



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE

CHARLES DARWIN

UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"

CORSO DI DOTTORATO IN BIOLOGIA ANIMALE

XXVI° CICLO

(2010 – 2013)



Silvia Belvedere

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Aspetti del sistema nuziale del Punteruolo rosso  
delle palme (*Rhynchophorus ferrugineus*):  
un approccio molecolare e bioinformatico.

*PhD Dissertation*

*Mating system aspects of the Red palm weevil*

*(Rhynchophorus ferrugineus):*

*a molecular and bioinformatic approach.*



Roma, Ottobre 2015

# INDICE

<b>1. Introduzione</b>	1
<b>1.1. Il Punteruolo rosso delle palme: importanza e pericolosità</b>	1
<b>1.1.1 Collocazione tassonomica</b>	2
<b>1.1.2. Caratteristiche morfologiche</b>	2
<b>1.1.3. Ciclo vitale e riproduzione</b>	3
<b>1.1.4. Area di distribuzione primaria e secondaria</b>	7
<b>1.1.5. Nozioni pregresse di variabilità genetica della specie su basi molecolari</b>	8
<b>1.1.6. Piante ospiti</b>	10
<b>1.1.7. Modalità e segni di infestazione della pianta ospite</b>	10
<b>1.1.8. Forme di controllo</b>	11
<b>1.2. Importanza dello studio del sistema nuziale nel controllo di specie dannose come <i>R. ferrugineus</i></b>	15
<b>1.3. Accoppiamenti multipli e selezione sessuale post-copula negli insetti</b>	17
<b>1.3.1. Costi e benefici dell'accoppiamento multiplo: il significato della Poliandria</b>	17
<b>1.3.2. Competizione spermatica</b>	22
<b>1.3.2.1. Adattamenti del maschio per la priorità dello sperma</b>	22
<b>1.3.2.2. Adattamenti per impedire alla femmina di riaccoppiarsi</b>	26
<b>1.3.3. Scelta criptica post-copula della femmina</b>	28
<b>1.3.3.1. Effetto materno</b>	29
<b>1.3.4. <i>Last male sperm precedence</i></b>	32
<b>1.3.5. Alcune considerazioni pratiche</b>	34
<b>1.4. L'analisi di parentela su base molecolare: un approccio allo studio del <i>mating system</i></b>	36
<b>1.4.1. Aspetti teorici dell'analisi di parentela: i diversi approcci</b>	36

1.4.2. Aspetti pratici dell'analisi di parentela	40
1.4.2.1. Il campionamento e la scelta dei metodi di analisi	40
1.4.2.2. I marcatori molecolari	41
<b>2. Materiali e metodi</b>	<b>44</b>
2.1. Messa a punto <i>ex novo</i> di un pannello di microsatelliti per la specie <i>R. ferrugineus</i>	44
2.1.1. Pirosequenziamento 454	46
2.1.2. <i>Mining</i> bioinformatico dei microsatelliti e progettazione dei <i>primer</i> specifici	50
2.1.3. Selezione dei loci microsatelliti	50
2.1.4. Saggi di amplificazione in vitro tramite PCR e verifica della presenza del microsatellite	51
2.1.5. Analisi elettroforetiche per la verifica dell'efficacia di amplificazione e la quantificazione del DNA	54
2.1.6. Saggi preliminari di polimorfismo	56
2.1.7. Genotipizzazione dei loci microsatelliti tramite elettroforesi capillare e <i>primer</i> fluorescenti	60
2.1.8. Attribuzione dei genotipi	62
2.1.9. Stime di variabilità genetica in aree di origine e di invasione e individuazione delle popolazioni sorgente per gli esperimenti di incrocio	65
2.2. Analisi di paternità su esperimenti di incrocio programmati	68
2.2.1. Incroci ed allevamento degli individui	68
2.2.2. Esperimento preliminare di calibrazione del metodo di analisi: esperimento zero	70
2.2.3. Esperimenti di accoppiamento multiplo	70
2.2.4. Caratterizzazione genetica della generazione parentale e filiale	71
2.2.5. Analisi di parentela	72
2.3. <i>Power analysis</i> dei loci microsatelliti sviluppati e simulazioni di analisi di paternità per le prospettive future di ricerca	76

<b>3. Risultati</b>	<b>79</b>
<b>3.1. Messa a punto <i>ex novo</i> di un pannello di microsatelliti per la specie <i>R. ferrugineus</i></b>	<b>79</b>
<b>3.1.1. Pirosequenziamento 454</b>	<b>79</b>
<b>3.1.2. <i>Mining</i> bioinformatico dei microsatelliti e progettazione dei <i>primer</i> specifici</b>	<b>82</b>
<b>3.1.3. Selezione dei loci microsatelliti</b>	<b>83</b>
<b>3.1.4. Saggi di amplificazione in vitro tramite PCR e verifica della presenza del microsatellite</b>	<b>86</b>
<b>3.1.5. Saggi preliminari di polimorfismo</b>	<b>87</b>
<b>3.1.6. Attribuzione dei genotipi</b>	<b>87</b>
<b>3.2. Stime di variabilità genetica in aree di origine e di invasione ed individuazione delle popolazioni sorgente per gli esperimenti di incrocio</b>	<b>89</b>
<b>3.2.1. Indici di variabilità genetica e test statistici</b>	<b>89</b>
<b>3.2.2. Analisi filogenetica sul gene mitocondriale Citocromo c ossidasi subunità I (COI)</b>	<b>97</b>
<b>3.3. Analisi di paternità su esperimenti di incrocio programmati</b>	<b>99</b>
<b>3.3.1. Esperimento preliminare di calibrazione del metodo di analisi: esperimento zero</b>	<b>99</b>
<b>3.3.2. Esperimenti di accoppiamento multiplo</b>	<b>107</b>
<b>3.3.2.1. Esperimento n°1: femmina italiana x maschio italiano x maschio vietnamita</b>	<b>107</b>
<b>3.3.2.2. Esperimento n°2: femmina italiana x maschio vietnamita x maschio italiano</b>	<b>115</b>
<b>3.4. Simulazioni e <i>power analysis</i> dei loci microsatelliti sviluppati in vista di prospettive future di ricerca</b>	<b>125</b>
<b>4. Discussione</b>	<b>129</b>
<b>4.1. Messa a punto <i>ex novo</i> di un pannello di microsatelliti per la specie <i>R. ferrugineus</i></b>	<b>129</b>

4.2. Stime di variabilità genetica in aree di origine e di invasione ed individuazione delle popolazioni sorgente per gli esperimenti di incrocio	132
4.3. Analisi di paternità su esperimenti di incrocio programmati	135
4.4. Simulazioni e <i>power analysis</i> dei loci microsatelliti sviluppati in vista di prospettive future di ricerca	145
<b>5. Conclusioni</b>	<b>147</b>
<b>6. Bibliografia</b>	<b>150</b>
<b>Appendici</b>	<b>173</b>
<b>Appendice n°1</b> Protocollo di estrazione del DNA	174
<b>Appendice n°2</b> Purificazione dei prodotti PCR	176
<b>Appendice n°3</b> Provenienza e periodo di raccolta dei 106 individui di <i>R. ferrugineus</i> analizzati	177
<b>Appendice n°4</b> Protocollo di <i>silver staining</i> per la colorazione di gel di poliacrilammide	180
<b>Appendice n°5</b> Caratteristiche dei 98 microsatelliti (SSR) individuati tramite <i>mining</i> bioinformatico e posizione del motivo ripetuto e dei suoi <i>primer</i> sulla sequenza prodotta dal 454	181
<b>Appendice n°6</b> Caratteristiche dei <i>primer</i> dei 98 microsatelliti individuati tramite <i>mining</i> bioinformatico	186
<b>Appendice n°7</b> Genotipi dei 106 individui di <i>R. ferrugineus</i> analizzati sui 16 marcatori microsatelliti risultati polimorfici	191
<b>Appendice n°8</b> Sequenze nucleotidiche dei 14 marcatori microsatelliti polimorfici selezionati, dimensioni del frammento amplificato e codici di accesso <i>GenBank</i>	196
<b>Appendice n°9</b> Genotipi delle 24 larve campionate dalla progenie dei due incroci dell'esperimento zero	197
<b>Appendice n°10</b> Risultati dell'analisi di paternità condotta con il <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 sulla progenie dell'esperimento zero	198
<b>Appendice n°11a</b> Risultati del <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni madre-figlio dell'esperimento zero	200
<b>Appendice n°11b</b> Risultati del <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni padre-figlio dell'esperimento zero	201

<b>Appendice n°12</b>	Output dell'analisi di paternità eseguita con il <i>software</i> PATRI sulle 24 larve campionate dalla progenie dei due incroci dell'esperimento n°1	202
<b>Appendice n°13</b>	Genotipi della progenie dell'esperimento n°1 in ordine di ovideposizione	204
<b>Appendice n°14</b>	Risultati dell'analisi di paternità condotta con il <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 sulla progenie dell'esperimento n°1	206
<b>Appendice n°15a</b>	Risultati del <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 riguardanti le coppie madre-figlio dell'esperimento n°1	208
<b>Appendice n°15b</b>	Risultati del <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni padre-figlio dell'esperimento n°1	210
<b>Appendice n°16</b>	Output dell'analisi di paternità eseguita con il <i>software</i> PATRI sulla progenie dell'esperimento n°1	214
<b>Appendice n°17</b>	Genotipi della progenie dell'esperimento n°2 in ordine di Ovideposizione	219
<b>Appendice n°18</b>	Risultati dell'analisi di paternità condotta con il <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 sulla progenie dell'esperimento n°2	222
<b>Appendice n°19a</b>	Risultati del <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 riguardanti le coppie madre-figlio dell'esperimento n°2	224
<b>Appendice n°19b</b>	Risultati del <i>software</i> CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni padre-figlio dell'esperimento n°2	227
<b>Appendice n°20</b>	Output dell'analisi di paternità eseguita con il <i>software</i> PATRI sulla progenie dell'esperimento n°2	232
<b>Ringraziamenti</b>		<b>239</b>

## Riassunto

Il Punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus*, Olivier (Curculionoidea, Dryophthoridae), è un coleottero invasivo originario del Sud-Est asiatico e della Melanesia che, a partire dagli anni '80 del secolo scorso, ha colonizzato attraverso il Medio Oriente quasi tutti i paesi del bacino del Mediterraneo, compresa l'Italia. Il fitofago arreca ingenti danni a numerose specie di Arecaceae, tra cui molte palme di interesse economico. Le attuali azioni di controllo integrato, adottate per contenerne l'espansione, si sono rivelate finora insufficienti anche perché manca una approfondita conoscenza del sistema nuziale dell'insetto, ed il suo grande successo riproduttivo è proprio una delle cause principali dell'enorme potenziale invasivo di questa specie dannosa.

Obiettivo generale di questo progetto di dottorato è stato dunque lo studio di aspetti del *mating system* del Punteruolo rosso legati ad eventuali comportamenti poliandrici e fenomeni criptici di selezione sessuale post-copulatoria. Sono stati eseguiti a questo scopo dei test di paternità, per mezzo di analisi genetiche e bioinformatiche, sulla prole di esperimenti di incrocio effettuati in laboratorio, in modo da verificare ipotesi alternative riguardanti il sistema nuziale della specie. Data la scarsità delle informazioni genetiche pregresse disponibili su *R. ferrugineus*, è stato necessario mettere a punto *ex novo* un pannello di 16 loci microsatelliti polimorfici, tramite un approccio innovativo basato su tecniche di *Next Generation Sequencing* accoppiate ad analisi bioinformatiche. Attraverso un'analisi preliminare della variabilità genetica di popolazioni provenienti sia dall'areale primario che da quello secondario della specie, sono state individuate aree a maggior diversità genetica reciproca, da utilizzare come sorgenti di campionamento degli individui destinati all'allevamento e agli accoppiamenti controllati. In seguito sono stati quindi condotti in laboratorio due esperimenti di incrocio, nei quali una femmina vergine si è accoppiata spontaneamente con due maschi in successione, ed è stata poi isolata e lasciata libera di ovideporre ad oltranza. La generazione filiale è stata poi allevata e caratterizzata geneticamente insieme a quella parentale per attribuire la paternità a ciascuna larva.

I risultati ottenuti, supportati da osservazioni del comportamento riproduttivo in natura e da esperimenti di incrocio con maschi sterilizzati e non, indicano che le femmine della specie si accoppiano normalmente con più individui, ma che le uova vengono fecondate quasi esclusivamente dal contributo spermatico ricevuto per ultimo ( $P_2$ -value=99.2%). Questo studio ha messo quindi in evidenza un fenomeno di selezione sessuale post-copulatoria e sono emerse evidenze, seppur preliminari, a favore dell'ipotesi di priorità spermatica dell'ultimo maschio (*last male sperm precedence*), che potrebbe essere legata a fenomeni di scelta criptica del *partner* da parte della femmina, o a meccanismi di competizione spermatica tra i maschi. La comprensione di tali aspetti del sistema di accoppiamento del Punteruolo rosso va senza dubbio approfondita, specialmente in vista dell'eventuale progettazione di interventi di controllo biologico mirati ad attaccare il successo riproduttivo della specie, come quelli basati sulla Tecnica dell'Insetto Sterile.

## Abstract

### Introduction

The Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae; hereafter RPW) is a polyphagous invasive pest insect, feeding on more than twenty species of palms in the family Arecaceae, many of which are widely grown for food and ornamental use (i.e. the Canary Island palm *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud and the date palm *Phoenix dactylifera* L.) (Murphy and Briscoe, 1999). Larval instars burrow into the trunk and/or the basal leaf shoots of the host plant and their perforations could reach the main meristem, causing the falling of the leaves and often the death of the palm tree (El-Mergawy and Al-Ajlan, 2011; Faleiro, 2006).

The weevil primary distribution is Southeastern Asia and Melanesia but, starting in the 80s, RPW spread in the Middle East and since the early 90s it reached the Mediterranean Basin through the trade of infected palm trees (Faghieh, 1996; Kehat, 1999). Recently, it has also expanded its distribution range eastwards to China and Japan and westwards to the Caribbean (Rugman-Jones, 2013).

As a result of the attacks on several palm species in the invaded countries, its spread is causing huge economic damage. RPW is in fact in the A2 EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) for quarantine pests (EPPO, 2014) and it is considered the main pest of date palm *Phoenix dactylifera*, widely cultivated in arid regions of Middle East and North Africa as an important food resource. This palm species is also exported to many countries of the Mediterranean basin, where it is extensively used as ornamental plant in urban centers and along coastal roads.

One of the key features of such widespread and harmful invasion is the high reproductive success of the species. Females could in fact oviposit even hundred eggs at a time during a long oviposition period lasting several weeks and lay fertile eggs even after one month since the last copulation occurred (Kaakeh, 2005). Also, depending on climate conditions, the species could complete more generations per year, even in the same tree (Dembilio and Jacas, 2011; Faleiro, 2006). Unfortunately, many aspects of RPW reproductive biology haven't been fully explained yet, and more in depth studies on its mating system are needed to ground future management actions. For example, even if multiple mating in RPW has been observed in nature and more frequently in laboratory (Inghilesi *et al.*, 2014; 2015), very little is available about sperm storage and usage mechanisms. The presence of multiple mating and the possibility that females could store and use different mates' sperm (potentially available for insemination), may constitute a critical factor influencing the success of eradication programs dependent on female mating, such as Sterile Insect Technique (SIT, Dyck *et al.*, 2005). SIT is in fact a biological control strategy based on the release of large numbers of mass-reared sterilized males to mate with the wild females, thus inducing sterility and reducing target population dimensions.

