



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO**  
**DIPARTIMENTO DEMETRA - FACOLTA' DI AGRARIA**

**Dottorato di ricerca in Gestione fitosanitaria eco-compatibile in ambienti agro-forestali e urbani**

**IDENTIFICAZIONE E UTILIZZAZIONE**  
**DI MARCATORI MOLECOLARI**  
**NELLA SISTEMATICA DEI FITOSEIDI**  
**(PARASITIFORMES, PHYTOSEIIDAE)**

**AGR/11- ENTOMOLOGIA**

**TESI DI**  
**DOTT. BARBARA SALERNO**

**COORDINATORE DEL DOTTORATO**  
**PROF. STEFANO COLAZZA**

**TUTOR**  
**PROF. STEFANO COLAZZA**

**CO-TUTOR**  
**PROF. ELENA CARRA**

**XXIII CICLO - ANNO ACCADEMICO 2011 - 2012**

---

**DOTTORATO**



## **INDICE**

<b>PREFAZIONE</b>	3
<b>1 INTRODUZIONE</b>	6
1.1 Gli acari predatori della famiglia Phytoseiidae	8
1.2 Identificazione sopraspecifica: cenni storici e problematiche correlate	11
<b>2 SISTEMATICA MOLECOLARE</b>	15
2.1 Metodi diretti : il sequenziamento	16
2.2 Marcatori nucleari : genoma ribosomale	19
2.3 Marcatori mitocondriali	20
2.4 Metodo indiretto: RAPD-PCR	23
2.5 Il DNA da preparati per microscopia	27
<b>3 ANALISI STATISTICA</b>	28
<b>4 OBIETTIVI DELLA RICERCA</b>	29
<b>5 MATERIALI E METODI</b>	30
5.1 Materiale Biologico	30
5.2 Estrazione del DNA	34
5.3 Estrazione del DNA da uova, metodo classico Fenolo-Cloroformio	36
5.4 Estrazione del DNA da uova, metodo inorganico Chelex®-100	37
5.5 Estrazione del DNA da acari allestiti per microscopia metodo classico Fenolo-Cloroformio	38
5.6 Estrazione del DNA da acari allestiti per microscopia metodo DNeasy Tissue Qiagen Kit	39
5.7 Analisi Molecolare dei Fitoseidi	40
5.8 Amplificazione enzimatica del mtDNA: regione COI	41
5.9 Amplificazione enzimatica del mtDNA: regione 12S	43
5.10 RAPD-PCR	45
5.11 Elettroforesi su gel di agarosio	48
<b>6 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	49
6.1 Estrazione del DNA totale (nucleare e mitocondriale)	49
6.2 Analisi molecolare dei Fitoseidi	54
6.3 RAPD-PCR	59
<b>7 CONSIDERAZIONI</b>	90
<b>8 BIBLIOGRAFIA</b>	92
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	100

## **PREFAZIONE**

Negli ultimi decenni gli acari predatori della famiglia Phytoseiidae hanno assunto un'importanza economica crescente come agenti di controllo biologico di diverse specie di acari fitofagi, poiché, tra tutti i nemici naturali di questi ultimi, sono quelli che meglio riescono a controllare le infestazioni sulle colture agrarie.

Per tale ragione molte specie sono adesso allevate in biofabbriche e commercializzate allo scopo di limitare l'uso dei fitofarmaci, che come è noto, arrecano gravi danni sia all'ambiente che all'uomo. Tra gli effetti negativi si possono annoverare la selezione di ceppi resistenti, l'eliminazione dei nemici naturali e la presenza di residui nei prodotti finali che possono provocare al consumatore la cosiddetta tossicità cronica, l'accumulo cioè di sostanze tossiche all'interno dell'organismo.

Sono diversi i motivi che rendono gli acari fitoseidi ottimi predatori. Tra i più importanti ricordiamo la grande mobilità (dispersione attiva e passiva), il tasso di accrescimento più elevato rispetto alla preda e il tempo medio di generazione inferiore a quello della preda.

Presentano, inoltre un regime dietetico notevolmente variabile, che permette a molte specie di nutrirsi non solo di prede ma anche di alimenti alternativi e facilmente disponibili sulle piante, come polline, ife e spore fungine, melata etc. (Elbadry & Elbanhawy, 1968; Ferragut *et al.*, 1997; Ragusa & Tsolakis, 1995). Questa diversità del regime trofico permette da una parte un elevato grado di adattamento ai diversi habitat e dall'altra assicura ai fitoseidi la sopravvivenza anche in periodi in cui le popolazioni delle prede sono basse o assenti.

Al pari della sua importanza ecologica, la comunità dei fitoseidi infeudata sulle diverse piante, presenta un altrettanto importante aspetto legato alla corretta definizione della composizione specifica di tale comunità.

Di quest'ultimo aspetto si sono occupati diversi sistematici nell'ultimo secolo, fornendo, da una parte molte informazioni utili sugli organi da considerare

per una corretta identificazione specifica, ma creando dall'altra parte diverse correnti di pensiero sul loro raggruppamento sopra-specifico.

Le varie ipotesi proposte sinora, si sono infine, cristallizzate in due teorie che si discostano sul carattere discriminante da utilizzare per definire l'appartenenza generica delle specie, quindi per risalire alle linee evolutive dei diversi gruppi nell'ambito della famiglia (Tsolakis *et al.* 2012).

La prima teoria, proposta dalla ricercatrice francese Athias-Henriot considera come carattere discriminante l'apparato di inseminazione che, essendo un organo interno, secondo l'autrice, dovrebbe essere meno soggetto agli effetti ambientali rispetto all'esoscheletro.

La seconda teoria, avanzata da Chant e McMurtry considera, al contrario, come carattere discriminante la chetotassi dorsale e ventrale, cioè un carattere presente nell'esoscheletro dell'animale.

Entrambe le ipotesi associano al carattere discriminante una serie di caratteri correlativi. Le due correnti, com'è naturale, portano a risultati diversi creando una grande confusione che, di certo, non giova non solo a chi studia le caratteristiche biologiche delle varie specie ma anche a chi impiega questi predatori in un processo economico in campo agricolo.

Attualmente non è stata ancora risolta questa diatriba, anche se un recente studio (Tsolakis *et al.*, 2012), utilizzando anche metodologie molecolari, ha dimostrato che la teoria di Chant e McMurtry non coincide con le vicinanze genetiche, mentre quella di Athias-Henriot definisce meglio, anche se non esattamente, le linee evolutive che caratterizzano i raggruppamento sopra-specifici.

Si rende necessario, dunque, associare, in una prima fase, alla sistematica morfologica, l'utilizzazione di metodologie molecolari allo scopo di fornire un valido contributo alla tassonomia, alla filogenesi e alla diagnostica della specie.

Il lavoro sperimentale descritto in questa tesi ha come obiettivo principale quello di ottenere DNA idoneo per le analisi molecolari, a partire da un singolo individuo allestito su vetrino per microscopia, risalente anche ad alcuni decenni fa, in maniera tale da disporre di campioni già sottoposti ad un'analisi morfologica, condizione necessaria ai fini del progetto di ricerca.

Il DNA è stato purificato avvalendosi di tre diverse tecniche di estrazione, la metodica classica fenolo-cloroformio, il metodo inorganico a mezzo Chelex e il kit commerciale Dneasy Tissue Qiagen kit, per valutare quale era la metodica di estrazione più idonea in termini di facilità di esecuzione e qualità del DNA purificato, considerando tra l'altro, la difficoltà dei campioni di partenza che si presentavano disidratati e con gli acidi nucleici sicuramente con parziale degradazione.

L'analisi molecolare è stata condotta su un gruppo di 15 specie di fitoseidi e gli esiti delle indagini molecolari hanno consentito sia la realizzazione ed il calcolo del coefficiente di similitudine tra le singole specie che la costruzione dei relativi dendrogrammi, tanto avvalendosi della metodica del sequenziamento della subunità del 12S rRNA e della subunità I della Citocromo c Ossidasi del genoma mitocondriale quanto con la metodica RAPD-PCR utilizzando 7 diverse cinetiche molecolari ciascuna delle quali si è avvalsa del potere risolutivo di 3 differenti oligonucleotidi *primers*.

Dal confronto tra i rispettivi dendrogrammi si può ricavare che per alcune specie si osserva piena sovrapposizione in termini di vicinanza nella scala evolutiva; tale risultato, però, non è stato raggiunto per l'intero gruppo delle specie selezionate.

Tuttavia, si ritiene che entrambe le metodiche molecolari, allo stato, non possano prescindere dall'analisi tassonomica classica dettata da criteri morfologici universalmente riconosciuti validi da parecchie decenni.

## 1 INTRODUZIONE

Negli anni successivi alla seconda guerra mondiale, lo sviluppo dell'agricoltura, ha richiesto un'attenzione sempre maggiore per la difesa delle piante tanto da portare alla decuplicazione della produzione di fitofarmaci di sintesi da 50 nell'anteguerra agli oltre 500 principi attivi di oggi.

Le ragioni che hanno favorito questo notevole incremento sono diverse; si possono annoverare tra di esse il basso costo di produzione (la materia prima è rappresentata dai residui della lavorazione del petrolio), la facilità d'uso, l'effetto immediato e la lunga persistenza d'azione (Ragusa & Tsolakis, 2005).

Per questi motivi il mercato dei fitofarmaci ha avuto un notevole sviluppo, raggiungendo il suo apice negli anni Settanta, quando, solo negli Stati Uniti, venivano utilizzate annualmente circa 450.000 tonnellate di insetticidi (McEwen, 1977).

Grazie agli studi portati avanti all'inizio solo da pochi esperti, che consapevoli del pericolo insito delle molecole di sintesi, cercavano di mettere in guardia gli operatori del settore e a proporre valide alternative all'abuso di fitofarmaci di sintesi (Crosby, 1971; Chapman, 1974; Onillon, 1974; Brown, 1974; Benham, 1974; Viggiani & Iannaccone, 1973), ben presto si è compreso che l'uso prolungato e irrazionale dei pesticidi, è anche causa di non pochi inconvenienti. Si ricordano tra questi la selezione di ceppi resistenti, la contaminazione ambientale (Brader, 1977), l'eliminazione dei nemici naturali, l'insorgenza di massicce infestazioni di specie fitofaghe che prima non procuravano danni economici e la presenza di residui nei prodotti consumati dall'uomo e quindi l'accumulo di sostanze tossiche all'interno del nostro organismo, fenomeno noto come tossicità acuta e cronica (Spear *et al.*, 1975).

A partire dagli anni '80 si è assistito ad un'inversione di tendenza con un costante decremento dell'uso di fitofarmaci che è stato reso più semplice sia dall'elaborazione di metodologie di controllo alternative sia dalla ricerca di nuove sostanze a basso impatto ambientale in grado di controllare le popolazioni di fitofagi divenute resistenti agli insetticidi convenzionali.

I composti di questa classe esplicano la loro azione interferendo sulla formazione della chitina bloccando quindi, lo sviluppo delle larve nella fase della muta. Per questo motivo sono classificati come insetticidi regolatori di crescita.

Questi prodotti sono generalmente meno tossici per l'uomo, ma la loro selettività nei confronti degli artropodi utili è stata spesso messa in discussione (Angeli *et al.*, 2000; Bortolotti *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 1991; Mendel *et al.*, 1994; Viggiani & Loia, 1991).

Nella difesa delle colture agrarie, quindi, si inizia ad orientarsi sempre più spesso verso l'adozione di metodologie di controllo che rispettino principalmente le esigenze di eco-compatibilità e non tossicità per la salute umana, come il controllo biologico e il controllo integrato che sfruttano i rapporti di antagonismo fra gli organismi viventi (virus, batteri, insetti e acari).

In quest'ottica, per quel che riguarda il controllo delle popolazioni di acari fitofagi, la famiglia Phytoseiidae rappresenta un importante taxon che comprende importanti agenti di controllo utilizzati da diversi decenni nei programmi di controllo biologico degli acari fitofagi.

## **1.1 Gli acari predatori della famiglia Phytoseiidae**

Gli acari costituiscono una sottoclasse della classe Aracnidi e appartengono al subphylum Chelicerata del Phylum Arthropoda.

Presentano un gran numero di specie con caratteristiche morfologiche, dimensioni, regimi dietetici e capacità di adattamento molto diversi tra di loro.

Negli anni '50 si conoscevano già circa 30.000 specie appartenenti a più di 1.700 generi (Radford, 1950) diffuse in tutto il mondo e in quasi tutti gli ambienti naturali e antropizzati .

Di particolare interesse economico sono sicuramente gli acari fitofagi e gli acari predatori. I primi sono in grado di arrecare danni consistenti alle produzioni agricole, nutrendosi del contenuto cellulare dei tessuti vegetali (Tetranychidae, Tarsonemidae) e sono in grado di defogliare una pianta in breve tempo, mentre i secondi, si nutrono degli acari fitofagi e risultano, quindi, utili per l'agricoltura perché capaci non solo di contenere le infestazioni in atto, ma anche di impedirne l'insorgenza.

Un efficace controllo biologico porta ad una riduzione dell'uso di fitofarmaci che, come è noto, provocano non pochi inconvenienti sia all'ecosistema che alla salute umana.

Esistono diverse famiglie di acari predatori, Phytoseiidae, Anystidae, Trombididae Pyemotidae e Stigmaeidae che annoverano numerose specie di predatori, ma tra queste, la famiglia Phytoseiidae che appartiene all'ordine Parasitiformes, è sicuramente quella che assume maggiore importanza economica perché ad essa appartengono i più efficaci predatori degli acari fitofagi in grado anche di controllare le pullulazioni di alcuni insetti, quali tripidi, stadi giovanili di aleirodidi, cocciniglie ecc. (Ragusa, 1979; Duso & Camporese, 1992; Tsolakis & Ragusa, 1994).

Molti studiosi hanno contribuito ad ampliare le conoscenze sulla loro sistematica, sulla loro biologia, ma anche sui numerosi effetti collaterali provocati dai fitofarmaci che venivano applicati ed allo stesso tempo sulle interrelazioni tra preda e predatore soprattutto negli agroecosistemi dove il margine di profitto era elevato (Dousse, 1958; Chant, 1959; Ragusa, 1979; Sabelis, 1985).

L'attenzione per questi nemici naturali è aumentata a partire dal 1950. Basti pensare che il numero di specie descritte è cresciuto in maniera esponenziale passando da 61 nel 1951 a 165 solo dopo alcuni anni per arrivare a più di 2.800 specie nel 2007 raggruppate in 3 sottofamiglie e 84 generi (Chant and McMurtry, 2007).

Bisogna considerare tuttavia che è stato riportato un elevato numero di sinonimie - fenomeno che si verifica quando una stessa specie viene denominata con due nomi diversi - più del 10% delle specie descritte risultano sinonime e molte altre devono ancora essere verificate (Moraes *et al.* 2004).

Sono molte le caratteristiche che rendono gli acari fitoseidi di notevole interesse economico in quanto ottimi predatori:

- Tasso di sviluppo più elevato rispetto a quello della preda.
- Grande mobilità, procedono a zig-zag, esaminando l'ambiente mediante soprattutto il primo paio di zampe, ricco di sensilli chemiorecettori.
- Notevole capacità di dispersione sia attiva, la deambulazione per le brevi distanze, che passiva, vento e foresi per le lunghe distanze (Treat, 1969; Kranz, 1973; Grogan & Navai, 1975; Fauvel & Cotton, 1981; Evans, 1993; Tixier *et al.*, 1998). In questo modo, sono in grado di colonizzare piccoli appezzamenti in un periodo di tempo molto breve.
- Regime dietetico variabile che consente loro di colonizzare l'ambiente anche con basse densità di preda o addirittura in assenza di questa, poiché riescono a sopravvivere e anche di riprodursi alimentandosi di substrati alternativi quali pollini, melata, nettare ecc. (Elbadry & Elbanhawy, 1968; Ferragut *et al.*, 1997; Ragusa & Tsolakis, 1995). Di conseguenza possono essere presenti tutto l'anno sia sulle piante coltivate che su piante spontanee presenti ai margini degli agroecosistemi, chiamate "piante serbatoio", e svolgere la loro azione di controllo all'inizio delle infestazioni dei fitofagi (Fauvel e Cotton, 1981; Tsolakis *et al.*, 1997).

In base al regime alimentare, si possono distinguere quattro tipi di categorie di fitoseidi (McMutry & Croft, 1997):

➤ **Tipo I:** predatori obbligati del genere *Tetranychus*, che si nutrono e si riproducono a spese di un solo genere di acari (Ragusa, 1979). Appartengono a questa categoria le specie del genere *Phytoseiulus*;

➤ **Tipo II:** predatori obbligati di specie appartenenti alla famiglia Tetranychidae, si tratta delle specie appartenenti principalmente a due generi *Galendromus* e *Neoseiulus* anche se ci sono alcune specie appartenenti al genere e *Typhlodromus*;

➤ **Tipo III:** predatori generici facoltativi, che si nutrono e si riproducono a spese di acari di famiglie diverse nonché di substrati alternativi (polline, altri artropodi), tra questi alcune specie del genere *Neoseiulus* e molte dei generi *Typhlodromus* e *Amblyseius*, ma sono comunque presenti in tutti i generi ad eccezione dei già menzionati *Phytoseiulus* e *Galendromus*;

➤ **Tipo IV:** predatori generici che si alimentano principalmente di polline, questo gruppo comprende le circa 200 specie del genere *Euseius*.

L'esistenza di un regime dietetico particolarmente diversificato, facilita gli agricoltori nella scelta degli acari da impiegare nella lotta biologica in base alle caratteristiche della specie fitofaga che deve essere contenuta, ma anche in base all'entità dell'infestazione in atto. Gli "specialisti", per esempio, vengono utilizzati quando l'infestazione è in corso e si rende necessaria una risposta immediata (Sabelis, 1985a, 1985b), mentre nelle colture arboree, che essendo pluriennali non richiedono un'azione repentina, si preferisce l'utilizzo di "generalisti" (McMutry, 1982), che oltre ad eliminare i fitofagi si nutrono anche stadi giovanili di insetti, uova di lepidotteri e rincoti, nematodi e funghi (McMutry & Rodriguez, 1987).

Per tutti questi motivi molte specie vengono adesso allevate da biofabbriche e commercializzate, per essere utilizzate nei programmi di lotta biologica e/o integrata.

## **1.2 Identificazione sopraspecifica: cenni storici e problematiche correlate**

La pianificazione di un'efficace strategia di contenimento ed il conseguente successo dei programmi di controllo biologico dipendono principalmente dalla corretta identificazione non soltanto delle specie fitofaghe, ma anche e soprattutto dei nemici naturali che sono ad esse associate su una determinata coltura, in modo da definire, in base alla composizione specifica della comunità dei predatori, le possibilità di controllo biologico naturale delle specie fitofaghe.

Purtroppo, gli studi sistematici che riguardano la famiglia Phytoseiidae, hanno avuto una storia tumultuosa e spesso confusa, perché gli autori non concordano tra di loro nell'approccio sistematico cioè nella scelta dei caratteri diagnostici da prendere in considerazione per determinare le entità tassonomiche sopraspecifiche (Chant & McMurtry, 2007; Tsolakis *et al.*, 2012).

In passato, quando l'analisi morfologica era effettuata attraverso strumenti a scarsa risoluzione ottica, la sistematica si basava sull'osservazione di pochi caratteri - la lunghezza di alcune setole della placca dorsale, la forma sia della placca ventrale che dell'epistosoma e la presenza di macrosetole sugli arti - che risultavano sufficienti anche perché effettuata in un'epoca in cui molte specie non erano ancora state identificate.

Da allora sono state proposte diverse classificazioni utilizzando caratteri come la chetotassi dorsale, ventrale e delle zampe; la forma della placca ventrianale e sternale, la forma dell'apparato di inseminazione, il numero di denti presenti sul dito mobile dei cheliceri, e l'adenotassi dorsale e ventrale (Athias-Henriot, 1977, 1978; Ragusa & Athias-Henriot, 1983; Chant & Yoshida-Shaul, 1987).

Attualmente esistono due scuole di pensiero che danno una diversa importanza ai caratteri presi in considerazione per la classificazione della famiglia Phytoseiidae: la scuola europea con Athias-Henriot e Ragusa e la scuola americana con Chant e McMurtry.

La prima ipotesi prende in considerazione le somiglianze nella forma dell'apparato di inseminazione e in questo modo il genere include un limitato

numero di specie (Athias-Henriot, 1977, 1978; Ragusa & Athias-Henriot, 1983; Ragusa & Tsolakis, 1994). Secondo gli stessi autori specie che presentano lo stesso apparato di inseminazione e caratteri correlati simili, appartengono allo stesso genere. Le diverse specie poi si differenziano attraverso altri caratteri “correlati” come la lunghezza delle setole, piccole variazioni dell’organotassi, e minime differenze nel calice, etc. La seconda ipotesi, invece, esattamente come la tassonomia classica si basa sostanzialmente sull’osservazione della chetotassi dorsale e ventrale; il genere così definito, risulta costituito da un elevato numero di specie (Wainstein, 1962; Muma & Denmark, 1968; Chant & McMurtry, 2003a, 2003b).

La differenza sostanziale tra le due teorie è che la scuola americana si basa su caratteri che sono direttamente a contatto con l’ambiente esterno e quindi variabili perché suscettibili ai fenomeni di adattamento ambientale. La scuola europea, invece, prende in considerazione un organo interno, piuttosto costante durante il corso dell’evoluzione, in quanto meno soggetto a fenomeni di adattamento.

Risulta quindi che spesso, all’interno dello stesso genere, vengano incluse specie che, in accordo con la teoria di Athias-Henriot, dovrebbero essere ascritte a generi diversi. In tabella 1 è riportato un esempio esplicativo delle due teorie attraverso lo studio del genere *Neoseiulus* (Tsolakis *et al.* 2012).

Athias-Henriot (1997) e Ragusa & Athias-Henriot (1983)	Chant & McMurtry (2003)
<b>Genere <i>Neoseiulus</i></b> <b>Specie tipo: <i>barkeri</i></b> <i>Neoseiulus barkeri</i> Hughes, 1948	<b>Genere <i>Neoseiulus</i></b> <b>Specie tipo del gruppo: <i>cucumeris</i></b> <b>Specie tipo del sottogruppo: <i>cucumeris</i></b> <i>Neoseiulus cucumeris</i> <i>Neoseiulus californicus</i> <i>Neoseiulus picanus</i>
<b>Genere <i>Cydnodromus</i></b> <i>Cydnodromus californicus</i> (McGregor, 1954) <i>Cydnodromus picanus</i> (Ragusa, 2000)	
<b>Genere <i>Amblyseius</i></b> <i>Amblyseius cucumeris</i> (Oudemans, 1930) <b>Genere <i>Typhlodromips</i></b> <i>Typhlodromips tunus</i> (De Leon, 1967)	

**Tabella 1: raggruppamento del genere *Neoseiulus* secondo le due teorie.**  
 Tratta da Tsolakis *et al.* (2012) modificata.

Il genere *Neoseiulus*, è risultato utile per mostrare le differenze che intercorrono tra le due teorie, ognuna delle quali ha dato una differente definizione del genere.

Secondo Chant tutte le specie riportate appartengono allo stesso genere che annovera ben 268 specie, mentre Athias-Henriot e Ragusa considerano queste stesse specie come appartenenti a generi diversi, e di conseguenza, il genere *Neoseiulus*, è costituito solo da 17 specie.

È importante sottolineare che, anche se le due teorie entrano spesso in conflitto tra di loro, ciò non significa che una delle due sia sbagliata, in quanto rappresentano approcci sistematici diversi, anche perché nessuna delle due ha mai previsto uno studio filogenetico, cioè una ricerca delle origini evolutive comuni delle specie che presentano caratteristiche morfologiche simili, per verificare i raggruppamenti.

L'analisi morfologica presenta, peraltro, alcune limitazioni significative:

- **la plasticità fenotipica**, cioè la possibilità che le caratteristiche morfologiche vadano incontro a modificazioni più o meno sostanziali in risposta ai cambiamenti climatici (Chant, 1955; Ragusa Di Chiara e Tsolakis, 1994); questo può portare a identificazioni errate ed alla presenza di specie sinonime cioè la stessa specie identificata con nomi diversi;

- **l'impossibilità di distinguere specie criptiche**, che sono comuni a molti gruppi perché sono praticamente identiche dal punto di vista morfologico;

- **la necessità di raccogliere la specie nella giusta fase del ciclo biologico**, quando cioè le caratteristiche morfologiche prese in considerazione per l'identificazione sono mature e ben evidenti, altrimenti molti individui raccolti non possono essere identificati. Per quanto riguarda i fitoseidi la corretta identificazione specifica può avvenire solo su femmine adulte, mentre gli stadi giovanili e i maschi non sono considerati sufficienti per la determinazione specifica;

- **l'esigenza di specialisti**, per evitare il più possibile errori nell'analisi.

Le limitazioni insite nella morfologia e nelle due ipotesi tassonomiche considerate richiedono la ricerca di un nuovo approccio per il riconoscimento ed una corretta classificazione dei taxa.

Di conseguenza allo scopo di verificare quale delle due teorie riflette maggiormente i lineamenti naturali, si rende necessaria l'utilizzazione della biologia molecolare che, attraverso la caratterizzazione molecolare, è in grado di fornire un valido contributo alla tassonomia, alla filogenesi e alla diagnostica della specie.

Lo studio della tassonomia ha subito così un notevole incremento, soprattutto da quando è stata utilizzata la PCR (Polymerase Chain Reaction) che ha completamente rivoluzionato la biologia molecolare ed ha permesso di realizzare metodi identificativi semplici, riproducibili, a basso costo e facilmente divulgabili anche in laboratori non prettamente dedicati alla biologia molecolare.

La possibilità di indagare la biodiversità a livello molecolare ha un immenso valore sistematico, tanto che la maggior parte degli studi include ormai almeno un aspetto molecolare.

## 2 SISTEMATICA MOLECOLARE

Il concetto di variabilità genetica è insito nella natura biologica; le differenze fondamentali tra organismi diversi sono determinate in modo ereditario, in quanto vengono trasmesse più o meno inalterate alle generazioni successive; considerato che, il genoma di ogni singolo individuo consiste in sequenze di DNA che hanno un'organizzazione specifica, è possibile la determinazione dei polimorfismi e della variabilità del DNA.

Di recente, l'applicazione di marcatori molecolari per lo studio degli acari, ha fornito nuove prospettive sulla struttura delle loro popolazioni, ma anche sulle relazioni tassonomiche.

I metodi utilizzati per studiare questi organismi possono essere diretti che permettono di analizzare le sequenze di alcune regioni del genoma attraverso il sequenziamento di esse (COI, 12S, ITS, 16S, 28S), o indiretti (Tabella 2), come l'analisi dei frammenti di restrizione (RFLP) e la PCR con *primers* arbitrari (RAPD).

	TARGET	VANTAGGI	SVANTAGGI
<b>Metodo diretto Sequenziamento (COI, 12S, ITS, Cytb)</b>	Un gene specifico, spesso dell'mtDNA	<i>primers</i> universali molto stabili	Ridotta variabilità
<b>Metodo indiretto RAPD-PCR</b>	Tutto il genoma	Tecnica, semplice e poco costosa. Numero illimitato di marker.	Richiede protocolli rigidi per ottenere riproducibilità

**Tabella 2: caratteristiche dei marcatori molecolari**

## **2.1 Metodi diretti: il sequenziamento**

Il sequenziamento del DNA è la tecnica più comunemente utilizzata per la determinazione della struttura primaria di un acido nucleico, e cioè dell'esatta successione di tutti i nucleotidi (Adenina, Citosina, Guanina e Timina) che lo costituiscono. Nel corso degli anni sono state ideate diverse strategie per ottenere la sequenza nucleotidica del DNA. Esistono due approcci diversi:

- 1) il metodo di Maxam e Gilbert;
- 2) il metodo di Sanger.

Il metodo di Allan Maxam e Walter Gilbert, detto anche della degradazione chimica del DNA, è stato proposto nel 1973 e si basa su modificazioni chimiche del DNA attuate ad opera di particolari composti quali l'idrazina e il dimetilsolfato (DMS) che agiscono rispettivamente sulle pirimidine e sulle purine, e la piperidina in grado di catalizzare la rottura del filamento del DNA a livello dei nucleotidi modificati.

