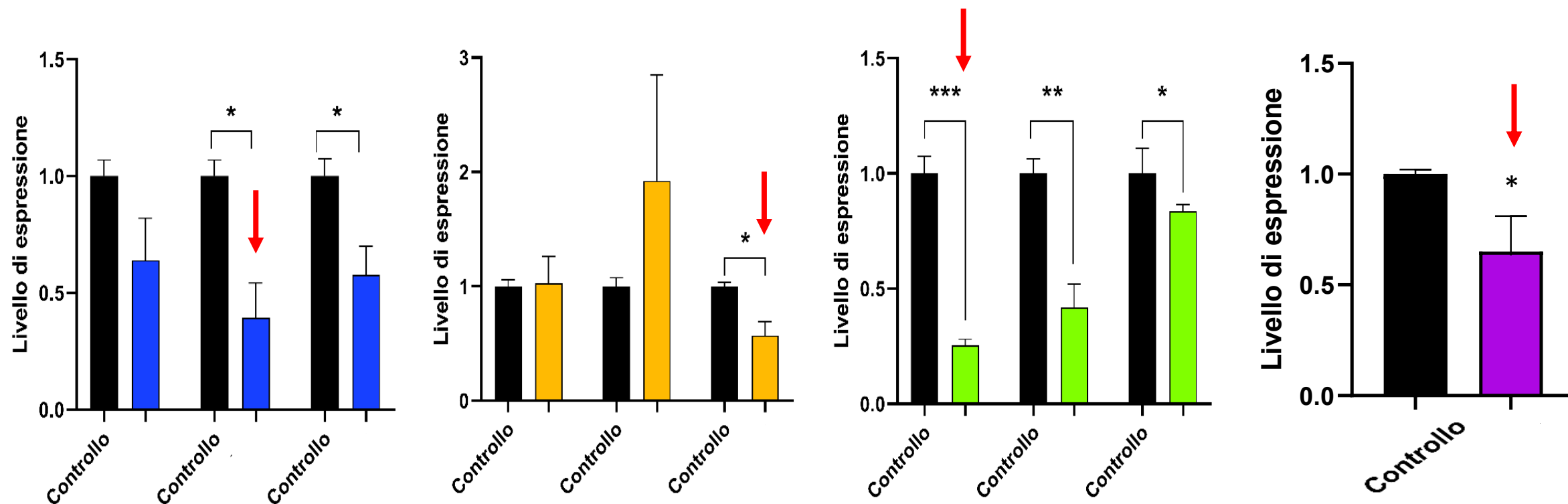
Neanidi al 2° stadio sono state trattate con il dsRNA depositando una goccia di soluzione direttamente sull'addome dell'insetto.

24 ore dopo il trattamento sono stati analizzati i livelli di silenziamento genico.

Parallelamente è stata misurata la mortalità indotta dal trattamento durante i 15 giorni successivi.