The occurrence of more consecutive matings in a species, however, does not necessarily translate into multiple paternity among the offspring of a single female because of the existence of post-copulatory sexual selection mechanisms, working basically at two levels (Danielsson, 1998): they could be cryptically actuated by females (*female cryptic choice*) or could result from competition between males for sperm priority and monopolization of the female (*sperm competition*). As a consequence, estimating the degree of polyandry of a species involves considering even the possibility of such post-mating sexual selection mechanisms (Gwynne, 1984; Parker, 1970, 1984; Ridley, 1989). Moreover, in insects is particularly frequent a kind of reproductive success advantage for the last male who mated the female (the so called *last male sperm precedence*). This mechanism may involve either the blocking of first-male sperm in the



spermatheca through stratification (Birkhead and Hunter, 1990), or the displacement of first-male sperm from the latter by later arriving ejaculates through mechanical and/or chemical removal, dilution and flushing (Gregory, 1965; Harshman and Prout, 1994; Ono *et al.*, 1989; Parker, 1990; Waage, 1979).

In this field, studies of the effects of mating order on fertilization success, even in a laboratory context, have often advanced our understanding of the relative influences of post-copulatory sexual selection. This is of particular interest because indirect evidence of last male sperm precedence in RPW comes from laboratory double mating experiments with wild and sterilized males, where the female produced viable progeny only when the last male who mated was the wild type (Musmeci *et al.*, 2014).

When studying aspects of the reproductive biology such as polyandry and the relative contribution of different males to a brood, genetic parentage analysis is surely the most powerful and reliable approach. In this case, the use of microsatellite markers (SSR) as molecular tools to assess paternity in the context of laboratory controlled mating experiments is the way of choice to test hypothesis about the mating system of species (Jones *et al.*, 2010), such as RPW, for which direct observations in the wild are difficult, particularly when cryptic sexual selection is suspected.

Connecting the RPW incredible spread with its high reproductive success, the aim of this study is to shed light on particular aspects of its mating system, such as the presence of polyandry and post-copula sexual selection mechanisms, through paternity analysis on the progeny of laboratory mating experiments

### **Preliminary genetic analysis and strain selection**

We first developed 16 polymorphic microsatellite loci, 14 of them *de novo* isolated through an innovative approach based on 454 Next Generation Sequencing and bioinformatics mining (Belvedere *et al.*, 2014), and 2 additional ones picked from literature. Genotyping was based on fragment length polymorphism of the fluorescently tagged DNA fragments.

In order to maximize the probability of exposing females to males carrying different alleles, thus improving the resolution power of our system, we performed a preliminary analysis of genetic variability on natural populations of RPW with the aim of individuate well differentiated source populations for the collection of the individuals to be crossed. For this purpose, we genotyped on our SSR panel a total of 106 samples from primary (Malaysia and Vietnam) and secondary distribution areas (Italy, Greece, Spain, Arab Peninsula, China).

What clearly emerged from statistical analysis and estimates of different variability indexes on genotype data is a higher genetic variability of individuals from the primary distribution areas than from those from the invaded ones, that probably experienced founder effects. With regard to our data set, comparing also data from *coxI* mitochondrial marker, we found that most reciprocally genetic divergent populations were the ones from Mediterranean Basin and Vietnam. We therefore created laboratory stocks of two distinct genealogical strains from some individuals field-collected in central Italy (Lazio, Rome, ENEA C.R. Casaccia), and from samples collected in Hanoi city (Hanoi Province, Vietnam) by kind collaborators.

### **Mating experiments, genotyping and paternity analysis**

We then performed two mating experiments where one virgin female from the Italian line was confined into a plastic cage with a single male until copulation occurred. The first male was then removed and replaced immediately with a second one before the female could start to oviposit any egg. The second male was then kept in the cage together with the female until the second copulation also took place. In experiment #1 the first male introduced in the cage was from the Italian strain and the second from the Vietnamese one. In experiment #2 it was the opposite, in order to evaluate also any differences in the paternal success due to a possible female selection

mechanism guided by genetic similarity between partners (Mack *et al.*, 2002). After mating, females were isolated and reared with apple slices as food and oviposition substrate and let to lay eggs to the bitter end. Laid eggs were daily checked and recorded, and larvae were isolated and fed by using apple substrate as for their mothers.

We genotyped mothers and candidate fathers using the 16 microsatellite markers, and analyzed them to identify those loci that were most informative in paternity assignment in the context of each experiment. After selection of most informative markers and exclusion of some loci because of the clear presence of null alleles, the progeny were assayed at three microsatellite loci for experiment #1 and at five loci for experiment #2. We genotyped all available survived offspring, for a total of 81 specimens for experiment #1 and 125 for experiment #2.

Paternity analysis on the progeny of the two experiments was conducted under a maximum-likelihood approach of exclusion and a categorical allocation, and a bayesian approach of full probability by two different softwares. Paternity analysis reveal a clear pattern of sperm usage on behalf of the last male mated, with a good statistical confidence for both experiments and analyses method. In fact, of the 81 progeny produced by the female in experiment #1, all larvae were fathered by the second male ( $P_2$ -value=1.00), while in experiment #2 only 2 larvae were attributed to the first male out of 123 clearly fathered by second male ( $P_2$ -value=0.98). Thinking that storage organs are not completely hermetic containers of sperm, this two exceptions are not so surprisingly. Moreover, different mechanisms of sperm competition could get involved and even fail, depending also by intra-specific variability between rival males. It's also noteworthy that the only two sons of male #1 in experiment #2 have been born at a long time lag (respectively 5 and 18 days after copulation) and came from eggs laid during different oviposition events. This suggests that sperm mixing in the spermatheca could occur within a few days after copulation, canceling possible stratification effects. Consequently, we can also hypothesize the absence of a determined temporal dynamics of paternity over the oviposition period (i.e. the female fertilizes eggs first with the last sperm received and then with the earliest). We didn't observe any evidences of a pre-copulatory female preference guided by genetic similarity with the male, given that there were not significant differences in the performance during copulations between Italian and Vietnamese males (in terms of copulation duration and time spent in a potential courtship behavior). Therefore, differences in reproductive success between Italian and Vietnamese males seem to validate the hypothesis that sperm selection follows only the order of copulation instead than partners relationship. In fact, the quasi-totally of the progeny of the two experiments was always attributed to the second mating male, who was the Vietnamese one in experiment #1 and the Italian one in experiment #2. We can therefore assume that we are most probably facing with a *last male precedence* interaction that could be either produced after copulation by a female cryptic choice, or by male physiological or behavioral adaptations for sperm priority (most likely a kind of sperm flushing). However, we can't exclude a female selection strategy based on genetic or phenotypic male quality. In both experiments, in fact, the "best" sexual partner could have been the last one by chance alone.

Certainly more specific experiments are necessary to assess the sperm usage mechanisms and to discriminate the relative roles of sperm competition and cryptic female choice in the evolution of the reproductive behavior of RPW.

## **Simulations**

We performed several simulations of paternity analysis to test the resolution power of our microsatellite set in the context of more complex laboratory mating experiments and possible studies on natural populations. We focused our attention on Italian RPW populations with the perspective of studying the mating system of the pest in its invaded areas, where some aspects that may affect reproductive strategies, such as life cycle parameters and population density, are quite different respect to the native distribution range (Dembilio and Jacas, 2011). We simulated

different scenarios of laboratory cross experiments, analogous to the ones conducted in this study, but offering an increasing number of males to the female (starting from 2 to 10 males). Preliminary results of these simulations suggest that it is possible to do paternity assignments for all the progeny with a reliable statistical confidence by using our 16 SSR set and crossing Italian RPW individuals, even when up to 8 males have been offered to the female. This simulations encourage not only to test the last sperm precedence hypothesis when the female mated with more than two males that are introduced singularly, but also to study what happens when more males, conveniently marked, are contemporary offered to one female. In a similar context, in fact, it would be possible to record all the observed interactions between sexual partners and study possible relations between order, duration and frequency of copulations and reproductive success of males.

We also wanted to test whether the method developed here to study mating system aspects through paternity analysis could be an efficient tool even when applied to invaded area populations. Supplementary simulations have also been carried out, hypothesizing to do paternity assignments of the progeny of known wild mothers who mated in natural environment. One strategy for this aim would be to collect from Italian populations adult samples of both sexes: males will be treated as candidate fathers, while females who resulted just fertilized before their capture will be reared until complete oviposition in order to analyze their progeny. Supposing such an experimental scenario, we not only tested the effects of higher numbers of candidate fathers, but also those of different proportions of candidate fathers sampled.

As reasonably expected, these simulations confirmed our suspect that the low genetic variability measured in invaded areas makes the resolution power of our microsatellites too low for the application of paternity analysis on natural populations. Results suggested in fact that this kind of approach on Italian natural populations have a low expected rate of success in paternity assignment, especially when the number of candidate fathers is high and the proportion by which they are sampled is less than 1. In natural conditions in fact, the effective males population dimension could be very high (males produce an attractant aggregation pheromone when colonizing a new host; Hallet *et al.*, 1991) and it is very hard (or unrealistic) to have a good confidence of capturing the quasi-totality of the males. However it is to be considered that it could be possible to reach better and reliable assignment rates, in populations of RPW with higher genetic variability (and so higher markers polymorphism), such as the ones of the primary distribution areas, or from the Arab peninsula, which probably plays a bridgehead role in the invasion dynamics (De Biase *et al.*, 2014).

## **Conclusions**

We successfully conducted two different double mating experiments between virgin adults of Red Palm Weevil aimed at evaluating the relative contribution of two competing males to the progeny of each female. The use of microsatellite genotyping for parentage assignment is a common procedure in animals and our set of such markers has proved to be a powerful tool for paternity check in laboratory cross experiments involving different males.

Through mating experiments we collected strong evidences of a last male sperm precedence mechanism in *Rhynchophorus ferrugineus* that surely needs to be better understood and should be considered in the future to evaluate the possibility to apply SIT strategies to the control of this pest. Our simulation trial also encouraged us to deepen the study of RPW mating system by the way of more complex experiments aimed at considering variables (timing, duration and frequency of copulations were the female is exposed to many males) that could highlight the mechanism behind the post-copulatory last male precedence observed (*female cryptic choice vs sperm competition strategies*).

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1. Il Punteruolo rosso delle palme: importanza e pericolosità

Il Punteruolo rosso delle palme, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), 1790, è una specie invasiva inserita nelle liste A2 dell'EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) per gli organismi da quarantena (EPPO, 2014), in quanto rappresenta il principale parassita mondiale della palma da dattero *Phoenix dactylifera* L., una delle specie più comuni e ampiamente coltivate nelle regioni aride del Medio Oriente e del Nord Africa, sia per scopi alimentari che ornamentali. La palma da dattero viene infatti esportata verso numerosi paesi del bacino del Mediterraneo, compresa l'Italia, ed è proprio il commercio di palme infette il principale fattore dell'incredibile espansione geografica del suo parassita. L'importanza economica di *R. ferrugineus* quale flagello per le palme è stata riconosciuta fin dall'800 (Vidyasagar *et al.*, 2000) e ad oggi il fitofago è stato segnalato nel 50% dei paesi del mondo in cui si coltivano palme da dattero, e nel 15% di quelli dove si producono palme da cocco (Faleiro, 2006). Inoltre, le condizioni agro-climatiche di questi paesi e le moderne coltivazioni intensive a monocoltura di palme offrono un habitat ideale alla proliferazione del Punteruolo (Abraham *et al.*, 1998). I danni economici provocati da questo coleottero sono dunque enormi e difficilmente quantificabili, basti pensare all'importanza della palma da dattero nell'alimentazione di numerosi paesi del Nord-Africa e del Medio Oriente, o a quanto le palme, in particolare quelle del genere *Phoenix*, rappresentino elementi paesaggistici ormai ben radicati nei centri urbani e lungo le vie costiere di moltissime regioni che si affacciano sul Mediterraneo, tra cui l'Italia.

Tra i fattori principali che conferiscono a *R. ferrugineus* il suo enorme successo come specie invasiva vi sono sicuramente l'elevatissimo tasso riproduttivo (è stato stimato che da una singola femmina possono derivare più di 5 milioni di larve nel corso di 4 generazioni, ossia in poco più di un anno; Nirula, 1956; El-Mergawy & Al-Ajlan, 2011), l'ecologia trofica polifaga (sono più di 20 le specie ospiti), la natura criptica del ciclo vitale (la presenza del parassita produce danni visibili solo ad uno stadio di infestazione molto avanzato, e dopo che gli adulti hanno già avuto modo di disperdersi), e la buona capacità dispersiva (l'adulto è in grado di coprire una distanza di 900-1200 m con un singolo volo; Wattanapongsiri, 1966).

### 1.1.1. Collocazione tassonomica

La specie *Rhynchophorus ferrugineus* è stata descritta per la prima volta da Olivier nel 1790, e la classificazione tassonomica attuale la colloca nella famiglia Dryophthoridae, superfamiglia Curculionoidea (Wattanapongsiri, 1966):

**Phylum:** Arthropoda

**Classe:** Insecta

**Sottoclasse:** Pterygota

**Ordine:** Coleoptera

**Famiglia:** Dryophthoridae

**Genere:** *Rhynchophorus*

**Specie:** *R. ferrugineus*

Il genere *Rhynchophorus* (Herbst, 1795) comprende almeno dieci specie di cui tre originarie del continente americano [*R. cruentatus* (Fabricius, 1775), *R. palmarum* (Linnaeus, 1758) e *R. richteri* Wattanapongsiri, 1966] , cinque dell'Asia [*R. bilineatus* (Montrouzier, 1857), *R. distinctus* Wattanapongsiri, 1966, *R. ferrugineus* (Olivier, 1790), *R. lobatus* Ritsema, 1882 e *R. vulneratus* (Panzer, 1798)] e due provenienti dall'Africa [*R. phoenicis* (Fabricius, 1801) e *R. quadrangulus* Queden, 1888]. L'intero gruppo presenta una spiccata polifagia ed il parassitismo verso le palme della famiglia Arecaceae è molto diffuso, tanto da essere comune a ben sette specie del genere. Da notare che *R. vulneratus* era stato recentemente posto in sinonimia con la specie congenere *R. ferrugineus* (Hallet *et al.*, 2004) e poi nuovamente distinto da quest'ultima su base morfologica e genetica (Rugman-Jones, 2013).

La sottofamiglia Rhynchophorinae comprende 140 generi, per un totale di circa 1000 specie, la maggior parte delle quali si nutre scavando nei tessuti vegetali della pianta ospite sia allo stadio larvale che adulto. Gli ospiti includono palme (Arecaceae), Bromeliaceae, banani (Zingiberales), yucche (Liliales), la canna da zucchero (Poales), ed altre monocotiledoni (Zimmerman, 1993).

### 1.1.2 Caratteristiche morfologiche

L'adulto ha tegumento dal tipico colore ferrugineo per la presenza di carotenoidi nelle cellule epidermiche, e macchie nere, di forma e numero variabili e disposte in maniera caratteristica sul protorace, dovute alla presenza di melanina nella cuticola. Sulle elitre sono presenti delle striature nerastre. Il corpo, di forma ovale allungata, è lungo dai 19 ai 45 mm (Longo, 2006).