La metodica prevede la marcatura terminale con  $^{32}\text{P}$  al 5' o al 3' del DNA a doppio filamento, la denaturazione e separazione dei due filamenti di DNA, la suddivisione del DNA marcato a singola elica in quattro aliquote, ognuna delle quali viene sottoposta a trattamento con DMS o idrazina, in presenza di piperidina (Tabella 3), la separazione dei filamenti marcati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide ed, infine, la visualizzazione mediante autoradiografia delle bande radioattive corrispondenti a ciascun nucleotide presente nel frammento originale.

Le reazioni sono condotte in modo controllato in maniera che in ogni reazione il filamento marcato sia tagliato una sola volta; statisticamente tutti le basi saranno degradate producendo una serie di frammenti la cui lunghezza dipenderà dalla distanza tra l'estremità marcata e il sito di taglio.

<b>Metodo Maxam-Gilbert</b>		
<b>Fasi</b>	<b>Reagenti</b>	<b>Effetto sul DNA</b>
<b>11</b>	DMS + piperidina	Rottura in corrispondenza della G
<b>22</b>	DMS + piperidina in acido formico	Rottura in corrispondenza di G e A
<b>33</b>	idrazina + piperidina	Rottura in corrispondenza di C e T
<b>44</b>	idrazina + piperidina in NaCl 1,5 M	Rottura in corrispondenza della C

**Tabella 3: reagenti utilizzati nel metodo Maxam-Gilbert**

Il metodo di Sanger, detto anche metodo dei terminatori di catena, è stato proposto nel 1975, facendo ricevere al suo autore il suo secondo premio Nobel.

E' un metodo enzimatico, poiché richiede l'utilizzo di un enzima; si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati (dideossitriofosfato, ddNTPs) per interrompere la reazione di sintesi in posizioni specifiche.

I nucleotidi dideossitriofosfato sono molecole artificiali corrispondenti ai nucleotidi naturali, ma si differenziano per l'assenza del gruppo idrossilico sul carbonio 2' e 3' della molecola. I dideossinucleotidi, a causa della loro conformazione, impediscono che un altro nucleotide si leghi ad essi, in quanto non si possono formare legami fosfodiesterici e provocando la terminazione della polimerizzazione.

Per il presente elaborato i prodotti di amplificazione ottenuti dalle analisi molecolari sono stati inviati alla ditta Eurofins MWG Operon (Germania) per il sequenziamento nucleotidico.

Le sequenze di DNA così acquisite sono state poi analizzate mediante il software MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001) che consente l'allineamento delle sequenze nonché il calcolo del *Neighbor Joining* (NJ), un algoritmo che calcola la stima delle distanze geniche tra due *taxa* per volta e identifica come vicini (*neighbor*) i *taxa* per cui la distanza risulta minima, questi poi vengono riuniti in un unico *taxa* permettendo la costruzione di un dendrogramma.

Per quanto riguarda l'applicazione in campo tassonomico, l'analisi delle sequenze è il metodo che consente la più approfondita analisi dei processi evolutivi che conducono alla diversificazione del DNA (Hoy, 2003).

Inoltre, i dati su sequenze omologhe sono comparabili direttamente tra i livelli tassonomici più disparati e tra studi indipendenti (Hillis *et al.* 1996). Infine, è possibile l'analisi di campioni anche molto piccoli e relativamente mal conservati.

Per gli studi sistematici in campo entomologico e non solo, sono attualmente utilizzati numerosi frammenti genici presenti tanto nel genoma nucleare che mitocondriale. In letteratura, è stato ampiamente dimostrato che ogni marcatore presenta vantaggi e problemi specifici che di volta in volta lo rendono più o meno adatto a dare informazioni circa i diversi livelli sistematici. Poiché si ritiene che la ricostruzione filogenetica sia più accurata se basata su gruppi di dati indipendenti i più recenti studi di sistematica molecolare includono spesso sia sequenze nucleari (rDNA) che mitocondriali (12S, COI, Cytb).

## 2.2 Marcatori nucleari : genoma ribosomale

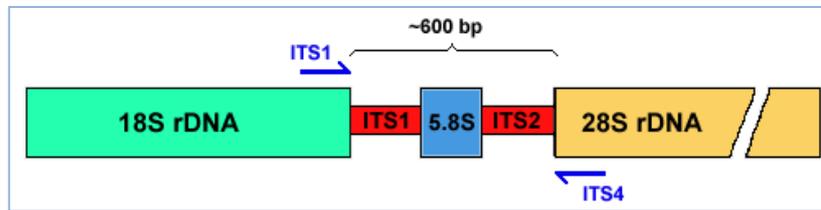


Figura 1: rappresentazione schematica del rDNA

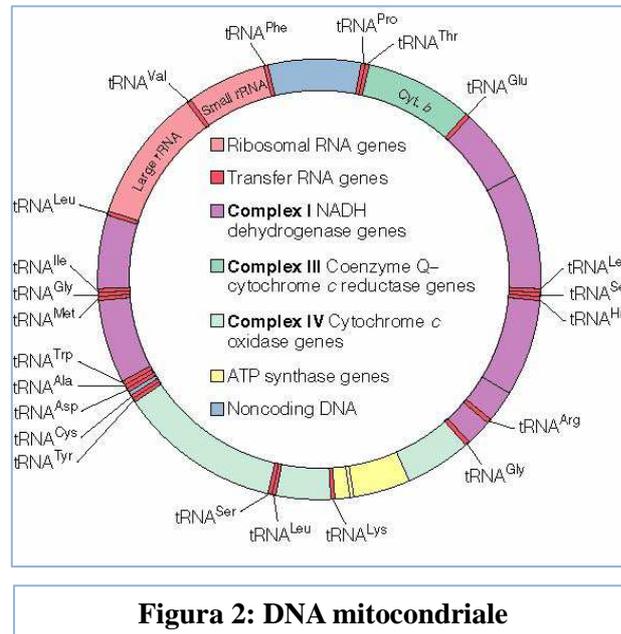
Il DNA nucleare codificante per gli RNA ribosomali (rDNA) è ampiamente impiegato negli studi di filogenesi, perché presenta sequenze altamente conservate (Navayas *et al.*, 2000).

Il rDNA è costituito da tre geni codificanti per i tre RNA ribosomali 18S, 5.8S e 28S che formano la subunità minore e maggiore del ribosoma. Sono geni mediamente ripetuti in tandem e per le loro caratteristiche possono essere molto utili per il confronto di taxa filogeneticamente distanti, l'rDNA 18S, ad esempio, costituisce una delle regioni di DNA più conservate ed è stato impiegato per ricostruire complessi rami filogenetici che includono regni, phyla, classi ed ordini.

Questi geni non sono continui (Figura 1), ma separati dalle sequenze ITS (Internal Transcribed Spacer) spaziatori interni trascritti di tipo 1 (ITS1) tra il gene 18S e 5.8S e di tipo 2 (ITS2) tra il 5.8S e gene 28S (Hillis e Dixon, 1991).

Le regioni ITS non codificano per alcun prodotto genico e per questo sono soggette ad una elevata variabilità di sequenza che genera un grado di polimorfismo sicuramente maggiore rispetto alle regioni codificanti (Hillis e Dixon, 1991) e per questo motivo vengono normalmente utilizzate per distinguere taxa strettamente correlati. Inoltre, la loro localizzazione tra geni altamente conservati (18S e 28S) permette l'utilizzo di *primers* universali, cioè uguali tra specie diverse o organismi diversi.

## 2.3 Marcatori mitocondriali



La scelta del marcatore molecolare da utilizzare per le analisi può dipendere da diversi fattori, ma i marcatori mitocondriali rimangono quelli più comunemente utilizzati per diverse ragioni:

- il genoma mitocondriale (mtDNA) è aploide, in quasi tutti gli organismi ad eredità uniparentale materna e non ricombinante. Ciò rende di più lieve entità tutti i problemi nella ricostruzione filogenetica derivanti dalla biologia riproduttiva, dalla ricombinazione e dall'eterozigosi che nei mitocondri è più propriamente definita eteroplasmia;
- i geni mitocondriali sono molto più facili da amplificare in quanto nella maggior parte dei tessuti si trovano molti mitocondri per cellula e quindi il mtDNA è presente in un numero maggiore di copie rispetto al DNA nucleare di cui è presente solo una molecola. Per tale ragione la purificazione mtDNA è possibile anche da campioni non appositamente conservati per l'analisi degli acidi nucleici. È stata riportata la possibilità di amplificare segmenti di DNA di circa 20-300 bp anche da campioni molto antichi e da tessuti mummificati, ed ossa;

- a differenza del genoma nucleare, non sono presenti sequenze introniche (non codificanti) intersperse tra i geni mitocondriali l'unica regione non codificante, chiamata D-loop, contiene l'origine di replicazione e le sequenze che regolano la trascrizione (Boore, 1999);
- la scarsa efficacia del sistema di riparazione (Croteau *et al.*, 1999) lo rendono più suscettibile al danno ossidativo e alle mutazioni con frequenza più elevata del DNA nucleare (Kenyon e Moraes, 1997). Negli insetti è stato stimato che i geni mitocondriali mutano da 2 a 9 volte più velocemente rispetto ai geni del nucleo codificanti per proteine (Lin e Danforth, 2004). Per l'analisi di taxa strettamente imparentati questo è un chiaro vantaggio;
- sono noti da tempo svariati *primers*, cosiddetti universali, che si legano a regioni molto conservate del genoma mitocondriale permettendo l'analisi tramite PCR.

Sono numerosi i geni dell'mtDNA che vengono utilizzati per l'analisi delle relazioni filogenetiche tra diversi taxa, in particolare abbiamo la porzione che codifica per la Citocromo c Ossidasi (COI) e la porzione genica codificante la subunità Citocromo b (Cytb).

Abbiamo inoltre, i geni per gli RNA ribosomali che sono molto più semplici delle controparti nucleari. Negli animali ci sono solo due geni ribosomali per genoma mitocondriale, uno per ogni subunità del ribosoma, e tra essi non è presente alcuna sequenza spaziatrice. Ogni gene è trascritto in un'unica molecola di RNA che poi si ripiega su se stessa in una struttura secondaria definita a loops and stems che si ripiega a sua volta in una struttura terziaria tenuta insieme da numerose proteine ribosomali. Le molecole di RNA ribosomale sono due, 12S e 16S, denominate in base alla loro costante di sedimentazione e formano, una volta associate con le proteine, le subunità minore e maggiore del ribosoma.

A causa della loro primaria importanza nella sintesi proteica, le porzioni centrali (*core*) della struttura secondaria e i siti dove le proteine ribosomali si attaccano ai filamenti di RNA, sono altamente conservati in entrambe le subunità; le altre regioni sottoposte a minori vincoli strutturali e funzionali sono più variabili. In genere i domini 1 e 2 sono meno conservati rispetto ai domini 3 e 4, sia nel 12S che nel 16S.

Tra i marcatori sopra descritti, sicuramente il gene che codificata per la subunità proteica Citocromo c Ossidasi I (COI) presenta due importanti vantaggi. In primo luogo, i *primers* universali per questo gene sono molto robusti, e consentono l'analisi di quasi, se non tutti, i phyla animali.

In secondo luogo, questa porzione genica sembra possedere una potere filogenetico maggiore di qualsiasi altro gene mitocondriale, la terza posizione dei nucleotidi infatti, mostra una elevata incidenza di sostituzioni, ha un tasso di evoluzione molecolare che è circa tre volte superiore a quella di 12S o 16S rDNA. Infine, l'evoluzione di questo gene è rapida abbastanza per permettere la discriminazione anche di specie strettamente affini.

L'utilizzo di marcatori mitocondriali presenta però anche alcuni svantaggi, innanzitutto perché il genoma mitocondriale è costituito da una singola molecola circolare di DNA, è stato supposto che le sue regioni non siano in grado di fornire una stima indipendente della filogenesi come invece farebbero i geni nucleari non associati nello stesso cromosoma (Harrison, 1989).

Il più elevato tasso di sostituzione rispetto alle sequenze nucleari può costituire uno svantaggio nell'inferenza filogenetica profonda. Inoltre, i geni mitocondriali hanno caratteristiche che comportano un elevato livello di omoplasia, come una frequenza elevata di basi A-T nella terza posizione dei codoni. Un ultimo possibile problema per l'analisi filogenetica è la presenza di pseudogeni cioè copie non funzionali di geni mitocondriali presenti a livello nucleare che possono essere amplificate con la PCR e falsare così gli studi filogenetici (Sorenson e Fleischer 1996).

Per quanto riguarda gli acari, i marcatori molecolari sono sempre più utilizzati, soprattutto alla luce dello sviluppo del DNA barcoding, metodica che prevede l'analisi di un frammento di DNA altamente conservato, ma che definisce in modo specifico una determinata specie, come se fosse un vero e proprio codice a barre. (Hebert *et al* 2003, 2004; Moritz e Cicero, 2004).

Questi concetti sono stati recentemente applicati con successo agli acari fitoseidi per risolvere alcuni casi di sinonimia (Tixier *et al.* 2006a, b; 2008; 2010; Okassa *et al.* 2008, 2009, 2010).

Questi risultati aprono nuove prospettive per la tassonomia non solo dei Phytoseiidae, ma anche degli altri acari.

Infatti, l'associazione precisa di molecole e caratteristiche morfologiche di un campione sono di grande aiuto negli studi tassonomici, tra cui analisi filogenetiche e identificazione delle specie, in particolare nel caso di specie criptiche (Magalhaes *et al.* 2007).

## 2.4 Metodi indiretti: RAPD-PCR

La tecnica della RAPD, acronimo di *Random Amplified Polymorphic DNA*, è stata introdotta nel 1991 (Williams *et al.* 1990) ed ha avuto immediata diffusione.

Si tratta sostanzialmente di una PCR condotta con un *primer* con una sequenza molto breve (8-10 bp) e arbitraria, cioè a localizzazione casuale sul genoma, poiché ogni primer essendo costituito da un basso numero di nucleotidi, potrà riconoscere molti siti sull'intero DNA target.

Un frammento è amplificato ogni qualvolta due di questi *primers* riconoscono nel genoma sequenze omologhe complementari sui due filamenti.

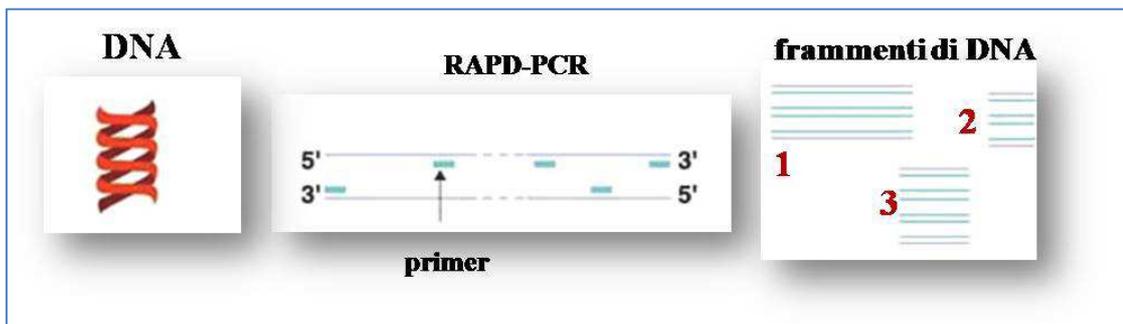


Figura 3: meccanismo RAPD-PCR

Differenti sequenze geniche saranno riconosciute da *primers* in diversi siti e quindi, amplificati, produrranno un differente “fingerprinting” genetico, cioè frammenti di diversa lunghezza altamente specifici per un dato microrganismo e che è possibile separare proprio in base alla massa molecolare e attraverso un'elettroforesi su gel dei prodotti di PCR (Figura 3).

I risultati possono poi essere comparati tra i campioni per calcolare la percentuale di similarità. L'uso di un insieme di primers ci aiuta anche ad essere certi che una regione sufficientemente ampia di DNA target sia stata esaminata (Ogram e Feng, 1997).

È possibile evidenziare tre possibili profili multibande: *bandeggi non polimorfi*, cioè l'insieme di bande che essendo presenti in tutte le specie prese in esame non permettono di discriminare una specie dall'altra, *bandeggi polimorfi*, cioè bande di DNA presenti solo in alcune specie permettendo di rilevare variabilità tra gli individui, e *bandeggi specifici*, cioè presenti solo in una specie.

Poiché la maggior parte delle regioni del DNA che presentano sequenze ripetute invertite sono quelle non codificanti altamente variabili, la RAPD consente di evidenziare un elevatissimo grado di polimorfismo anche tra taxa strettamente correlati (Haymer, 1994).

Oltre ad essere una metodica poco costosa, e di rapida esecuzione, il grande vantaggio della RAPD-PCR è quello di consentire anche l'analisi di nuovi organismi senza necessità di grandi conoscenze preliminari.

Il principale problema della RAPD è l'assunzione che bande che migrano allo stesso livello siano realmente omologhe.

Anche la ripetibilità dei risultati è un altro consistente problema: variazioni anche minime delle condizioni di PCR e dello stato di conservazione dei campioni possono modificare il profilo delle bande. Ciò significa che risultati ottenuti in studi indipendenti sono difficilmente confrontabili (Loxdale e Lushai 1998).

Per far fronte a questo problema, è indispensabile curare una scrupolosa standardizzazione dei protocolli in questo modo, la RAPD resta un metodo rapido e poco costoso per la definizione di razze, biotopi e specie (Caterino *et al.* 2000).

In conclusione, i diversi approcci per l'analisi del DNA, metodi diretti e metodi indiretti, non possono considerarsi complementari e/o alternativi, poiché essi pongono in rilievo caratteristiche genetiche diverse tra loro sia sotto il profilo funzionale che delle mutazioni nel corso dell'evoluzione.

E', infatti, noto che il DNA mitocondriale (mtDNA) utilizzato in tassonomia ottempera allo scopo di selezionare dei marcatori diagnostici di sequenze codificanti che vedono inalterato il proprio ruolo funzionale sino alla specie umana. Pertanto, dal confronto nucleotidico mediante la tecnica del

sequenziamento del DNA gli studiosi traggono delle informazioni valutando il grado di similitudine tra le singole specie allo scopo di rispondere agli interrogativi insiti nel concetto di variazione ed intervallo fenotipico continuo.

La possibilità di ricostruire la filogenesi degli organismi viventi sulla base del confronto delle strutture molecolari deriva dal fatto che, a questo livello, tutti gli organismi sono strettamente imparentati: le macromolecole con le quali sono costruiti i loro tessuti sono le stesse (proteine, acidi nucleici, polissaccaridi); l'informazione genetica è codificata negli acidi nucleici secondo lo stesso ordine e viene trascritta e tradotta essenzialmente con gli stessi meccanismi; le caratteristiche generali del metabolismo sono molto simili.

Uno degli elementi principali della teoria dell'evoluzione è che le popolazioni contengono variabilità nei riguardi di caratteri che, direttamente o indirettamente, determinano il successo riproduttivo dei singoli individui o della popolazione del suo insieme.

Fisher nel 1930, nella sua trattazione matematica della teoria della selezione naturale, ha postulato che esiste una relazione quantitativa diretta tra la variabilità genetica a carico della *fitness* e le variazioni evolutive prodotte dalla selezione.

Più precisamente Fisher prendendo, in considerazione un modello basato su un solo fattore genetico, ha stabilito che ***il tasso d'incremento in fitness di una popolazione è uguale alla varianza genetica in fitness della popolazione stessa.***

L'enorme quantità di variabilità genetica, presente nelle popolazioni naturali e necessaria per la loro evoluzione, è il risultato del riassortimento delle variazioni ereditarie prodotte dalle mutazioni.

Recentemente, grazie allo sviluppo di nuove tecnologie sul DNA, il concetto di variabilità genetica può anche essere associato alla variabilità fingerprint del DNA che risulta, per gli individui di specie umana, caratteristica peculiare e discriminante gli individui gli uni dagli altri.

La ricerca ha contribuito a porre in evidenza svariati marcatori a variabilità polimorfa e l'analisi di popolazioni genetiche controllate ha consentito di stabilire quali e quanti siano i marcatori polimorfi da utilizzare per poter identificare e discriminare gli individui di specie umana tra loro.

Il DNA fingerprint sfrutta la variabilità dell'organizzazione delle singole basi del DNA nucleare che viene preservato e mantenuto inalterato per il corretto mantenimento della specie.

La metodica RAPD, scelta quale strumento tecnico per la caratterizzazione della variabilità del DNA delle singole specie di fitoseidi, se da un canto ottemperava ai parametri per la configurazione di una diagnostica molecolare, poneva non poche difficoltà per individuazione e selezione del numero di marcatori polimorfi idonei ad una rigorosa analisi filogenetica.

## 2.5 Il DNA da preparati per microscopia

L'applicazione di tecniche molecolari ha aperto negli ultimi anni, nuove prospettive per lo sviluppo della tassonomia dei fitoseidi.

Tuttavia il problema fondamentale è quello di non poter sottoporre ad analisi genetica specie già identificate dal punto di vista morfologico. L'estrazione del DNA di esemplari provenienti da collezioni museali, renderebbe infatti, tutto più semplice, non solo per i problemi legati alla tassonomia delle specie, ma anche perché, in particolari zone del mondo, è più facile sovente ottenere un esemplare proveniente da collezioni che raccoglierlo nel campo, a causa di estinzione locale di taxa e/o di perdita dell'habitat e quindi la specie ricercata a volte non è più presente nella località dove è stata inizialmente segnalata.

Le collezioni di acari fitoseidi consistono in campioni montati su vetrini in soluzione Hoyer, un mezzo che contiene gomma arabica (30,0 g), acqua (50,0 ml), cloralio idrato (200,0 g) e glicerolo (16,0 ml). Cloralio idrato, la componente principale di questo *medium*, è un agente di compensazione di chitina che possono alterare DNA.

Alcuni test preliminari effettuati su acari montati su vetrini (recenti o risalenti a dieci anni) non ha avuto risultati positivi con la metodologia attuale, soprattutto a causa di contaminazioni durante la procedura di estrazione del DNA, e quindi, si sono ottenuti prodotti di PCR, ma tutti corrispondenti a DNA umano.

Lo sviluppo di protocolli molecolari che consentano la purificazione e l'analisi del DNA antico da questi organismi risulta essere la principale ambizione attuale, in modo tale da poter utilizzare le collezioni del museo.

### 3 ANALISI STATISTICA

Il Clustering o analisi dei gruppi dal termine inglese *cluster analysis* introdotto da Robert Tryon nel 1939, è un insieme di tecniche di analisi multivariata aventi come scopo il raggruppamento di elementi omogenei in un insieme di dati, minimizzando la “lontananza logica” interna a ciascun gruppo e massimizzando quella tra i gruppi, in maniera tale da costruire un dendrogramma.

La “lontananza logica” viene quantificata per mezzo di misure di similarità/dissimilarità definite tra le unità statistiche, in particolare è stato utilizzato l'indice di similarità calcolato secondo il modello proposto da Nei and Li (1979).  $F = 2N_{sl}/(N_{sl} + N_s)$  dove  $N_{sl}$  è il numero dei frammenti o bande di DNA nella specie etichettata Ph1,  $N_s$  indica il numero dei frammenti o bande di DNA per la specie Ph2,  $N_{sl}$  il numero dei frammenti o bande di DNA in comune tra le due specie prese in esame sulla base della contemporanea migrazione e risoluzione elettroforetica.

I coefficienti di similarità forniscono una misura del grado di somiglianza fra osservazioni, campioni, o altre entità ed hanno valori che variano nell'intervallo compreso fra 0 ed 1.

Tali valori limite corrispondono, rispettivamente, al caso di osservazioni del tutto disgiunte, prive di elementi comuni, ed al caso di osservazioni che soddisfano pienamente il criterio utilizzato per misurare la similarità .

Una volta calcolato l'indice di similarità per tutte le coppie dei campioni in esame, i valori numerici sono posti in una matrice triangolare.

I risultati di una procedura di clustering gerarchico, possono essere rappresentati in diversi modi, anche se in prevalenza si preferisce utilizzare un *dendrogramma*.

Il dendrogramma è stato ottenuto mediante il software Mini Tab 15.0.

## **4 OBIETTIVI DELLA RICERCA**

Obiettivo della ricerca è quello di contribuire alla configurazione di una diagnostica molecolare idonea alla caratterizzazione di singole specie di fitoseidi allo scopo di avvalersi di uno strumento identificativo semplice (in termini di esecuzione e riproducibilità sperimentale), a basso costo e facilmente accessibile anche in laboratori non prettamente dedicati alla biologia molecolare, attraverso il raggiungimento di tre obiettivi fondamentali:

1) la scelta e la messa a punto di una metodica di estrazione e purificazione del DNA di singoli individui provenienti da preparati microscopici di varia natura (anche vetrini preparati da diversi decenni), onde assicurare la corretta corrispondenza tra dati genetici e tassonomia classica basata su caratteri morfologici.

2) la definizione di una corretta cinetica di amplificazione molecolare sia mirata al sequenziamento di porzioni del mtDNA, che all'analisi di tutto il genoma attraverso la RAPD-PC;

3) la risoluzione di aspetti controversi della classificazione degli acari fitoseidi secondo la tassonomia classica.

## 5 MATERIALI E METODI

### 5.1 Materiale biologico

Per il presente studio sono state prese in considerazione 15 specie di acari della famiglia Phytoseiidae, appartenenti a generi diversi, come riportato in tabella 1.

Phytoseiidae		
1	<i>Typhlodromus exhilaratus</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
2	<i>Phytoseiulus longipes</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
3	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
4	<i>Neoseiulus cucumeris</i>	Preparato per microscopia allestito nel 1971
5	<i>Amblyseius swirskii</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
6	<i>Cydnodromus californicus</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
7	<i>Cydnodromus picanus</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
8	<i>Iphiseius degenerans</i>	Preparato per microscopia allestito nel 1971
9	<i>Kampimodromus ericinus</i>	Preparato per microscopia allestito nel 1990
10	<i>Typhlodromus aberrans</i>	Preparato per microscopia allestito nel 1990
11	<i>Phytoseiulus phragariae</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
12	<i>Phytoseiulus macropilis</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
13	<i>Amblyseius andersoni</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
14	<i>Typhlodromus pyri</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza
15	<i>Euseius stipulatus</i>	individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza

**Tabella 1: fitoseidi selezionati per l'analisi**

I campioni sono stati forniti dal laboratorio di Acarologia applicata "Eliahu Swirski" del Dipartimento Demetra, Università degli Studi di Palermo e consistevano in:

- *materiale fresco*, uova o adulti provenienti da allevamenti;
- *materiale secco*, singoli acari allestiti su preparati per microscopia ottica, derivanti da collezioni museali e vecchi anche di alcuni decenni.

I campioni provenienti da allevamento erano preservati in alcool al 70%, mentre gli acari delle collezioni erano montati su vetrino con liquido di Hoyer, un mezzo che contiene gomma arabica (30,0 g), acqua (50,0 ml), cloralio idrato (200,0 g) e glicerolo (16,0 ml). Si ricorda, all'uopo che il cloralio idrato, è un agente di compensazione della chitina e può alterare il DNA.

Si pone, inoltre, in evidenza la complessità del tipo di analisi in considerazione del fatto che alcune specie di Phytoseiidae non solo erano state allestite per l'analisi morfologica alcune decine di anni orsono ma, per alcune di esse, si trattava perfino di preparati unici, e quindi rendevano irripetibili i singoli esperimenti.

Atteso che, tutte le metodiche di estrazione del DNA prevedono la distruzione dell'esemplare, in assenza, altresì, di precedenti scientifici in letteratura, si è ritenuto necessario avvalersi di materiale reperibile in allevamento per il settaggio delle condizioni molarie maggiormente idonee per la purificazione del DNA.

Sono state messe a confronto tre diverse metodiche di estrazione degli acidi nucleici e non appena calibrate le concentrazioni molarie degli enzimi proteolitici in funzione della temperatura e del tempo di incubazione necessario alla lisi cellulare, si è proceduto all'estrazione del DNA da singolo individuo montato su vetrino sia preparato per l'occorrenza, che risalente ad alcuni decenni fa.

Il DNA è stato isolato e purificato dalle succitate 15 specie di Phytoseiidae e successivamente analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio prima di sottoporlo ad amplificazione molecolare per la tipizzazione genetica, mediante RAPD-PCR che permetteva l'analisi di tutto il genoma, e mediante sequenziamento della regione COI del genoma mitocondriale deputata alla sintesi della subunità proteica I della Citocromo c Ossidasi e di quella deputata alla sintesi dell'RNA ribosomale 12S mitocondriale.