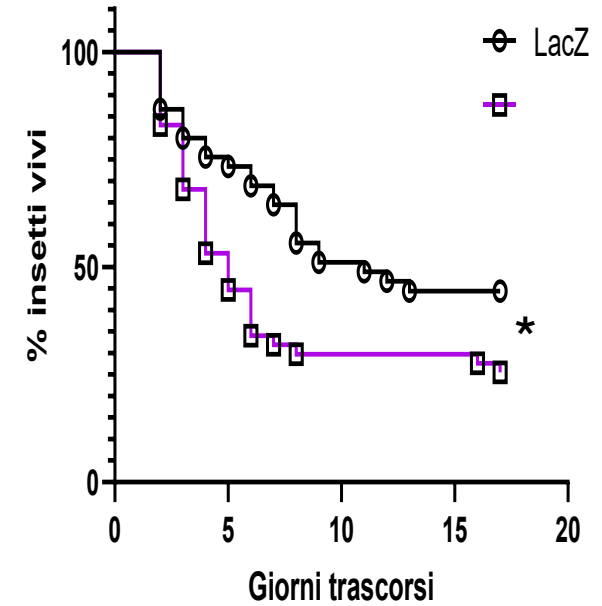
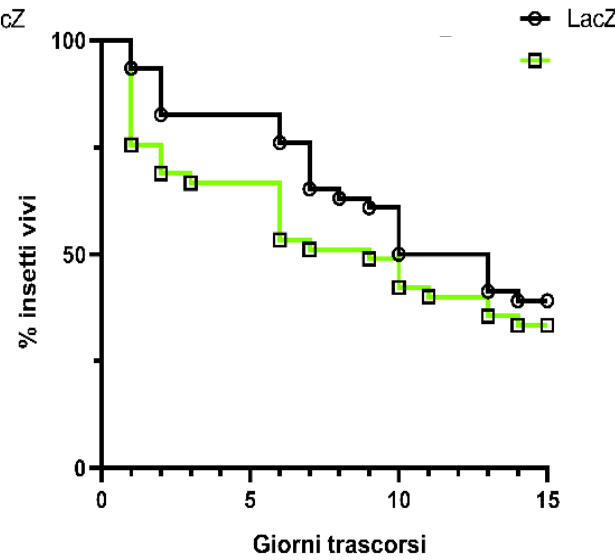
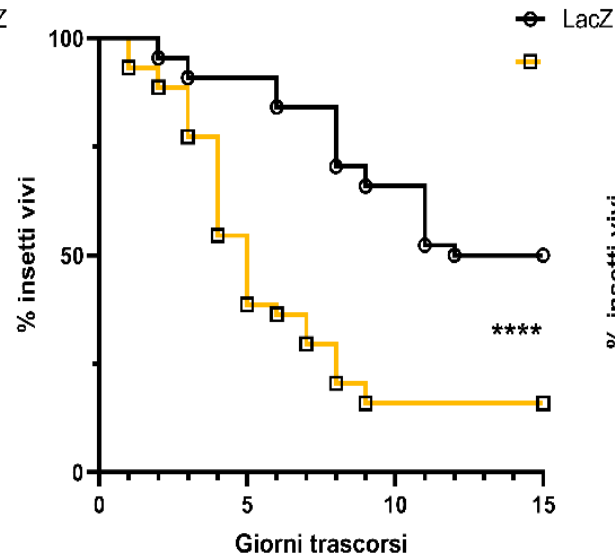
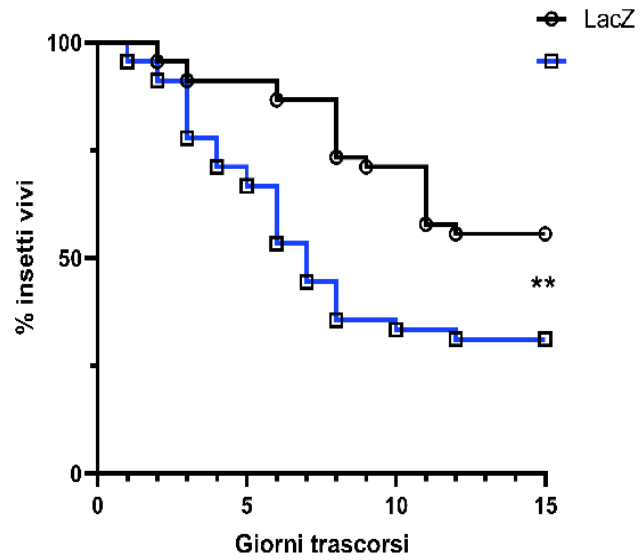


Silenziamento in neanidi



Il trattamento topico delle neanidi al 2° stadio con i diversi dsRNA induce silenziamento genico. Non necessariamente più dsRNA induce un maggior silenziamento genico.