La fase adulta è caratterizzata da un accentuato dimorfismo sessuale legato sia a caratteri

morfologici che alle dimensioni (Fig. 1.1). Il maschio presenta infatti una serie di setole erette sulla parte terminale del rostro e sulle tibie anteriori, assenti invece nella femmina, e lunghezza media del capo e del corpo inferiori rispetto a quelli femminili. Il rostro della femmina appare inoltre più sottile, lungo e ricurvo di quello maschile.

L'uovo è di forma ellittica e allungata, può raggiungere 3 mm di lunghezza, è di colore giallastro avorio ed il corion, osservato a 50 ingrandimenti, appare liscio (Longo, 2006).

La larva, apoda, ha il corpo di colore bianco-giallastro e di forma conica, arrotondata al centro e affusolata alle estremità, dall'aspetto massiccio e carnoso. La capsula cefalica, di colore rosso-bruno, presenta potenti mandibole delle quali l'insetto si serve per scavare lunghe gallerie nella parte basale delle foglie e farsi strada nel tessuto meristemato della pianta ospite. A maturità la larva, che raggiunge in media una lunghezza di 50 mm e 20 mm di larghezza al centro, migra verso la periferia degli steli fogliari e del tronco, dove costruisce un bozzolo ovale (circa 80 mm x 35 mm) con i residui di alimentazione, e al suo interno si trasforma in una pupa adectica, cioè priva di mandibole funzionali, che può raggiungere i 40 mm di lunghezza e 16 mm di larghezza (Longo, 2006). La pupa, di colore giallastro, è caratterizzata da antenne e occhi prominenti, e da elitre e ali portate ventralmente (Wattanapongsiri, 1966).

### **1.1.3. Ciclo vitale e riproduzione**

Nelle aree a clima tropicale la specie compie più generazioni nel corso dell'anno, ognuna delle quali della durata di circa tre mesi e mezzo, ed ha un potenziale biotico piuttosto elevato (Longo *et al.*, 2009).

La vita degli adulti può infatti durare tre mesi e oltre, nel corso dei quali una singola femmina depone generalmente un numero di uova molto elevato e variabile (la media è stimata intorno alle 200 uova per ciclo riproduttivo, ma esistono stime molto superiori; Faghieh, 1996; Abraham *et al.*, 2002; Kaakeh, 2005; Faleiro, 2006; Prabhu & Patil, 2010). Si pensa che le femmine siano in grado di immagazzinare nella spermateca elevate quantità di sperma e di mantenerlo vitale per lunghi periodi, in quanto è stato riscontrato che possono continuare a produrre uova fertili anche ad un mese di distanza dall'ultima copula effettuata (Kaakeh, 2005). Il periodo di ovideposizione in condizioni di laboratorio può durare infatti diverse settimane (Cristofaro *et al.*, 2010; Ince *et al.*, 2011). È stato inoltre dimostrato che il maschio è in grado di trasferire quantità di sperma sufficienti alla fecondazione delle uova anche nel corso di copule della durata di pochi minuti (Kaakeh, 1998).

I dati presenti in letteratura circa la durata dei vari stadi e dell'intero ciclo vitale (Fig. 1.2) riportano periodi molto variabili e sono quasi tutti riferiti a condizioni di allevamento in laboratorio, su substrati artificiali o tessuti freschi di pianta, in condizioni ambientali (temperatura, umidità, fotoperiodo) controllate (Dembilio & Jacas, 2011; El-Mergawy & Al-Ajlan, 2011). Mancano invece studi approfonditi sul ciclo vitale dell'insetto all'interno della pianta ospite ed in condizioni naturali. Sono stati inoltre condotti vari studi inerenti gli effetti della temperatura sullo sviluppo larvale, i cui risultati sono però spesso discordanti (Salama *et al.*, 2002; Martin & Cabello, 2006; Dembilio & Jacas, 2011). Per fare un esempio di questa estrema eterogeneità, le temperature minime tollerate dalla specie sono state stimate dai 17.4° C fino ai -2.3 °C (Salama & Abdel-Razek, 2002; Martin & Cabello, 2006; Dembilio *et al.*, 2011). Indubbiamente nei paesi a clima temperato, come lo sono molti dell'area di invasione, la durata dello stadio larvale e pupale è influenzata dalla stagionalità (Dembilio & Jacas, 2011), per quanto la temperatura all'interno della pianta ospite sia diversa da quella esterna a causa del calore sviluppato dai processi di fermentazione dei tessuti vegetali che vengono triturati dall'attività trofica delle larve. Salama *et al.* (2009) hanno infatti osservato, in Egitto, una differenza media di temperatura tra ambiente esterno ed interno della palma che varia tra i 2° C in inverno ed i 6° C in estate. Nel suo studio del 2005, Kaakeh ha invece analizzato gli effetti di diversi tipi di dieta artificiale e naturale sulla durata dei diversi stadi vitali, mentre Ju *et al.* (2010) hanno studiato più in particolare gli effetti della pianta ospite sui tempi di sviluppo dell'animale. In entrambi i casi le variabili in questione influenzano significativamente i parametri del ciclo vitale esaminati. In generale è possibile affermare che le uova si schiudono dopo 1-6 giorni (Faghih, 1996), mentre il periodo di sviluppo delle larve riportato in letteratura può variare dai 24 (Butani, 1975) ai 128 giorni (Salama *et al.*, 2009). Anche sul numero di stadi larvali sono presenti osservazioni piuttosto discordanti, che vanno dai 3 (Nirula, 1956) ai 17 (Martin & Cabello, 2006) differenti stadi di sviluppo, sempre in condizioni di allevamento. La metamorfosi avviene invece nell'arco di un periodo che va dalle 2-3 settimane ai 50 giorni (Abbas *et al.*, 2010).

**Fig 1.1.** Dimorfismo sessuale in *R. ferrugineus*  
*R. ferrugineus* sexual dimorphism



Femmina adulta



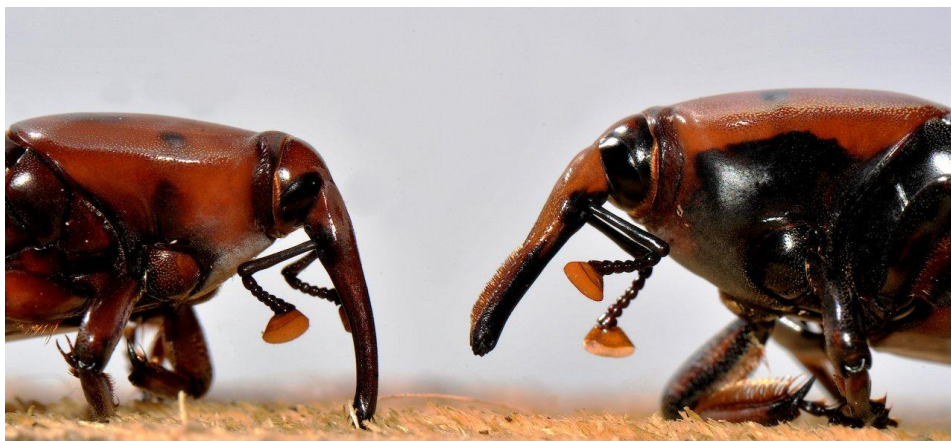
Maschio adulto



Rostro di femmina



Rostro di maschio



Femmina (sinistra) e maschio (destra) a confronto



**Fig. 1.2.** Stadi del ciclo vitale di *R. ferrugineus*  
*R. ferrugineus* life cycle



Visione dorsale e ventrale della larva



Pupa



Adulto che emerge dal bozzolo



Uova



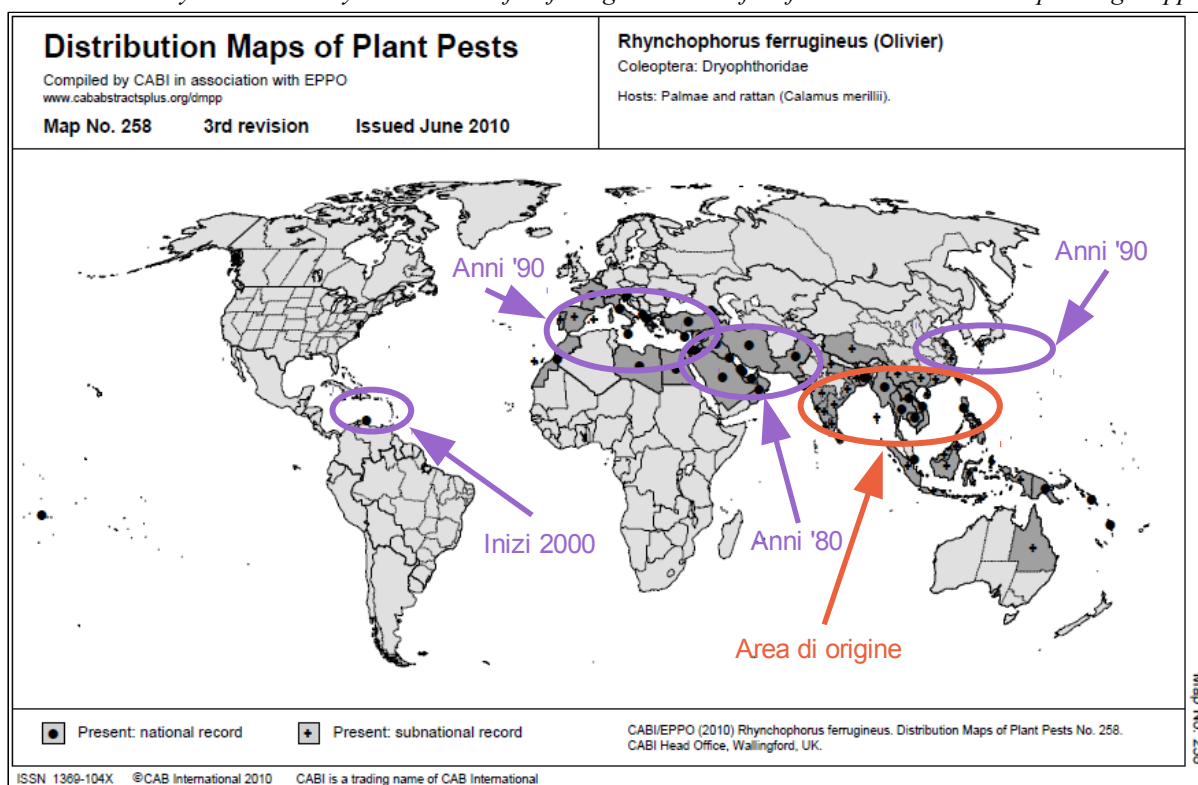
#### 1.1.4. Area di distribuzione primaria e secondaria

Nella figura 1.3 sono rappresentati l'areale d'origine e quello secondario di *R. ferrugineus* con le principali tappe del suo processo di invasione. La specie è originaria del sud-est asiatico e della Melanesia, con un areale primario che comprende Pakistan, India, Ceylon, Indocina, Indonesia (Sumatra, Borneo, Java, etc.), le Filippine ed il sud del Giappone e della Cina. Va precisato che secondo l'EPPO (2005, 2008), il Punteruolo rosso è da considerarsi una specie naturalizzata in ogni paese del sud-est, sud e ovest del continente asiatico. In estremo oriente, ad esempio, è segnalato in Giappone dal 1975 (Matsuura, 1993). In Oceania ha colonizzato Papua Nuova Guinea, isole Solomon, Samoa occidentale, Nuova Caledonia, e vi è una segnalazione isolata nel Queensland in Australia (Wattanapongsiri, 1966).

A partire dalla metà degli anni '80 del secolo scorso, il Punteruolo si è diffuso in Medio Oriente attraverso gli Emirati Arabi (Gush, 1997; Abraham *et al.*, 1998; Ferry & Gomez, 2002), e da qui si è spostato rapidamente verso il nord Africa a partire dal 1992, e verso l'Europa meridionale dal 1994 (Cox, 1993; Abozuhairah *et al.*, 1996; Barranco *et al.*, 1995; Faghieh, 1996; El-Ezaby, 1997; Kehat, 1999; Murphy & Briscoe, 1999; EPPO, 2007; 2008; 2009; 2010; Kaakeh, 2005; Kontodimas *et al.*, 2006; Al-Eryan, 2010; Bertone *et al.*, 2010; Roda *et al.*, 2011). In Giordania ed Israele la sua presenza è riportata dal 1999. Nel bacino del Mediterraneo, la prima segnalazione risale al 1992 in Egitto. In Spagna ha raggiunto l'Andalusia nel 1996 e la Comunità valenzana nel 2004, mentre è segnalato nella regione di Murcia e nelle isole Canarie e Baleari dal 2007. In Italia il primo ritrovamento è avvenuto nel 2004 nei pressi di Pistoia, successivamente è stato rinvenuto in Sicilia e da qui si è diffuso verso il nord della penisola colonizzando Campania, Lazio, Basilicata e Puglia. Sembra sia inoltre presente in Sardegna, Calabria, Liguria e Marche (Longo & Colazza, 2009). RPW ha poi invaso nel 2005 la Turchia, e nel 2006 Cipro, la Francia nelle regioni della Provenza, delle Alpi, della Costa Azzurra e della Corsica, e le isole greche di Creta e Rodi.

Nel 2009 è stato segnalato anche nei Caraibi (Alhudaib, 2009).

**Fig. 1.3.** Areale primario e secondario della specie *R. ferrugineus*  
*Primary and secondary distribution of R. ferrugineus. Modified from: www.cababstractplus.org/dmpp.*



### 1.1.5. Nozioni pregresse di variabilità genetica della specie su basi molecolari

Nel corso dell'ultimo decennio sono stati condotti diversi studi di variabilità genetica e differenziamento di popolazioni del Punteruolo rosso, basati fondamentalmente su marcatori RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e mitocondriali (Abulyazid *et al.*, 2002; Salama & Saker, 2002; Gadelhak & Enan, 2005; Al-Ayied *et al.*, 2006; El-Mergawy *et al.*, 2011a ; 2011b). In uno di questi lavori, ad esempio, è stata riscontrata una diversità genetica significativa tra tre forme di Punteruolo rosso raccolte in Egitto, simpatriche e morfologicamente distinte sulla base della presenza e disposizione delle macchie scure sul torace degli adulti (Salama & Saker, 2002). In particolare, sembra che il morfotipo caratterizzato dall'assenza di tali macchie presenti un profilo di RAPD ben distinto dagli altri due (Salama & Saker, 2002). Analogamente sono state studiate le differenze genetiche tra individui raccolti in diverse località degli Emirati Arabi, senza però apparenti correlazioni con la colorazione del torace (Abulyazid *et al.*, 2002). Sempre attraverso la tecnica RAPD, sono state riscontrate somiglianze genetiche tra popolazioni dell'Arabia Saudita e dell'Indonesia, che al contrario si sono rivelate ben differenziate da quelle provenienti dall'Egitto (Abulyazid *et al.*, 2002). In un lavoro del 2005, invece, Gadelhak ed Enan (2005), sulla base di distanze genetiche calcolate sempre tramite

RAPD, suggeriscono addirittura che negli Emirati Arabi siano presenti più specie afferenti allo stesso genere e che le distanze genetiche di tali popolazioni/specie (comprese tra 0.129 e 0.617) non siano correlate significativamente con la distanza geografica.

Capdevielle-Dulac *et al.* (2012) hanno isolato invece con metodi classici un pannello di marcatori microsatelliti, due dei quali sono stati impiegati in questo lavoro, ma ne hanno valutato il polimorfismo solamente in due popolazioni, provenienti rispettivamente dall'Egitto e dall'Oman.