I diversi approcci di caratterizzazione del DNA degli acari appartenenti alla famiglia Phytoseiidae non possono considerarsi complementari né alternativi, poiché essi pongono in rilievo caratteristiche genetiche diverse tra loro sia sotto il profilo funzionale che del *rate* di mutazione nel corso dell'evoluzione.

Infatti, la RAPD-PCR si effettua utilizzando brevi sequenze di DNA (massimo 10 paia di basi) che si appiano in maniera casuale sul genoma e

consente di sottoporre ad analisi anche nuovi organismi senza la necessità di avere grandi conoscenze preliminari, il DNA mitocondriale (mtDNA) utilizzato in tassonomia invece, ottempera allo scopo di selezionare dei marcatori diagnostici di sequenze codificanti (COI, 12S rRNA, 28S rRNA) che vedono inalterato il proprio ruolo funzionale sino alla specie umana.

Pertanto, dal confronto nucleotidico mediante la tecnica del sequenziamento nucleotidico del DNA gli studiosi traggono delle informazioni valutando il grado di similitudine tra le singole specie allo scopo di rispondere agli interrogativi insiti nel concetto di variazione ed intervallo fenotipico continuo.

## **5.2 Estrazione del DNA**

Tutte le metodiche per l'estrazione di acidi nucleici possono essere suddivise in 3 fasi fondamentali: la lisi cellulare, la purificazione del campione lisato ed, infine, la precipitazione dell'acido nucleico.

La lisi cellulare rappresenta una fase molto delicata perché, da un lato deve essere abbastanza incisiva da frammentare il materiale di partenza e, dall'altro, deve assicurare l'integrità dell'acido nucleico, idoneo per le successive analisi molecolari.

La lisi cellulare prevede l'ausilio di un tampone di lisi e di due enzimi la proteinasi K e la chitinasi.

La soluzione di lisi contiene Tris HCl 500 mM pH 8.0 c. f., EDTA 0.01 M pH 8.0 c. f., 0.5% SDS con l'aggiunta di 30 µl di una soluzione 20mg/ml di proteinasi K e 5 µl di una soluzione 1M di DTT (Dithiothreitol).

L'EDTA e l'SDS sono ottimi chelanti di ioni bivalenti ed hanno la capacità di solubilizzare i lipidi di membrana.

La proteinasi K, invece è un enzima che inibisce le DNAsi endogene, normalmente presenti a livello citoplasmatico, che una volta degradata la membrana nucleare (durante la lisi) potrebbero entrare a contatto con il DNA degradandolo.

Il tempo della lisi enzimatica a mezzo proteinasi K varia in base al materiale di partenza, nel caso degli acari il problema fondamentale è riuscire a penetrare e distruggere lo strato di chitina che forma l'esoscheletro, per permettere

la fuoriuscita e quindi il recupero del DNA. Per questo motivo oltre ai reagenti enzimatici e ai detergenti che comunemente vengono utilizzati in questa fase nei laboratori di biologia molecolare, è stato necessario aggiungere la Chitinasi, che è appunto un enzima che degrada l'esoscheletro di chitina.

Dopo la rottura delle pareti cellulari e della membrana plasmatica, si otterrà una miscela complessa costituita da varie componenti cellulari come DNA, RNA, lipidi, mono e polisaccaridi, proteine e sali.

La rimozione delle proteine dal lisato cellulare è particolarmente importante sia per la presenza delle nucleasi che per la presenza di altre proteine che legandosi agli acidi nucleici ne impediscono la funzione e/o la purificazione.

Dopo la lisi cellulare i campioni sono stati sottoposti a tre diverse metodiche di estrazione del DNA:

- 1) il metodo classico Fenolo-Cloroformio;
- 2) il metodo inorganico mediante resina Chelex® 100-Mesh;
- 3) kit commerciale Dneasy Tissue Qiagen.

Il metodo classico richiede tempi di lavoro relativamente lunghi (circa 5 giorni), e l'utilizzo di sostanze tossiche, tuttavia, consente di ottenere un DNA ad alto peso molecolare e quindi idoneo alle analisi successive, ma soprattutto, un DNA stabile, tanto da assicurare la riproducibilità del dato sperimentale qualora sia necessario ripetere l'analisi anche a distanza di tempo dall'estrazione.

Il Chelex è una resina costituita da un copolimero di stirene-divinilbenzene coniugato a molecole di imminodiacetato, che ha la capacità di "chelare" cationi metallici bi e trivalenti grazie alla presenza di gruppi funzionali imminodiacetici, quando ci troviamo a pH neutri o debolmente alcalini.

L'estrazione mediante Chelex è sicuramente più rapida rispetto alla metodica classica, consente infatti, di ottenere in poche ore il campione di DNA già pronto per le analisi molecolari (Walsh *et al.*, 1991). Prevede una minore complessità operativa con un numero di passaggi ridotto da effettuare, riducendo in questo modo anche il rischio di contaminazione sia tra i vari campioni che da parte dell'operatore stesso.

Il kit commerciale Dneasy Tissue Qiagen per l'estrazione del DNA è una metodica rapida ed efficiente che si basa sull'utilizzo di una membrana di silice per l'isolamento del DNA cellulare totale, senza che si faccia uso di fenolo e

cloroformio per la purificazione né etanolo per la precipitazione, presenta inoltre il vantaggio di poter recuperare e osservare nuovamente su vetrino l'esemplare che rimane intrappolato nella membrana di silice

### **5.3 Estrazione del DNA da uova**

#### **Metodo classico Fenolo-Cloroformio**

Si è proceduto alla purificazione del DNA a partire da uova di *P. persimilis* provenienti da allevamento in laboratorio, ponendo a confronto due diverse metodiche di estrazione degli acidi nucleici: la metodica classica di tipo organico (fenolo-cloroformio) e quella inorganica che si avvale della resina chiamata Chelex<sup>®</sup>-100.

Sono state, quindi, selezionate quantità crescenti pari a 2, 4, ed 8 che venivano trasferite in tubi eppendorf e poste ad incubare in presenza di 200 µl di una soluzione di lisi contenente Tris-HCL 500 mM, EDTA 100 mM, 50 mM NaCl, 0.5% SDS con aggiunta di DTT e Proteinasi K per 24 ore a 56°C.

Si è proceduto, quindi, alla purificazione del DNA mediante l'uso di solventi organici fenolo e cloroformio: sono state effettuate ripetute estrazioni fenoliche (fenolo saturato con TRIS pH 8.0) che ha la funzione di sequestrare e denaturare le proteine, ed un'unica estrazione con cloroformio per rimuovere le eventuali tracce di fenolo presenti ancora nel campione.

Il DNA è stato in seguito isolato mediante precipitazione in etanolo con aggiunta di Acetato di Sodio alla c. f. di 0,3 M, e posto a -20°C overnight.

I singoli campioni sono stati, infine, centrifugati a 10.000 rpm per 20 minuti, per recuperare il DNA ed eliminare l'etanolo.

I DNA così purificati sono stati risospesi in 100 µl di acqua sterile MilliQ ed incubati per 24 ore a 55°C al fine di una completa solubilizzazione ed in seguito quantizzati per contribuire al successivo *setting* delle amplificazioni molecolari mediante PCR.

La valutazione dello stato fisico del DNA era, invece condotta mediante elettroforesi su gel di agarosio in presenza di etidio-bromuro.

## 5.4 Estrazione del DNA da uova

### Metodo inorganico Chelex®-100Mesh

Anche in questo caso, quantità crescenti pari a 2, 4, ed 8 uova di *P. persimilis* provenienti da allevamento in laboratorio, venivano trasferite in tubi eppendorf e poste ad incubare in presenza di 200 µl di una soluzione di lisi contenente Tris-HCL 500 mM, EDTA 100 mM, 50 mM NaCl, 0.5% SDS con aggiunta di DTT e proteinasi K per 24 ore a 56°C.

Dopo la lisi cellulare si procedeva alla purificazione del DNA a mezzo Chelex addizionando ai singoli campioni una quantità pari a 200µl di resina Chelex® – 100 al 5% preriscaldata a 55°C, e ponendo gli stessi in bagno termostatico a 55°C per 30 minuti, per facilitare l'interazione della resina con i campioni.

Infine, dopo un ciclo di denaturazione a 90°C per 10 min, i campioni sono stati centrifugati a 14.000rpm, ed aliquote pari a 5-20µl sono state utilizzate per le reazioni di amplificazione molecolare.

La valutazione dello stato fisico del DNA era condotta mediante elettroforesi su gel di agarosio in presenza di etidio-bromuro.

I DNA così purificati erano poi quantizzati per contribuire al successivo *setting* delle amplificazioni molecolari mediante PCR.

## 5.5 Estrazione del DNA da acari allestiti per microscopia

### Metodo classico Fenolo-Cloroformio

Tutte le fasi di trasferimento e recupero del materiale, sono state effettuate avvalendosi del microscopio ottico.

I preparati per microscopia sono stati posti in camera umida a 50°C per favorire il distacco del collante di adesione e, dopo rimozione del vetrino copri oggetto, è stato recuperato l'individuo con l'ausilio di ritagli di carta sterile 3MM, di circa 1cm<sup>2</sup>, imbevuti di H<sub>2</sub>O sterile pre-riscaldata a 37°C, onde facilitare e consentire il trasferimento della specie in esame dal vetrino al substrato cartaceo.

Successivamente il substrato cartaceo contenente l'individuo veniva trasferito in tubo eppendorf da 0.5ml e sottoposto a lisi cellulare in presenza di 100 µl di una soluzione di lisi contenente Tris-HCL 500 mM, EDTA 100 mM, 50 mM NaCl, 0.5% SDS, con l'aggiunta di proteinasi K e chitinasi in bagno termostatico a 56°C per 8-10 giorni.

Anche in questo caso, la lisi cellulare era controllata e monitorata avvalendosi della microscopia per verificare che l'individuo stratificato su carta fosse effettivamente distrutto e consentisse il rilascio del proprio DNA.

Si è proceduto, quindi, alla purificazione del DNA mediante l'uso del metodo classico fenolo-cloroformio effettuando ripetute estrazioni fenoliche ed un solo passaggio in cloroformio, dopo aver allontanato il substrato cartaceo dalla provetta.

Il DNA è stato in seguito isolato mediante precipitazione in etanolo con aggiunta di Acetato di Sodio alla c. f. di 0,3 M, e posto a -20°C overnight.

I singoli campioni sono stati, infine, centrifugati a 10.000 r.p.m. per 20 minuti, per recuperare il DNA ed eliminare l'etanolo.

I DNA così purificati sono stati risospesi in 50 µl di acqua sterile MilliQ, ed incubati per 24 ore a 55°C al fine di ottenere una completa solubilizzazione, ed in seguito quantizzati per contribuire al successivo *setting* delle amplificazioni molecolari mediante PCR, mentre la valutazione dello stato fisico del DNA era condotta mediante elettroforesi su gel di agarosio in presenza di etidio-bromuro.

## **5.6 Estrazione del DNA da acari allestiti per microscopia**

### **Metodo Dneasy Tissue Qiagen kit**

Dopo il recupero dell'individuo dal preparato per microscopia i campioni sono stati trasferiti in tubi eppendorf da 1.5 ml e sottoposti alla fase di lisi cellulare in bagno termostatico a 56°C in presenza di proteinasi K overnight.

Successivamente i campioni sono stati riposti in un tubo eppendorf da 2 ml che conteneva una colonna di silice, il DNA si legherà in maniera selettiva alla membrana, mentre tutte le altre sostanze, attraverseranno la membrana e verranno rimosse.

Sono stati effettuati due passaggi aggiungendo ai campioni rispettivamente 250 µl di tampone AW1, 250 µl di tampone AW2, che contengono entrambi etanolo.

Dopo aver centrifugato a 13000 r.p.m. per 5 minuti, i campioni sono stati posti in un tubo da 1,5 ml con l'aggiunta di 40 µl di acqua sterile preriscaldata a 70°C, per la fase di eluizione.

Il kit di estrazione, oltre ad essere estremamente costoso (circa 7 euro per singolo acaro!), è risultato scarsamente efficace se applicato su preparati per microscopia abbastanza vetusti, dove i singoli acari sono più che disidratati ed il contenuto interno degli acidi nucleici è presumibile che sia ridotto ad un alto stato di cristallizzazione intracellulare.

## 5.7 Analisi molecolare dei Fitoseidi

Come già accennato, le caratteristiche molecolari delle 15 specie di Phytoseiidae selezionate per la presente ricerca, è stata effettuata avvalendosi di marcatori mitocondriali e marcatori random nucleari.

Anche in questo caso, l'assenza di precedenti scientifici in letteratura come riferimento per esperimenti condotti su DNA di *Phytoseiidae* purificato da singoli individui allestiti per la microscopia ottica risalenti per lo più nel tempo, imponeva di procedere con cautela onde preservare quell'esigua quantità di DNA, parzialmente degradata, che da essi poteva essere isolata.

Com'è noto il DNA nucleare ed il DNA mitocondriale coesistono all'interno delle cellule con un diverso rapporto numerico-quantitativo a favore di quello mitocondriale tant'è che lo stesso viene definito, abbondante o altamente ripetuto nel numero di copie all'interno della cellula.

Pertanto, il DNA totale (nucleare e mitocondriale) estratto dai singoli individui allestiti su preparati per microscopia, veniva saggiato mediante amplificazione di due differenti porzioni geniche mitocondriali, codificanti l'una per la subunità della Citocromo c ossidasi (COI) e l'altra per l'RNA della subunità ribosomale (12S), prima di procedere al settaggio delle condizioni di amplificazione delle RADP-PCR.

Veniva, quindi, selezionato un DNA più abbondante e verosimilmente a minore degradazione poiché ad inferiore complessità rispetto a quello nucleare.

Il DNA mitocondriale (mtDNA) è infatti, ampiamente utilizzato negli studi che riguardano la tassonomia degli acari (Navajas *et al.* 1996; Navajas and Fenton 2000) perché possiede i succitati vantaggi che ne facilitano l'analisi rispetto al DNA nucleare.

## 5.8 Amplificazione enzimatica del mtDNA: regione COI

Si procedeva all'amplificazione della porzione codificante della Citocromo c Ossidasi (COI) del genoma mitocondriale utilizzando aliquote di DNA purificato da singolo individuo allestito tanto su preparati per microscopia risalenti al 1971, specie *C. californicus* ed *N. cucumeris*, quanto su materiale prelevato da allevamento, specie *P. persimilis* e *P. longipes*, che venivano montate per l'occorrenza su vetrini in maniera analoga agli altri.

Il prodotto atteso di circa 400 coppie di basi individua una porzione genica che possiede un potere di identificazione filogenetica di rilievo, grazie all'elevata incidenza di sostituzioni in terza posizione, ne consegue che il tasso di evoluzione molecolare è circa tre volte superiore a quello ricavabile dall'utilizzo delle porzioni codificanti del 12SrRNA o 16SrRNA, contribuendo inoltre alla discriminazione di specie strettamente affini.

La coppia di *oligonucleotidi primers* utilizzata per l'analisi è indicata in tabella 2.

Regione	Sequenza <i>Oligonucleotidi primers 5'-3'</i>	Ref.
Citocromo c ossidasi	5'- TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG -3' 5'- TACAGCTCCTATAGATAAAC -3'	Navajas <i>et al</i> (1996).

**Tabella 2:** descrizione delle porzioni geniche del genoma mitocondriale e relativa coppia di *oligonucleotidi primers* utilizzata nelle reazioni di PCR.

L'amplificazione molecolare è stata effettuata in un volume finale di 25 µl, utilizzando aliquote pari a 2 µl di DNA, corrispondenti a circa un decimo del volume totale di solubilizzazione adottato, in presenza di 1 µl di 4 deossinucleosidi trifosfati (ATP, CTP, GTP, TTP, 0.2 µM c. f.), 1 µl di ogni

*primers* (c. f. 0.5  $\mu$ M) 2.5  $\mu$ l di buffer di reazione (c. f. 1  $\mu$ M) in accordo con la casa produttrice dell'enzima *taq DNA Polimerasi*, 1  $\mu$ l di  $MgCl_2$  (c. f. 1,5  $\mu$ M) e 0,5 unità di *Go Taq® Flexi DNA Polymerase*, Promega.

Le reazioni sono state allestite nelle thermal-cyclers 2.400 Perkin Elmer o Eppendorf.

Ogni reazione di amplificazione è stata eseguita su aliquote di reagenti utilizzati una sola volta ed in condizioni di assoluta sterilità, sotto cappa a flusso laminare ed in presenza di un controllo negativo (miscela di reazione senza DNA) onde prevenire la possibilità di contaminazioni di DNA aspecifico (per esempio batterico) oppure delle cross-contaminazioni tra i campioni che avrebbero contribuito a falsare gli esiti molecolari.

Tutte le cinetiche di amplificazione venivano eseguite in duplicato ed, in caso di esito negativo, si procedeva alla ri-amplificazione dei prodotti fino a tre volte.

<b>Condizioni di amplificazione</b>			
<b>Citocromo c Ossidasi</b>			
<b>FASI PCR</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TEMPO</b>	<b>n CICLI</b>
Denaturazione iniziale	95°C	3 minuti	1 ciclo
Denaturazione	92°C	1 minuto	40 cicli
Appaiamento Primers	45°C	1 minuto	
Estensione	72°C	1 minuto	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1 ciclo
<b>Tabella 3: condizioni di amplificazione</b>			

I prodotti di amplificazione così ottenuti sono stati separati tramite corsa elettroforetica in gel di agarosio 1,5% in tampone TBE (Tris, a. borico, EDTA) per circa 30 minuti a 100 Volt e visualizzati con Bromuro di Etidio.

Sono stati infine utilizzati marcatori di peso molecolare noto (1kb DNA ladder, *Fermentas*) per verificare il corretto peso molecolare del frammento ottenuto.

I prodotti di amplificazione venivano spediti alla ditta Eurofins MWG Operon (Germania), commissionando il sequenziamento nucleotidico del genoma mitocondriale inviando le specifiche sequenze oligonucleotidiche *primers* di innesco *nested* le sequenze *primers* utilizzate per l'amplificazione dei prodotti di PCR.

L'analisi delle sequenza è stata eseguita avvalendosi del software MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001), utilizzando il metodo *Neighbor Joining* (NJ).

## 5.9 Amplificazione enzimatica del mtDNA: regione 12 S

Il sistema individua la porzione genica del genoma mitocondriale deputata alla sintesi dell'RNA ribosomale 12S. La coppia di *primers* permette di amplificare un frammento di peso molecolare pari a 516 bp.

Regione	Sequenza Oligonucleotidi primers 5'-3'	Ref.
12S	5'- TACTATGTTACGACTTAT -3' 5'- AAAC TAGGATTAGATACCC -3'	Jeyaprskash and Hoy (2002)

**Tabella 4:** descrizione delle porzioni geniche del genoma mitocondriale e relativa coppia di *oligonucleotidi primers* utilizzata nelle reazioni di PCR.

L'amplificazione molecolare è stata effettuata in un volume finale di 25 µl, utilizzando aliquote pari a 2 µl di DNA (nucleare e mitocondriale), in presenza di

1 µl di 4 deossinucleosidi trifosfati (ATP, CTP, GTP, TTP, 0.2 µM c. f.), 1 µl di ogni *primers* (c. f. 0.5 µM) 2.5 µl di buffer di reazione (c. f. 1 µM) in accordo con la casa produttrice dell'enzima *taq DNA Polimerasi*, 1 µl di MgCl<sub>2</sub> (c. f. 1,5 µM) e 0,5 unità di *Go Taq® Flexi DNA Polymerase*, Promega.

Le reazioni sono state allestite nelle thermal-cyclers 2.400 Perkin Elmer o Eppendorf.

Ogni reazione di amplificazione è stata eseguita su aliquote di reagenti utilizzati una sola volta ed in condizioni di assoluta sterilità, sotto cappa a flusso laminare ed in presenza di un controllo negativo (miscela di reazione senza DNA) onde prevenire la possibilità di contaminazioni di DNA aspecifico (per esempio batterico) oppure delle cross-contaminazioni tra i campioni che avrebbero contribuito a falsare gli esiti molecolari.

Tutte le cinetiche di amplificazione venivano eseguite in duplicato ed in caso di esito negativo si procedeva alla ri-amplificazione dei prodotti fino a tre volte

<b>Condizioni di amplificazione</b>			
<b>rRNA 12 S</b>			
<b>FASI PCR</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TEMPO</b>	<b>n CICLI</b>
Denaturazione iniziale	94°C	3 minuti	1 ciclo
Denaturazione	92°C	30 secondi	35 cicli
Appaiamento primers	40°C	30 secondi	
Estensione	72°C	1 minuto	
Estensione finale	72°C	5 minuti	1 ciclo
<b>Tabella 5: condizioni di amplificazione</b>			

I prodotti di amplificazione così ottenuti sono stati separati tramite corsa elettroforetica in gel di agarosio 1,5% in tampone TBE (Tris, a. borico, EDTA) per circa 30 minuti a 100 Volt e visualizzati con Bromuro di Etidio.

Sono stati infine utilizzati marcatori di peso molecolare noto (1kb DNA ladder, *Fermentas*) per verificare il corretto peso molecolare del frammento ottenuto.

I prodotti di amplificazione venivano spediti alla ditta Eurofins MWG Operon (Germania) commissionando il sequenziamento nucleotidico del genoma mitocondriale inviando le specifiche sequenze oligonucleotidiche *primers* di innesco *nested* le sequenze *primers* utilizzate per l'amplificazione dei prodotti di PCR.

L'analisi delle sequenza è stata eseguita avvalendosi del software MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001), utilizzando il metodo *Neighbor Joining* (NJ).

## 5.10 RAPD-PCR

Il medesimo DNA totale (nucleare e mitocondriale) estratto e purificato da singoli individui di 15 differenti specie di fitoseidi, veniva sottoposto all'amplificazione molecolare utilizzando 9 oligonucleotidi *primers* a sequenza arbitraria (Tabella 6).

<i>Oligonucleotidi primers</i>	Sequenza 5'-3'	Ref.
A	5'- CCG AGG TGA C -3'	disegnato dalla Prof. E. Carra
B	5'- CCG TCG AGT C -3'	disegnato dalla Prof. E. Carra
C	5'- CCG ACC AGT C -3'	disegnato dalla Prof. E. Carra
D	5'- GGC TCC ACT G -3'	disegnato dalla Prof. E. Carra
E	5'- CTA CCC TTG G -3'	disegnato dalla Prof. E. Carra
G	5'- TCA TAC CGG CTA ACC GCC AAT -3'	disegnato dalla Prof. E. Carra
H	5'- TAC AGC TCC TAT AGA TAA AAC 3'	disegnato dalla Prof. E. Carra
L	CAG GCC CTT C	Jaya <i>et al.</i> (2002)
M	TTC CGA ACC C	Jaya <i>et al.</i> (2002)

Tabella 6: oligonucleotidi *primers* utilizzati per le RAPD-PCR.

Ciascuna amplificazione molecolare è stata eseguita utilizzando aliquote di reagenti scongelati per l'occorrenza ed in condizioni di assoluta sterilità, ovvero, sotto cappa a flusso laminare ed in presenza di un controllo positivo (DNA di un individuo non correlato) e di un controllo negativo (miscela di reazione senza DNA) onde prevenire la possibilità di contaminazioni di DNA aspecifico (per esempio batterico) oppure delle cross-contaminazioni tra i campioni che avrebbero contribuito a falsare gli esiti molecolari in ordine alle effettive riconducibilità genetiche dei pattern multibande.

L'amplificazione molecolare è stata effettuata in un volume finale di 40 µl, utilizzando aliquote pari a 2 µl di DNA (nucleare e mitocondriale) ed in presenza di 1 µl di 4 deossinucleosidi trifosfati (ATP, CTP, GTP, TTP, 0.2 µM c. f.), 4 µl di ogni *primers* (c. f. 2 µM) 2.5 µl di buffer di reazione (c. f. 1 µM) in accordo con la casa produttrice dell'enzima *taq DNA Polimerasi*, 1 µl di MgCl<sub>2</sub> (c. f. 1,5 µM) e 0,5 unità di *Go Taq® Flexi DNA Polymerase*, Promega.

Le reazioni sono state allestite nelle thermal-cyclers 2.400 Perkin Elmer o Eppendorf, secondo le condizioni mostrate in tabella 7.

FASI PCR	TEMPERATURA	TEMPO	N CICLI
Denaturazione iniziale	95°C	5 minuti	1 ciclo
Denaturazione	95°C	1 minuto	35 cicli
Appaiamento primers	36°C	1 minuto	
Estensione	70°C	1 minuto	
Estensione finale	70°C	5 minuti	1 ciclo

**Tabella 7: condizioni di amplificazione RAPD-PCR**

Ognuna delle reazioni molecolari è stata inoltre effettuata utilizzando una combinazione di tre oligonucleotidi primers, descritte in tabella 8 ,allo scopo di aumentare il potere di risoluzione dei singoli primers.

<b>RAPD-PCR</b>
<b>A+B+C</b>
<b>A+C+E</b>
<b>E+D+F</b>
<b>D+G+H</b>
<b>B+C+L</b>
<b>A+B+M</b>
<b>A+L+M</b>

Tabella 8: combinazioni degli oligonucleotidi primers utilizzati per le singole amplificazioni

I prodotti di amplificazione così ottenuti sono stati separati tramite corsa elettroforetica in gel di agarosio 1,5% in tampone TBE 1X (Tris, a. borico, EDTA) per circa 2 ore a 100 Volt, per assicurare l'adeguata separazione dei frammenti, e successivamente visualizzati con Bromuro di Etidio.

Per una corretta rivelazione elettroforetica veniva sottoposto alla contemporanea migrazione anche un campione di DNA ladder noto (100 bp Plus DNA Ladder, GeneRuler <sup>TM</sup>), da utilizzare come riferimento per l'assegnazione dei pesi molecolari ai singoli bandeggi ottenuti.

## 5.11 Elettroforesi su gel di agarosio

I campioni di DNA sottoposti ad amplificazione e/o a ri-amplificazione sono stati analizzati mediante risoluzione elettroforetica su gel di agarosio, 1.5% (peso/volume) in TBE 1X a 100 Volt, per 20 minuti (PCR convenzionale) o 2 ore (RAPD-PCR).

Come tracciante è stato utilizzato il bromuro di etidio, in quanto è un intercalante delle basi azotate del DNA ed emette luce arancione se colpito dai raggi UV di un trans-illuminatore. In questo modo i prodotti amplificati possono essere facilmente visualizzabili e le immagini possono essere acquisite tramite un apposito analizzatore d'immagini collegato al trans-illuminatore.

Infatti, per la corretta rivelazione dei pattern multibande, si provvedeva ad acquisire i supporti elettroforetici esposti alla luce trasmessa u.v. mediante specifico software per acquisizione immagini DOC-It LS versione 5.5.4, e successivamente avvalendosi del programma di Adobe Photoshop CS2, la stessa immagine veniva sottoposta ad analisi dettagliata attraverso l'ausilio della funzione *curve* ad una migliore evidenza onde non trascurare alcuna evidenza significativa per l'identificazione polimorfica.