Mortalità in neanidi

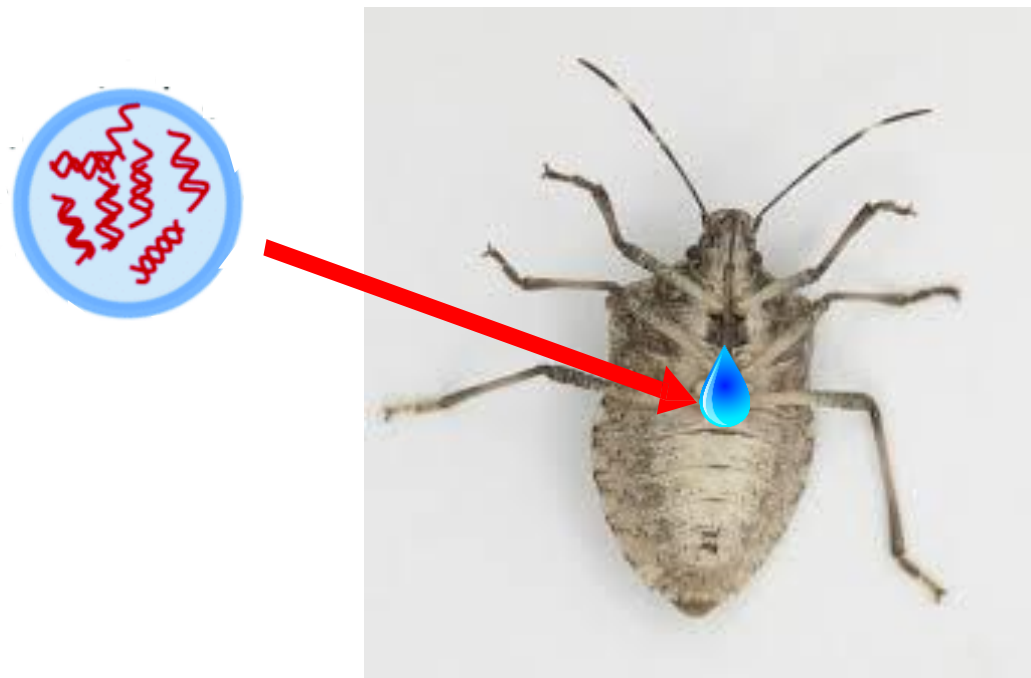


Il trattamento topico delle neanidi al 2° stadio con dsRNA può indurre mortalità.

Silenziamento in cimici adulte - Nanoincapsulamento

Il dsRNA è stato nanoincapsulato con materiale polisaccaridico.