Quasi tutte queste ricerche si basano su *data set* ridotti, con campionamenti in aree geografiche ristrette che interessano quasi esclusivamente le zone di invasione, e pertanto non forniscono conoscenze approfondite sui livelli di variabilità genetica della specie nel suo *range* di distribuzione primario e secondario (De Biase *et al.*, 2014).

Nel 2011, El-Mergawy e colleghi (2011a; 2011b) hanno condotto tuttavia due studi, utilizzando rispettivamente RAPD e marcatori classici (geni *cytb* e *ITS2*), nei quali sono state campionate numerose popolazioni, provenienti da 13 paesi del Mediterraneo e del Medio Oriente, oltre a Pakistan e Giappone. Nonostante anche in questo caso la numerosità dei campioni sia estremamente bassa, il merito principale di questi lavori è senza dubbio quello di aver messo in luce diverse evidenze a favore di ipotesi di colonizzazione multipla delle aree mediterranee e mediorientali da parte di *R. ferrugineus*. Sono stati infatti distinti su base genetica 3 principali gruppi filogeografici, che accomunano da una parte le popolazioni dell'Egitto e del Mediterraneo, e dall'altra quelle del Medio Oriente e del Pakistan, entrambe ben differenziate dal campione giapponese. I dati molecolari relativi al gene Citocromo b suggerirebbero inoltre delle interessanti relazioni tra l'Arabia Saudita ed il gruppo Egitto-Mediterraneo. In uno studio successivo, sempre El-Mergawy e colleghi (2011c) hanno ampliato considerevolmente le dimensioni dei campioni, stavolta analizzando però il marcatore mitocondriale *cox1*. I risultati ottenuti, che in parte ribattono quelli precedenti degli stessi autori, evidenziano un'estrema omogeneità genetica che accomuna le popolazioni di Mediterraneo, Egitto e Arabia, compatibilmente con l'ipotesi di un'unica introduzione della specie in queste aree, mentre è presente una maggiore variabilità e strutturazione delle popolazioni per quanto riguarda il resto del Medio Oriente ed il Pakistan, il che fa pensare che queste regioni siano state colonizzate in occasioni differenti, e probabilmente tramite più rotte di invasione.

Solo recentemente, Rugman-Jones *et al.*, (2013) hanno condotto uno studio con un campionamento molto più consistente e geograficamente esteso, basato sull'analisi del marcatore mitocondriale *cox1* in numerose popolazioni appartenenti sia all'areale primario che a quello secondario. Questo lavoro ha messo in luce rilevanti livelli di variabilità genetica nelle aree di

origine del Punteruolo rosso e una marcata strutturazione filogeografica, sia in areale primario che secondario, permettendo di formulare interessanti ipotesi circa le dinamiche di invasione del fitofago. Sono state inoltre individuate due linee filogenetiche ben separate, che hanno portato a distinguere definitivamente su base genetica la specie *R. vulneratus* (Panzer) dalla congenere *R. ferrugineus*, le quali erano state precedentemente poste in sinonimia da Hallet *et al.*, (2004).

#### **1.1.6. Piante ospiti**

La prima segnalazione riguardante il Punteruolo rosso come specie dannosa risale ad una pubblicazione del 1891 nel periodico *Indian Museum Notes*, dove veniva indicato come importante parassita della palma da cocco (*Cocos nucifera* L.), la quale può probabilmente essere considerata il suo ospite primario. Mentre nell'Asia sud-orientale è infatti una delle specie più dannose per la palma da cocco, in Medio Oriente e in Nord-Africa il Punteruolo rosso costituisce un vero e proprio flagello soprattutto per la palma da dattero (*Phoenix dactylifera* L.). È documentato che il fitofago attacchi più di 20 specie di palme appartenenti a 15 generi della famiglia Arecaceae, molte delle quali sono ampiamente coltivate a scopo alimentare e/o ornamentale (Murphy & Briscoe, 1999; Faleiro, 2006; Kontodimas *et al.*, 2006; EPPO, 2008; Bertone *et al.*, 2010; Dembilio & Jacas, 2012). Tra le specie di rilevanza economica sono da citare anche la palma delle Canarie *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud e quella da olio *Elaeis guineensis* Jacq. Sembra ormai inoltre appurata la potenzialità di attacco su *Chamaerops humilis* L., palma nana autoctona del nostro paese (Dembilio *et al.*, 2009; Manachini *et al.*, 2013).

#### **1.1.7. Modalità e segni di infestazione della pianta ospite**

L'insetto sembra particolarmente attratto da palme danneggiate o potate anche se, in particolari condizioni, può attaccare anche esemplari perfettamente sani (Speranza *et al.*, 2007). Su *P. dactylifera* è stato osservato che le piante giovani (5-20 anni) sono più sensibili alle infestazioni e possono arrivare alla morte nell'arco di 6-8 mesi. Sulla specie *P. canariensis*, invece, sono stati registrati attacchi quasi prevalentemente su esemplari che superassero i 7 metri di altezza.

La femmina depone le uova dentro piccoli fori, che produce con l'apparato boccale masticatore all'apice del rostro alla base delle foglie o dei germogli della palma, oppure all'interno di ferite o cicatrici preesistenti. Il maschio attira altri individui sull'ospite appena colonizzato tramite un feromone di aggregazione il cui componente principale è il (4S,5E)-2-methyl-5-hepten-4-ol), commercializzato come *rhynchopherol* (Zada *et al.*, 2002).

Le larve penetrano nelle ascelle fogliari e scavano lunghe gallerie causando prima l'ingiallimento e poi la rottura, la marcescenza e la caduta via via dell'intera chioma. Dai fori provocati dalle larve fuoriesce un essudato viscoso e brunastro. I primi sintomi della presenza del fitofago appaiono sulle foglie apicali sotto forma di asimmetrie nella chioma, la cui cima è destinata inevitabilmente a piegarsi sulle foglie inferiori, dando alla pianta il tipico aspetto 'capitozzato'. Con l'intensificarsi dell'attività trofica delle larve prossime all'impupamento, tutte le foglie infestate si ripiegano verso il basso (Longo, 2005). In ogni caso la presenza di sintomi evidenti, come fori di sfarfallamento degli adulti all'ascella fogliare e foglie cadute a terra con gallerie e bozzoli vuoti ben visibili alla base (Fig. 1.4), denunciano lo stato di infestazione della palma solo quando questa è ormai seriamente compromessa.

### **1.1.8. Forme di controllo**

Gli attuali provvedimenti adottati per contenere la diffusione di *R. ferrugineus* sono stati finora concentrati, senza molto successo, su azioni di controllo integrato che comprendono monitoraggio, bonifica dei possibili focolai di infestazione, distruzione delle piante infette, pesticidi chimici preventivi e curativi, cattura massale, regolamenti che impongono misure fitosanitarie, educazione e divulgazione. Purtroppo il ciclo vitale criptico della specie, dovuto alla natura endofita delle sue larve, ne rende il controllo estremamente difficile (Dembilio *et al.*, 2010).

Le tecniche diagnostiche, molte delle quali vanno ancora adeguatamente sperimentate, si avvalgono di metodi bioacustici e olfattivi, nonché della termografia, della fotografia infrarossa (NIR), e dell'endoscopia. Per il monitoraggio e la cattura massale degli adulti, sono state messe a punto trappole innescate con uno specifico feromone di aggregazione sintetico (*rhynchopherol*; Zada *et al.*, 2002), la cui attrattività è amplificata dall'azione sinergica dei prodotti della fermentazione di origine vegetale. Il loro uso è utile ad esempio per ottenere informazioni sulla presenza del fitofago in una determinata zona. Ad oggi le più efficaci misure di lotta contro il Punteruolo sono quelle preventive, mentre risulta più problematico l'intervento curativo su palme già attaccate, soprattutto a causa del comportamento endofita delle larve, delle notevoli dimensioni delle piante colpite e, spesso, anche della loro posizione all'interno di aree urbane densamente popolate. Nei paesi d'origine e in Medio Oriente, per combattere le infestazioni del Punteruolo sulle palme da cocco, da olio e da dattero, sono stati ampiamente utilizzati, con risultati non sempre eccellenti, insetticidi cloroderivati, organofosforici (es. *acefate*, *azinfol metile*, *diclorvos*, *dimetoato*, *fention*, *pirimifos etile*, *monocrotofos*, *triclorfon*) e carbammati (es. *carbaril*, *carbosulfan*).

**Fig. 1.4.** Danni causati da *R. ferrugineus* alla pianta ospite  
*Damages caused by *R. ferrugineus* to its host plant*



In Spagna, le palme sono state ripetutamente trattate con esteri fosforici (*fenitrothion*, *clorpirifos*, *diazinone*, *metidation*), anche all'interno dei parchi pubblici, oppure mediante iniezioni ai tronchi con prodotti a base di *carbaril* e *imidacloprid* (Ferry & Gómez, 2002). Anche nel nostro paese, come in molti del Mediterraneo, i privati ricorrono spesso all'uso di vari insetticidi, soprattutto formulati a base di *clorpirifos* (Barranco *et al.*, 1998, 2006).

Di recente si sta valutando l'ipotesi di affiancare alle strategie classiche di eradicazione e controllo forme di lotta biologica. Riguardo alla possibilità di utilizzare nemici naturali del fitofago, non sono stati ancora individuati antagonisti che possano essere impiegati con successo, e in generale non sembra che essi giochino un ruolo importante nel controllo del drioftoride (Reginald, 1973), data anche la frequenza molto bassa del loro ritrovamento in associazione con il Punteruolo in natura. Sicuramente sarebbero necessarie indagini più approfondite sui suoi antagonisti naturali nelle aree di origine (Faleiro, 2006), mentre finora sono stati condotti studi soprattutto in quelle di recente espansione (Massa & Lo Verde, 2009).

Sono segnalati in particolare il nematode *Praecocilenchus ferruginophorus*, il batterio *Pseudomonas aeruginosa* e un virus della poliedrosi citoplasmatica (CPV) che attacca tutti gli stadi. Da adulti e pupe del Punteruolo sono stati isolati i funghi *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Non è chiaro il ruolo degli acari *Tetranychus rhynchophori*, *Hypoaspis* sp. e *Centrouropoda almerodai* che infestano gli adulti e, talvolta, anche le larve (Fig. 1.5). Occasionale e di scarso rilievo è l'attività di insetti predatori e parassitoidi (Mazza *et al.*, 2014b).



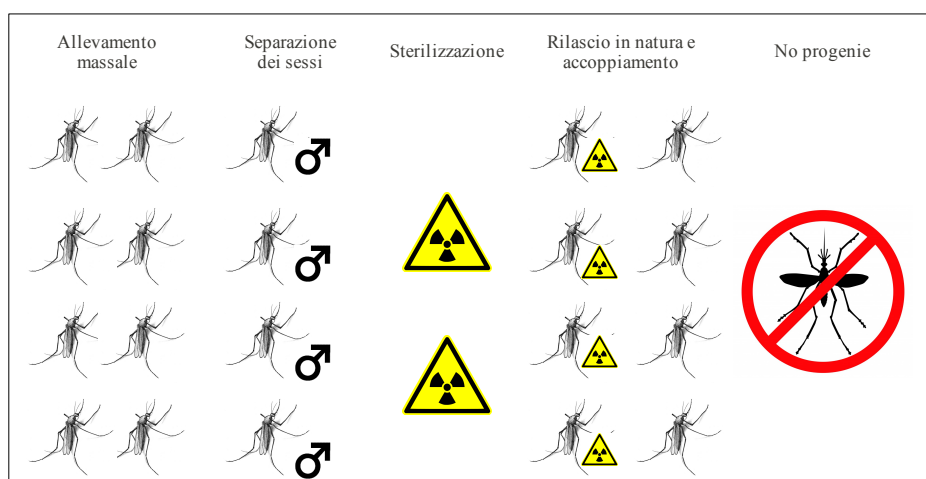
**Fig. 1.5.** Esemplare adulto di *R. ferrugineus* infestato da acari.

*Adult sample of R. ferrugineus infested by mites*

<http://www.pestbook.it/magazine/author/5>



Se da un lato l'utilizzo di antagonisti naturali efficaci sembra poco promettente, la tecnica del maschio sterile, denominata SIT (*Sterile Insect Technique*; Dyck *et al.*, 2005; FAO, 2005), sta ricevendo invece crescente attenzione (Ramachandran, 1991): essa prevede la sterilizzazione, generalmente tramite radiazioni, di un certo numero di maschi ed il loro successivo rilascio in natura, mediante una successione di lanci protratti nel tempo, al fine di ridurre drasticamente i tassi di natalità all'interno delle popolazioni (Fig. 1.6). Obiettivo primario della tecnica è il contenimento della diffusione di focolai di infestazione della specie dannosa nelle zone non ancora colonizzate, finanche la sua eradicazione nelle aree infestate (Klassen, 2005). La tecnica dell'insetto sterile, sviluppata per la prima volta negli Stati Uniti, è stata impiegata per mezzo secolo nel controllo di diversi insetti dannosi, tra cui la diffusissima mosca mediterranea della frutta, *Ceratitis capitata* (Hendrichs *et al.* 1995; Hendrichs, 2000), un dittero sarcofagide parassita di bestiame, *Cochliomyia hominivorax* (Lindquist *et al.*, 1992; Klassen, 2000; Feldmann & Hendrichs, 2001) e la zanzara vettrice della filiasi linfatica, *Culex quinquefasciatus* (Curtis & Andreason, 1999). La SIT è stata applicata con successo anche in Italia nell'isola di Procida sulla mosca della frutta (Cirio, 1975) e, più recentemente, per la zanzara tigre (*Aedes albopictus*; Bellini *et al.*, 2013). L'utilizzo di questa strategia presenta diversi vantaggi in quanto non comporta l'uso di sostanze chimiche dannose, è altamente specifica e non richiede l'introduzione nell'ambiente di organismi esotici e nuovi geni, come avviene nei programmi di lotta biologica basati sull'uso di antagonisti naturali.



**Fig. 1.6.** Tecnica dell'insetto sterile: la specie dannosa viene allevata, i maschi vengono isolati e sterilizzati tramite radiazioni per essere poi rilasciati in natura. Il loro accoppiamento con femmine selvatiche non dà luogo a progenie vitale per cui l'accrescimento della popolazione declina.