I *markers* di DNA utilizzati per l'attribuzione del peso molecolare dei frammenti di DNA sottoposti a contemporanea migrazione elettroforetica sono stati i seguenti:

1kb DNA ladder *Fermentas*

100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™)

Tampone utilizzato per la corsa elettroforetica:

**TBE 10X (pH 8.3)**

107.8 g/l Tris base

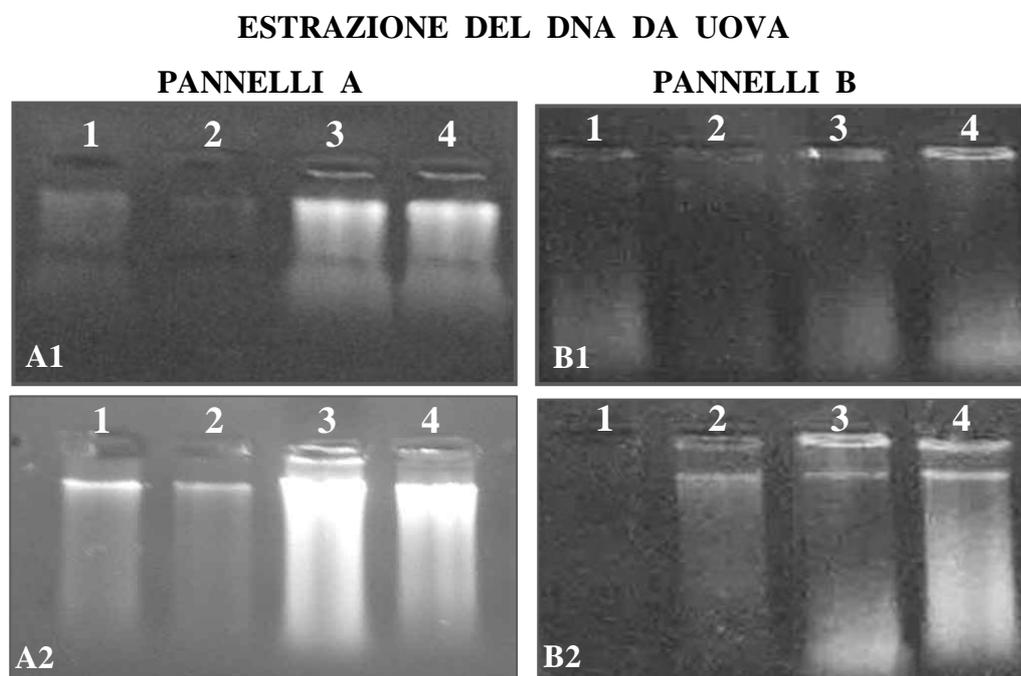
7.44 g/l EDTA

55.0 g/l acido borico

## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 6.1 Estrazione del DNA totale (nucleare e mitocondriale)

La figura 1 mostra i pannelli elettroforetici A e B relativi a due differenti esperimenti di estrazione e purificazione del DNA condotti con la metodica classica fenolo-cloroformio (pannelli A1 e A2) e con il metodo inorganico a mezzo Chelex®-100 (pannelli B1 e B2).



**Figura 1: analisi dello stato fisico del DNA - risoluzione elettroforetica su gel di agarosio 0,8%, in TBE 1X. PANNELLI A1 ed A2:**

si riportano due esempi di risoluzione elettroforetica del DNA purificato da uova di *P. persimilis* provenienti da allevamento in laboratorio.

I DNA sono stati purificati con il metodo classico **Fenolo-Cloroformio** e risospesi in 50 µl di H<sub>2</sub>O sterile milli Q; l'analisi di essi è stata effettuata su aliquote pari a 5 µl.

Corsia 1 = DNA estratto da 4 uova di *P. persimilis*.

Corsia 2 = DNA estratto da 2 uova di *P. persimilis*.

Corsia 3 = DNA estratto da 8 uova di *P. persimilis*.

Corsia 4 = DNA estratto da 8 uova di *P. persimilis*.

**PANNELLI B1 e B2:**

si riportano due esempi di risoluzione elettroforetica del DNA purificato da uova di *P. persimilis* provenienti da allevamento in laboratorio.

I DNA sono stati purificati con il metodo inorganico a mezzo **Chelex®-100** e recuperati in un volume di 200 µl secondo protocollo; l'analisi di essi è stata effettuata su aliquote pari a 10 µl.

Corsia 1 = DNA estratto da 4 uova di *P. persimilis*.

Corsia 2 = DNA estratto da 2 uova di *P. persimilis*.

Corsia 3 = DNA estratto da 8 uova di *P. persimilis*.

Corsia 4 = DNA estratto da 8 uova di *P. persimilis*.

Nei pannelli A si riportano le risoluzioni elettroforetiche del DNA purificato rispettivamente da numero 4, 2, 8 e 8 uova di *P. persimilis* raccolte in allevamento, avvalendosi della metodica classica fenolo-cloroformio.

I pannelli B corrispondono, invece, alla purificazione del DNA con la metodica inorganica a mezzo Chelex®-100 utilizzando le medesime quantità di uova provenienti dall'allevamento di *P. persimilis*.

Indubbiamente la diversa concentrazione del DNA era da attribuire alla differente quantità delle cellule di partenza (2, 4 ed 8 uova) e anche se dal confronto della visualizzazione elettroforetica si ricava che con entrambe le metodiche era possibile estrarre il DNA tuttavia, la metodica con fenolo-cloroformio (pannelli A1 ed A2) consentiva di purificare il DNA a più alto peso molecolare rispetto a quello estratto mediante Chelex®-100 (pannelli B1 ed B2).

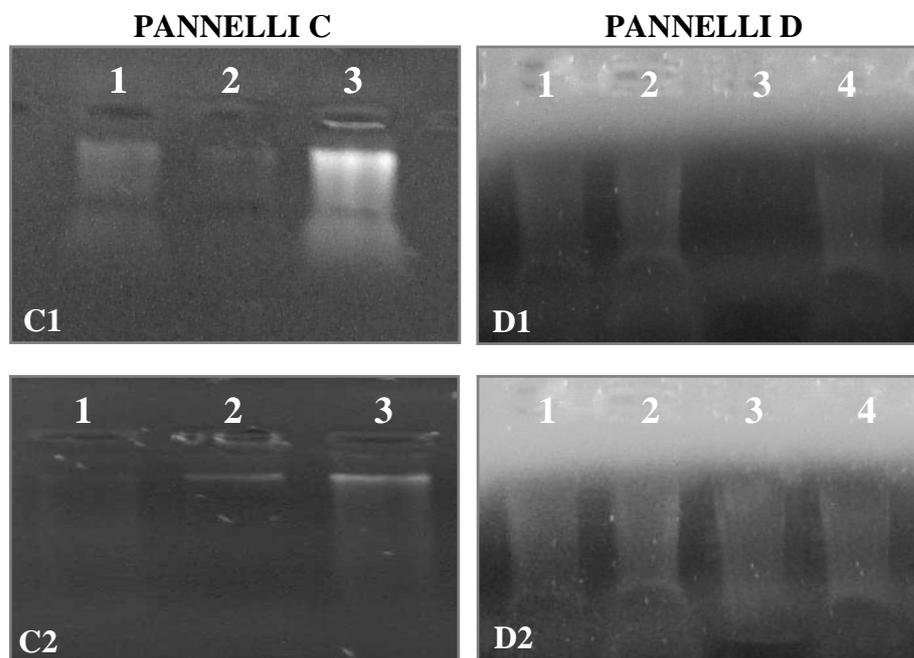
Pertanto, per l'estrazione del DNA da individui allestiti per microscopia si è ritenuto di avvalersi esclusivamente del metodo classico, ma prima di utilizzare i preparati del prezioso archivio scientifico del laboratorio, sono stati allestiti all'occorrenza dei preparati microscopici per consentire di settarne le condizioni sperimentali.

Per il recupero dell'individuo dal vetrino ci si è avvalsi di una camera umida a 50°C per favorire il distacco del collante di adesione tra i vetrini del preparato e di ritagli di carta sterile 3MM, di circa 1cm<sup>2</sup>, imbevuta di H<sub>2</sub>O sterile pre-riscaldata a 37°C, onde facilitare e consentire il trasferimento della specie in esame su carta. Tutte le fasi di trasferimento e recupero del materiale, dal vetrino al substrato cartaceo, sono state controllate con l'ausilio della microscopia.

Per il recupero del DNA si è ritenuto necessario adottare la metodica di estrazione classica; di conseguenza, il substrato cartaceo contenente l'individuo veniva riposto in presenza di opportuno tampone di lisi cellulare in tubo eppendorf da 0.5ml ed, anche in questo caso, la lisi cellulare era controllata e monitorata avvalendosi della microscopia per verificare che l'individuo stratificato su carta fosse effettivamente distrutto e consentisse il rilascio del proprio DNA.

In figura 2, pannelli C, si mostra la risoluzione elettroforetica del DNA estratto da *C. californicus* preparati per microscopia da una settimana, mentre nei pannelli D vengono riportati due diversi esempi di estrazione di singoli individui di *I. degenerans* montati su vetrini risalenti al 1971.

ESTRAZIONE DEL DNA DA *PHYTOSEIIDAE*  
ALLESTITI PER MICROSOPIA



**Figura 2:** analisi dello stato fisico del DNA - risoluzione elettroforetica su gel di agarosio 0,8%. in TBE 1X.

**PANNELLI C1 e C2:**

si riportano due esempi di risoluzione elettroforetica del DNA purificato da singoli individui allestiti su preparati per microscopia da una settimana.

I DNA sono stati purificati con il metodo classico **Fenolo-Cloroformio** e risospesi in 50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile milliQ; l'analisi di essi è stata effettuata su aliquote pari a 5  $\mu$ l.

Corsia 1 = DNA estratto da n. 2 individui di *C. californicus*;

Corsia 2 = DNA estratto da singolo individuo *C. californicus*;

Corsia 3 = DNA estratto da n. 5 individui di *C. californicus*;

**PANNELLI D1 e D2:**

si riportano due esempi di risoluzione elettroforetica del DNA purificato da singolo individuo della specie *I. degenerans* allestito nel 1971.

I DNA sono stati purificati con il metodo classico **Fenolo-Cloroformio** e risospesi in 50  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O sterile milliQ; l'analisi di essi è stata effettuata su aliquote pari a 5  $\mu$ l.

Corsia 1 = DNA estratto da singolo individuo di *I. degenerans*;

Corsia 2 = DNA estratto da singolo individuo di *I. degenerans*;

Corsia 3 = DNA estratto da singolo individuo di *I. degenerans*;

Corsia 4 = DNA estratto da singolo individuo di *I. degenerans*;

Dall'analisi dello stato fisico del DNA si ricava che la qualità del DNA recuperato dagli individui allestiti per l'analisi morfologica classica era strettamente dipendente alla vetustà del preparato, infatti, per gli individui provenienti dall'archivio scientifico di interesse museale, il DNA si presentava in quantità molto esigua ed a media degradazione (pannelli C1 e C2) rispetto a

quello estratto dalle medesime specie allestite per l'occorrenza in preparati per microscopia (pannelli D1 e D2).

Anche in questo caso, l'assenza di precedenti in letteratura scientifica e la mancanza di protocolli dedicati, contribuiva a rendere sempre più complesso il percorso di studio intrapreso, anche perché la maggior parte delle specie di Phytoseiidae selezionate erano allestite su vetrini risalenti nel tempo; pertanto, prima di iniziare la seconda fase di settaggio delle condizioni di amplificazione molecolare (RAPD-PCR e mt-PCR), si è proceduto con il passare al vaglio una terza metodica di estrazione del DNA su preparati per analisi morfologica onde valutare e confrontare il grado di degradazione del DNA ottenibile.

Si rappresenta che era necessario verificare le specie di Phytoseiidae secondo la classificazione morfologica prima di procedere all'estrazione del DNA da esse, poiché ciò costituiva il presupposto fondamentale per la corretta riconducibilità dei dati di caratterizzazione molecolare.

L'estrazione del DNA da Phytoseiidae allestiti per microscopia veniva, anche, eseguita avvalendosi del Kit commerciale DNeasy Tissue Qiagen, oggetto della pubblicazione scientifica dal titolo "*Voucher specimens for DNA sequences of Phytoseiid mites (Acari: Mesostigmata)*" Tixier M.S., Okassa M., Liguori M., Poinso A., Salerno B. and Kreiter S. *Acarologia*, 487-494".

Le tre metodiche di estrazione del DNA adottate hanno avuto esito positivo in base dall'origine del campione di partenza:

- la metodica inorganica del kit commerciale DNeasy Tissue Qiagen che da un lato presentava il vantaggio di poter recuperare e osservare nuovamente su vetrino l'esemplare intrappolato nella membrana di silicio, non permetteva di ottenere risultati positivi a partire da preparati allestiti per microscopia abbastanza risalenti nel tempo;
- la metodica rapida che si avvaleva del metodo inorganico con la resina Chelex®-100, nonostante non richiedesse l'uso di reagenti tossici, permetteva il recupero di DNA mediamente degradato con bassa qualità molecolare ed instabile nel tempo (soggetto a lenta degradazione anche a -20°C e durante le fasi congelamento e scongelamento per le seguenti fasi di amplificazione molecolare);
- la metodica di purificazione a mezzo fenolo-cloroformio ha, invece, consentito di recuperare una migliore qualità del DNA a fronte della degradazione

fisiologica intercorsa prima del processo di estrazione per quei preparati allestiti per l'analisi morfologica risalenti nel tempo; essa veniva ritenuta quella maggiormente idonea per il conseguimento dei dati di tipizzazione molecolare, nonostante richiedesse sia l'uso di reagenti tossici ed una serie di accorgimenti per lo smaltimento di essi, che una manualità fine per l'estrazione del DNA da singolo individuo da eseguire su piccolissimo volume (50–100µl).

Si fa presente, inoltre, la necessità che tutte le fasi dell'esperimento fossero condotte sotto cappa a flusso laminare, utilizzando aliquote di reagenti sterili che sarebbero state usate solamente una volta, per evitare qualunque fenomeno di cross-contaminazione tra i campioni che in considerazione dell'esigua quantità di DNA da essi recuperabile avrebbe potuto sovvertire i risultati delle analisi molecolari.

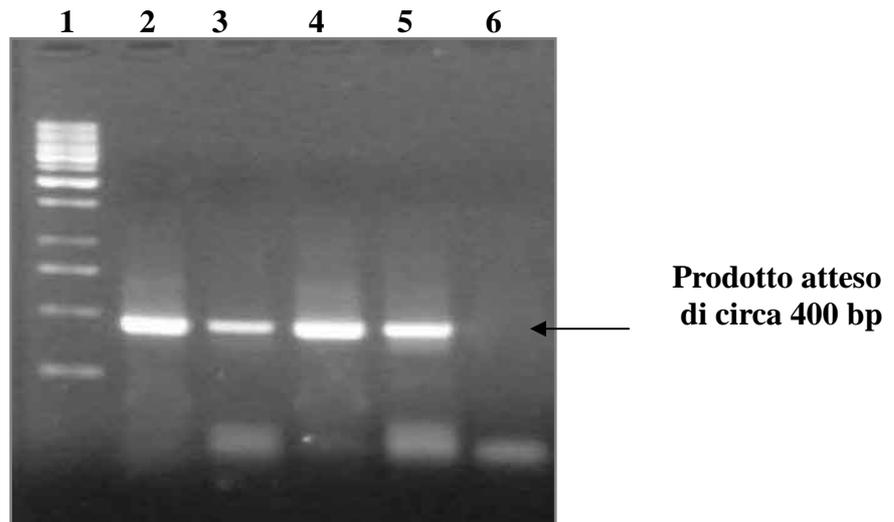
Si era, dunque, consapevoli dell'evenienza che, da individui allestiti per l'analisi morfologica in preparati risalenti nel tempo, avremmo potuto ottenere del DNA degradato, indipendentemente dal tipo di metodica utilizzata poiché tali erano le alterazioni fisiologiche cellulari indotte dalla morte dell'individuo prima di procedere alle fasi di estrazione del DNA da essi.

Tuttavia, il resistente scheletro di rivestimento proprio dei Phytoseiidae offriva quel vantaggio naturale alla preservazione del DNA anche per quelle specie *chiarificate* da parecchio tempo.

## 6.2 Analisi molecolare dei Fitoseidi

### Genoma mitocondriale

La figura 3 riporta un esempio di risoluzione elettroforetica dei prodotti di amplificazione molecolare della regione COI del genoma mitocondriale.



**Figura 3: risoluzione elettroforetica su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X dei prodotti di amplificazione della regione COI del mtDNA.**

Si riporta un esempio della risoluzione elettroforetica dei prodotti di amplificazione attesi di circa 400 bp da singoli individui allestiti su preparati per microscopia da circa una settimana, o risalenti al 1971. L'analisi è stata effettuata su aliquote pari a 5  $\mu$ l su 25 $\mu$ l di amplificato.

Corsia 1: Marker 1kb ladder (*Fermentas Life Science*).

Corsia 2: prodotto di amplificazione del DNA isolato da *Cydnodromus californicus* allestito su vetrino per l'occorrenza.

Corsia 3: prodotto di amplificazione del DNA isolato da *Phytoseiulus persimilis* allestito su vetrino per l'occorrenza.

Corsia 4: prodotto di amplificazione del DNA isolato da *Phytoseiulus longipes* allestito su vetrino per l'occorrenza.

Corsia 5: prodotto di amplificazione del DNA isolato da *Neoseiulus cucumeris* allestito su vetrino nel 1971.

Corsia 6: Controllo negativo (Miscela senza DNA).

Per tutte le specie sottoposte ad analisi si otteneva l'atteso prodotto di circa 400bp.

Pertanto, indipendentemente dalla vetustà del campione sottoposto ad analisi (un individuo era stato recuperato da un vetrino allestito nel 1971) si

osservava la possibilità di poter utilizzare la succitata regione mitocondriale come marcatore filogenetico.

Anche in questo caso, tutte le amplificazioni molecolari venivano eseguite sotto cappa a flusso laminare su aliquote di reagenti utilizzati una sola volta ed adeguati controlli positivi e negativi.

A conferma di ciò, si mostra l'assenza di amplificazione aspecifica nel campione caricato nella corsia 6 corrispondente al controllo negativo della cinetica costituito dalla mix di reazione senza DNA.

Tutte le reazioni di amplificazione venivano eseguite in duplicato ed in caso di esito negativo si procedeva alla ri-amplificazione dei prodotti fino a tre volte.

I prodotti di amplificazione venivano spediti alla ditta Eurofins MWG Operon (Germania), commissionando il sequenziamento nucleotidico del genoma mitocondriale inviando le specifiche sequenze oligonucleotidiche *primers* di innesco *nested* le sequenze *primers* utilizzate per l'amplificazione dei prodotti di PCR.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche è stata eseguita avvalendosi del software MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001), utilizzando il metodo *Neighbor Joining* (NJ); in figura 4 si riporta la costruzione del dendrogramma ad esse relativo.

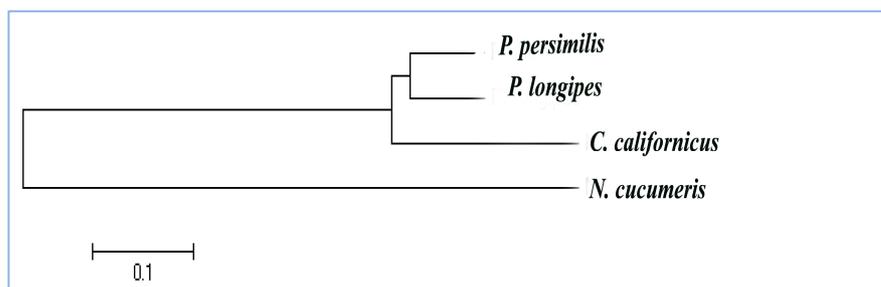


Figura 4: neighbour joining trees ottenuto con il programma Mega 2.1 utilizzando come marcatore molecolare la porzione COI del genoma mitocondriale.

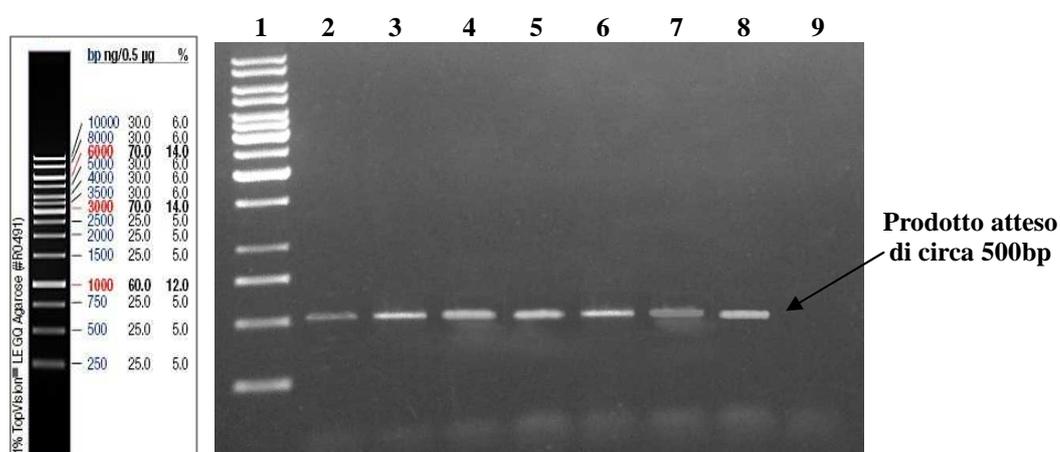
L'analisi delle sequenze nucleotidiche ha contribuito a confermare i dati esistenti in letteratura scientifica, secondo i quali le specie *P. persimilis* e *P. longipes* risulterebbero molto vicine tra esse, mentre le specie *C. californicus* e *N. cucumeris* sarebbero diversificate.

In base agli esiti ottenuti si è deciso di proseguire la ricerca avvalendosi di un secondo marcatore molecolare mitocondriale.

Si procedeva all'amplificazione della porzione mitocondriale codificante per il 12S rRNA selezionando le seguenti specie di Phytoseiidae: *Iphiseius degenerans*, *Phytoseiulus persimilis*, *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus macropilis*, *Cydnodromus californicus*, *Neoseiulus cucumeris*, *Phytoseiulus phragariae*, le quali venivano prelevate da allevamento in laboratorio, allestite su vetrino per analisi di identificazione morfologica ad eccezione di quelle *Iphiseius degenerans* e *Cydnodromus californicus*, che erano già state allestite su vetrino nel 1971.

La coppia di *oligonucleotidi primers* utilizzata individua una regione di circa 500 coppie di basi:

In figura 5 si riporta un esempio della risoluzione elettroforetica dei prodotti di amplificazione ottenuti.



**Figura 5:** risoluzione elettroforetica su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X dei prodotti di amplificazione della regione 12S dell'rRNA.

Si riporta un esempio della risoluzione elettroforetica dei prodotti di amplificazione attesi di circa 500 bp da singoli individui allestiti su preparati per microscopia entro una settimana, o risalenti al 1971.

L'analisi è stata effettuata su aliquote pari a 5 µl su 25µl di amplificato.

**Corsia 1:** Marker 1kb ladder (*Fermentas Life Science*).

**Corsia 2:** prodotto di amplificazione del DNA di *Phytoseiulus persimilis* allestito su vetrino per l'occorrenza.

**Corsia 3:** prodotto di amplificazione del DNA di *Phytoseiulus macropilis* allestito su vetrino per l'occorrenza.

**Corsia 4:** prodotto di amplificazione del DNA di *Neoseiulus cucumeris* allestito su vetrino del 1971.

**Corsia 5:** prodotto di amplificazione del DNA di *Phytoseiulus phragariae* allestito su vetrino per l'occorrenza.

**Corsia 6:** prodotto di amplificazione del DNA di *Iphiseius degenerans* allestito su vetrino del 1971.

**Corsia 7:** prodotto di amplificazione del DNA di *Phytoseiulus longipes* allestito su vetrino per l'occorrenza.

**Corsia 8:** prodotto di amplificazione del DNA di *Cydnodromus californicus* allestito su vetrino per l'occorrenza.

**Corsia 9:** Controllo negativo (Miscela senza DNA).

Anche in questo caso, si osservava l'atteso prodotto di amplificazione conformemente ai criteri di attendibilità adottati; gli amplificati venivano inviati alla ditta Eurofins MWG Operon (Germania) per l'analisi delle sequenze nucleotidiche provvedendo ad accludere, anche le complementari coppie di oligonucleotidi *primers nested* le sequenze *primers* utilizzate per l'amplificazione della regione mitocondriale, al fine di una sicura riconducibilità delle sequenze ottenute alle specie cui assegnarle.

Le sequenze così ottenute per le 8 specie analizzate sono state confrontate con quelle inserite in Banca dati GenBank, per la costruzione del dendrogramma che si riporta in figura 7; tuttavia, al fine di incrementarne il potere di classificazione, sono state selezionate (ed utilizzate) dalla banca dati altre 5 sequenze corrispondenti alle specie seguenti: *Typhlodromus exhilaratus*, *Amblyseius swirskii*, *Cydnodromus picanus*, *Typhlodromus aberrans*, *Typhlodromus pyri*.

Per la costruzione del dendrogramma tutte le sequenze nucleotidiche utilizzate sono state allineate ed analizzate mediante il software MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001) con il metodo *Neighbor Joining* (NJ).

In figura 6 viene mostrato il dendrogramma corrispondente.

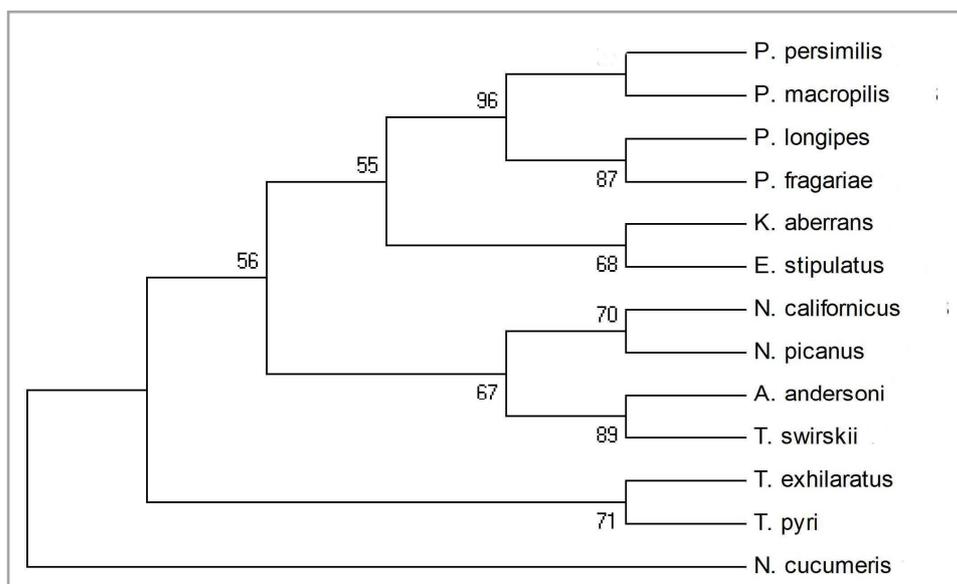


Figura 6: neighbour joining trees ottenuto con il programma Mega 2.1 utilizzando come marcatore molecolare la porzione 12S del genoma mitocondriale.

Il test di *bootstrap* supporta sostanzialmente tutti i nodi in accordo ai dati in letteratura, l'apparente eccezione del nodo che connette *K. aberrans* con *E. stipulatus* (valore *bootstrap* 68) è da ritenersi conforme poiché nell'analisi non era stata inclusa la sequenza nucleotidica di *K. ericinus* che secondo la teoria proposta da Athias-Henriot e Ragusa nel 1983 apparterebbe allo stesso genere, e quindi, contribuirebbe ad modificare il suddetto indice.

È opportuno sottolineare che, in accordo con Athias-Henriot e Ragusa (1983) e Ragusa e Tsolakis (1994), è possibile identificare un genere dall'osservazione dell'apparato di inseminazione e di altri caratteri morfologici ad esso correlati.

Ciò significa che specie che presentano lo stesso apparato di inseminazione e caratteri correlati simili, appartengono allo stesso genere. Le diverse specie poi si differenzerebbero attraverso la lunghezza delle setole, o minime differenze nel calice, ecc. Gli stessi autori ritengono che la maggior parte delle diagnosi dei generi spesso risulti non corretta perché sarebbero presi in considerazione caratteristiche variabili nel tempo e quindi devianti.

Secondo la classificazione proposta da Ragusa e Athias-Henriot, le 15 specie selezionate dovrebbero essere suddivise in 8 gruppi:

Gruppo 1: *P. persimilis*, *P. macropilis*, *P. longipes*, *P. phragariae*;

Gruppo 2: *C. californicus*, *C. picanus*;

Gruppo 3: *A. swirskii*, *A. andersoni*;

Gruppo 4: *A. cucumeris*;

Gruppo 5: *K. aberrans*, *K. ericinus*;

Gruppo 6: *T. exhilaratus*, *T. pyri*;

Gruppo 7: *I. degenerans*;

Gruppo 8: *E. stipulatus*.

Tale classificazione viene altresì, supportata da recenti studi (Okassa *et al.*, 2008; Tsolakis *et al.* 2012) che, utilizzando metodologie molecolari, hanno dimostrato come la teoria di Chant e McMurtry non coincidesse con le vicinanze genetiche, mentre quella di Athias-Henriot definisse meglio, anche se non esattamente, le linee evolutive che caratterizzano i raggruppamenti sopra-specifici.