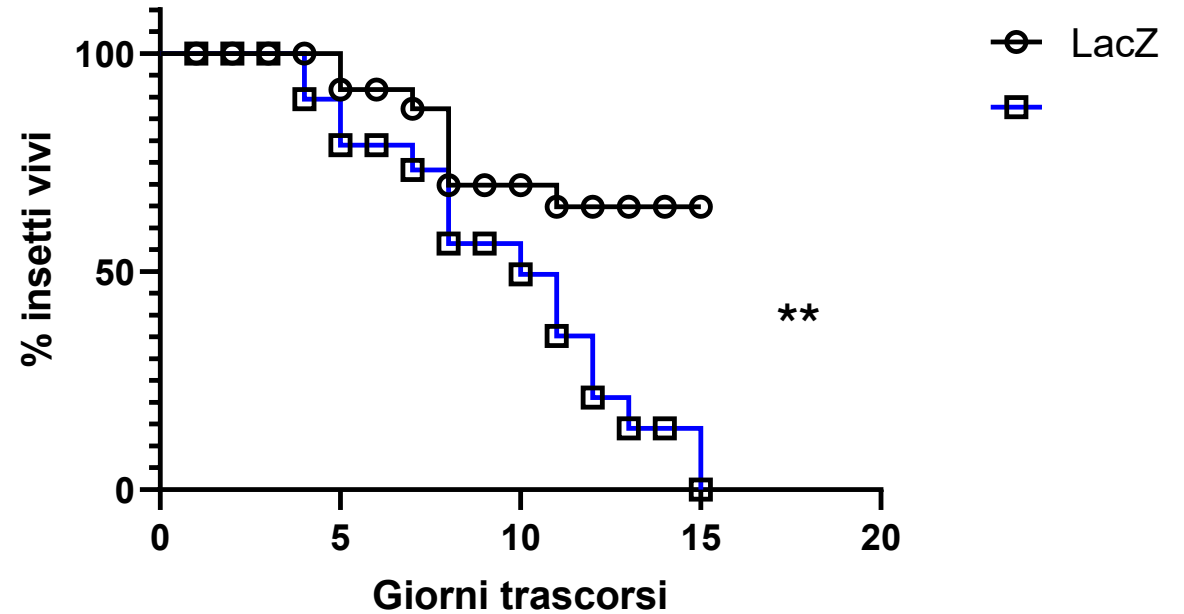
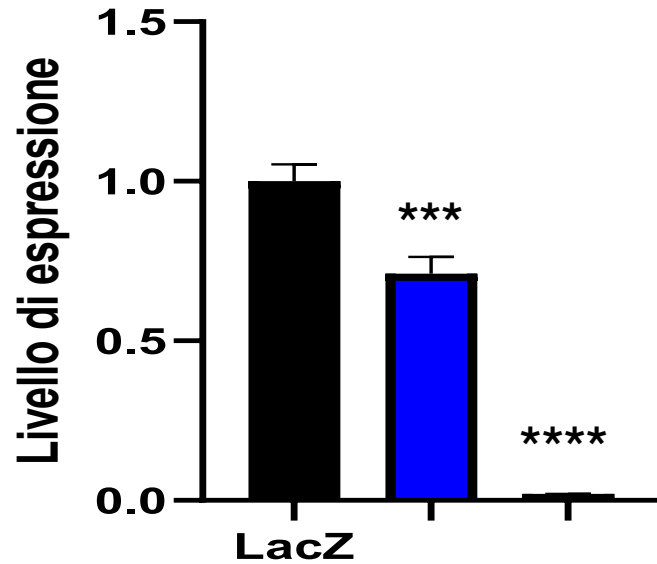
Cimici adulte sono state trattate con il dsRNA incapsulato depositando una microgoccia di soluzione direttamente sull'addome dell'insetto.



24 ore dopo il trattamento sono stati analizzati i livelli di silenziamento genico.

La mortalità indotta dal trattamento è stata misurata durante i 15 giorni successivi.

dsRNA nanoincapsulato: silenziamento genico e mortalità su cimici adulte



I dsRNA mirati ai geni incapsulati ed applicati sull'addome di cimici adulte, causano silenziamento genico. Questo **non** si osserva con dsRNA nudo.

Il silenziamento del gene induce mortalità nelle cimici adulte.

Geni target testati per il silenziamento genico mediato da dsRNA in cimice asiatica