*Conventional SIT schedule: mass rearing of insects followed by manual sex separation to assure that exclusively males have to be sterilized by ionizing radiation and further released to mate with wild females resulting in no progeny.*

## 1.2. Importanza dello studio del sistema nuziale nel controllo di specie dannose come *R. ferrugineus*

Il sistema nuziale di una specie (*mating system*) viene fondamentalmente descritto secondo due accezioni principali. Per gli ecologi comportamentali, esso è definito come il complesso dei comportamenti legati all'accoppiamento in una popolazione (Davies, 1991). Dal punto di vista dei genetisti, il sistema nuziale è dato invece dalle relazioni di parentela tra gli individui che si accoppiano, che determinano la posizione occupata dalla popolazione in un'ipotetica scala di gradazioni che vanno dall'*inbreeding* all'*outbreeding* totali, dal numero di individui che si accoppiano all'interno di un gruppo sociale e dalla varianza nel successo riproduttivo dei due sessi (Ross, 2001). Conoscere il sistema di accoppiamento di un organismo dannoso è un aspetto fondamentale nella pianificazione di interventi di lotta contro quest'ultimo. Il sistema nuziale può avere infatti ripercussioni sulla variabilità genetica della specie (Wade, 1985), la quale gioca un ruolo importante nel determinare la risposta evolutiva delle sue popolazioni alle azioni di eradicazione da parte dell'uomo. Inoltre, appare piuttosto scontato che studiare approfonditamente le modalità con cui la specie si riproduce può offrire spunti chiave nel progettare strategie efficaci per minare i tassi di accrescimento delle sue popolazioni e contenerne l'espansione demografica. Ad esempio, per applicare con successo la Tecnica dell'Insetto Sterile (SIT), è fondamentale conoscere e tenere in considerazione alcuni aspetti del *mating system* come: la proporzione di individui di entrambi i sessi in grado di accoppiarsi all'interno della popolazione, il loro livello di parentela, il rapporto tra i sessi, la presenza di un sistema monogamo o di accoppiamenti multipli (poliandria o poliginia), e di fenomeni di selezione sessuale post-copula (competizione spermatica o scelta criptica da parte della femmina). Inoltre è necessario mettere a punto tecniche di sterilizzazione che permettano di introdurre maschi che non presentino differenze, rispetto agli individui selvatici, nella capacità di competere per le femmine e di accoppiarsi con esse (Lance & McInnis, 2005). È poi estremamente importante stimare correttamente il numero di maschi sterili da rilasciare, in rapporto al numero di maschi naturali, in modo che gran parte delle femmine abbia una maggiore probabilità di accoppiarsi con un individuo sterile. Molte caratteristiche del sistema nuziale della specie da controllare possono incidere anche pesantemente su questa proporzione. Di conseguenza, ai fini di impiegare la tecnica del maschio sterile con successo, e più in generale di pianificare metodi di eradicazione e controllo di *R. ferrugineus*, è senz'altro indispensabile una maggiore conoscenza della biologia di questo organismo ed in particolar modo del suo sistema di accoppiamento e di riproduzione, che finora non è stato indagato in maniera approfondita. Sebbene infatti siano stati osservati accoppiamenti multipli da parte delle femmine, sia in

condizioni di laboratorio che in natura (Kaakeh, 2005; Mazza *et al.*, 2014a), ed in condizioni di elevata densità si registri una forte tendenza a comportamenti sessuali promiscui (Inghilesi *et al.*, 2014), non si conosce praticamente nulla sui meccanismi di utilizzazione dello sperma da parte delle femmine, né si sa se vi sia una reale forma di poliandria che si traduce in prole con paternità multipla, ed eventualmente in che proporzioni e con che frequenza essa si verifichi. Nonostante il comportamento gregario e criptico del Punteruolo, e le evidenze sulla presenza di poliandria siano elementi a sfavore dell'impiego della SIT per questa specie (Whitten & Mahon, 2005), alcune sperimentazioni di campo esplorative hanno fornito risultati potenzialmente positivi (Rahalkar *et al.*, 1977; Krishnakumar & Maheswari, 2007). Nel 2010 è stato inoltre avviato presso l'ENEA uno studio preliminare di fattibilità (Cristofaro *et al.*, 2011), in collaborazione con l'*International Atomic Energy Agency* (IAEA) di Vienna e al quale questo progetto collabora, allo scopo di verificare con maggior dettaglio la possibilità di applicazione della strategia SIT per il controllo di *R. ferrugineus*.

### 1.3. Accoppiamenti multipli e selezione sessuale post-copula negli insetti

#### 1.3.1. Costi e benefici dell'accoppiamento multiplo: il significato della poliandria

Il *mating system* di una specie può prevedere accoppiamenti singoli o multipli e in molti insetti sia i maschi che le femmine possono accoppiarsi più volte. Secondo il principio di Bateman (Bateman, 1948), tuttavia, mentre il successo riproduttivo del maschio è determinato dal numero di femmine che riesce ad inseminare, quello della femmina è indipendente dal numero di maschi con cui si accoppia. In base a tale principio infatti, se da una parte i maschi sono in competizione per l'accesso alle femmine, queste ultime tendono piuttosto a limitare il numero di accoppiamenti in quanto costosi. Questi costi sono rappresentati dal generale dispendio di tempo ed energie (Alcock *et al.*, 1977; Daly, 1978; Thornhill & Alcock, 1983), ed in particolare dall'aumentato rischio di predazione (Fairbairn, 1993; Rowe, 1994), dalla possibilità di contrarre malattie durante la copula (Daly, 1978; Thornhill & Alcock, 1983) o di subire danni fisici da parte dei maschi in competizione (Daly, 1978; Parker, 1979). Nel complesso poi, un tasso riproduttivo troppo elevato può accorciare la vita della femmina e quindi il suo periodo riproduttivo (Fowler & Patridge, 1989; Chapman *et al.*, 1995; Rice, 1996). Certamente nell'ambito della riproduzione esistono dei conflitti di interessi tra i due sessi, ma non soltanto dal punto di vista dei costi dell'accoppiamento multiplo per la femmina, in conflitto con gli interessi del maschio volti ad esempio a prolungare il corteggiamento e la copula e a sostituire spermatozoi precedentemente acquisiti. Esistono infatti interessi contrastanti che riguardano anche benefici dell'accoppiamento multiplo per la femmina, che rappresentano invece svantaggi per il maschio, il cui “fine” può essere invece quello di prevenire accoppiamenti successivi al suo.

In una analisi comparativa di 122 studi sperimentali svolti su insetti, Arnqvist e Nilsson (2000) hanno trovato forti evidenze di effetti positivi della poliandria sulla *fitness* della femmina in termini di numero di uova prodotte e loro percentuale di schiusa. I vantaggi sulla produttività di uova sono particolarmente evidenti nelle specie in cui la copula è accompagnata dall'offerta di un apporto nutritivo da parte del maschio, che può avvenire nella forma di un “dono nuziale” di cibo, di secreti prodotti durante il corteggiamento, o essere costituito dallo stesso liquido spermatico (Fig. 1.7). Alcuni insetti producono infatti spermatozoi particolarmente lunghi e caratterizzati da grandi mitocondri, ad elevato contenuto proteico, che durante la spermatogenesi assumono una configurazione cristallina, perdendo ogni attività biochimica e metabolica. Questi possono accrescere in maniera diretta la fecondità ed il benessere della femmina (Thornhill, 1976; 1980), o essere completamente assorbiti dallo zigote (Perotti, 1973, Baccetti *et al.*, 1977). Sia che vengano utilizzati come fonte energetica supplementare dalla madre, sia che vengano

impiegati dallo zigote, questi doni accrescono il benessere e la *fitness* della femmina (Afzelius, 1970) e possono essere interpretati come una sorta di compenso in cambio del quale il maschio ottiene la copula.



**Fig 1.7.** Esempi di doni nuziali in alcuni ditteri.  
*Nuptial gift examples in some dipterans.*

<http://www.nadsdiptera.org/Doid/Empidchar/Empidchar.htm>; [https://www.flickr.com/photos/overton\\_cat/](https://www.flickr.com/photos/overton_cat/)

È stato dimostrato che negli insetti le cui femmine spesso digeriscono o espellono una parte dell'eiaculato, vengono immagazzinati e conservati molti più spermatozoi di quelli strettamente necessari per la fertilizzazione delle uova (Sivinski, 1980), il che riflette una maggiore tendenza ad accoppiarsi ripetutamente. Va sottolineato però che, laddove le femmine traggono un beneficio diretto da questa forma di investimento da parte del maschio, mentre lo zigote trae solo benefici indiretti attraverso la madre, i maschi diventano particolarmente suscettibili di essere sfruttati inutilmente, perché la femmina può apportare beneficio anche a zigoti fecondati con i contributi di altri maschi competitori. Questa funzione nutritiva potrebbe contribuire inoltre a spiegare relazioni omosessuali osservate in alcuni insetti come i cimicidi, per i quali è stato

suggerito che esse abbiano lo scopo ulteriore di ridurre la capacità di fertilizzazione del maschio rivale. Una maggiore produzione di uova è stata correlata alla poliandria, tuttavia, anche in insetti che non praticano il rito del dono nuziale. In quest'ultimo caso, una delle ipotesi è che l'eiaculato maschile contenga ormoni che inducono l'ovideposizione, e che quindi più accoppiamenti abbiano l'effetto di amplificare questo tipo di stimolazione. L'aumentato tasso di natalità delle uova deposte da femmine che si sono accoppiate più volte sembra invece essere semplicemente legato al fatto che più accoppiamenti garantiscono l'immagazzinamento di quantità di sperma sufficienti a fecondare un maggior numero di uova. Una singola inseminazione può infatti non bastare ad assicurare la fertilizzazione di tutte le uova che verranno deposte nell'arco della stagione riproduttiva (Halliday & Arnold, 1987), anche a causa di una ridotta capacità della spermateca. Questo apparente limite può celare in realtà una strategia di ottimizzazione per cui la femmina, accoppiandosi ripetutamente, preferisce ridurre il costo di dover mantenere a lungo gli spermatozoi vitali all'interno del suo corpo (Ridley, 1988).

Tra i possibili altri vantaggi dell'accoppiamento multiplo per la femmina vi è anche la maggiore acquisizione di sostanze di difesa attraverso la copula (Sierra *et al.*, 1976), l'accesso a risorse controllate dai maschi, come ad esempio il permesso di nutrirsi o ovideporre nel loro territorio (Alcock *et al.*, 1977), il diritto di essere protetta da parte dei maschi, che per salvaguardare la propria progenie la difendono da altri accoppiamenti indesiderati o predatori (Fig. 1.8) fino al momento in cui deporrà le uova (Fincke, 1984).

In un lavoro del 1977, Gillespie ha modellizzato le conseguenze sulla dinamica di popolazione della varianza nella progenie vitale prodotta per generazione. Questo studio dimostra che, a parità di numero medio di figli sopravvissuti per femmina, risulta favorita una strategia poliandrica in quanto essa presenta una varianza inferiore tra una generazione e l'altra (Knowlton & Greenwell, 1984). Ovviamente il vantaggio selettivo di una bassa varianza nella progenie vitale è difficile da valutare in quanto dipende anche dalla stabilità e dalle dimensioni della popolazione. In linea di massima è però possibile affermare che in popolazioni piccole o che hanno subito effetti del fondatore, i benefici dell'accoppiamento multiplo legati a questo fenomeno saranno di maggiore entità (Parker, 1984).

Esistono poi diverse ipotesi per spiegare quelli che sono i vantaggi genetici della poliandria. Secondo una delle teorie principali, essa conferisce maggiore probabilità di acquisire “buoni geni” perché attraverso accoppiamenti successivi la femmina può operare una selezione sequenziale. Quando essa incontra un maschio “di migliore qualità” rispetto ai precedenti, essa può riaccoppiarsi con esso e decidere di utilizzare per la fecondazione solo il suo sperma (Dickinson & Rutowski, 1989; Eberhard, 1996; Yasui, 1997). Il modello proposto da Yasui

(1997) sostiene che le femmine poliandriche tendono a ricevere buoni geni perché i maschi con maggiore abilità nella competizione spermatica possiedono complessivamente una qualità genetica migliore. Analogamente, secondo “l’ipotesi dello scambio vantaggioso” (Kempenaers *et al.*, 1992), le femmine cercano accoppiamenti extra al di fuori del “contesto sociale” della loro colonia o popolazione per accedere a maschi con caratteri genetici nuovi che possono risultare vincenti.



**Fig. 1.8.** Femmina di *Archilestes californica* che depone le uova sotto il controllo e la protezione del maschio.  
*Archilestes californica* female laying eggs under control and protection of the male.  
[http://casswww.ucsd.edu/archive/personal/ron/CVNC/odonata/ips\\_odonata.html](http://casswww.ucsd.edu/archive/personal/ron/CVNC/odonata/ips_odonata.html)

Il beneficio che le femmine traggono dagli accoppiamenti multipli può essere visto anche come una forma di prevenzione dall’incompatibilità genetica col maschio. Elementi genetici “egoisti” come endosimbionti cellulari, elementi trasponibili e distorsori della segregazione possono incidere sugli aplotipi materni e paterni al punto da renderli incapaci di combinarsi tra loro e produrre uno zigote vitale (Zeh & Zeh, 1996). Tramite i meccanismi di selezione post-copulatoria, le femmine possono allora minimizzare i costi dell’essere fecondate da spermatozoi geneticamente incompatibili (Zeh & Zeh, 1996). Inoltre, la poliandria riduce il rischio di mutazioni nel numero di cromosomi, che sono spesso legate alla necessità di immagazzinare a

lungo lo sperma, o ad eiaculati sterili o sub-fertili (Dewsbury, 1982; Halliday & Arnold, 1987). “L’ipotesi della diversità genetica” si fonda invece sul fatto che una progenie derivante da più padri avrà mediamente maggiori livelli di eterozigosità e maggiori probabilità di acquisire nel proprio pool genico alleli potenzialmente vantaggiosi per affrontare cambiamenti ambientali improvvisi (Yasui, 1998; 2001). La poliandria sarà allora vincente in ambienti instabili o dove vi sia forte competizione tra fratelli (Knowlton & Greenwell, 1984; Smith, 1989). Ovviamente l’aumento della variabilità genetica della prole sarà inversamente proporzionale al livello di parentela tra i maschi che partecipano alla fecondazione (Yasui, 1998). Una parziale obiezione a questa teoria è che mediamente già con un solo accoppiamento la femmina è in grado di fornire alla progenie una diversità genetica pari a circa la metà di quella presente nella sua popolazione, e quindi spesso è sufficiente un numero esiguo di copule per coprire la diversità genetica complessiva a disposizione (Williams, 1975). Secondo “l’ipotesi dello sperma attraente” (Keller & Reeve, 1995), le femmine incentivano la competizione tra gli spermatozoi di più maschi in quanto garantisce loro di essere fecondate dallo sperma migliore e quindi produrranno una progenie maschile a sua volta più competitiva (e con una *fitness* maggiore). La prole, infatti, acquisirà dal maschio vincente quei caratteri ereditari che conferiscono uno sperma di maggiore successo, e che verranno quindi selezionati nelle generazioni future. Va sottolineato però che Curtsinger (1991) ha testato questa ipotesi in un modello genetico a due loci, dimostrando che essa fallisce non appena vi siano dei costi associati all’accoppiamento multiplo, e che le condizioni necessarie affinché la competizione tra spermatozoi da sola possa promuovere l’evoluzione della poliandria sono piuttosto restrittive.

Tutte queste considerazioni suggeriscono quindi che il verificarsi di più accoppiamenti consecutivi può essere vantaggioso per la *fitness* della femmina, ma che non si traduce necessariamente in fenomeni di paternità multipla nella sua prole, in quanto esistono dei meccanismi di selezione sessuale post-copulatoria. Questi meccanismi vengono modellati proprio sulla base dei conflitti di interessi tra i due sessi riguardanti l’accoppiamento multiplo, di cui si accennava sopra. Essi possono avvenire fondamentalmente a due livelli: la competizione spermatica messa in atto dai maschi per monopolizzare le femmine, o fenomeni di scelta criptica controllati dalle femmine stesse. La competizione spermatica è definita come la competizione tra gli eiaculati di due o più maschi per fecondare le uova di una femmina (Parker, 1970), mentre per scelta criptica si intende la capacità della femmina di influenzare il successo di fecondazione di un determinato maschio, favorendo attivamente il suo eiaculato nella competizione spermatica rispetto a quello di altri maschi (Eberhard, 1996).