### 6.3 RAPD-PCR

Dopo aver verificato che il DNA purificato dalle singole specie sottoposte ad esame consentiva di configurare correttamente i marcatori mitocondriali selezionati e dopo aver avuto conforto che i raggruppamenti sopra-specifici ottenuti erano più o meno sovrapponibili con quelli esistenti in letteratura scientifica, si è proceduto all'analisi del DNA nucleare mediante RAPD-PCR, procedendo ad impostare le condizioni di amplificazione per l'ottenimento di pattern multibande discriminanti le singole specie.

Anche in questo caso, preliminarmente il DNA veniva purificato ed isolato da singolo individuo allestito su vetrino per l'analisi morfologica dalle seguenti sette specie di acari appartenenti alla famiglia Phytoseiidae , *Typhlodromus exhilaratus* , *Phytoseiulus longipes*, *Phytoseiulus persimilis*, *Amblyseius swirskii*, *Cydnodromus californicus*, *Cydnodromus picanus*, individui prelevati da allevamento ed allestiti su preparati per l'occorrenza e *Neoseiulus cucumeris*, preparato per microscopia allestito nel 1971.

Tutte le specie sono state fornite su preparati per microscopia allestiti già da diversi anni, alcuni negli anni '70.

L'amplificazione random è stata eseguita avvalendosi di 7 oligonucleotidi *primers* costituiti da 10 coppie di basi (come riportato nella sezione *Materiali e Metodi*).

Le reazioni di amplificazione molecolare sono state condotte utilizzando singolarmente i 7 oligonucleotidi *primers*, per saggiare la capacità di ognuno di essi come marcatore di polimorfismo.

In tabella 1 si riportano, come esempio, i pannelli elettroforetici relativi alle amplificazioni di tipo random condotte con gli oligonucleotidi *primers* A, B e C.

TABELLA 1 – analisi RAPD

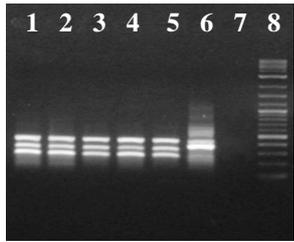
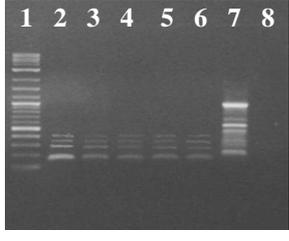
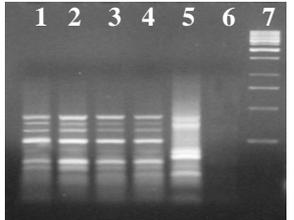
<i>Oligo-primers</i>	gel elettroforetici	Corsie	Acari analizzati
A	<p style="text-align: center;">Pannello 1</p> 	1	<i>T. exhilaratus</i>
		2	<i>P. longipes</i>
		3	<i>A. cucumeris</i>
		4	<i>C. californicus</i>
		5	<i>P. persimilis</i>
		6	Controllo positivo
		7	Controllo negativo
		8	Marker peso molecolare noto
B	<p style="text-align: center;">Pannello 2</p> 	1	Marker peso molecolare noto
		2	<i>T. exhilaratus</i>
		3	<i>P. longipes</i>
		4	<i>P. longipes</i>
		5	<i>A. cucumeris</i>
		6	<i>C. californicus</i>
		7	Controllo positivo
		8	Controllo negativo
C	<p style="text-align: center;">Pannello 3</p> 	1	<i>A. cucumeris</i>
		2	<i>C. californicus</i>
		3	<i>P. longipes</i>
		4	<i>P. persimilis</i>
		5	Controllo positivo
		6	Controllo negativo
		7	Marker peso molecolare noto

Tabella 1: risoluzione elettroforetica su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X. RAPD-PCR A, B e C.

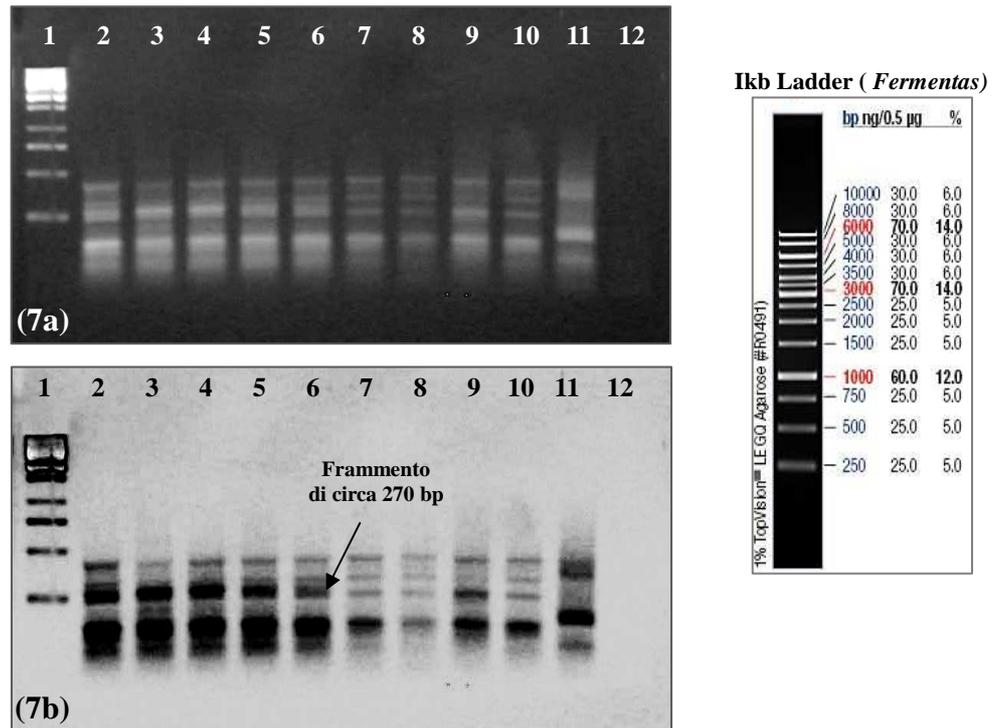
Tuttavia, come si rileva dall'analisi elettroforetica presentata nei pannelli 1, 2 e 3 ottenuta mediante amplificazione random con singoli oligonucleotidi primers 10-mer (etichettati A, B e C), il potere di discriminazione polimorfo di essi era molto basso e non era sufficiente a porre in evidenza alcuna significativa variabilità da utilizzare come riferimento per la caratterizzazione filogenetica.

Pertanto, veniva valutata la possibilità di incrementare il detto potere di discriminazione utilizzando contemporaneamente i tre oligonucleotidi primers (A,

B e C) per le cinetiche di amplificazione RAPD.

In figura 7, pannelli 7a e 7b, si riporta un esempio di risoluzione elettroforetica ottenuto dalla triplice associazione casuale degli oligonucleotidi *primers* A, B e C nel DNA nucleare utilizzato come stampo per la cinetica di amplificazione delle specie da saggiare.

### Analisi RAPD con gli oligonucleotidi *primers* A+B+C



**Figura 7: esempio di risoluzione elettroforetica RAPD.**

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione RAPD ottenuti dalla associazione casuale sul DNA stampo isolato da singoli individui allestiti per preparati microscopici, mediante 3 oligonucleotidi *primers* A, B, e C utilizzati per l'innesco delle cinetiche di polimerizzazione.

I singoli amplificati ottenuti in un volume di reazione pari a 25 µl erano caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X alla contemporanea presenza di: marcatore noto di peso molecolare **1kb ladder (Fermentas Life Science)** come riferimento dell'andamento della corsa elettroforetica; un controllo positivo corrispondente a DNA noto non riconducibile alla famiglia dei Phytoseiidae e controllo negativo costituito da mix di reazione in assenza di DNA per all'attendibilità dei bandeggi rilevati.

**Pannello (7a):** acquisizione mediante il software DOC-It LS versione 5.5.4.

**Pannello (7b):** analisi mediante Adobe Photoshop CS2.

Corsia 1: Marcatore noto.

Corsia 2: Prodotti di PCR di *T. exhilaratus*.

Corsia 3: Prodotti di PCR di *P. longipes*

Corsia 4: Prodotti di PCR di *P. longipes*.

Corsia 5: Prodotti di PCR di *P. persimilis*.

Corsia 6: Prodotti di PCR di *P. persimilis*.

Corsia 7: Prodotti di PCR di *N. cucumeris*.

Corsia 8: Prodotti di PCR di *A. swirskii*.

Corsia 9: Prodotti di PCR di *C. californicus*.

Corsia 10: Prodotti di PCR di *C. picanus*.

Corsia 11: Controllo positivo.

Corsia 12: Controllo negativo.

Dall'analisi del pattern elettroforetico è possibile evidenziare un bandeggio multiplo per tutte le specie analizzate; si rileva la presenza di una banda di circa 270bp solo per le specie *P. longipes*, *P. persimilis* e *T. exhilaratus* (corsie 2, 3, 4, 5 e 6, pannello 7a e 7b) come evidenziato nel rilievo fotografico a mo di esempio.

Le specie analizzate potrebbero essere, pertanto, preliminarmente suddivise nei due gruppi come mostrato nella tabella 2:

1 - le specie *P. longipes*, *P. persimilis* e *T. exhilaratus* mostrano un pattern elettroforetico sovrapponibile, fatto che indicherebbe una vicinanza nel percorso evolutivo.

2 - le specie *C. californicus*, *N. cucumeris*, *A. swirskii* e *C. picanus* differiscono dal primo gruppo per l'assenza di un frammento di DNA di circa 270 bp.

Specie	Gruppi RAPD-PCR
<i>Typhlodromus exhilaratus</i>	1
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	1
<i>Phytoseiulus longipes</i>	1
<i>Neoseiulus cucumeris</i>	2
<i>Amblyseius swirskii</i>	2
<i>Cydnodromus californicus</i>	2
<i>Cydnodromus picanus</i>	2

**Tabella 2: gruppi RAPD-PCR**

La classificazione delle succitate specie in 2 gruppi è, altresì avvalorata, dal contributo filogenetico offerto dall'analisi del marcatore mitocondriale (COI), dato già presentato nel paragrafo precedente.

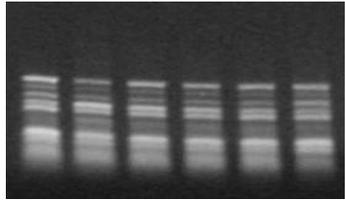
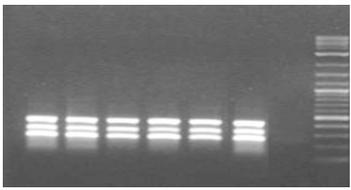
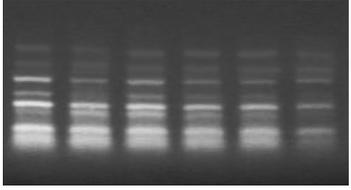
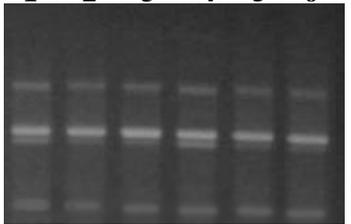
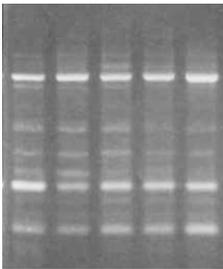
Quindi, l'analisi RAPD- PCR viene estesa al gruppo delle 15 specie di acari selezionate.

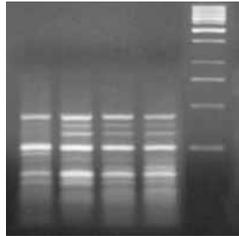
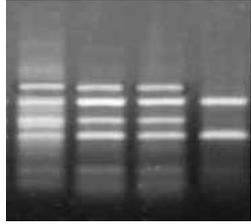
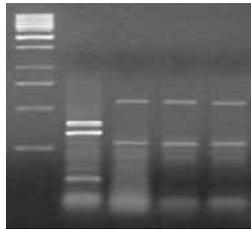
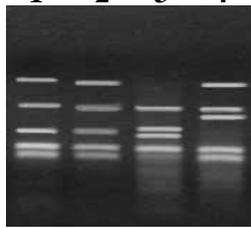
Il DNA veniva estratto e purificato sempre nel medesimo modo e sottoposto all'amplificazione molecolare utilizzando 7 diverse combinazioni di 9 oligonucleotidi *primers*, 7 di essi costituiti da 10 coppie di basi e 2 di essi da 21 coppie di basi.

Le singole cinetiche sono state condotte in doppio cieco, cioè senza conoscere preliminarmente la specie oggetto di esame e di conseguenza la sua tassonomia, allo scopo di eliminare qualsiasi coinvolgimento a priori che avrebbe potuto falsare la valutazione dei risultati.

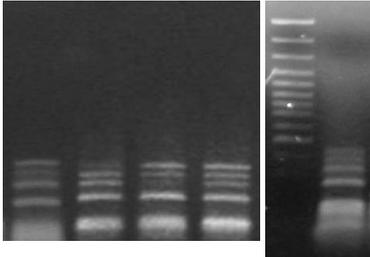
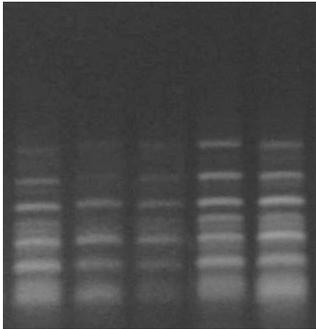
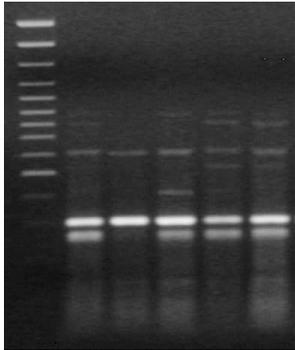
Per tale ragione inizialmente la caratterizzazione è stata eseguita su gruppi ristretti di specie di fitoseidi senza alcuna relazione filogenetica.

Si riportano nelle tabelle seguenti alcuni esempi delle molteplici amplificazioni molecolari eseguite dalla scrivente al fine della caratterizzazione del pattern multibande specifico ad ogni specie analizzata.

<p align="center"><b>Tabella 3: analisi –RAPD del DNA</b>  <i>T. exhilaratus</i> - <i>P. longipes</i> - <i>P. persimilis</i></p>			
<i>Oligo primers</i>	gel elettroforetici	Corsia	Acari analizzati
<b>A - B - C-</b>		1	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		2	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		3	<i>P. longipes</i> ind.2
		4	<i>P. longipes</i> ind.2
		5	<i>P. persimilis</i> ind.1
		6	<i>P. persimilis</i> ind.2
<b>A</b>		1	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		2	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		3	<i>P. longipes</i> ind.2
		4	<i>P. longipes</i> ind.2
		5	<i>P. persimilis</i> ind.1
		6	<i>P. persimilis</i> ind.2
		7	Controllo negativo
		8	Marker noto
<b>A - C - E</b>		1	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		2	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		3	<i>P. longipes</i> ind.2
		4	<i>P. longipes</i> ind.2
		5	<i>P. persimilis</i> ind.1
		6	<i>P. persimilis</i> ind.2
<b>D - G- H</b>		1	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		2	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		3	<i>P. longipes</i> ind.2
		4	<i>P. longipes</i> ind.2
		5	<i>P. persimilis</i> ind.1
		6	<i>P. persimilis</i> ind.2
<b>E - D- F</b>		1	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		2	<i>T. exhilaratus</i> ind.1
		3	<i>P. longipes</i> ind.2
		4	<i>P. persimilis</i> ind.1
		5	<i>P. persimilis</i> ind.2

<p align="center"><b>Tabella 4: analisi –RAPD del DNA</b>  <i>C.californicus - C. picanus- A. Swirskii- A. cucumeris</i></p>			
Oligo-primers	Pattern elettroforetico	Corsia	Acari analizzati
<b>A – B - C</b>	<p>1 2 3 4 5</p> 	1	<i>C. californicus</i>
		2	<i>C. picanus</i>
		3	<i>A. cucumeris</i>
		4	<i>A. swirskii</i>
		5	Marker noto
<b>A – C - E</b>	<p>1 2 3 4</p> 	1	<i>C. picanus</i>
		2	<i>A. cucumeris</i>
		3	<i>A. swirskii</i>
		4	<i>C. californicus</i>
<b>D – G - H</b>	<p>1 2 3 4 5</p> 	1	Marker noto
		2	<i>C. californicus</i>
		3	<i>C. picanus</i>
		4	<i>A. cucumeris</i>
		5	<i>A. swirskii</i>
<b>E – D - F</b>	<p>1 2 3 4</p> 	1	<i>A. cucumeris</i>
		2	<i>A. swirskii</i>
		3	<i>C. californicus</i>
		4	<i>C. picanus</i>

<b>Tabella 5: analisi –RAPD del DNA</b> <i>C.californicus - C. picanus- A. Swirskii- A. cucumeris</i>			
<i>Oligo primers</i>	Pattern elettroforetico	Corsia	Acari analizzati
<b>A – B – M</b>		1	Marker noto
		2	<i>C.californicus</i>
		3	<i>A. cucumeris</i>
		4	<i>A. swirskii</i>
		5	<i>C. picanus</i>
<b>B – C – L</b>		1	Marker noto
		2	<i>C. picanus</i>
		3	<i>A. cucumeris</i>
		4	<i>A. swirskii</i>
		5	<i>C.californicus</i>
<b>A – L – M</b>		1	Marker noto
		2	<i>A. cucumeris</i>
		3	<i>A. swirskii</i>
		4	<i>C.californicus</i>
		5	Marker noto
		6	<i>P. longipes</i>
		7	<i>C. picanus</i>

<p align="center"><b>Tabella 6: analisi –RAPD del DNA</b>  <i>T. aberrans</i>- <i>K. ericinus</i> - <i>A. andersoni</i> - <i>P. macropilis</i> - <i>P.phragariae</i></p>			
<i>Oligo primers</i>	Pattern elettroforetico	Corsia	Acari analizzati
A – B - C	<p>1 2 3 4 5 6</p> 	1	<i>P. macropilis</i>
		2	<i>A. andersoni</i>
		3	<i>T. aberrans</i>
		4	<i>K. ericinus</i>
		5	Marker noto
		6	<i>P. phragariae</i>
A – C - E	<p>1 2 3 4 5</p> 	1	Marker noto
		2	<i>A. andersoni</i>
		3	<i>T. aberrans</i>
		4	<i>K. ericinus</i>
		5	<i>P. phragariae</i>
		6	<i>P. macropilis</i>
E – D - F	<p>1 2 3 4 5 6</p> 	1	Marker noto
		2	<i>A. andersoni</i>
		3	<i>T. aberrans</i>
		4	<i>K. ericinus</i>
		5	<i>P. phragariae</i>
		6	<i>P. macropilis</i>

<p><b>Tabella 7: analisi –RAPD del DNA</b>  <i>T. aberrans</i>- <i>K. ericinus</i> - <i>A. andersoni</i> - <i>P. macropilis</i> - <i>P.phragariae</i></p>			
<i>Oligo primers</i>	Pattern elettroforetico	Corsia	Acari analizzati
<b>A – L - M</b>		1	<i>Marker noto</i>
		2	<i>A. andersoni</i>
		3	<i>T. aberrans</i>
		4	<i>K. ericinus</i>
		5	<i>P. phragariae</i>
		6	<i>P. macropilis</i>
<b>B – C – L</b>		1	Marker noto
		2	<i>A. andersoni</i>
		3	<i>T. aberrans</i>
		4	<i>K. ericinus</i>
		5	<i>P. macropilis</i>
		6	<i>T. aberrans</i>
<b>A – B – M</b>		1	Marker noto
		2	<i>A. andersoni</i>
		3	<i>T. aberrans</i>
		4	<i>K. ericinus</i>
		5	<i>P. macropilis</i>

<p><b>Tabella 8: analisi –RAPD del DNA</b>  <i>T.pyri</i> - <i>E.stipulatus</i> - <i>I.degenerans</i></p>			
Oligo primers	Pattern elettroforetico	Corsia	Acari analizzati
<p><b>A - B - C</b></p>		1	Marker noto
		2	<i>T. pyri</i>
		3	<i>E. stipulatus</i>
		4	<i>I. degenerans</i>
<p><b>A - C - E</b></p>		1	Marker noto
		2	<i>E.stipulatus</i>
		3	<i>E.stipulatus</i>
		4	Marker noto
		5	<i>T. pyri</i>
		6	<i>A. cucumeris</i>
		7	<i>A. cucumeris</i>
		8	<i>I. degenerans</i>
		9	<i>A. cucumeris</i>

<p align="center"><b>Tabella 9: analisi –RAPD del DNA</b> <i>T.pyri - E.stipulatus - I.degenerans</i></p>			
Oligo primers	Pattern elettroforetico	Corsia	Acari analizzati
<b>A – B – M</b>		1	Marker noto
		2	<i>I. degenerans</i>
		3	<i>T. pyri</i>
		4	<i>E. stipulatus</i>
<b>E – D – F</b>		1	<i>T. pyri</i>
		2	<i>E. stipulatus</i>
		3	<i>I. degenerans</i>
		4	Controllo positivo
		5	Controllo negativo
		6	Marker noto
<b>A – L – M</b>		1	Marker noto
		2	<i>P. longipes</i>
		3	<i>I. degenerans</i>
		4	<i>I. degenerans</i>
		5	Controllo positivo
		6	Marker noto
		7	<i>T. pyri</i>
		8	<i>E. stipulatus</i>
<b>B – C – L</b>		1	Marker noto
		2	<i>I. degenerans</i>
		3	Controllo positivo
		4	Controllo negativo
		5	Marker noto
		6	<i>T. pyri</i>
		7	<i>E. stipulatus</i>

Il singoli pannelli elettroforetici mostrano alcuni esempi di amplificazione RAPD eseguita sul DNA purificato da singoli individui allestiti su preparati per microscopia, alcuni anche risalenti a decine di anni fa.

Come già accennato, l'analisi molecolare è stata eseguita su piccoli gruppi (massimo di 5 specie), senza alcuna correlazione e/o appartenenza secondo classificazione filogenetica.

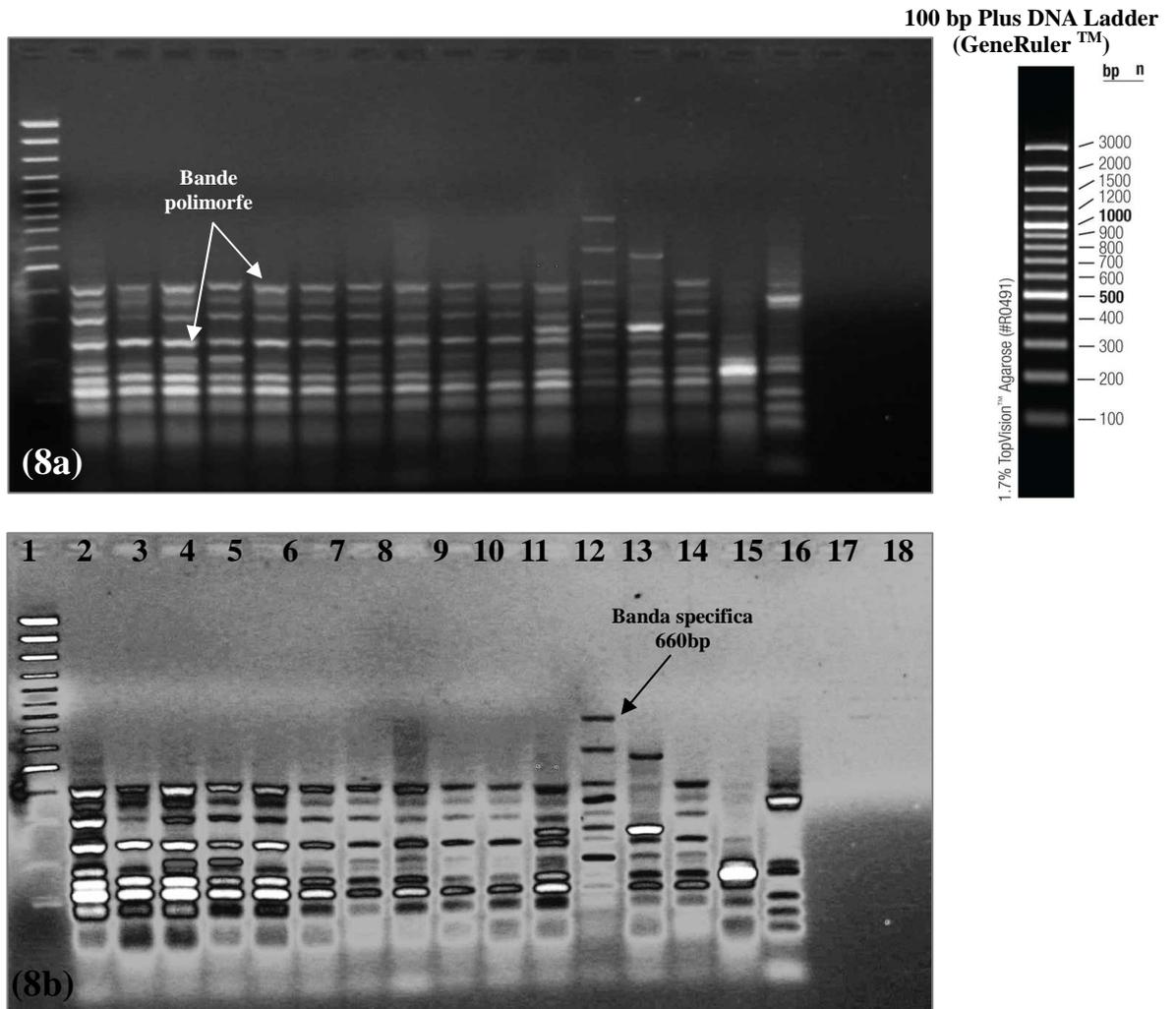
Si rendeva necessario, pertanto, al fine di una più puntuale normalizzazione dei singoli bandeggi elettroforetici, la contemporanea amplificazione RAPD di tutte e 15 le specie sottoposte ad esame e conseguente risoluzione elettroforetica.

Inoltre, le molteplici amplificazioni RAPD mostrate nei pannelli precedenti, hanno ottemperato allo scopo di consentire una migliore calibrazione delle condizioni micromolari della cinetica di amplificazione al fine di incrementarne il potere di discriminazione.

Le rilevazioni fotografiche che seguono mostrano, pertanto, le risoluzioni elettroforetiche RAPD relative alle singole combinazioni di *oligonucleotidi primers* utilizzate per le cinetiche molecolari.

Anche in questo caso per una corretta rivelazione dei pattern multibande si è provveduto ad acquisire i supporti elettroforetici esposti alla luce trasmessa u.v. mediante software DOC-ItLS versione 5.5.4; successivamente avvalendosi del programma di Adobe Photoshop CS2 le stesse immagini sono state sottoposte ad analisi dettagliata e con l'ausilio della funzione *curve* ad una migliore evidenza dei bandeggi, onde non trascurare alcuna significatività per l'identificazione polimorfica.

RAPD-PCR oligonucleotidi primers A + B + C



**Figura 8: esempio di risoluzione elettroforetica RAPD A+B+C.**

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione RAPD ottenuti dalla associazione casuale sul DNA stampo isolato da singoli individui allestiti per preparati microscopici, mediante 3 oligonucleotidi primers A, B e C, ed utilizzati per l'innesco delle cinetiche di polimerizzazione.

I singoli amplificati ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl erano caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X alla contemporanea presenza di: 1)-marcatore noto di peso molecolare 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™) utilizzato come riferimento dell'andamento della corsa elettroforetica; 2) - amplificato corrispondente a DNA noto non riconducibile alla famiglia dei Phytoseiidae utilizzato quale controllo positivo; 3) -controllo negativo costituito da mix di reazione in assenza di DNA per all'attendibilità dei bandeggi rilevati.