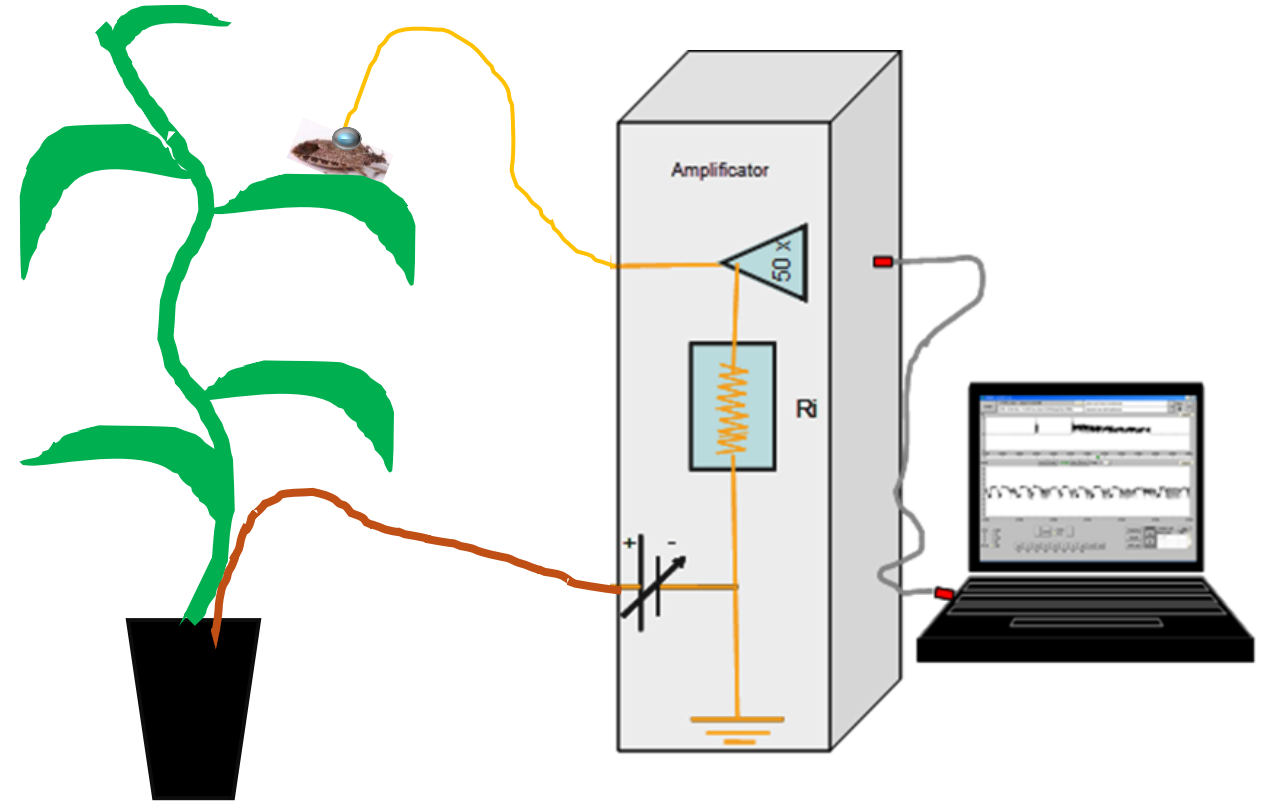
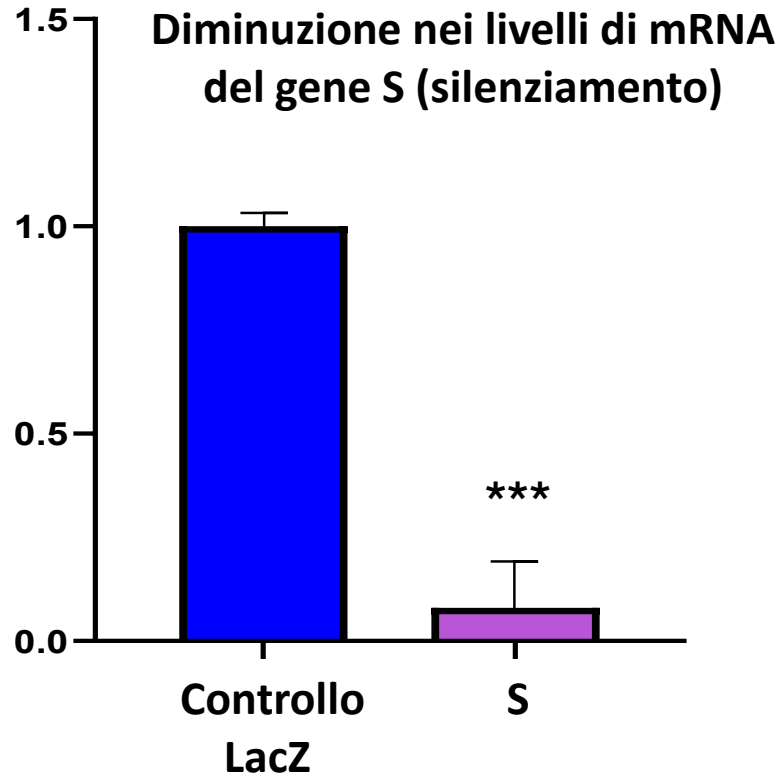
Mortalità

Alterazione dell'alimentazione

Gene codificante per un enzima presente nella saliva (**gene S**)

Gene di controllo, non presente in cimice, LacZ di *E. coli* (**gene LacZ**).