### **1.3.2. Competizione spermatica**

Secondo la teoria darwiniana la selezione sessuale consiste in un successo riproduttivo differenziale e non attribuibile al caso, ma al risultato della competizione per l'accesso agli accoppiamenti. Il concetto di competizione spermatica è stato introdotto da Parker nel 1970 ed amplia il campo d'azione della competizione per un maggiore successo riproduttivo anche alla fase della fecondazione. La strategia ottimale per il maschio può non essere infatti quella di fecondare quante più femmine possibile ma piuttosto quante più uova. Per competizione spermatica si intende quindi una forma di competizione per la fertilizzazione delle uova che avviene tra gli spermatozoi dei maschi all'interno dell'apparato riproduttore femminile, e che comporta la selezione di caratteri maschili sia di attacco che di difesa. La competizione spermatica è dunque un aspetto della competizione sessuale tra maschi che costituisce una potente forza della selezione sessuale nel generare adattamenti comportamentali, fisiologici e morfologici. Questi adattamenti possono essere finalizzati da una parte ad ostacolare l'accesso alle femmine da parte di altri maschi, e quindi prevenire che esse si riaccoppino, dall'altra ad assicurare che il proprio sperma sia quello impiegato dalla femmina per la fecondazione, e abbia la priorità su quelli di accoppiamenti precedenti (Simmons, 2001). Inoltre, uno stesso carattere può svolgere diverse funzioni adattative (Thornhill, 1984), ad esempio, un comportamento che riduce il rischio di riaccoppiamento della femmina può anche avere un ruolo nella stimolazione di una scelta criptica da parte di quest'ultima. Diverse strategie possono coesistere, ed il bilancio complessivo del loro successo determinerà il risultato di un accoppiamento multiplo nei termini della proporzione in cui ciascuno dei maschi coinvolti ha contribuito alla progenie di una determinata femmina.

#### **1.3.2.1. Adattamenti del maschio per la priorità dello sperma**

Nel 1962 Lefevre e Jonsson ipotizzarono per primi l'esistenza di un qualche meccanismo che permettesse ai maschi di escludere lo sperma di altri competitori a favore del proprio. Essi infatti osservarono che in *Drosophila melanogaster* il numero di spermatozoi immagazzinati nella spermateca rimane pressoché invariato prima e dopo una seconda copula, ma che la maggior parte della progenie è attribuibile all'ultimo maschio accoppiato. Quando nella fertilizzazione delle uova viene favorita l'utilizzazione dello sperma di uno o più maschi a discapito di quello di altri possono entrare in gioco diversi meccanismi. Esistono principalmente 5 strategie attraverso le quali un maschio può tentare di assicurarsi che il proprio contributo spermatico abbia maggiore successo sugli altri: rimozione, stratificazione o diluizione dello sperma, manipolazione dei processi di fertilizzazione e possesso di particolari caratteristiche adattative

dello sperma (forma e dimensioni).

### 1. Meccanismi di rimozione

Si parla di *sperm displacement* quando un maschio sposta o rimuove fisicamente lo sperma di un altro proveniente da un accoppiamento precedente, in modo che il suo eiaculato abbia maggiori probabilità di fecondare la femmina. La strategia adottata può essere di tipo meccanico, chimico, o fisico.

- **Rimozione meccanica:** senza dubbio diversi caratteri morfologici particolarmente complessi dell'organo copulatore maschile sembrano evoluti per eludere meccanicamente le barriere dell'apparato femminile. La rimozione meccanica è stata osservata per la prima volta negli Odonati (Waage, 1979) e si è scoperto essere ampiamente diffusa in quest'ordine di insetti. L'edeago di molti Anisotteri e Zigotteri presenta infatti adattamenti morfologici particolari che servono a raccogliere ed estromettere lo sperma preesistente dall'apparato riproduttore femminile durante la copula. Nel genere *Orthectrum*, ad esempio, l'organo maschile è provvisto di uno speciale flagello munito di barbigli (Siva-Jothy, 1984, 1987). Anche nel coleottero *Tenebrio molitor* è stato dimostrato che il maschio è in grado di rimuovere lo sperma altrui, tramite una specie di guaina rivestita di spine chitinee sul suo organo copulatorio. Tale struttura risulta però efficace finché il liquido seminale permane nella *bursa copulatrix*, ma non può più accedervi quando questo raggiunge la spermateca (Gage, 1992).
- **Rimozione chimica:** particolari sostanze presenti nel liquido seminale, generalmente di natura proteica, possono ridurre la motilità o addirittura uccidere gli spermatozoi già presenti nella spermateca, oppure indurre la femmina a svuotare essa stessa l'organo di immagazzinamento, come è stato riscontrato in *D. melanogaster* da Harshman e Prout (1994).
- **Rimozione fisica basata sul “risciacquo”:** in questo caso viene provocata la fuoriuscita dello sperma dei competitori riempiendo la spermateca con un'abbondante quantità del proprio eiaculato. Questo tipo di rimozione è stato proposto per *Locusta migratoria* e per il grillo *Truljalia hibinosis* (Gregory, 1965; Ono *et al.*, 1989).

### 2. Meccanismi di stratificazione

All'interno delle spermateche, i contributi dei vari maschi possono disporsi in maniera stratificata ed essere quindi impiegati in ordine sequenziale. Generalmente, infatti, lo sperma lascia la spermateca per fecondare le uova dallo stesso canale dal quale vi è stato introdotto, per cui si

crea un meccanismo del tipo “ultimo che entra, primo ad uscire” (Birkhead & Hunter, 1990) che favorisce gli spermatozoi che si vengono a trovare vicino all'entrata della spermateca. Questa condizione può essere ottenuta volutamente se il maschio spinge con il proprio eiaculato lo sperma dei rivali verso l'estremità più interna dell'organo di immagazzinamento.

È da tenere presente che il vantaggio riproduttivo dato dai meccanismi di stratificazione spesso decresce col passare del tempo dopo la copula (Siva-Jothy & Tsubaki, 1989; 1994) perché gli spermatozoi dei maschi competitori tendono a mescolarsi all'interno della spermateca, annullando l'effetto “ultimo che entra, primo ad uscire”. Questo rimescolamento può essere immediato o verificarsi dopo diversi giorni, la velocità con cui avviene varia da specie a specie e probabilmente è influenzata dalla motilità degli spermatozoi (Mc Vey & Smittle, 1984; Simmons, 1987a; Siva-Jothy & Tsubaki, 1994).

### **3. Diluizione mediante trasferimento di grandi quantità di sperma**

Quando gli spermatozoi di diversi maschi tendono a mescolarsi immediatamente tra loro nella spermateca, il successo nella fecondazione delle uova diventa direttamente correlato alla proporzione relativa dei diversi contributi spermatici e quindi alla quantità di sperma trasferita da ciascun rivale. Si deve creare così un compromesso tra il tempo speso nella ricerca di *partner* sessuali e quello speso durante la copula. Quest'ultimo deve essere sufficiente a trasferire un'adeguata quantità di eiaculato ma non troppo lungo perché, se gli spermatozoi si mescolano immediatamente, scompaiono i vantaggi dati dall'evitare accoppiamenti successivi e cercare di essere l'ultimo ad introdurre lo sperma, e subentrano gli svantaggi legati ad una maggiore vulnerabilità e dispendio di energie durante la copula (Parker & Simmons, 1991). La durata della copula tenderà allora ad essere inferiore nei maschi di grandi dimensioni, in quanto sono più rapidi nel trasferire lo sperma alla femmina (Parker & Simmons, 1994). Esiste inoltre un ulteriore compromesso tra le risorse energetiche spese nella produzione di sperma (va ricordato che esso ha un costo, seppur inferiore rispetto alla produzione di uova) e quelle investite nell'ottenere accoppiamenti (Parker, 1990a). Questo porta alcuni maschi a conservare una parte delle proprie riserve di sperma, e magari a cercare di accoppiarsi più volte nelle situazioni in cui il rischio di competizione spermatica è più basso, e a trasferire grandi quantità di eiaculato quando la competizione è più alta (Parker, 1990b). Questo fenomeno è stato osservato in diversi insetti, come la tarma della farina *Tenebrio molitor* (Gage & Baker, 1991), la mosca della frutta *Ceratitis capitata* (Gage, 1991), i grilli *Acheta domesticus* e *Gryllobates supplicans* (Gage & Barnard, 1996). Conseguentemente, il volume dell'eiaculato aumenta con il livello di poliandria. Nelle specie poliandriche si registra, tra l'altro, anche una più rapida produzione dello sperma e

di sostanze accessorie, ed una maggiore capacità di mantenere a lungo lo sperma vitale (Svard & Wiklund, 1989; Bissondath & Wiklund, 1996).

Tuttavia, in alcuni casi di marcata precedenza spermatica a favore dell'ultimo maschio, le dimensioni dell'eiaculato possono anche diminuire con l'intensificarsi della competizione spermatica. Un'interpretazione plausibile è che i maschi possano trarre vantaggio dal conservare le proprie riserve, trasferendo solo il minimo sperma necessario ad assicurarsi la fertilizzazione delle poche uova che saranno probabilmente deposte prima che la femmina si accoppi di nuovo (Pitnick & Markow, 1994).

Una strategia alternativa per diluire gli eiaculati dei competitori facendo prevalere il proprio può essere inoltre quella di accoppiarsi ripetutamente con la stessa femmina. Questo, oltre a contrastare gli effetti negativi del rimescolamento, può sostituire in parte anche la strategia di fare la guardia alla femmina per prevenire che si riaccoppi.

#### **4. Stimolazioni chimiche e comportamentali della femmina**

Il maschio può interagire con la femmina a livello chimico o comportamentale inducendo in essa l'avvio di particolari attività legate alla sfera riproduttiva, come ovulazione, trasporto dello sperma, aborto, o espulsione degli spermatozoi di accoppiamenti precedenti, come fa ad esempio la mosca *Dryomyza anilis* prima di ovideporre. I maschi di questa specie inducono infatti l'espulsione dello sperma dei competitori occludendo i genitali esterni femminili (Otronen & Siva-Jothy, 1991).

#### **5. Caratteristiche adattative dello sperma**

Nell'ultimo ventennio è stata sviluppata una estesa base teorica tramite la quale è possibile predire gli effetti della competizione spermatica sulla base delle caratteristiche degli eiaculati, come il numero di spermatozoi, la loro morfologia e motilità (Parker, 1998; Wedell *et al.*, 2002). A volte gli spermatozoi presentano infatti adattamenti finalizzati ad ostacolarne l'espulsione da parte della femmina e a favorire la loro permanenza nel suo apparato riproduttivo (grandi dimensioni, barbe e strutture varie che si impigliano alle membrane dei canali). Le dimensioni, ed in particolare la lunghezza degli spermatozoi, sono stati più volte relazionati alla competizione spermatica (Pitnick & Markow, 1994). Spermatozoi più lunghi e che nuotano più velocemente possono infatti offrire un vantaggio adattativo. In alcuni casi estremi, lo spermatozoo arriva ad essere addirittura più lungo della distanza che dovrebbe percorrere nelle vie femminili. Il vantaggio di ciò sembra essere legato alla capacità di impedire l'accesso ad altri spermatozoi competitori, o ad una maggiore resistenza a tentativi di rimozione da parte dei rivali (Dybas &

Dybas, 1981; Pitnick & Markow, 1994). Spermatozoi di grandi dimensioni possono inoltre beneficiare di maggiori riserve energetiche o migliori sistemi di difesa, ed avere quindi più elevate potenzialità di sopravvivenza, fattori particolarmente importanti quando la femmina si accoppia più volte e feconda le uova in momenti successivi (Parker, 1993). Una variabilità intraspecifica nelle dimensioni degli spermatozoi è stata osservata in molte specie di artropodi (Ward, 1998), e in un caso è stata verificata la sua relazione con la *fitness* del maschio: nell'acaro *Rhizoglyphus robini* le dimensioni degli spermatozoi sono infatti positivamente correlate con il successo nella fertilizzazione (Radwan, 1996).

Di contro, un certo numero di artropodi produce spermatozoi aflagellati e immobili, una forma di resa che potrebbe essersi evoluta sotto un assoluto controllo della femmina (Baccetti & Afzelius, 1976; Dallai, 1979). In molti Lepidotteri invece il maschio produce due diversi tipi di gameti: spermatozoi eupirenici, completamente normali e attivi nella fertilizzazione, e spermatozoi apirenici, di ridotte dimensioni, privi di nucleo e quindi sterili, ma con elevata motilità e più rapidi tempi di sviluppo. Sebbene sembrino contro-selezionati, gli spermatozoi apirenici sono il componente principale dell'eiaculato di questi insetti. Sono state dunque formulate diverse ipotesi per spiegarne il ruolo enigmatico, e si pensa principalmente che possano servire per sostituire o inattivare lo sperma eupirenico di altri competitori (comportandosi da “spermatozoi assassini”), o per ritardare accoppiamenti successivi (Silberglied *et al.*, 1984). L'elevata motilità potrebbe infatti interferire con la ricettività della femmina simulando in essa la percezione di avere la spermateca piena (Silberglied *et al.*, 1984; Cook & Gage, 1995). In uno studio comparativo del 1994 su 74 specie di farfalle, Gage ha inoltre osservato che la lunghezza degli spermatozoi eupirenici aumenta con l'intensità della competizione spermatica (secondariamente al controllo sulle dimensioni corporee), dimostrando un chiaro ruolo adattativo delle dimensioni dei gameti maschili anche in quest'ordine di insetti. Questo spiegherebbe in parte perché nella falena *Plodia interpunctella* e nella farfalla *Pieris rapae* i maschi sono in grado di aumentare la proporzione di spermatozoi eupirenici quando si accoppiano con femmine non vergini (Cook & Gage, 1995; Cook & Wedell, 1996), suggerendo che vi sia un gioco di equilibri nella produzione dei due tipi di sperma, volto a bilanciare i vantaggi selettivi di entrambi. Nel dittero *Drosophila pseudoobscura* è stato osservato lo stesso fenomeno con la differenza che gli spermatozoi normali sono gli unici a partecipare alla fecondazione nonostante anche quelli più piccoli possiedano un nucleo con il corretto contenuto genetico (Snook *et al.*, 1994).

### **1.3.2.2. Adattamenti per impedire alla femmina di riaccoppiarsi**

Esistono diversi caratteri morfologici, chimici e comportamentali selezionati perché riducono la

probabilità che la femmina, dopo essersi accoppiata con un maschio, copuli nuovamente con altri (Parker, 1970).

1. **Tappi:** generalmente il maschio spalma il secreto di ghiandole accessorie sull'apertura dei genitali femminili e questa sostanza si solidifica formando un tappo che impedisce l'inseminazione da parte di competitori successivi. Alcuni autori hanno anche suggerito che questi tappi potrebbero inoltre aiutare a prevenire una perdita passiva e accidentale di liquido seminale dalle vie genitali femminili durante la copula (Parker, 1970).
2. **Copulazione prolungata:** il maschio continua ad occupare le vie genitali femminili anche dopo aver terminato l'inseminazione, spesso grazie a strutture speciali che mantengono uniti gli organi copulatori.
3. **Attività di guardia contro l'avvicinamento di altri maschi:** il maschio impedisce l'accesso alla femmina da parte di altri competitori senza mantenersi in contatto diretto con essa, ma attraverso comportamenti aggressivi o intimidatori verso i rivali, oppure allontanando la femmina dalle aree a più alta densità di maschi. È interessante notare come l'azione di controllo sulla femmina del grillo *Teleogryllus commodus* ha in realtà anche l'ulteriore scopo di prevenire che questa si nutra della spermatofora ricevuta, fino a che gli spermatozoi non siano migrati nella spermateca.
4. **Induzione di un periodo di refrattarietà nella femmina:** in questo caso la femmina può essere resa meno ricettiva nei confronti di altri maschi attraverso lo sperma stesso o sostanze in esso contenute (Eberhard, 1996), oppure il maschio può ridurre il potere attrattivo della femmina inibendone la produzione di feromoni sessuali o applicando sul suo corpo sostanze anti-afrodisiache (Riddiford & Ashenhurst, 1973; Kukuk, 1985).

