

## Validazione di geni di riferimento per l'analisi dell'espressione genica mediante qRT-PCR nell'afide *Megoura viciae* (Hemiptera: Aphididae)

G. Grossi<sup>1</sup>, G. Cristiano<sup>1</sup>, A. Scala<sup>1</sup>, C. Scieuzo<sup>1</sup>, M. Nardiello<sup>1</sup>, S. Laurino<sup>1</sup>, A. R. Santandrea<sup>1</sup>, R. Salvia<sup>1</sup>, M. Petrone<sup>1</sup>, F. Villani<sup>2</sup>, S. A. Bufo<sup>1</sup>, P. Fanti<sup>1</sup>, P. Falabella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi della Basilicata - Dipartimento di Scienze; <sup>2</sup>TAB consulting Srl

La Real Time PCR quantitativa (qRT-PCR) rappresenta una tra le metodologie più sensibili per l'analisi quantitativa dell'espressione genica. La validazione di geni di riferimento selezionati, con un livello di espressione stabile nei differenti campioni analizzati è di fondamentale importanza per una corretta normalizzazione dei risultati ottenuti, a causa della probabilità di introduzione, nel corso delle analisi, di un elevato numero di errori non intenzionali. Per fornire un sicuro elemento di riferimento per future analisi di espressione genica nell'afide *Megoura viciae*, Buckton (Hemiptera: Aphididae), parassita delle coltivazioni di leguminose, sono stati valutati otto differenti geni nei quattro stadi di sviluppo e nelle due forme dell'adulto (alata ed aptera). I geni selezionati codificano per la proteina ribosomiale L32 (RPL32), la flavoproteina 1 della NADH deidrogenasi (ubichinone) (NADH), la subunità A del complesso della succinato deidrogenasi (SUCC), la proteina ribosomiale S9 (RPS9), la TATA-box binding protein (TATA), l'actina (ACT), la  $\beta$ -tubulina (TBU) e la proteina coniugata all'ubiquitina (UBIQ). Al fine di comparare i livelli di espressione di questi geni è stato utilizzato il classico approccio comparativo basato sul  $\Delta C_t$  che confronta l'espressione relativa di coppie di geni in ogni campione, identificando i geni con  $\Delta C_t$  costante, e tre differenti software: geNorm, basato sul presupposto che due geni di riferimento ideali abbiano rapporti di espressione identici in diversi campioni; NormFinder, che utilizza un algoritmo in grado di fornire un valore di stabilità dei geni legato alla varianza intra-gruppo e indipendente dal gene e dal campione; BestKeeper, che fornisce informazioni sulla variazione dell'espressione genica in tutti i campioni. I risultati hanno indicato che due fra i geni analizzati rappresentano la migliore coppia di geni di riferimento nei diversi stadi di sviluppo dell'afide. Lo studio ha, inoltre, messo in evidenza che il gene codificante per l'actina, comunemente usato come gene house-keeping per la normalizzazione, ha mostrato le peggiori caratteristiche tra tutti i geni esaminati, per tale utilizzo. Infine, sono state confrontate e sottolineate le differenze tra un metodo classico di normalizzazione, utilizzando l'actina come gene di riferimento, e i risultati ottenuti sfruttando i migliori geni di riferimento individuati nel nostro studio. Tale analisi è stata condotta sulla valutazione dei livelli di espressione del gene codificante per OBP4, una odorant-binding protein di *Megoura viciae*.