Silenziamento genico salivare indotto da dsRNA su neanidi

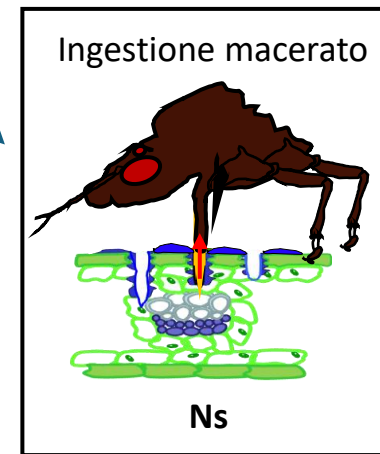
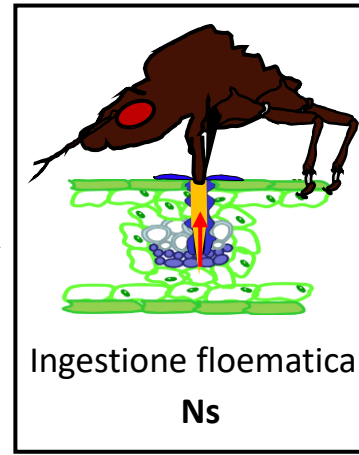
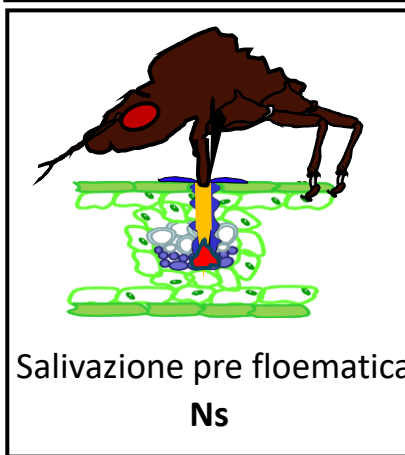
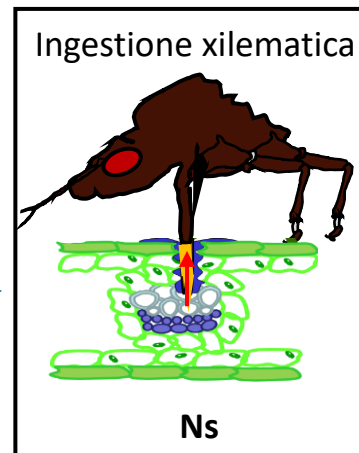
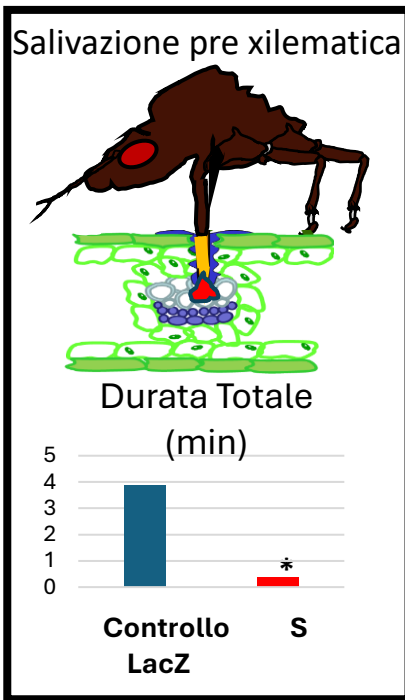
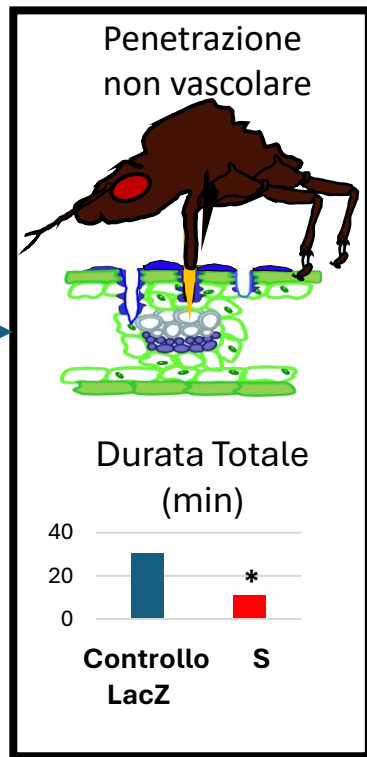
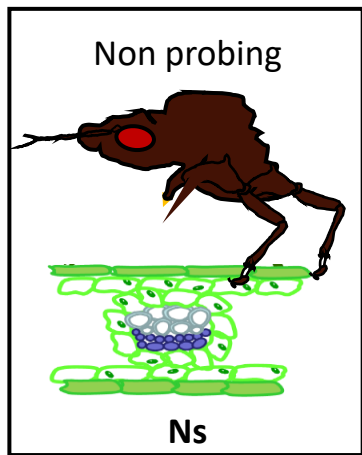