Va considerato che sia la copula prolungata che l'attività di guardia hanno un costo elevato per il maschio, in termini di perdita di ulteriori opportunità di accoppiamento, proporzionale al tempo speso ad occupare la femmina. Questi comportamenti evolvono quindi solo quando giustificati da un aumento della *fitness* del maschio che superi il loro costo. La strategia dei tappi richiede invece un dispendio di energia nella produzione dei secreti responsabili dell'occlusione, ma dopo la copula il maschio è immediatamente libero di cercare altre *partner*.

### 1.3.3. Scelta criptica post-copula della femmina

Questo tipo di selezione sull'eiaculato, che avviene a livello delle vie riproduttive femminili (da qui la definizione "scelta criptica"), risulta particolarmente difficile da studiare e misurare, e per tale ragione ha ricevuto relativamente meno attenzioni. Tuttavia, già nel suo contributo del 1970, che rappresenta una pietra miliare nello studio della competizione spermatica, Parker sottolineava che il ruolo femminile nell'accoppiamento non può essere ridotto a quello di un semplice fattore ambientale inerte, intorno al quale evolvono gli adattamenti per la competizione sessuale tra maschi. Negli ultimi anni si è compresa maggiormente l'importanza della femmina nel processo di fecondazione ed è emerso che essa ha spesso la capacità di dettare le regole del gioco, fertilizzando le proprie uova in modo selettivo così da favorire il maschio che apporterà una *fitness* maggiore alla sua progenie. Sotto questo punto di vista, la poliandria sembrerebbe essersi evoluta come un meccanismo che aumenta il successo riproduttivo delle femmine (Sivinski, 1984), contraddicendo il principio di Bateman citato prima. Il mondo degli insetti rappresenta dunque un tipico caso in cui la femmina ha un maggior controllo sul processo riproduttivo rispetto al maschio. Essa infatti conserva le uova all'interno del proprio corpo e riceve lo sperma, che generalmente immagazzina e utilizza a sua discrezione. Inoltre tende a non accoppiarsi ogni volta che ne ha l'opportunità, rifiutando spesso il corteggiamento del maschio. È infatti comunemente accettato che la femmina ottimizzi il suo successo riproduttivo attraverso la scelta del maschio. Effettuare questa selezione prima della fertilizzazione serve indubbiamente a prevenire la perdita di gameti, e farlo prima che avvenga la copula ha la funzione di evitare i pericoli e la perdita di tempo e risorse energetiche che l'accoppiamento comporta. Esistono tuttavia circostanze nelle quali la femmina è costretta, o preferisce, operare la scelta del *partner* sessuale dopo l'accoppiamento, identificando e manipolando il suo sperma. Nonostante le scarse evidenze empiriche esistenti per la scelta criptica femminile, sono stati ipotizzati diversi meccanismi che danno alla femmina la facoltà di selezionare e controllare la quantità dello sperma ricevuto. Essa può infatti espellere attivamente dello sperma, inibire o rallentare il suo trasporto verso gli organi di immagazzinamento, digerirlo o non creare le condizioni per mantenerlo vitale, controllare l'ovulazione o usare selettivamente solo una parte dello sperma a disposizione. Inoltre, quando una femmina incontra un *partner* sessuale con una qualità genetica migliore rispetto ai precedenti, ma non può selezionarne attivamente l'eiaculato perché l'anatomia della spermateca determina un immediato mescolamento degli spermatozoi, essa può favorirne la precedenza spermatica dell'ultimo maschio accoppiandosi ripetutamente con esso e rifiutando copule successive (Hunter *et al.*, 1993).

Gli eiaculati di maschi geneticamente inferiori o troppo simili alla femmina possono dunque

essere esclusi dalla fecondazione (Thornhill, 1980; Walker, 1980) e l'accoppiamento multiplo diventa un meccanismo fondamentale per evitare di riprodursi con individui geneticamente incompatibili. La femmina ad esempio può ottenere informazioni aggiuntive sulla *fitness* del *partner* sessuale dalla qualità del suo eiaculato, in termini di volume e concentrazione di spermatozoi. È verosimile anche che le femmine possano interpretare i costituenti dello sperma come indicatori chimici della qualità genetica del loro portatore e che i maschi depositino in esso composti chimici informativi in tal senso. Un'altra forma di incompatibilità genetica è quella dovuta all'eccessiva somiglianza (accoppiamenti con parenti stretti), che produce gli effetti della depressione da *inbreeding*, con una ridotta *fitness* della progenie (Tregenza & Wedell, 2000). In questo caso sono documentati diversi meccanismi per ridurre il rischio di riprodursi con consanguinei (Pusey & Wolf, 1996), e tutta una serie di studi recenti suggerisce che le femmine, se soggette ad accoppiamenti con maschi imparentati e non, siano in grado di manipolare la paternità della loro prole a favore dei maschi non imparentati (Olsson *et al.*, 1996; Stockley, 1999; Mack *et al.*, 2002; Bretman *et al.*, 2004; Thuman & Griffith, 2005; Simmons *et al.*, 2006; Jehle *et al.*, 2007), anche se queste evidenze non sono state riscontrate diffusamente (Stockley, 1997; Jennions *et al.*, 2004; Denk *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2008).

Un altro vantaggio della selezione post-copula è dato dal fatto che, quando una femmina emette segnali attrattivi per l'accoppiamento, come feromoni sessuali nel caso degli insetti, rinuncia in buona parte alla possibilità di discriminare i maschi a distanza. Specialmente se i maschi sono difficili da reperire o comparare simultaneamente, e/o quando il corteggiamento richiede tempo ed espone maggiormente al rischio di predazione, può essere dunque vantaggioso investire in copule multiple e selezionare in un secondo momento gli spermi. I criteri di discriminazione in questo caso possono essere sia morfologici che chimici. La complessità chimica e anatomica dell'apparato femminile (Fig. 1.9) e della cellula uovo offrono infatti diversi meccanismi di selezione e le strutture genitali particolarmente articolate e la presenza di organi di conservazione dello sperma, che sono caratteri comuni negli insetti, possono essere degli strumenti in questo senso. I canali del sistema riproduttivo femminile ed i muscoli ad essi associati hanno ad esempio un ruolo dominante nel favorire la capacità degli spermi di muoversi al loro interno (Hinton, 1964; Blackith, 1973; Fig. 1.10).

### **1.3.3.1. Effetto materno**

Un altro aspetto della selezione sessuale post-copula femminile è “l'effetto materno”, ossia la capacità della femmina di modulare le risorse allocate alla sua progenie. Essa può infatti variare il suo investimento energetico sulle uova a seconda del fenotipo del compagno, influenzando



selettivamente ed in maniera profonda la qualità e la *fitness* della prole (Mousseau & Fox, 1998; Qvarnström & Price, 2001; Cunningham & Russell, 2000; Sheldon, 2000). Nel grillo *Gryllus bimaculatus*, ad esempio, si è visto che le femmine investono maggiormente nella produzione di figli se è data loro la possibilità di scegliere il maschio piuttosto che se gliene viene offerto uno solo (Simmons, 1987b). La possibilità di selezionare cripticamente il *partner* sessuale può dunque influenzare le risorse spese nella produzione di uova, e questo potrebbe spiegare molte differenze nelle percentuali di schiusa tra accoppiamenti poliandrici e monoandrici (Simmons, 2005). È da tenere in considerazione che questo fenomeno può confondere gli studi sui benefici genetici associati alle modalità di accoppiamento della femmina (Sheldon, 2000). Ad esempio, in un lavoro sullo scarabeo stercorario *Onthophagus taurus* (Kotiaho *et al.*, 2003), è emerso che gli effetti genetici del contributo paterno sulla lunghezza del corno nei maschi sono significativamente influenzati da un effetto materno, per il quale le femmine investono di più nella prole se si accoppiano con maschi grandi e dal corno lungo, selezionando così attivamente queste caratteristiche.

D'altra parte in molti insetti, i prodotti ghiandolari accessori vengono incorporati nell'eiaculato e trasferiti alla femmina, la quale subisce un'influenza dose-dipendente (le stimolazioni chimiche cui si accennava sopra), che spesso si traduce in un'aumentata allocazione di risorse nella produzione di uova (Simmons, 2001). Ad esempio, molte proteine secrete da ghiandole accessorie nei grilli vengono convertite in prostaglandine da una prostaglandino-sintetasi secreta dai testicoli (Destephano & Brady, 1977), assumendo così un'azione stimolante sulla produzione di uova (Stanley-Samuelson & Loher, 1986; Stanley-Samuelson *et al.*, 1986). Ci si può aspettare allora che una variabilità intraspecifica nella composizione o nell'efficacia di tali proteine produrrà variazioni nell'investimento materno sulle uova e nella vitalità degli embrioni. Eady *et al.*, (2000) hanno infatti osservato che, nel coleottero del fagiolo *Callosobruchus maculatus*, femmine poliandriche depongono più uova di quelle monoandriche, e lo stesso si è verificato in un esperimento di Worden e Parker (2001) su *Tenebrio molitor*. In entrambi i casi però il numero di accoppiamenti per femmina era lo stesso, con la differenza che al gruppo monoandrico veniva offerto ripetutamente lo stesso maschio. Sembra di conseguenza che in questo caso non vi sia un effetto significativo dato dal regime di accoppiamento, quanto piuttosto una maggiore risposta nella produzione di uova scatenata dalla varietà dei maschi con cui la femmina ha avuto modo di accoppiarsi. In uno studio su *Teleogryllus oceanicus* (Garcia-González & Simmons, 2005), è emersa invece una forte e positiva correlazione genetica tra gli effetti paterni sul successo di schiusa delle uova ed il peso delle ghiandole accessorie dei maschi. Questo risultato suggerisce allora un'interessante riflessione sul fatto che l'effetto materno sulla riproduzione può essere in

realità un riflesso indiretto di un effetto paterno responsabile della sua attivazione.

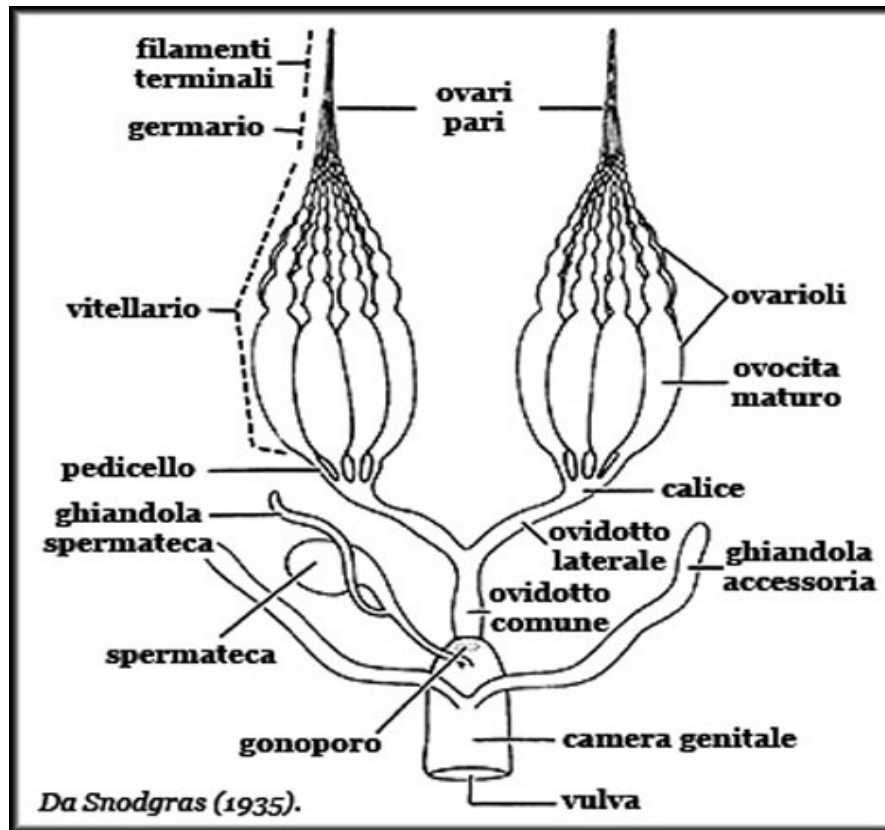


Fig. 1.9. Anatomia dell'apparato riproduttore femminile.  
*Anatomy of female reproductive system. From: Snodgras, 1935.*

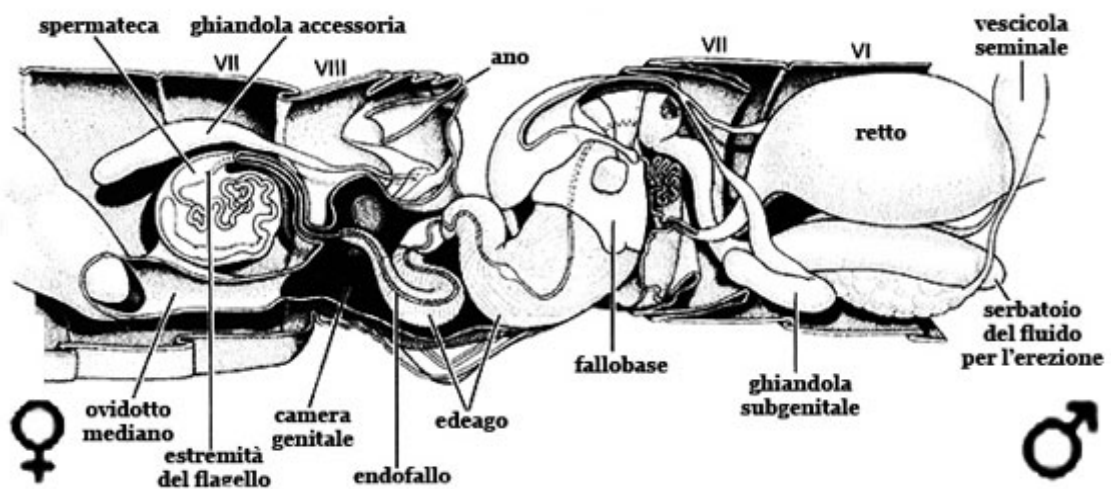


Fig. 1.10. Anatomia dell'apparato riproduttore femminile e maschile durante la copula.  
*Anatomy of female and male reproductive systems during copulation.*  
<http://alexminico.it/entomologia-anatomia.html>

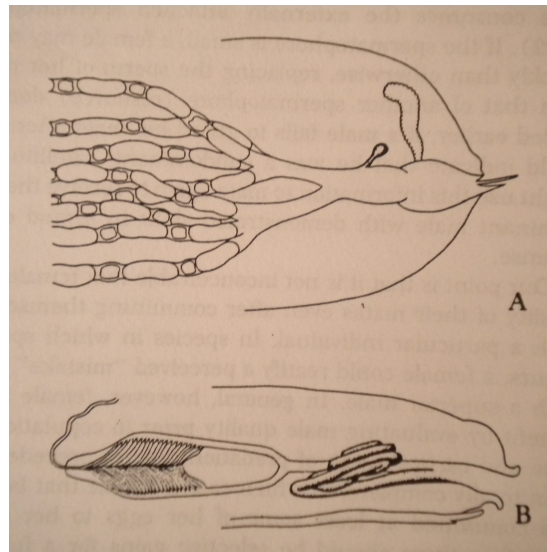
#### 1.3.4. *Last male sperm precedence*

Esistono quindi diversi fattori che influenzano le modalità di precedenza spermatica negli insetti, come ad esempio la durata dell'ultimo accoppiamento, l'intervallo di tempo tra una copula e l'altra, il numero di copule, le dimensioni dei maschi e delle spermatofore, laddove presenti, e la quantità di spermatozoi trasferiti da ciascun maschio (Simmons & Siva-Jothy, 1998).