**Pannello (8a):** acquisizione mediante il software DOC-It LS versione 5.5.4.

**Pannello (8b):** analisi mediante Adobe Photoshop CS2.

Corsia 1: Marcatore noto

Corsia 2: *Amblyseius andersoni*

Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*

Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*

Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*

Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*

Corsia 7: *Amblyseius cucumeris*

Corsia 8: *Amblyseius swirskii*

Corsia 9: *Cydnodromus californicus*

Corsia 10: *Typhlodromus pyri*

Corsia 11: *Euseius stipulatus*

Corsia 12: *Typhlodromus exhilaratus*

Corsia 13: *Phytoseiulus longipes*

Corsia 14: *Phytoseiulus persimilis*

Corsia 15: *Cydnodromus picanus*

Corsia 16: *Iphiseius degenerans*

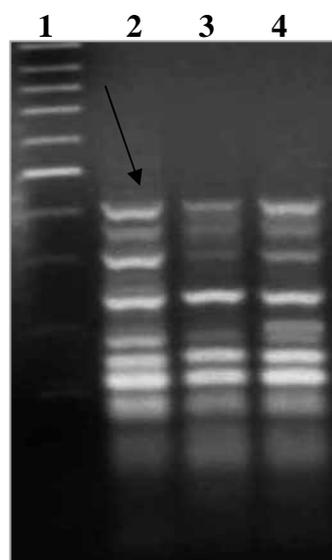
Corsia 17: Controllo positivo

Corsia 18: Controllo negativo

Dopo la visualizzazione elettroforetica, si rendeva necessaria un'attenta stima dei bandeggi ottenuti; ci si è avvalsi delle molteplici funzioni dei software Adobe Photoshop CS2 e Gel Compar Ver 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), assegnando, altresì, i corretti frammenti standard (riferimenti di peso molecolare noti, fronte di caricamento dei campioni, dimensione del gel, ecc.).

Dalla valutazione complessiva dei bandeggi presentati, veniva calcolata la presenza di 19 bande totali, di cui 2 bandeggi comuni tra le varie specie, definiti bandeggi non polimorfi, 11 bandeggi polimorfi presenti in alcune specie e 6 bande specie-specifiche, 5 delle quali sono caratterizzanti della specie *P. longipes* (corsia 13), mentre una banda di circa 550bp è presente solo in *P. persimilis* (corsia 14).

I bandeggi presentati mostrano delle differenze di carattere quantitativo oltre che qualitativo per intensità delle bande; si riportano alcuni particolari ingranditi tratti dal pannello (8a) al fine di contribuire all'esemplificazione delle bande comuni a tutte le specie (bandeggi non polimorfi) da quelle caratterizzanti la specie stessa (bande specifiche).



**Figura 9: particolare del pannello (8a) dell'analisi RAPD A+B+C.**

Si riportano i singoli prodotti ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl e caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X.

Corsia 1: Marcatore noto

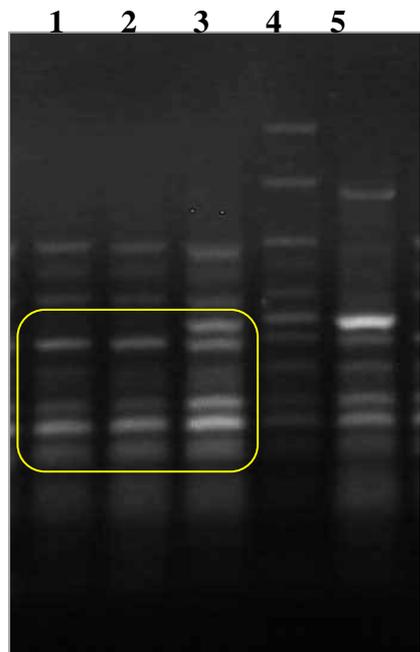
Corsia 2: *Amblyseius andersoni*

Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*

Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*

Come mostrato in figura 9 si rileva che la banda a più alto peso molecolare della specie *Amblyseius andersoni* (corsia 2) differisce dalla banda a più alto peso molecolare rilevata nel DNA delle specie *Kampimodromus aberrans* e *Kampimodromus ericinus* (corsie 3 e 4), particolare che nel riquadro mostrato in figura 8 risultava appena apprezzabile.

Analogamente, si riporta in figura 10 un altro esempio mediante ingrandimento tratto dalla summenzionata immagine relativo ai prodotti di amplificazione delle specie *Typhlodromus pyri*, *Euseius stipulatus*, *Typhlodromus exhilaratus*, *Phytoseiulus longipes* e *Phytoseiulus persimilis*.



**Figura 10: particolare del pannello (8a) dell'analisi RAPD A+B+C.**  
Si riportano i singoli prodotti ottenuti in un volume di reazione pari a 40  $\mu$ l e caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X.  
Corsia 1: *Typhlodromus pyri*  
Corsia 2: *Euseius stipulatus*  
Corsia 3: *Typhlodromus exhilaratus*  
Corsia 4: *Phytoseiulus longipes*

In questo caso le bande a più alto peso molecolare delle corsie 1,2 e 3 corrispondenti al DNA delle specie *Typhlodromus pyri*, *Euseius stipulatus*, *Typhlodromus exhilaratus*, mostrano una differenza in termini di massa molecolare non essendo perfettamente allineate sul fronte orizzontale a differenza di quelle ad inferiore massa evidenziate nel riquadro in giallo, che risultano perfettamente allineate tra esse.

Nell'ipotesi di verosimile shift nel corso del caricamento e migrazione del campione, tutti i bandeggi corrispondenti ad un medesimo campione devono essere, infatti, disallineati rispetto ai campioni caricati nel pozzetto adiacente.

Nella tabella 10 viene riportato il Coefficiente di similitudine genetica (F) calcolato secondo il modello proposto da Nei and Li (1979).  $F = 2N_{sls}/(N_{sl} + N_s)$  dove  $N_{sl}$  è il numero dei frammenti o bande di DNA della specie indicata Ph1,  $N_s$  indica il numero dei frammenti o bande di DNA per la specie Ph2,  $N_{sls}$  il numero dei frammenti o bande di DNA in comune tra le due specie prese in esame sulla

base della contemporanea migrazione e risoluzione elettroforetica.

**Tabella 10 -  $F = 2N_{sls}/(N_{sl} + N_s)$**   
**A + B + C**

	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	Ph6	Ph7	Ph8	Ph9	Ph10	Ph11	Ph12	Ph13	Ph14	Ph15
Ph1	1.0														
Ph2	0.81	1.0													
Ph3	0.81	1.0	1.0												
Ph4	0.90	0.90	0.90	1.0											
Ph5	0.86	0.95	0.90	0.85	1.0										
Ph6	0.86	0.95	0.90	0.85	1.0	1.0									
Ph7	0.86	0.76	0.76	0.85	0.81	0.81	1.0								
Ph8	0.80	0.78	0.78	0.69	0.83	0.83	0.66	1.0							
Ph9	0.52	0.38	0.38	0.47	0.54	0.54	0.63	0.41	1.0						
Ph10	0.38	0.42	0.42	0.42	0.40	0.40	0.50	0.36	0.90	1.0					
Ph11	0.46	0.50	0.57	0.41	0.48	0.48	0.48	0.66	0.40	0.43	1.0				
Ph12	0.33	0.27	0.27	0.27	0.34	0.34	0.43	0.29	0.69	0.66	0.30	1.0			
Ph13	0.56	0.60	0.60	0.26	0.66	0.66	0.66	0.53	0.41	0.36	0.74	0.48	1.0		
Ph14	0.58	0.45	0.45	0.45	0.52	0.52	0.60	0.56	0.69	0.66	0.46	0.66	0.56	1.0	
Ph15	0.58	0.45	0.45	0.45	0.52	0.52	0.60	0.48	0.69	0.66	0.38	0.66	0.56	0.91	1.0

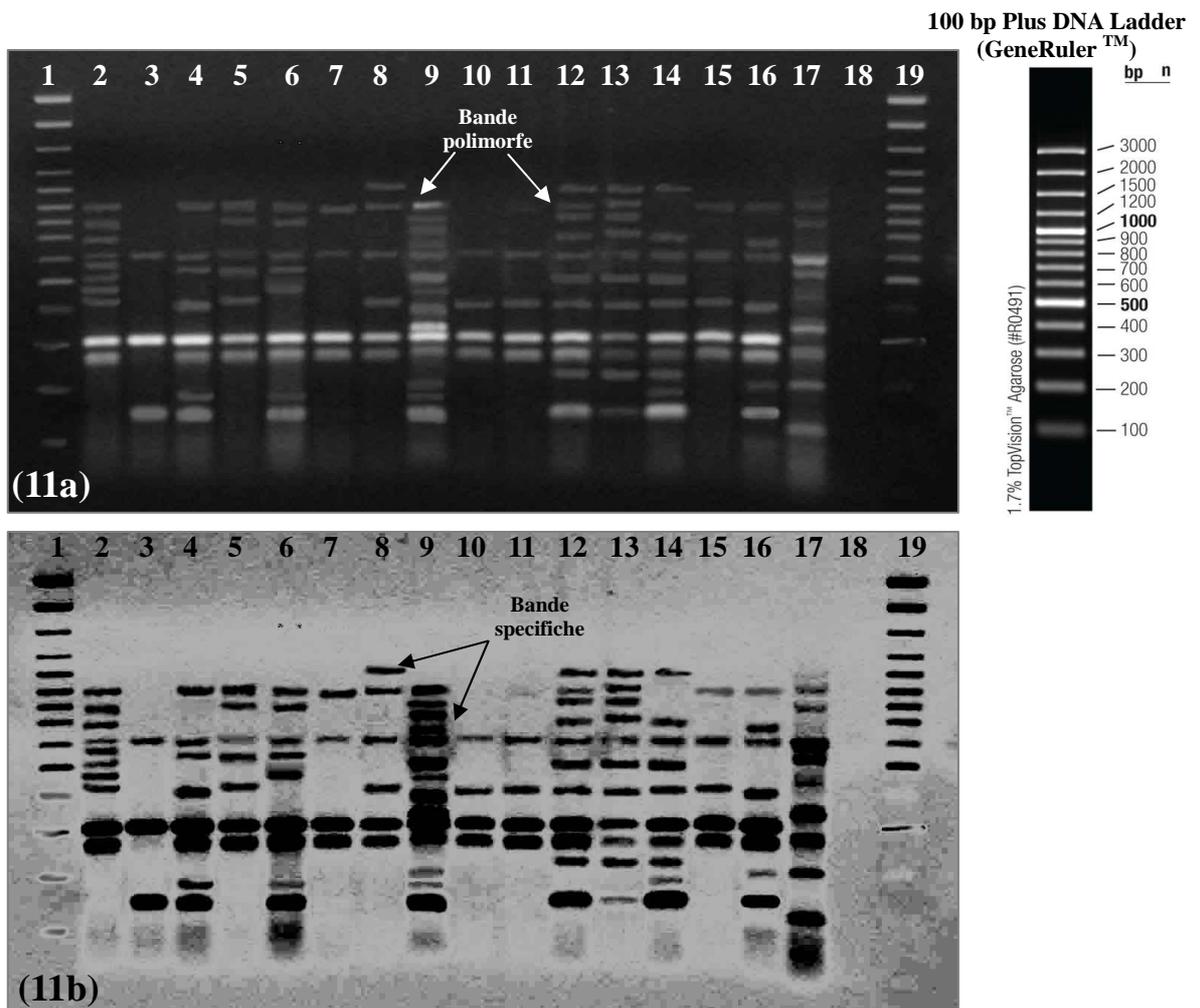
Campioni	Specie
Ph1	<i>Amblyseius andersoni</i>
Ph2	<i>Kampimodromus aberrans</i>
Ph3	<i>Kampimodromus ericinus</i>
Ph4	<i>Phytoseiulus phragarye</i>
Ph5	<i>Phytoseiulus macropilis</i>
Ph6	<i>Amblyseius cucumeris</i>
Ph7	<i>Amblyseius swirskii</i>
Ph8	<i>Cydnodromus californicus</i>
Ph9	<i>Typhlodromus pyri</i>
Ph10	<i>Euseius stipulatus</i>
Ph11	<i>Typhlodromus exhilaratus</i>
Ph12	<i>Phytoseiulus longipes</i>
Ph13	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
Ph14	<i>Cydnodromus picanus</i>
Ph15	<i>Iphiseius degenerans</i>

Secondo quanto descritto nei paragrafi precedenti, l'informazione polimorfa determinata dall'associazione casuale di 3 *oligonucleotidi primers* sul DNA stampo delle 15 specie da saggiare, non poteva essere sufficiente per una corretta analisi filogenetica.

Infatti, soltanto dalla valutazione complessiva ottenuta mediante 21 differenti associazioni casuali sul DNA delle singole specie, si sarebbe potuto determinare con un sufficiente grado di attendibilità la distanza genica tra le specie in esame.

Si riportano pertanto, i singoli rilievi fotografici che mostrano le rilevazioni elettroforetiche corrispondenti.

**RAPD-PCR oligonucleotidi primers E + D + F**



**Figura 11: esempio di risoluzione elettroforetica RAPD. E + D +F.**

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione RAPD ottenuti dalla associazione casuale sul DNA stampo isolato da singoli individui allestiti per preparati microscopici, mediante 3 oligonucleotidi *primers* E, D e F ed utilizzati per l'innescio delle cinetiche di polimerizzazione.

I singoli amplificati ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl erano caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X alla contemporanea presenza 1) -di: marcatore noto di peso molecolare 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™) utilizzato come riferimento dell'andamento della corsa elettroforetica; 2) -amplificato corrispondente a DNA noto non riconducibile alla famiglia dei Phytoseiidae utilizzato quale controllo positivo, 3) - controllo negativo costituito da mix di reazione in assenza di DNA per all'attendibilità dei bandeggi rilevati.

**Pannello (11a):** acquisizione mediante il software DOC-It LS versione 5.5.4.

**Pannello (11b):** analisi mediante Adobe Photoshop CS2.

Corsia 1e 19: Marcatore noto  
 Corsia 2: *Amblyseius andersoni*  
 Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*  
 Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*  
 Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*  
 Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*  
 Corsia 7: *Amblyseius cucumeris*  
 Corsia 8: *Amblyseius swirskii*  
 Corsia 9: *Cydnodromus californicus*

Corsia 10: *Typhlodromus pyri*  
 Corsia 11: *Euseius stipulatus*  
 Corsia 12: *Typhlodromus exhilaratus*  
 Corsia 13: *Phytoseiulus longipes*  
 Corsia 14: *Phytoseiulus persimilis*  
 Corsia 15: *Cydnodromus picanus*  
 Corsia 16: *Iphiseius degenerans*  
 Corsia 17: Controllo positivo  
 Corsia 18: Controllo negativo

## Considerazioni

La cinetica di amplificazione molecolare eseguita con la combinazione di primers E + D + F, ha consentito di evidenziare un pattern elettroforetico multibande caratterizzato per la presenza di bandeggi comuni tra le varie specie, definiti bandeggi non polimorfi, e bandeggi polimorfi; i singoli bandeggi vengono normalizzati grazie alla presenza del marcatore noto di peso molecolare (100 bp ladder) utilizzato per la risoluzione elettroforetica.

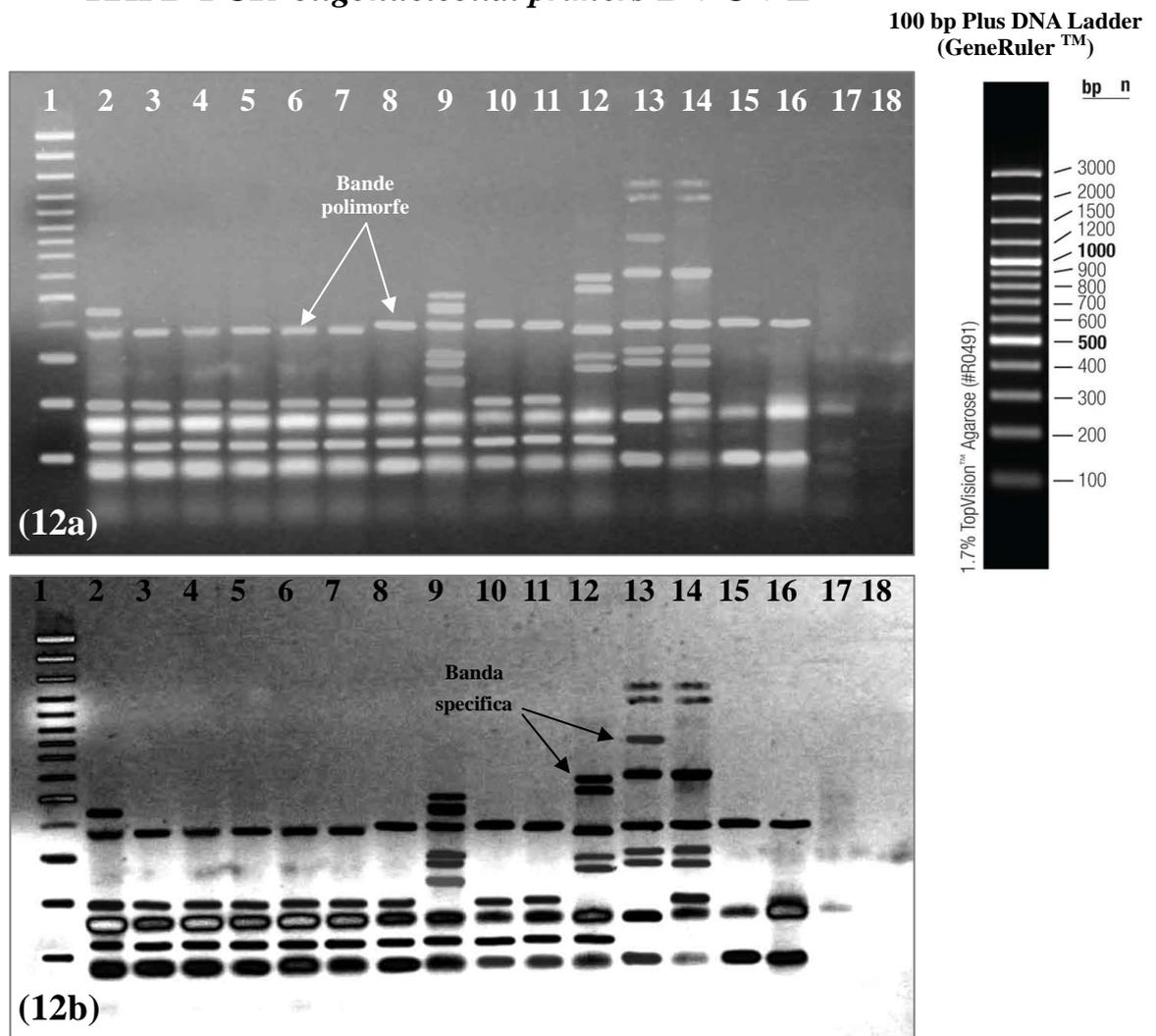
Sono state ottenute ben 22 bande di DNA, 2 di esse (300bp, e 600bp) sono bandeggi non polimorfi perché comuni alle 15 specie analizzate, 3 bandeggi specifici di circa 300bp,400bp e 760bp per la specie *C. californicus* (corsia 9), una per *P. longipes* di circa 740bp (corsia 12), mentre i 16 bandeggi restanti sono condivisi da più specie.

Nella tabella 11 viene riportata la matrice triangolare con il calcolo del Coefficiente di similarità genetica  $F = 2N_{sls}/(N_{sl} + N_s)$  secondo il modello di Nei and Li (1979).

<b>Tabella 11 - <math>F = 2N_{sls}/(N_{sl} + N_s)</math></b>															
	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	Ph6	Ph7	Ph8	Ph9	Ph10	Ph11	Ph12	Ph13	Ph14	Ph15
<b>Ph1</b>	1.0														
<b>Ph2</b>	0.3	1.0													
<b>Ph3</b>	0.55	0.54	1.0												
<b>Ph4</b>	0.82	0.40	0.66	1.0											
<b>Ph5</b>	0.8	0.46	0.77	0.70	1.0										
<b>Ph6</b>	0.57	0.57	0.66	0.72	0.57	1.0									
<b>Ph7</b>	0.66	0.50	0.61	0.83	0.53	0.88	1.0								
<b>Ph8</b>	0.48	0.22	0.52	0.45	0.64	0.42	0.40	1.0							
<b>Ph9</b>	0.57	0.57	0.50	0.72	0.42	0.75	0.88	0.31	1.0						
<b>Ph10</b>	0.57	0.57	0.50	0.72	0.42	0.75	0.88	0.31	1.0	1.0					
<b>Ph11</b>	0.60	0.46	0.55	0.70	0.50	0.57	0.66	0.56	0.57	0.57	1.0				
<b>Ph12</b>	0.50	0.46	0.55	0.58	0.50	0.57	0.66	0.56	0.57	0.57	0.90	1.0			
<b>Ph13</b>	0.50	0.46	0.55	0.47	0.80	0.42	0.53	0.48	0.57	0.57	0.80	0.80	1.0		
<b>Ph14</b>	0.75	0.44	0.57	0.92	0.62	0.80	0.90	0.47	0.80	0.80	0.62	0.62	0.50	1.0	
<b>Ph15</b>	0.44	0.54	0.75	0.53	0.55	0.51	0.61	0.60	0.50	0.50	0.55	0.44	0.55	0.57	1.0

<b>Campioni</b>	<b>Specie</b>
Ph1	<i>Amblyseius andersoni</i>
Ph2	<i>Kampimodromus aberrans</i>
Ph3	<i>Kampimodromus ericinus</i>
Ph4	<i>Phytoseiulus phragarye</i>
Ph5	<i>Phytoseiulus macropilis</i>
Ph6	<i>Amblyseius cucumeris</i>
Ph7	<i>Amblyseius swirskii</i>
Ph8	<i>Cydnodromus californicus</i>
Ph9	<i>Typhlodromus pyri</i>
Ph10	<i>Euseius stipulatus</i>
Ph11	<i>Typhlodromus exhilaratus</i>
Ph12	<i>Phytoseiulus longipes</i>
Ph13	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
Ph14	<i>Cydnodromus picanus</i>
Ph15	<i>Iphiseius degenerans</i>

**RAPD-PCR oligonucleotidi primers B + C + L**



**Figura12: esempio di risoluzione elettroforetica RAPD B+C+L.**

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione RAPD ottenuti dalla associazione casuale sul DNA stampo isolato da singoli individui allestiti per preparati microscopici, mediante 3 oligonucleotidi *primers* B, C, L ed utilizzati per l'innesco delle cinetiche di polimerizzazione.

I singoli amplificati ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl erano caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X alla contemporanea presenza di: 1) - marcatore noto di peso molecolare 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™) utilizzato come riferimento dell'andamento della corsa elettroforetica; 2) -amplificato corrispondente a DNA noto non riconducibile alla famiglia dei Phytoseiidae utilizzato quale controllo positivo; 3) - controllo negativo costituito da mix di reazione in assenza di DNA per all'attendibilità dei bandeggi rilevati.

**Pannello (12a):** acquisizione mediante il software DOC-It LS versione 5.5.4.

**Pannello (12b):** analisi mediante Adobe Photoshop CS2.

Corsia 1: Marcatore noto

Corsia 2: *Amblyseius andersoni*

Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*

Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*

Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*

Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*

Corsia 7: *Amblyseius cucumeris*

Corsia 8: *Amblyseius swirskii*

Corsia 9: *Cydnodromus californicus*

Corsia 10: *Typhlodromus pyri*

Corsia 11: *Euseius stipulatus*

Corsia 12: *Typhlodromus exhilaratus*

Corsia 13: *Phytoseiulus longipes*

Corsia 14: *Phytoseiulus persimilis*

Corsia 15: *Cydnodromus picanus*

Corsia 16: *Iphiseius degenerans*

Corsia 17: Controllo positivo

Corsia 18: Controllo negativo

La cinetica di amplificazione molecolare eseguita con i *primers* B + C + L ha consentito di evidenziare un pattern elettroforetico di 21 bande, rispettivamente 2 bandeggi non polimorfi, 11 bandeggi polimorfi e 8 bande specifiche, in particolare 3 bande di circa 240bp, 430bp e 520bp, presenti solo per la specie *C. californicus* (corsia 9), e due bande rispettivamente di circa 570bp e 800bp presenti solo per *P. longipes* (corsia 13).

Anche in questo caso, i singoli bandeggi venivano normalizzati grazie alla presenza del marcatore a peso molecolare noto 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™) utilizzato per la risoluzione elettroforetica.

L'attendibilità dei risultati presentati è altresì validata dall'assenza di bandeggio nel controllo negativo costituito dalla miscela di reazione priva di DNA.

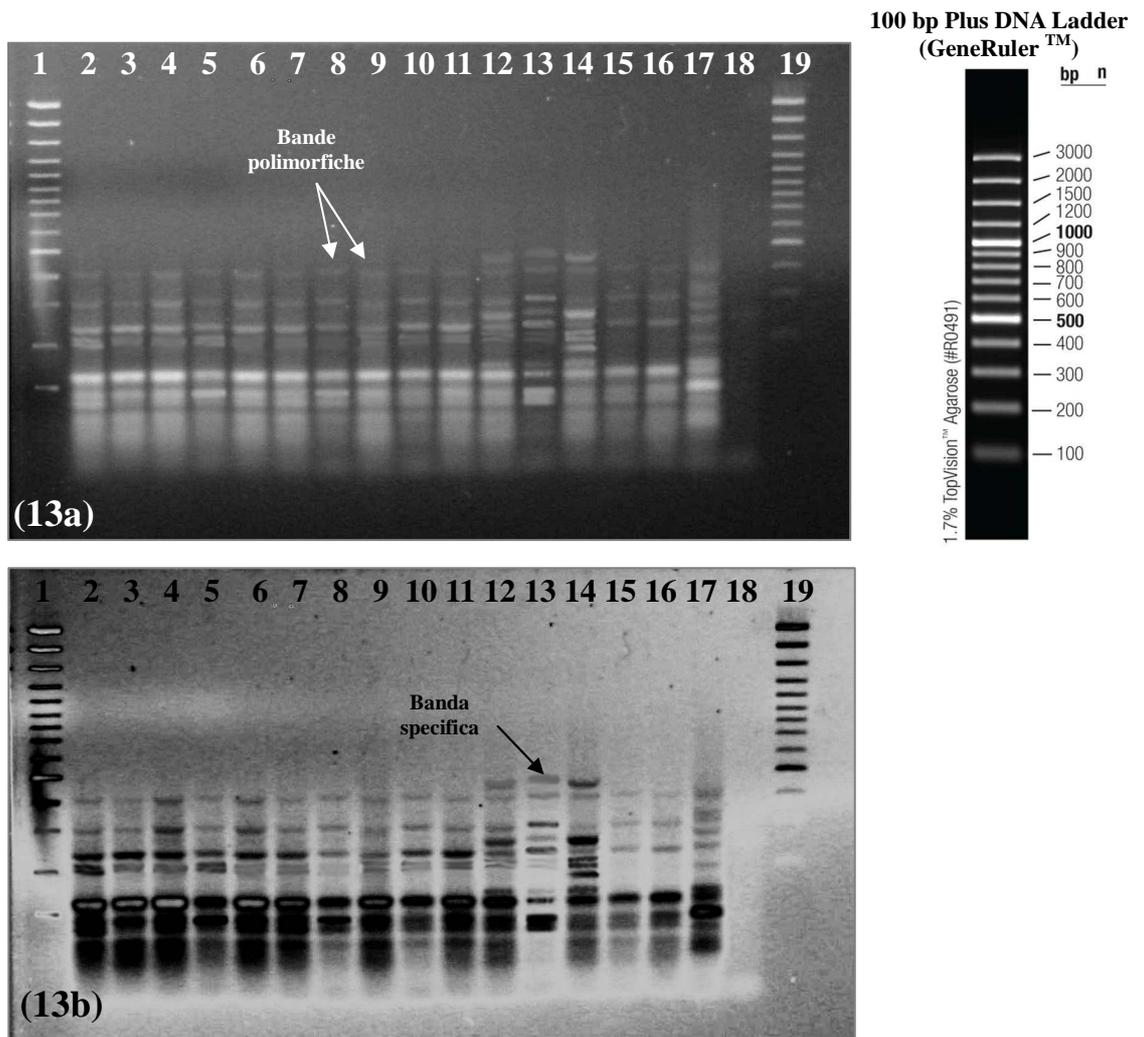
Nella tabella 12 viene riportato il Coefficiente di similitudine genetica  $F=2Nsls/(Nsl +Ns)$  calcolato secondo il modello proposto da Nei and Li (1979).