Il trattamento delle neanidi di cimice al 2° stadio con il dsRNA (1 µg) mirato al gene S, proteasi di saliva, induce un notevole silenziamento genico.



Esperimenti di EPG per studiare il profilo di alimentazione delle neanidi dopo il trattamento con dsRNA

Trattamento delle neanidi di cimice al 2° stadio con il dsRNA mirato al gene S salivare



Altera il profilo di alimentazione, inducendo una riduzione nell'attività di penetrazione periferica e nella successiva salivazione prexilematica.

Conclusioni

- L'applicazione topica di dsRNA è in grado di indurre silenziamento genico per diversi geni della cimice asiatica.
- Il silenziamento genico può essere ottenuto dopo applicazione topica non solo sulle neanidi ma anche sugli adulti grazie al nanoincapsulamento del dsRNA.
- Il silenziamento genico indotto dopo applicazione topica del dsRNA nanoincapsulato induce mortalità sia sugli stadi giovanili che sugli adulti.
- E' stato inoltre osservato che silenziando un gene implicato nella composizione della saliva è possibile alterare i profili di alimentazione delle neanidi.



Health and Food Safety

EU's rules on New Genomic Techniques

4 December 2025



WHY IS THIS IMPORTANT?

New Genomic Techniques enable highly precise and efficient plant breeding. They can help increase the **sustainability** of agriculture and the food chain through the development of **improved plant varieties** that are more resilient to droughts or other climate extremes, that require **less fertilisers and pesticides**, and that lead to higher yields.



WHY NEW RULES?

The EU needs an **adapted framework for safe NGT plants** that reduces burden, enables innovation and enhances the competitiveness and sustainability of the European agri-food system and the bioeconomy.

OBJECTIVES OF THE NEW REGULATION



Ensure **high level of protection of health and the environment**



Contribute to **sustainability** in a wide range of plant species and to the competitiveness of the agri-food system.



Create opportunities for **research and innovation**, including for SMEs.

Sul fronte legislativo europeo qualcosa si sta muovendo...

L'UE ha individuato la necessità di ridurre i tempi procedurali per l'approvazione dei pesticidi a basso rischio (Low-Risk Pesticide, LRP) quindi anche il dsRNA.

WHAT ARE NEW GENOMIC TECHNIQUES?

NGTs are techniques that can help breed new plant varieties faster and with higher precision compared to conventional breeding techniques, such as seed selection or cross-breeding. **NGTs** can produce a wide diversity of plant products. These plants may have small changes that might also occur in nature or through conventional breeding or they may have more complex modifications.