**Tabella 12 -  $F = 2Nsls/(Nsl +Ns)$**

	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	Ph6	Ph7	Ph8	Ph9	Ph10	Ph11	Ph12	Ph13	Ph14	Ph15
<b>Ph1</b>	1.0														
<b>Ph2</b>	0.90	1.0													
<b>Ph3</b>	0.90	1.0	1.0												
<b>Ph4</b>	0.90	1.0	1.0	1.0											
<b>Ph5</b>	0.90	1.0	1.0	1.0	1.0										
<b>Ph6</b>	0.90	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0									
<b>Ph7</b>	0.72	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	1.0								
<b>Ph8</b>	0.50	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.53	1.0							
<b>Ph9</b>	0.72	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	1.0	0.53	1.0						
<b>Ph10</b>	0.72	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	1.0	0.53	1.0	1.0					
<b>Ph11</b>	0.57	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.46	0.44	0.46	0.46	1.0				
<b>Ph12</b>	0.28	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.46	0.44	0.46	0.46	0.25	1.0			
<b>Ph13</b>	0.42	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.61	0.44	0.61	0.61	0.25	0.75	1.0		
<b>Ph14</b>	0.44	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.75	0.46	0.75	0.75	0.36	0.36	0.54	1.0	
<b>Ph15</b>	0.44	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.75	0.46	0.75	0.75	0.36	0.54	0.54	1.0	1.0

Campioni	Specie
Ph1	<i>Amblyseius andersoni</i>
Ph2	<i>Kampimodromus aberrans</i>
Ph3	<i>Kampimodromus ericinus</i>
Ph4	<i>Phytoseiulus phragarye</i>
Ph5	<i>Phytoseiulus macropilis</i>
Ph6	<i>Amblyseius cucumeris</i>
Ph7	<i>Amblyseius swirskii</i>
Ph8	<i>Cydnodromus californicus</i>
Ph9	<i>Typhlodromus pyri</i>
Ph10	<i>Euseius stipulatus</i>
Ph11	<i>Typhlodromus exhilaratus</i>
Ph12	<i>Phytoseiulus longipes</i>
Ph13	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
Ph14	<i>Cydnodromus picanus</i>
Ph15	<i>Iphiseius degenerans</i>

**RAPD-PCR oligonucleotidi primers A + B + M**



**Figura 13: esempio di risoluzione elettroforetica RAPD. A+B+M.**

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione RAPD ottenuti dalla associazione casuale sul DNA stampo isolato da singoli individui allestiti per preparati microscopici, mediante 3 oligonucleotidi *primers* A, B ed M ed utilizzati per l'innesco delle cinetiche di polimerizzazione.

I singoli amplificati ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl erano caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X alla contemporanea presenza di: 1) -marcatore noto di peso molecolare 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™) utilizzato come riferimento dell'andamento della corsa elettroforetica; 2) -amplificato corrispondente a DNA noto non riconducibile alla famiglia dei Phytoseiidae utilizzato quale controllo positivo; 3)- controllo negativo costituito da mix di reazione in assenza di DNA per all'attendibilità dei bandeggi rilevati.

**Pannello (13a):** acquisizione mediante il software DOC-It LS versione 5.5.4.

**Pannello (13b):** analisi mediante Adobe Photoshop CS2.

Corsia 1e 19: Marcatore noto.  
Corsia 2: *Amblyseius andersoni*  
Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*  
Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*  
Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*  
Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*  
Corsia 7: *Amblyseius cucumeris*  
Corsia 8: *Amblyseius swirskii*  
Corsia 9: *Cydnodromus californicus*

Corsia 10: *Typhlodromus pyri*.  
Corsia 11: *Euseius stipulatus*  
Corsia 12 *Typhlodromus exhilaratus*  
Corsia 13: *Phytoseiulus longipes*  
Corsia 14: *Phytoseiulus persimilis*  
Corsia 15: *Cydnodromus picanus*  
Corsia 16: *Iphiseius degenerans*  
Corsia 17: Controllo positivo  
Corsia 18: Controllo negativo

Anche con la combinazione di primers A + B + M, la cinetica di amplificazione molecolare eseguita ha consentito di evidenziare un pattern elettroforetico multi bande caratterizzato dalla presenza di bandeggi comuni tra le varie specie, definiti bandeggi non polimorfi, e bandeggi polimorfi specifici; i singoli bandeggi sono stati normalizzati grazie alla presenza del marcatore noto di peso molecolare (100 bp ladder) utilizzato per la risoluzione elettroforetica.

I bandeggi evidenziati sono 16, 4 bandeggi non polimorfi, 9 bandeggi polimorfi, inoltre sono presenti 3 bande esclusivamente per una specie, e cioè una banda di circa 180bp, presente solo in *P. persimilis* (corsia 14), una banda di circa 280bp presente in *T. exhilaratus* (corsia 12) e una banda di circa 540bp in *P. longipes*.

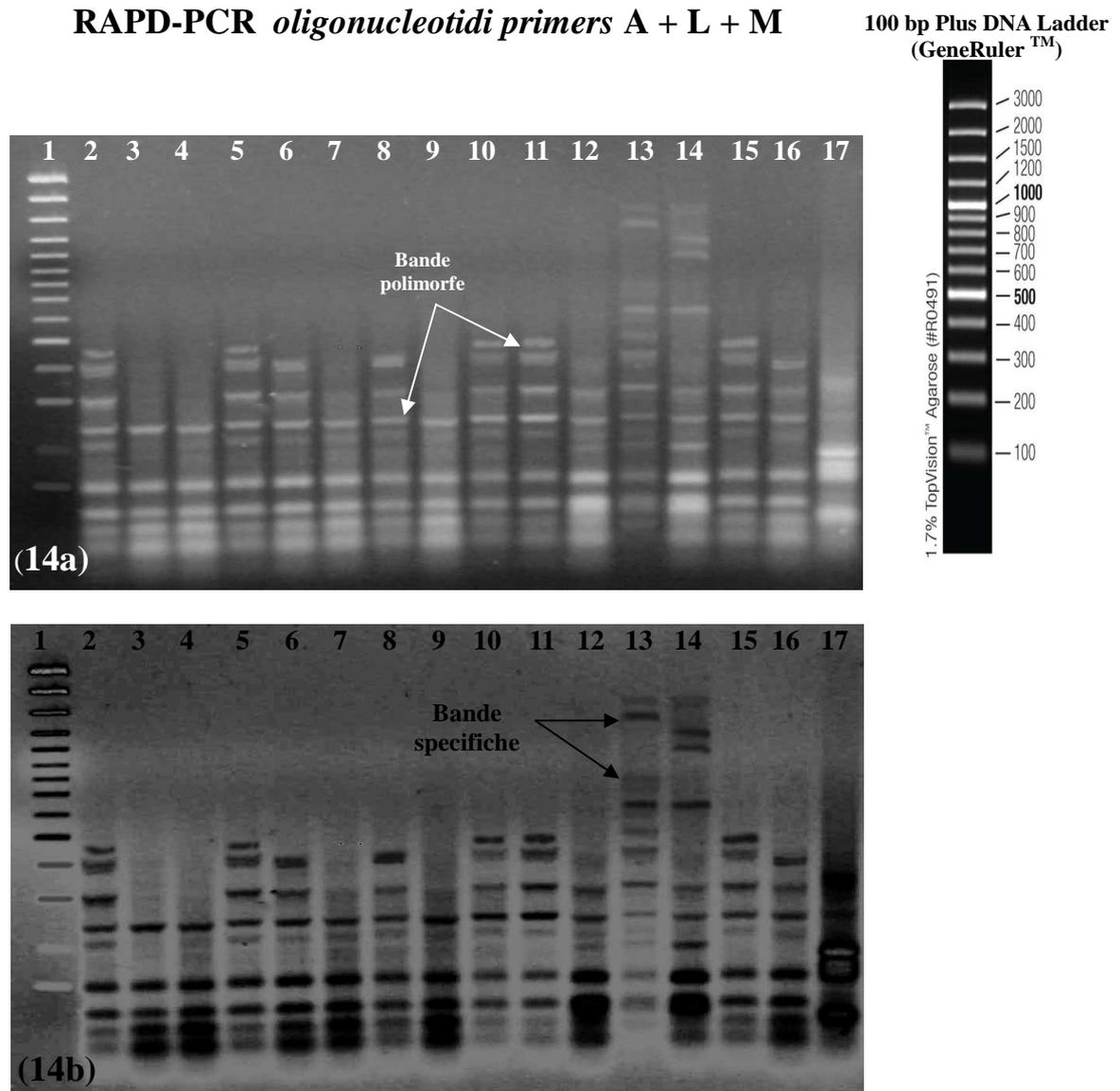
L'attendibilità dei risultati presentati è altresì validata dall'assenza di bandeggio nel controllo negativo costituito dalla miscela di reazione priva di DNA. Nella tabella 13 viene riportato il Coefficiente di similitudine genetica dato dalla formula  $F = 2N_{sls} / (N_{sl} + N_s)$  secondo il modello proposto da Nei and Li (1979).

Tabella 13 -  $F = 2N_{sls} / (N_{sl} + N_s)$

	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	Ph6	Ph7	Ph8	Ph9	Ph10	Ph11	Ph12	Ph13	Ph14	Ph15
Ph 1	1.0														
Ph 2	0.94	1.0													
Ph 3	0.94	0.88	1.0												
Ph 4	0.88	0.82	0.84	1.0											
Ph 5	0.94	0.88	1.0	0.84	1.0										
Ph 6	1.0	0.94	0.94	0.88	0.94	1.0									
Ph 7	0.88	0.82	0.84	1.0	0.84	0.88	1.0								
Ph 8	0.94	1.0	0.88	0.82	0.88	0.94	0.82	1.0							
Ph 9	0.88	0.82	0.84	1.0	0.84	0.88	1.0	0.82	1.0						
Ph 10	0.88	0.82	0.84	1.0	0.84	0.88	1.0	0.82	1.0	1.0					
Ph 11	0.85	0.80	0.81	0.76	0.81	0.85	0.76	0.80	0.76	0.76	1.0				
Ph 12	0.80	0.73	0.85	0.66	0.85	0.80	0.70	0.73	0.66	0.66	0.78	1.0			
Ph 13	0.81	0.76	0.86	0.72	0.78	0.81	0.72	0.76	0.72	0.72	0.88	0.83	1.0		
Ph 14	0.66	0.57	0.62	0.80	0.62	0.66	0.80	0.57	0.80	0.80	0.55	0.58	0.52	1.0	
Ph 15	0.75	0.66	0.70	0.87	0.70	0.75	0.87	0.66	0.87	0.87	0.63	0.55	0.50	0.57	1.0

Campioni	Specie
Ph1	<i>Amblyseius andersoni</i>
Ph2	<i>Kampimodromus aberrans</i>
Ph3	<i>Kampimodromus ericinus</i>
Ph4	<i>Phytoseiulus phragarye</i>
Ph5	<i>Phytoseiulus macropilis</i>
Ph6	<i>Amblyseius cucumeris</i>
Ph7	<i>Amblyseius swirskii</i>
Ph8	<i>Cydnodromus californicus</i>
Ph9	<i>Typhlodromus pyri</i>
Ph10	<i>Euseius stipulatus</i>
Ph11	<i>Typhlodromus exhilaratus</i>
Ph12	<i>Phytoseiulus longipes</i>
Ph13	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
Ph14	<i>Cydnodromus picanus</i>
Ph15	<i>Iphiseius degenerans</i>

**RAPD-PCR oligonucleotidi primers A + L + M**



**Figura 14: esempio di risoluzione elettroforetica RAPD. A+L+M..**

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione RAPD ottenuti dalla associazione casuale sul DNA stampo isolato da singoli individui allestiti per preparati microscopici, mediante 3 oligonucleotidi *primers* A, L ed M ed utilizzati per l'innesco delle cinetiche di polimerizzazione.

I singoli amplificati ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl erano caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X alla contemporanea presenza di: 1) - marcatore noto di peso molecolare 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™) utilizzato come riferimento dell'andamento della corsa elettroforetica; 2) - amplificato corrispondente a DNA noto non riconducibile alla famiglia dei Phytoseiidae utilizzato quale controllo positivo; 3) - controllo negativo costituito da mix di reazione in assenza di DNA per all'attendibilità dei bandeggi rilevati.

**Pannello (14a):** acquisizione mediante il software DOC-It LS versione 5.5.4.

**Pannello (14b):** analisi mediante Adobe Photoshop CS2.

Corsia 1: Marcatore noto

Corsia 2: *Amblyseius andersoni*

Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*

Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*

Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*

Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*

Corsia 7: *Amblyseius cucumeris*

Corsia 8: *Amblyseius swirskii*

Corsia 9: *Cydnodromus californicus*

Corsia 10: *Typhlodromus pyri*

Corsia 11: *Euseius stipulatus*

Corsia 12: *Typhlodromus exhilaratus*

Corsia 13: *Phytoseiulus longipes*

Corsia 14: *Phytoseiulus persimilis*

Corsia 15: *Cydnodromus picanus*

Corsia 16: *Iphiseius degenerans*

Corsia 17: Controllo positivo

Con la combinazione di primers A + L + M, la cinetica di amplificazione molecolare eseguita ha consentito di evidenziare un pattern elettroforetico di 25 bande, 3 di esse sono comuni tra le varie specie, definiti bandeggi non polimorfi, 15 sono comuni solo ad alcune specie e vengono chiamati bandeggi polimorfi, inoltre sono presenti 7 bande specifiche, una di circa 380bp, presente solo in *I. degenerans* (corsia 16), quattro bande presenti solo in *P. longipes* (corsia 13), e due bande presenti solo nella specie *P. persimilis* (corsia 14).

I singoli bandeggi vengono normalizzati grazie alla presenza del marcatore noto di peso molecolare (100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler™) utilizzato per la risoluzione elettroforetica.

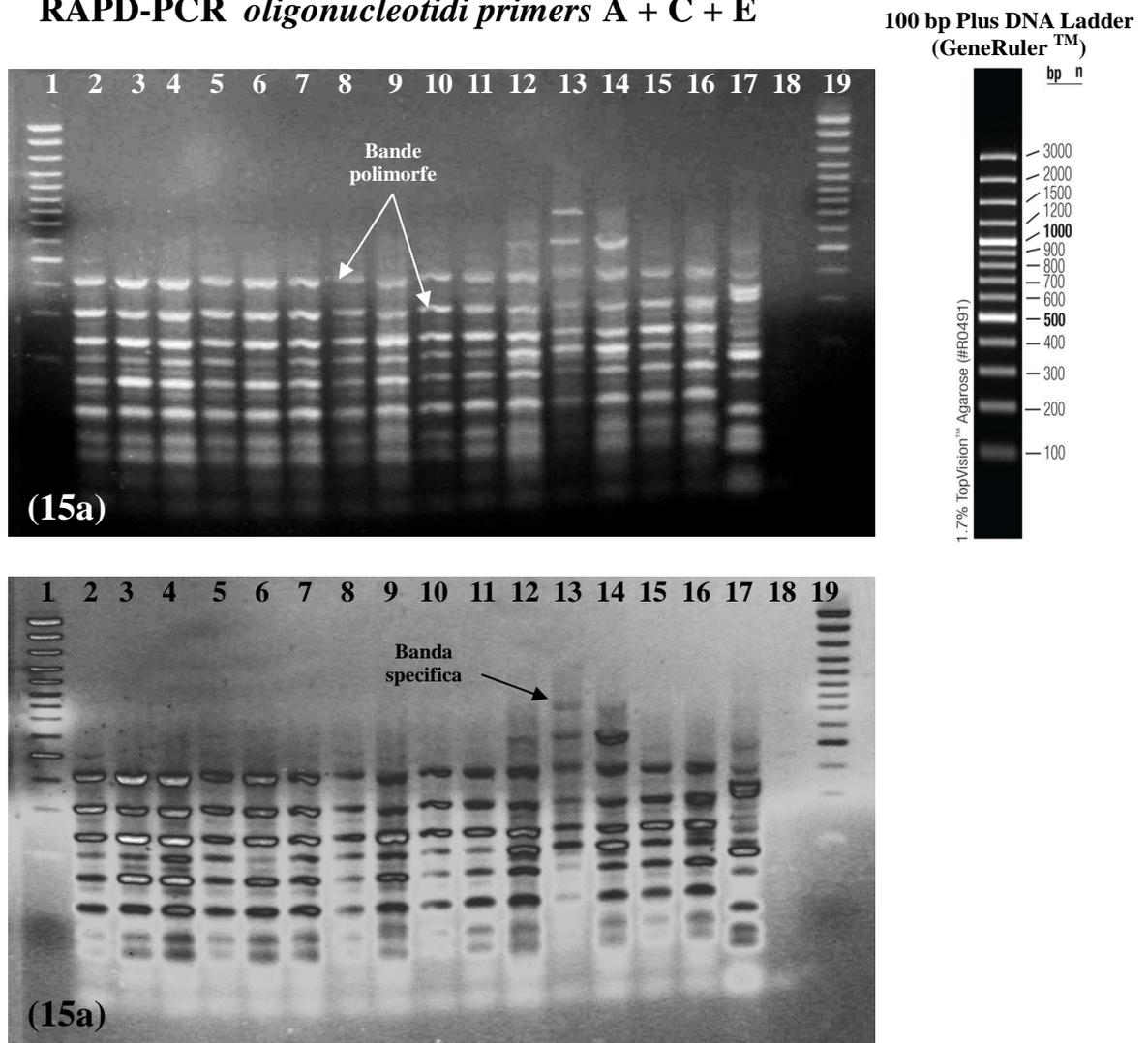
L'attendibilità dei risultati presentati è altresì validata dall'assenza di bandeggio nel controllo negativo costituito dalla miscela di reazione priva di DNA. Anche in questo caso è stato calcolato Coefficiente di similitudine genetica dato dalla formula  $F = 2N_{sls}/(N_{sl} + N_s)$  seguendo il modello proposto da Nei and Li (1979).

**Tabella 14 -  $F = 2N_{sls}/(N_{sl} + N_s)$**   
**A L M**

	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	Ph6	Ph7	Ph8	Ph9	Ph10	Ph11	Ph12	Ph13	Ph14	Ph15
<b>Ph 1</b>	1.0														
<b>Ph 2</b>	0.66	1.0													
<b>Ph 3</b>	0.70	0.83	1.0												
<b>Ph 4</b>	0.90	0.53	0.58	1.0											
<b>Ph 5</b>	0.84	0.57	0.62	0.84	1.0										
<b>Ph 6</b>	0.66	0.76	0.93	0.55	0.58	1.0									
<b>Ph 7</b>	0.70	0.53	0.58	0.80	0.73	0.55	1.0								
<b>Ph 8</b>	0.55	0.61	0.80	0.55	0.70	0.87	0.55	1.0							
<b>Ph 9</b>	0.73	0.57	0.50	0.84	0.66	0.47	0.84	0.47	1.0						
<b>Ph 10</b>	0.73	0.57	0.50	0.84	0.66	0.47	0.84	0.47	1.0	1.0					
<b>Ph 11</b>	0.55	0.61	0.80	0.55	0.70	0.75	0.55	0.87	0.47	0.47	1.0				
<b>Ph 12</b>	0.41	0.42	0.38	0.50	0.43	0.36	0.66	0.36	0.60	0.60	0.36	1.0			
<b>Ph 13</b>	0.40	0.53	0.47	0.40	0.52	0.44	0.40	0.55	0.42	0.42	0.66	0.41	1.0		
<b>Ph 14</b>	0.80	0.53	0.47	0.80	0.84	0.44	0.80	0.55	0.84	0.84	0.55	0.50	0.50	1.0	
<b>Ph 15</b>	0.73	0.57	0.62	0.73	0.88	0.58	0.63	0.70	0.55	0.55	0.70	0.43	0.52	0.73	1.0

Campioni	Specie
Ph1	<i>Amblyseius andersoni</i>
Ph2	<i>Kampimodromus aberrans</i>
Ph3	<i>Kampimodromus ericinus</i>
Ph4	<i>Phytoseiulus phragarye</i>
Ph5	<i>Phytoseiulus macropilis</i>
Ph6	<i>Amblyseius cucumeris</i>
Ph7	<i>Amblyseius swirskii</i>
Ph8	<i>Cydnodromus californicus</i>
Ph9	<i>Typhlodromus pyri</i>
Ph10	<i>Euseius stipulatus</i>
Ph11	<i>Typhlodromus exhilaratus</i>
Ph12	<i>Phytoseiulus longipes</i>
Ph13	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
Ph14	<i>Cydnodromus picanus</i>
Ph15	<i>Iphiseius degenerans</i>

**RAPD-PCR oligonucleotidi primers A + C + E**



**Figura 15: Esempio di risoluzione elettroforetica RAPD. A+C+E.**

Visualizzazione dei prodotti di amplificazione RAPD ottenuti dalla associazione casuale sul DNA stampo isolato da singoli individui allestiti per preparati microscopici, mediante 3 oligonucleotidi *primers* A, C ed E ed utilizzati per l'innesco delle cinetiche di polimerizzazione.

I singoli amplificati ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl erano caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X alla contemporanea presenza di: 1) -marcatore noto di peso molecolare utilizzato come riferimento dell'andamento della corsa elettroforetica; 2) - amplificato corrispondente a DNA noto non riconducibile alla famiglia dei Phytoseiidae utilizzato quale controllo positivo; 3) - controllo negativo costituito da mix di reazione in assenza di DNA per all'attendibilità dei bandeggi rilevati.

**Pannello (15a):** acquisizione mediante il software DOC-It LS versione 5.5.4.

**Pannello (15b):** analisi mediante Adobe Photoshop CS2.

Corsia 1e 19: Marcatore noto  
 Corsia 2: *Amblyseius andersoni*  
 Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*  
 Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*  
 Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*  
 Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*  
 Corsia 7: *Amblyseius cucumeris*  
 Corsia 8: *Amblyseius swirskii*  
 Corsia 9: *Cydnodromus californicus*

Corsia 10: *Typhlodromus pyri*  
 Corsia 11: *Euseius stipulatus*  
 Corsia 12: *Typhlodromus exhilaratus*  
 Corsia 13: *Phytoseiulus longipes*  
 Corsia 14: *Phytoseiulus persimilis*  
 Corsia 15: *Cydnodromus picanus*  
 Corsia 16: *Iphiseius degenerans*  
 Corsia 17: Controllo positivo  
 Corsia 18: Controllo negativo

La cinetica di amplificazione molecolare eseguita con i *primers* A + C + E ha consentito di evidenziare un pattern elettroforetico costituito da 28 bande caratterizzato dalla presenza di 3 bandeggi comuni tra le varie specie, definiti bandeggi non polimorfi, 21 bandeggi polimorfi presenti in alcune specie, e 4 bande specie-specifiche, presenti esclusivamente per una specie.

I singoli bandeggi vengono normalizzati grazie alla presenza del marcatore noto di peso molecolare utilizzato per la risoluzione elettroforetica.

L'attendibilità dei risultati presentati è altresì validata dall'assenza di bandeggio nel controllo negativo costituito dalla miscela di reazione priva di DNA.

Nella tabella 15 viene riportato il Coefficiente di similitudine genetica dato dalla formula  $F = 2N_{sls} / (N_{sl} + N_s)$  secondo il modello proposto da Nei and Lei (1979), il numero dei frammenti o bande di DNA vengono osservati per stabilire quali sono comuni alle specie in esame e quali no, sulla base della contemporanea migrazione e risoluzione elettroforetica.

**Tabella 15 -  $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$**

	Ph1	Ph2	Ph3	Ph4	Ph5	Ph6	Ph7	Ph8	Ph9	Ph10	Ph11	Ph12	Ph13	Ph14	Ph15
<b>Ph 1</b>	1.0														
<b>Ph 2</b>	0.53	1.0													
<b>Ph 3</b>	0.50	0.93	1.0												
<b>Ph 4</b>	0.50	0.93	1.0	1.0											
<b>Ph 5</b>	0.53	1.0	0.93	0.93	1.0										
<b>Ph 6</b>	0.53	1.0	0.93	0.93	1.0	1.0									
<b>Ph 7</b>	0.50	0.93	1.0	1.0	0.93	0.93	1.0								
<b>Ph 8</b>	0.40	0.85	0.93	0.93	0.85	0.85	0.93	1.0							
<b>Ph 9</b>	0.40	0.85	0.93	0.93	0.85	0.85	0.93	1.0	1.0						
<b>Ph 10</b>	0.40	0.85	0.93	0.93	0.85	0.85	0.93	1.0	1.0	1.0					
<b>Ph 11</b>	0.82	0.50	0.58	0.58	0.50	0.50	0.58	0.50	0.50	0.50	1.0				
<b>Ph 12</b>	0.35	0.37	0.35	0.35	0.37	0.37	0.35	0.37	0.37	0.37	0.22	1.0			
<b>Ph 13</b>	0.47	0.62	0.70	0.70	0.62	0.62	0.70	0.75	0.75	0.75	0.66	0.22	1.0		
<b>Ph 14</b>	0.40	0.85	0.93	0.93	0.85	0.85	0.93	1.0	1.0	1.0	0.50	0.37	0.75	1.0	
<b>Ph 15</b>	0.76	0.50	0.46	0.46	0.50	0.50	0.46	0.50	0.50	0.50	0.71	0.28	0.42	0.50	1.0

Campioni	Specie
Ph1	<i>Amblyseius andersoni</i>
Ph2	<i>Kampimodromus aberrans</i>
Ph3	<i>Kampimodromus ericinus</i>
Ph4	<i>Phytoseiulus phragarye</i>
Ph5	<i>Phytoseiulus macropilis</i>
Ph6	<i>Amblyseius cucumeris</i>
Ph7	<i>Amblyseius swirskii</i>
Ph8	<i>Cydnodromus californicus</i>
Ph9	<i>Typhlodromus pyri</i>
Ph10	<i>Euseius stipulatus</i>
Ph11	<i>Typhlodromus exhilaratus</i>
Ph12	<i>Phytoseiulus longipes</i>
Ph13	<i>Phytoseiulus persimilis</i>
Ph14	<i>Cydnodromus picanus</i>
Ph15	<i>Iphiseius degenerans</i>

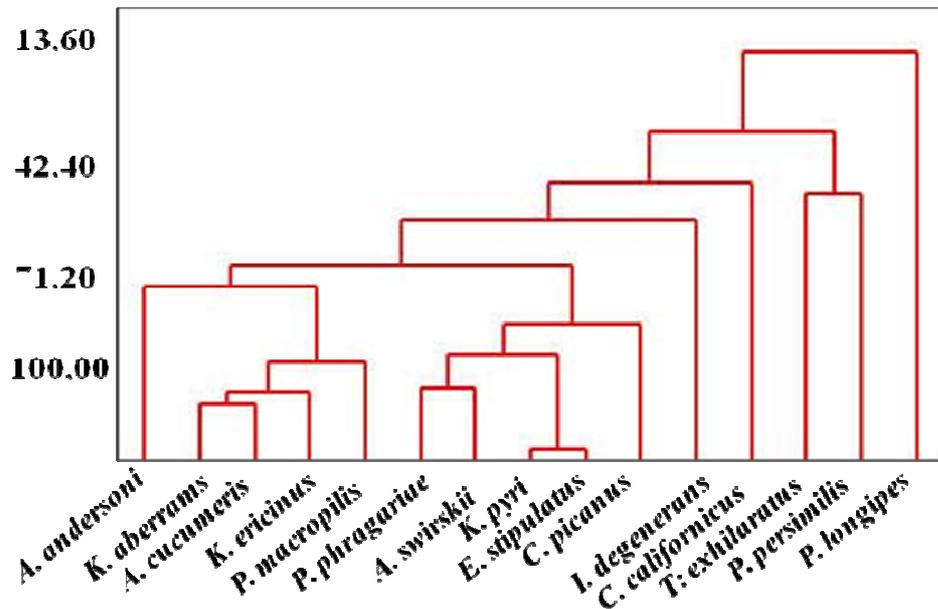
Nella tabella 16 si riporta il numero totale di bande polimorfiche e non polimorfiche che veniva ricavato agli esiti delle caratterizzazioni molecolari, per ogni specie presa in esame.

	Specie	Numero bande Polimorfiche	Numero bande non polimorfiche	Numero bande totali
1	<i>A. andersoni</i>	38	17	55
2	<i>K. aberrans</i>	21	17	38
3	<i>K. ericinus</i>	31	17	48
4	<i>Ph. phragariae</i>	32	17	49
5	<i>Ph. macropilis</i>	35	17	52
6	<i>A. cucumeris</i>	27	17	44
7	<i>A. swirskii</i>	32	17	49
8	<i>C. californicus</i>	43	17	60
9	<i>T. pyri</i>	28	17	45
10	<i>E. stipulatus</i>	26	17	43
11	<i>T. exhilaratus</i>	44	17	61
12	<i>Ph. longipes</i>	49	17	66
13	<i>Ph. persimilis</i>	47	17	64
14	<i>C. picanus</i>	27	17	44
15	<i>I. degenerans</i>	27	17	44
<b>Totale bande</b>		<b>507</b>	<b>255</b>	<b>762</b>

**Tabella 16: numero di bande RAPD prodotte dalle 15 specie analizzate.**

Sulla scorta dell'analisi sommativa dei coefficienti di similitudine calcolati per le singole specie è stato possibile, attraverso il software Mini Tab 15.0, costruire il dendrogramma riportato in figura 16 prendendo in considerazione la distanza di Manhattan.

Figura 16: dendrogramma



In particolare i risultati mostrano che :

➤ I campioni 4 e 5, rispettivamente *Ph. phragariae* e *Ph. macropilis* sono molto vicini tra di loro, come evidenziato anche dall'analisi RAPD condotta con i primers EDF (pannello 11a) dove risultano perfettamente sovrapponibili. Si riporta di seguito il particolare del pannello elettroforetico.

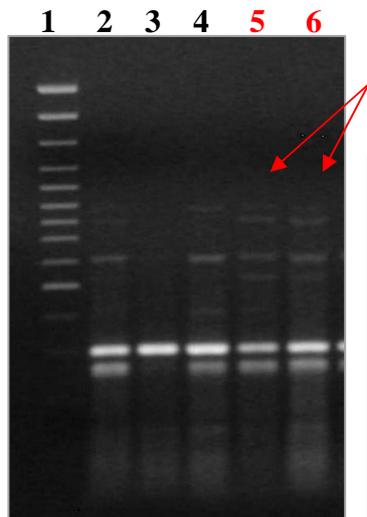


Figura 17: particolare del pannello (11a) dell'analisi RAPD E+D+F.

Si riportano i singoli prodotti ottenuti in un volume di reazione pari a 40  $\mu$ l e caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X.

Corsia 1: Marcatore noto

Corsia 2: *Amblyseius andersoni*

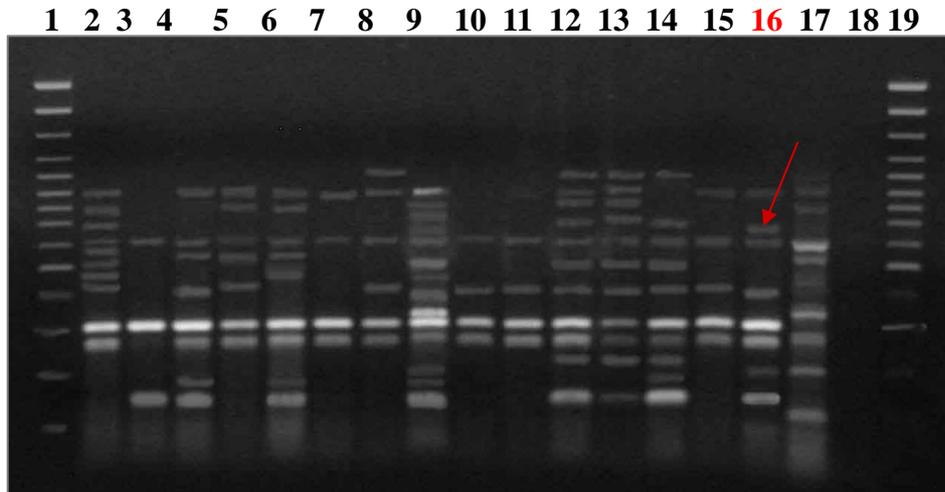
Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*

Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*

Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*

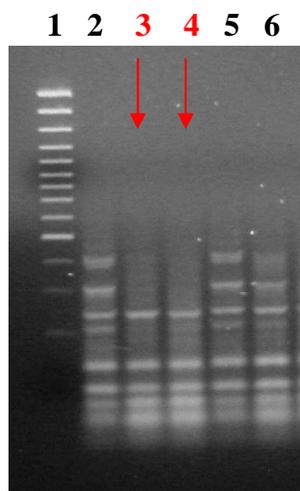
Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*

➤ Il campione numero 15, *I. degenerans*, ha un pattern elettroforetico diverso da tutti gli altri campioni, come evidenziato in figura 18 relativo all'analisi RAPD condotta con i primers E D F, per la presenza di una banda specifica di circa 760 bp riportata di seguito.



**Figura 18: particolare del pannello (11a) dell'analisi RAPD E+D+F. Si riportano i singoli prodotti ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl e caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X.**

➤ I campioni 2 e 3, *K. aberrans* e *K. ericinus*, presentano un pattern sovrapponibile, maggiormente evidente nell'analisi RAPD condotta con gli oligonucleotidi primers ALM, si riporta in figura 19 il particolare del pannello (14a).

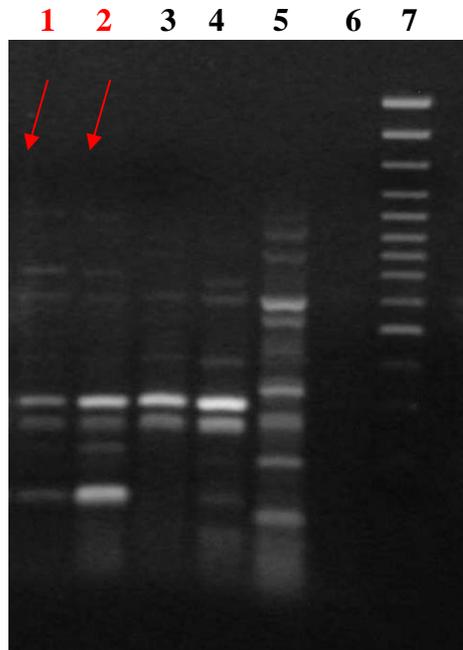


**Figura 19: particolare del pannello (14a) dell'analisi RAPD A+L+M.**

**Si riportano i singoli prodotti ottenuti in un volume di reazione pari a 40 µl e caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X.**

Corsia 1: Marcatore noto  
 Corsia 2: *Amblyseius andersoni*  
 Corsia 3: *Kampimodromus aberrans*  
 Corsia 4: *Kampimodromus ericinus*  
 Corsia 5: *Phytoseiulus phragariae*  
 Corsia 6: *Phytoseiulus macropilis*  
 Corsia 7: *Amblyseius cucumeris*

➤ I campioni 12 e 13, *P. longipes* e *P. persimilis*, presentano un pattern sovrapponibile. Si riporta in figura 20 il particolare del pannello come riportato di seguito, nel particolare del pannello (11a).



**Figura 20: particolare del pannello (11a) dell'analisi RAPD E+D+F.**  
Si riportano i singoli prodotti ottenuti in un volume di reazione pari a 40  $\mu$ l e caricati su gel di agarosio 1,5% in TBE 1X.  
Corsia 1: *Phytoseiulus longipes*  
Corsia 2: *Phytoseiulus persimilis*  
Corsia 3: *Cydnodromus picanus*  
Corsia 4: *Iphiseius degenerans*  
Corsia 5: Controllo positivo  
Corsia 6: Controllo negativo  
Corsia 7: Marcatore noto.

Tuttavia tale risultato non è stato raggiunto per l'intero gruppo delle specie selezionate.

## 7 CONSIDERAZIONI

L'argomento di tesi trattato nelle pagine precedenti ha descritto la messa a punto di metodiche per la configurazione della diagnostica molecolare dei fitoseidi.

Il primo obiettivo raggiunto è stato quello del settaggio e scelta della metodica di estrazione e purificazione del DNA – idoneo per le analisi di amplificazione molecolare – da singolo individuo allestito per preparato microscopico anche risalente alcune di decine di anni orsono.

Il secondo obiettivo raggiunto è stato quello della messa a punto della cinetica di amplificazione molecolare sia funzionale al sequenziamento nucleotidico di porzioni codificanti del genoma mitocondriale, utilizzato quale marcatore classico nella tassonomia e filogenesi dei fitoseidi, che *random* (RAPD) sul DNA purificato *in toto* dai singoli individui da sottoporre ad analisi, allo scopo di avvalersi di uno strumento che potesse contribuire a dirimere aspetti controversi circa la classificazione degli stessi secondo tassonomia classica.

Come già accennato nella sezione introduttiva del presente elaborato è di grande interesse la corretta caratterizzazione dei fitoseidi in quanto essi rivestono un ruolo naturale di antagonismo di acari fitofagi dannosi per le colture arboree.

L'analisi molecolare è stata, pertanto, condotta su un gruppo di 15 specie di fitoseidi e gli esiti delle indagini molecolari hanno consentito la realizzazione ed il calcolo del coefficiente di similarità tra le singole specie e la costruzione dei relativi dendrogrammi, tanto avvalendosi della metodica del sequenziamento delle subunità 12S rRNA e COI mtDNA, quanto con la metodica RAPD utilizzando 7 diverse cinetiche molecolari ciascuna delle quali si è avvalsa del potere risolutivo di 3 differenti oligonucleotidi *primers*.

Dal confronto molecolare tra i rispettivi dendrogrammi si può ricavare che per alcune specie si osserva piena sovrapposizione in termini di vicinanza nella scala evolutiva; tuttavia tale risultato non è stato raggiunto per tutte le specie selezionate.

Il significato genetico da attribuire alle evidenze degli esiti di laboratorio potrebbe essere riassunto affermando che la metodica RAPD, dato l'elevato potere

discriminativo, in grado di mettere in evidenza anche variabilità intraspecifiche, può essere considerata risolutiva nella determinazione specifica.

Di conseguenza può essere valutata una tecnica indispensabile nei casi di discriminazione di specie gemelle. Tuttavia, proprio questa caratteristica potrebbe rappresentare un limite per la sua utilizzazione nella classificazione dei fitoseidi, specialmente nei raggruppamenti sopraspecifici; D'altra parte questo limite da noi evidenziato, potrebbe essere solamente legato sia al numero che alla tipologia dei marcatori random scelti. Un numero maggiore di marcatori o la selezione di altri marcatori potrebbe determinare un maggiore potere discriminante al fine di una caratterizzazione sopraspecifica più dettagliata.

Si ritiene, pertanto, che entrambe le metodiche molecolari, il sequenziamento del genoma mitocondriale e l'analisi di tipo *random*, non possano, allo stato, prescindere dall'analisi tassonomica classica.

Tuttavia, i dati fin qui ottenuti sono considerati incoraggianti in quanto pongono le basi per ulteriori approfondimenti che gli studiosi del settore ritengono oramai un indispensabile strumento di supporto alla classificazione morfologica classica.

## BIBLIOGRAFIA

- ❖ Angeli, G., Forti, D., Maines, R. (2000). Side effects of eleven insect growth regulators on the predatory bug *Orius laevigatus* Fieber (Heteroptera: Anthocoridae). IOBC WRSP Bulletin 23 (9): 85 - 92.
- ❖ Athias-Henriot, C. (1977). Nouvelles notes sur les Amblyseini. III. Sur le genre *Cydnodromus*: Redefinition, composition (Parasitiformes, Phytoseiidae). *Entomophaga*, 22, 61–73.
- ❖ Athias-Henriot, C. (1978). Définition de *Dictyonotus* nov. gen., avec description de deux espèces nouvelles de France méridionale (Gamasides, Phytoseiidae). *Entomophaga* 23(2): 189-194.
- ❖ Benham, G.S. (1974). A synopsis of the obligate and facultative insect parasitic nematodes. *J. Invertebr. Path.*, 24 (3): 263-270.
- ❖ Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767-1780.
- ❖ Bortolotti, L., Nanni, C., Porrini, C., Sbrenna, G., Celli, G. (1999). Effetti di Fenoxycarb su larve di *Chrysoperla carnea*. - *Inf.tore Fitopatol.*, 49 (4): 48-52.
- ❖ Brader, L. (1977). Resistance in mites and insects affecting orchard crops.- In: Watson D.L. & Brown A.W. (eds) "Pesticide management and insecticide resistance", Academic Press: 353-376.
- ❖ Brown, A.W.A. (1974). The safety of biological agents for arthropod control. - *Int. Pest Contr.*, 16 (4): 13-16.
- ❖ Caterino, M. S., Cho S., Sperling, F. A. H. (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45: 1-54.
- ❖ Chant, D. A. & McMurtry, J. A. (2003a). A review of the sub family Amblyseinae Muma (Acari: Phytoseiidae): Part 1. Neoseiulini new tribe. *International Journal of Acarology*, 29(1), 3–46.
- ❖ Chant, D. A. & McMurtry, J. A. (2003b). A review of the subfamily Amblyseinae Muma (Acari: Phytoseiidae). Part II. The tribe Kampimodromini Kolodochka. *International Journal of Acarology*, 29(3), 179–224.

- ❖ Chant, D. A. & McMurtry, J. A. (2007). Illustrated Keys and Diagnoses for the Genera and Subgenera of the Phytoseiidae of the World (Acari: Mesostigmata) (p. 220). Michigan: Indira Publishing House.
- ❖ Chant, D. A. & Yoshida-Shaul, E. (1987). A world review of the pyri species group in the genus *Typhlodromus* Scheuten (Acari: Phytoseiidae). *Canadian Journal of Zoology*, 65(7), 1770–1804.
- ❖ Chant, D. A. (1955). Notes on mites of the genus *Typhlodromus* Scheuten, 1857 (Acarina: Laelaptidae), with descriptions of the male of some species and the female of a new species. *Can. Ent.* 87 (11) : 496-503.
- ❖ Chant, D. A. (1959). Phytoseiid mites (Acarina: Phytoseiidae). Part I. Bionomics of seven species in Southeastern England. Part II. A taxonomic review of the family Phytoseiidae, with descriptions of 38 new species. *Can. Entomol.* 91: 1-166.
- ❖ Chapman, R.F. (1974). Chemical inhibition of feeding by phytophagous insects a review. *Bull. Ent. Res.*, 64:339-363.
- ❖ Crosby, D.G. (1971). *Minor insecticides of plant origin.* - Marcel Dekker Inc., New York, 1-589
- ❖ Croteau, D.L., Stierum, R.H., Bohr, V.A. (1999). Mitochondrial DNA repairs pathways. *Mutat. Res.* 434: 137-148.
- ❖ Dosse, G. (1958). Uber einige neue Raubmilbenarten (Acar., Phytoseiidae). *Pflanzenschutzberichte*, 21: 44-61.
- ❖ Duso, C, Camporese, P., Van Der Geest, P.S. (1992). Toxicity of a number of pesticides to strains of *Typhlodromus pyri* and *Amblyseius andersoni* (Acari: Phytoseiidae). *Entomophaga*, 37 (3): 363-372.
- ❖ Elbadry, L.A. & Elbenhawy, L.M. (1968). The effects of pollen feeding on the predatory efficiency of *Amblyseius gossipi* (Acarina: Phytoseiidae). *Entomol. Exp. Appl.* 11(3): 273-276.
- ❖ Evans, G. O. (1993). *Principles of Acarology.* Ed. C. A. B. Internat., Wallingford: 563 pp.
- ❖ Fauvel, G. & Cotton, D. (1981). Evolution des populations de tiphlodromes, *Amblyseius aberrans* (Oudms.) essentiellement, (Acariens: Phytoseiides) dans une haie d'ormes et un verger de pommiers et observations sur leur transport par le vent.- *Sixieme Jour. Phytoiatric*

- ❖ Ferragut, F. & Escudero, A. (1997). Taxonomía y distribución de los ácaros depredadores del género *Euseius* Wainstein 1962, en España (Acari: Phytoseiidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 23: 227-235.
- ❖ Fisher, R. A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford [Variorum edition, BENNETT, J. H. (Editor), 1999, Oxford University Press, Oxford].
- ❖ Grogan, W. L., Navai, S. (1975). New record of mites associated with ceratopogonids (Diptera: Ceratopogonidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 77: 214-215 pp.
- ❖ Harrison, R. G. (1989). Mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 6-11.
- ❖ Hassan S.A, Bigler, F., Bogenschütz H., Boller E., Brun J., Calis J.N.M., Chiverton P., Coremans-Pelseneer J., Duso C., Lewis G., Mansour F., Moreth L., Oomen P.A., Overmer W.P.J., Polgar L., Rieckman W., Samsøe-Petersen L., Stäubli A., Sterk G., Tavares K., Tuset J.J., Viggiani G. (1991). Results of the fifth joint pesticide testing programme, IOBC/WPRS - Working Group "Pesticide and Beneficial Organisms". - *Entomophaga*, 36 (1): 5 -67.
- ❖ Haymer, D. S. (1994). Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and they can tell us anything we don't already know? *Annals of the Entomological Society of America* 87: 717-722.
- ❖ Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., De Waard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes- *Proc. R.I Soc. Biol. Sci.*, 270: 313-321.
- ❖ Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2(10):312.
- ❖ Hillis, D.M. and Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* 66: 411-429. 770
- ❖ Hillis, D.M. and Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* 66: 411-429. 770

- ❖ Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B. (1996). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts, USA.
- ❖ Hoy, M. A. (2003). *Insect molecular genetics an introduction to principles and applications*. 2nd ed. Academic press, San Diego, CA.
- ❖ Jaya, R. Soneji, P.S., Rao And Minal Mhatre. (2002). Suitability of RAPD for Analyzing Spined and Spineless Variant Regenerants of Pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.) *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 307a–307i.
- ❖ Jeyaprakash ,A., Hoy, M. A. (2002). Mitochondrial 12S rRNA sequences used to design a molecular ladder assay to identify sic commercially available phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) *Biol. Control* 25 (2): 136-142.
- ❖ Kenyon, L., Moraes, C.T., (1997). Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial cybrids. *Cell Biology* 94 (17): 9131-9135.
- ❖ Kranz G. W., 1973 – Dissemination of *Kampimodromus aberrans* by Filbert Aphid. *J. Econ. Ent.*, 66(2): 575-576 pp.
- ❖ Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. B. & Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Tempe, AZ: Arizona State University.
- ❖ Lin, C.-P., e B. N. Danforth. (2004). How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 686-702.
- ❖ Loxdale, H. D., e Lushai G.. (1998). Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88: 577-600.
- ❖ Magalhães, S., Forbes M.R., Skoracka, A., Osakabe, M., Chevillon, C., McCoy K. (2007). Host race formation in the Acari. *Exp. Appl. Acarol.*, 42(4): 225-238.
- ❖ McEwen, F.L. (1977). Pesticide residues and agricultural workers. An overview. In: *Pesticide management and insecticide resistance*. In: Watson D.L. & Brown A.W. (eds), *Academic Press*: 37-49.
- ❖ McMurtry, J.A., Croft, B.A. (1997). Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control- *Ann. Rev. Entomol.*, 42: 291-321.
- ❖ McMurtry, J.A. & Rodriguez, J. G. (1987). Nutritional ecology of Phytoseiid mites. In F. Slansky Jr. and J. G. Rodriguez (Ed.), *Nutritional ecology of Insects, Mites and Spiders*. John Wiley, New York: 609-644 pp.
- ❖ McMurtry, J.A. (1982). The use of phytoseiid mites for biological control: progress and future prospects. In M. A. Hoy (Ed.), *Recent advances in the*

knowledge of Phytoseiidae. Div. Agric. Univ. California Publ., 3284 pp.: 23-48 pp.

- ❖ Mendel, Z., Blumberg, D., Ishaaya, I. (1994). Effects of some insect growth regulators on natural enemies of scale insects (Hom: Coccoidea). - *Entomophaga* 39 (2): 199- 209.
- ❖ Moraes, G. J., McMurtry, J. A., Denmark, H. A. & Campos, C. B. (2004). A revised catalog of the mite family Phytoseiidae. *Zootaxa*, 434, 1–494.
- ❖ Moritz, C., Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls —*PloS Biol.*, 2: 1529-1531.
- ❖ Muma, M.H., Denmark, H.A. (1968). Some generic descriptions and name changes in the family Phytoseiidae (Acarina:Mesostigmata). *Florida Entomologist* 51(4): 229-240.
- ❖ Navajas, M. & Fenton, B. (2000). The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 751–774.
- ❖ Navajas, M., Gutierrez, J. & Lagnel, J. (1996) Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bulletin of Entomological Research* 86, 407-417.
- ❖ Nei, M., & Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 76, No. 10, pp. 5269-5273,
- ❖ Ogram, A. and Feng, X. (1997). Methods of soil microbial community analysis. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.C., McInerney, M.J., Stetzenback, L.D., Walter, M.V. (Eds), *Manual of Environment Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 422-430.
- ❖ Okassa *et al.* (2008). Molecular biology for Phytoseiidae identification: Preliminary results. *Integrative Acarology. Proceedings of the 6th European Congress*: 62-69.
- ❖ Okassa, M., Tixier, M.-S., Cheval, B., Kreite, S. (2009). Molecular and morphological evidence for new species status within the genus *Euseius* (Acari: Phytoseiidae) - *Can. J. Zool.*, 87: 689-698.
- ❖ Okassa, M., Tixier, M.-S., Kreiter, S. (2010). The use of two mitochondrial DNA fragments (12S rDNA and Cytb mtDNA) for assessing the diagnosis of

*Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot and *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae) — Exp. Appl. Acarol. on line first doi: 10.1017/s10493-010-9364-.

❖ Onillon, J.C. (1974). Study of the population dynamics of citrus Homoptera. First observations on the biological control of *Aleurothrixus floccosus* (Aleurodidae) by *Cales noacki* (Aphelinidae). - *Fruits.*, 29: 4, 291-295.

❖ Radford, C.D. (1950). Systematic check list of mite genera and type species. International Union of Biological Sciences Ser.C, n°1: 1-232.

❖ Ragusa Di Chiara, S. & Tsolakis, H. (1995). Influences of different kinds of food substances on the postembryonic development and oviposition rate of *Amblyseius andersoni* (Chant) (Parasitiformes, Phytoseiidae).- In: The Acari - Physiological and Ecological Aspects of Acari-Host Relationships (Kropczynska D., Boczek J. and Tomczyk A. Editors): 411-419.

❖ Ragusa Di Chiara, S., Tsolakis, H. (1994). Revision of the genus *Kampimodromus* Nesbitt 1951 (Parasitiformes, Phytoseiidae), with a description of a new species. *Acarologia* 35(4): 305- 322.

❖ Ragusa, S. & Tsolakis, H. (2005). I fitofarmaci di origine vegetale: Cenni storici, attualità e prospettive di sviluppo Marsala 10-11 ottobre 2005 Università degli Studi di Palermo - pp. 205-222.

❖ Ragusa, S. (1979). Laboratory studies on the food habits of the predaceous mite *Typhlodromus exhilaratus*. *Recent Advances in Acarology*, 1: 485-490.

❖ Ragusa, S., Athias-Henriot, C. (1983). Observations on the genus *Neoseiulus* Hughes (Parasitiformes, Phytoseiidae). Redefinition. Composition. Geography. Description of two new species. *Revue Suisse de Zoologie* 90(3): 657-678.

❖ Sabelis, M.W. (1985). Capacity for population increase. Pp. 35-41 in: W. Helle and M.W. Sabelis (Eds.), *Spider mites, their biology, natural enemies and control*», Vol. IB, *Elsevier*, Amsterdam.

❖ Sabelis, M.W. (1985a). Development. In: "Spider Mites: their Biology, Natural Enemies and Control." W. Welle & M.W. Sabelis. Amsterdam. Elsevier, vol. I B: pp. 43-54.

❖ Sabelis, M.W. (1985b). Capacity for Population Increase. In: "Spider Mites: their Biology, Natural Enemies and Control." W. Welle & M.W. Sabelis. Amsterdam. Elsevier, vol. I B: pp. 35-42.

- ❖ Sorenson, M. D., e Fleischer, R. C. (1996). Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proceeding of the National Academy of Science* 93: 15239-15243.
- ❖ Spear, R. C., Jankins, D.L., Milby, T.H. (1975). Pesticide residues and field workers. - *Environ. Sci. Technol.*, 9: 308-313.
- ❖ Tixier, M. S, Okassa, M., Liguori, M.L., Poinso, A., Salerno, B., Kreiter, S. (2010). Voucher specimens for DNA sequences of Phytoseiid mites (Acari: Mesostigmata). *Acarologia*, 22: 487-494.
- ❖ Tixier, M. S., Ferrero, M., Okassa, M., Guichou, S., Kreiter, S. (2010). Morphological and molecular analyses of four populations of *Phytoseiulus longipes* (Mesostigmata: Phytoseiidae) in accordance with their feeding behaviour. *Bull. Entomol. Res.*, 100(5): 569-579. doi:10.1017/S0007485309990617.
- ❖ Tixier, M. S., Kreiter, S., Auger, P. & Weber, M. (1998). Colonization of Languedoc vineyards by phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae): influence of wind and crop environment. *Experimental & Applied Acarology* 22: 523-542.
- ❖ Tixier, M. S., Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S., Cheval, B. (2006a). The status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy— *Zool. Scr.*, 35: 115-122.
- ❖ Tixier, M. S., Kreiter, S., Croft, B. A., Cheval, B. (2008). *Kampimodromus aberrans* (Acari: Phytoseiidae) from USA: morphological and molecular assessment of its identity — *Bull. Entomol. Res.*, 98: 125-134.
- ❖ Tixier, M. S., Kreiter, S., Ferragut, F., Cheval, B. (2006b). Morphological and molecular evidences for the synonymy of *Kampimodromus hmiminai* McMurtry & Bounfour and Ferragut K.& Pena-Estevez (Acari: Phytoseiidae) - *Can. J. Zool.*, 84 (8): 1216-1222.
- ❖ Treat, A. E. (1969). Behavioural aspects of the association of mites with noctuid moths. *Proc. II° Int. Congr. Acarol.*, Sutton Bonington, England, 1967: 275-286 pp.
- ❖ Tsolakis *et al.* (2012). The concept of genus within the family Phytoseiidae (Acari: Parasitiformes): Historical review and phylogenetic analyses of the genus *Neoseiulus* Hughes. *Zoological Journal of the Linnean Society*.

- ❖ Tsolakis, H., Ragusa Di Chiara, S. (1994). Biological and life table parameters of *Amblyseius andersoni* (Chant) (Parasitiformes, Phytoseiidae) on different kinds of food substances. *Phytophaga*, 5: 21-28 XX.
- ❖ Tsolakis, H., Ragusa, E. & Ragusa, S. (1997). Importanza della flora spontanea ai margini degli agroecosistemi per gli acari fitoseidi (Parasitiformes, Phytoseiidae). *Naturalista sicil*, S. IV, XXI (Suppl.): 159-173.
- ❖ Viggiani, G., Iannaccone, F. (1972-1973). Observations on the biology and on the parasites of the Diaspini *Chrysomphalus dictyospermi* (Morg.) and *Lepidosaphes beckii* (Newm.) carried out in Campania in the three-year period 1969-1971. - *Boll. Lab. Ent. Agr. 'Filippo-Silvestri'-Portici.*, 30: 104-116.
- ❖ Viggiani, G., Loia, M. (1991). I rischi della lotta agli insetti dannosi con i regolatori di crescita. - *Inf.tore agr.*, 47: 67-69.
- ❖ Wainstein, B. A. (1962). Révision du genre *Typhlodromus* Scheuten, 1857 et systématique de la famille des Phytoseiidae (Berlese, 1916) (Acarina: Parasitiformes). *Acarologia* 4(1): 5-30.
- ❖ Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10(4): 506-13
- ❖ Williams, Kubelik, J.G.K., Kenneth, A. R., Livak, J., Antoni Rafalski, J. and Scott V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22.

*Ringraziamenti*

*Questo progetto di ricerca è nato dalla collaborazione di agronomi e biologi, ognuno con competenze diverse che mi hanno permesso di accrescere ancora di più il mio bagaglio culturale. Per questo motivo sono tante le persone da ringraziare.*

*Prima di tutto desidero ringraziare il mio relatore professore Stefano Colazza per la pazienza dimostrata in questo ultimo anno, il professore Salvatore Ragusa Di Chiara per aver fornito tutte le specie analizzate, il professore Haralabos Tsolakis per la disponibilità e la cura nella stesura della tesi, il dottore Ernesto Ragusa e tutti i ragazzi del laboratorio di Acarologia applicata per la simpatia e la disponibilità, la dottoressa M.S. Tixier per l'incredibile esperienza in Francia, ed infine la professoressa Elena Carra per tutto quello che mi ha insegnato in questi anni e per aver creduto in me.*

*Un grazie anche a tutti i mie amici, in particolare a Iolanda, Rosa e Sergio per essermi stati vicino ed avermi supportato e sopportato nei momenti di crisi.*

*Infine ringrazio la mia famiglia, mia madre Maria, mio padre Salvatore e mia sorella Rossana, per il profondo amore e per avermi sempre incoraggiato ad andare avanti, permettendomi di coltivare le mie passioni.*

*Un grazie particolare va a mia nonna Maria Barbara, per la sua dolcezza, la bontà d'animo e la tenacia che dimostra anche nei momenti più difficili, spero un giorno di essere come lei, non soltanto per averne ereditato il nome.*