Generalmente l'ordine in cui avvengono le copule può influire sul successo riproduttivo in termini di vantaggio o per il primo o per l'ultimo maschio che si è accoppiato. Nella stragrande maggioranza degli insetti in cui è stata osservata competizione per la precedenza sulla fecondazione, il vantaggio riproduttivo è a favore dell'ultimo maschio (*last male sperm precedence*, Parker, 1970; 1984; Ridley, 1989; Birkhead & Hunter, 1990). Gwynne (2012) ha infatti dimostrato la presenza di questo fenomeno in ben sette ordini di insetti, e Parker (1984) ha osservato che in moltissime specie l'ultimo maschio feconda spesso una proporzione di uova che varia dal 75 al 100%. Sono infatti numerosi gli studi che riportano alti livelli di precedenza spermatica dell'ultimo maschio negli insetti, ed in particolare nei coleotteri questo fenomeno è stato riscontrato nelle seguenti specie: *Trilobium confusum* e *Trilobium castaneum* (Tenebrionidae), *Trogoderma inclusum* (Dermestidae), *Ephilachana varivestis* (Coccinellidae), *Anthonomus grandis* e *Conotrachelus nenuphar* (Curculionidae) (dalla review di Gwynne, 2012), *Tetraopes tetraophthalmus* (McCauley & Rielly, 1984), *Callosobruchus maculatus* (Eady, 1991), *Adalia bipunctata* (Jong *et al.*, 1993), *Aleochara curtula* (Gack & Peschke, 1994), *Tenebrio molitor* (Siva-Jothy *et al.*, 1996).

Tradizionalmente, il grado di priorità raggiunto dallo sperma dell'ultimo maschio viene quantificato attraverso il valore  $P_2$ , che corrisponde alla proporzione di individui della progenie attribuiti al secondo maschio nell'accoppiamento di una femmina vergine con due *partner* (Boorman & Parker, 1976). Tale parametro, che oscilla tra 0 e 1, indicherà un completo mescolamento degli spermatozoi per valori intorno a 0.5, e una forma di precedenza dello sperma dell'ultimo maschio quanto più si avvicinerà al valore 1 (Gwynne, 2012). Ovviamente il valore  $P_2$  è molto variabile da specie a specie, e diverse considerazioni sono state fatte sui fattori che possono influire sulla precedenza dell'ultimo maschio. Ad esempio, in uno studio bibliografico comparativo su 21 specie, Boorman e Parker (1976) ipotizzano che i meccanismi di spostamento e rimozione di sperma eterologo possono essere di minore entità in insetti che producono tappi. Un altro lavoro condotto da Walker nel 1980 su 30 specie indica invece che questi meccanismi siano meno efficienti negli insetti con spermateca di forma sferica, mentre hanno un impatto molto maggiore quando la forma della spermateca è allungata (Fig. 1.11). La forma della spermateca influirebbe soprattutto nei processi di stratificazione dello sperma, in cui il contributo

di uno o più maschi può essere escluso dalla fecondazione delle uova se spinto e compresso verso l'estremità terminale dell'organo.



**Fig. 1.11.** **A:** Spermatheca sferoidale di un bombo / *Spheroidal spermatheca of a bumblebee* (Alford, 1975); **B:** Spermatheca allungata di una locusta migratoria / *Elongated spermatheca of a migratory locust* (Gregory, 1965).

Un altro aspetto estremamente interessante è la correlazione tra il fenomeno di precedenza dell'ultimo maschio ed il numero medio di accoppiamenti che una femmina effettua in condizioni naturali. In un lavoro del 1989, Ridley ha dimostrato come nelle specie con *last male sperm precedence* sia selezionata una maggiore frequenza negli accoppiamenti mentre, quando è spesso il primo maschio ad avere maggior successo, si osserva una tendenza al ritorno alla monoandria. Come già accennato, specialmente quando la competizione spermatica è particolarmente intensa, accoppiamenti ripetitivi con la stessa femmina possono costituire una strategia per far prevalere il proprio sperma su quello degli altri.

Esiste poi una variabilità intraspecifica nel successo delle strategie per la priorità sulla fertilizzazione delle uova (e quindi nel valore  $P_2$ ), che dipende da caratteristiche che possono variare nei singoli individui e negli eventi di accoppiamento, come la durata della copula ed il successo nel corteggiamento, le dimensioni del maschio, delle sue cellule spermatiche, o la capienza della spermatofora femminile, la morfologia delle strutture genitali maschili, il contenuto proteico dello sperma, o l'efficacia di eventuali molecole attrattive prodotte dal maschio (Simmons & Parker, 1992; Ward, 1993; LaMunyon & Eisner, 1994; Lewis & Austad,

1994; Clark *et al.*, 1995; Otronen, 1994). Dato il grande numero di fattori potenzialmente influenti, è piuttosto difficile stabilire se la variabilità riscontrata all'interno di una specie nel successo dell'ultimo maschio si possa attribuire a differenze nella capacità di competere proprie dei maschi o a scelte criptiche operate dalla femmina. Vi è poi da tenere sempre presente che la *performance* di un maschio può anche dipendere dalla particolare interazione tra genotipi maschili e femminili, per cui il suo successo può variare a seconda della femmina incontrata. Alcune considerazioni che si possono fare abbastanza semplicemente riguardano la correlazione tra volume dell'eiaculato, che si può mettere in relazione con caratteri come le dimensioni del maschio e la durata della copula, e valore  $P_2$ . Nell'ambito della variabilità intraspecifica, è probabile infatti che maschi più grandi e/o che si accoppiano più a lungo, trasferiscano alla femmina una maggiore quantità di sperma e per questo abbiano un maggior successo riproduttivo, indipendentemente dall'ordine di accoppiamento, ed è questo che può produrre la variabilità del valore  $P_2$  all'interno di una specie (Wedell, 1991; Simmons *et al.*, 1996).

Probabilmente un efficiente meccanismo di *last male sperm precedence* necessita la presenza congiunta sia di adattamenti per ottenere la priorità sugli spermatozoi di eventuali copule precedenti, sia di adattamenti volti ad impedire alla femmina di riaccoppiarsi.

### **1.3.5. Alcune considerazioni pratiche**

Uno degli approcci più comuni per studiare il sistema nuziale di un organismo, ed in particolare analizzarne aspetti difficilmente evidenziabili tramite la sola osservazione etologica, come appunto i meccanismi di selezione sessuale post-copula, consiste nell'effettuare degli esperimenti di incrocio in condizioni controllate, per poi verificare delle ipotesi di studio sulla progenie che ne risulta. In questo tipo di ricerche il disegno sperimentale degli accoppiamenti può influire molto sui risultati e dovrebbe riprodurre quanto possibile condizioni simili a quelle naturali per prevenire errori di interpretazione sulle modalità di utilizzo dello sperma della specie in questione (Danielsson, 1998). Ad esempio, i meccanismi di priorità spermatica possono essere influenzati dal numero di accoppiamenti successivi, e molti studi basati su accoppiamenti doppi e sul calcolo del valore  $P_2$  potrebbero avere esiti diversi se ripetuti con un maggior numero di copule. In un lavoro condotto sullo pseudoscorpione *Cordylochernes scorpioides* (Zeh & Zeh, 1994) emerge ad esempio un chiaro modello di precedenza dell'ultimo maschio quando la femmina si accoppia con due *partner* diversi mentre, portando il numero di accoppiamenti a 3, la progenie sembra risultare da un completo miscuglio degli spermatozoi. Un altro fattore importante negli esperimenti di accoppiamento in cattività è l'intervallo di tempo che intercorre tra le copule (Boorman & Parker, 1976; Ridley, 1989). Un lasso di tempo maggiore può infatti sia favorire

l'ultimo maschio (se ad esempio la femmina ha la facoltà di espellere gli spermatozoi dei maschi precedenti tra una copula e l'altra), sia ridurre la sua capacità di rimuovere lo sperma dei competitori (se ad esempio il maschio è in grado di raggiungere lo sperma presente nella *bursa copulatrix* ma non quello che è stato trasferito alla spermateca). Sono inoltre da tenere sotto controllo fattori già citati come le dimensioni dei maschi e delle eventuali spermatofore, la durata delle copule ed il tempo trascorso tra il penultimo e l'ultimo accoppiamento (Simmons & Siva-Jothy, 1998). Inoltre bisogna considerare che in natura non sempre un maschio incontra femmine che si trovano nello stato di ricettività sessuale ottimale (in termini di età, salute, verginità), come avviene invece normalmente durante gli esperimenti di laboratorio.

## 1.4. L'analisi di parentela su base molecolare: un approccio allo studio del *mating system*

La comprensione dei modelli e delle relazioni di parentela gioca un ruolo centrale non solo nello studio della struttura e dell'evoluzione dei sistemi di accoppiamento, ma anche di numerosissimi aspetti ecologici ed evolutivi, come la selezione sessuale (Jones & Avise, 2001; Sichlau *et al.*, 2015), i modelli di dispersione (Hardesty *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2014), la stima di parametri genetici quantitativi (Kruuk *et al.*, 2000; Garant & Kruuk, 2005) e di aspetti di biologia della conservazione (Planes *et al.*, 2009; Hess *et al.*, 2015). Solo per fare alcuni esempi di applicazioni nel campo della genetica di popolazioni, la capacità di ricostruire le relazioni genealogiche tra individui offre gli strumenti per minimizzare l'*inbreeding* in popolazioni tenute in cattività, stimare i tassi di flusso genico, correggere le stime delle frequenze alleliche su un campione popolazionistico in base alla presenza di individui strettamente imparentati, stimare le dimensioni effettive della popolazione a partire dalle differenze nel successo riproduttivo degli individui (Blouin, 2003). L'analisi di parentela è quindi una pietra miliare della ricerca nell'ambito dell'ecologia molecolare e non solo, per quanto sia ancora una disciplina relativamente giovane (Jones *et al.*, 2010).

### 1.4.1. Aspetti teorici dell'analisi di parentela: i diversi approcci

L'analisi di parentela può seguire dal punto di vista teorico due principali approcci. Il primo è volto a stimare il grado di parentela tra individui, inteso basilamente come la misura complessiva della proporzione di alleli tra essi condivisi ed identici “per discendenza”. Il secondo approccio consiste invece nell'assegnazione di coppie o gruppi di individui a determinate “categorie di parentela” (come ad esempio l'essere fratelli o cugini), e attraverso questi raggruppamenti ricostruisce relazioni di tipo genealogico (Blouin, 2003). Dal punto di vista metodologico esistono poi fondamentalmente sei approcci statistici all'analisi di parentela, che vengono qui brevemente descritti, all'interno dei quali sono stati sviluppati negli ultimi anni numerosissimi algoritmi, parallelamente ad altrettanti *software* dedicati (Jones *et al.*, 2010).

1. **Metodo di esclusione (*Exclusion*; Chakraborty *et al.*, 1974):** il principio di questo metodo è che in organismi diploidi, a riproduzione sessuata, ciascun genitore condivide almeno un allele per ogni locus con ciascuno dei propri figli, in accordo con le leggi di Mendel. I genotipi dei possibili genitori sono pertanto confrontati con quelli di ogni individuo della generazione filiale e viene escluso ogni candidato che non rispetti il criterio di condivisione di almeno un allele su tutti i loci presi in esame. Nella pratica

della maggior parte degli studi basati su questo approccio, in realtà, il criterio di esclusione viene rilassato, permettendo in genere discordanze tra il genitore candidato e la prole su almeno due loci, in modo da considerare anche eventuali errori di genotipizzazione, specialmente quando i marcatori impiegati sono microsatelliti. In questo caso, infatti, errori nell'assegnazione dei genotipi o la presenza di alleli nulli (alleli la cui amplificazione fallisce più o meno sistematicamente) possono far apparire un genitore e suo figlio omozigoti per alleli diversi (Pemberton *et al.*, 1995; Dakin & Avise, 2004; van Oosterhout *et al.*, 2004). Condizione necessaria affinché il metodo sia efficace è che gli errori di genotipizzazione siano considerabili come eventi rari, e si ottimizzi il potere risolutivo dei marcatori impiegati (Jones *et al.*, 2010).

2. **Attribuzione di parentela, o assegnazione categorica (*Categorical allocation*; Meagher & Thompson, 1986):** con i metodi di esclusione può accadere, specialmente se si devono analizzare un elevato numero di figli e di putativi genitori, che sia impossibile scartare tutti gli individui che non sono i reali genitori, ma che restino più candidati per la figura materna e/o paterna. L'assegnazione categorica è stata sviluppata in origine proprio per supplire quei casi in cui l'esclusione completa, che rappresenta l'optimum per un'analisi di parentela, fallisce (Meagher & Thompson, 1986). Secondo questo metodo, tra i più comunemente usati, differenti genotipi parentali avranno diverse probabilità di aver prodotto i genotipi della progenie sotto osservazione. Tali probabilità derivano dalla probabilità di transizione mendeliana, descritta in Marshall *et al.* (1998) come la probabilità di ottenere un certo genotipo filiale dati dei particolari genotipi parentali. L'intera progenie è quindi assegnata al genitore potenziale con il valore di massima verosimiglianza (*likelihood*) o la probabilità a posteriori più alte, a seconda che si sia scelto un approccio di *maximum likelihood* (Marshall *et al.*, 1998) o di tipo bayesiano (Nielsen *et al.*, 2001). Lo stesso impianto teorico può essere inoltre applicato quando si vuole assegnare un genitore al proprio *partner*. I principali vantaggi di questi metodi sono nella possibilità di gestire errori di genotipizzazione o mutazioni, agendo sulle probabilità di transizione prima citate, e di integrare metodi per determinare la confidenza statistica nell'assegnazione di parentela (Kalinowski *et al.*, 2007). Per queste ragioni l'assegnazione categorica è considerata come uno degli approcci più potenti e flessibili dell'analisi di parentela (Jones *et al.*, 2010).
3. **Assegnazione frazionata (*Fractional allocation*; Devlin *et al.*, 1988):** questo metodo



prevede il calcolo dei valori di *likelihood* o di probabilità a posteriori analogamente ai metodi di assegnazione categorica, con la differenza che ogni individuo della prole viene assegnato parzialmente a ciascuno dei genitori candidati non eliminati dal metodo di esclusione, in modo proporzionale alle probabilità relative di parentela. Di conseguenza, può essere assegnato ad un dato genitore putativo anche un numero di figli che non sia un intero. Anche se una tale assegnazione frazionata non ha alcun significato biologico, può presentare però, dal punto di vista statistico, delle proprietà migliori rispetto all'assegnazione categorica in alcuni particolari contesti e scopi di ricerca. Ad esempio può essere maggiormente efficace nella stima di variabili a livello popolazionistico, come la *fitness* relativa delle diverse classi genotipiche, o la varianza nel successo riproduttivo (Devlin *et al.*, 1988; Nielsen *et al.*, 2001).

4. **Analisi di parentela basata sulla probabilità complessiva (*Full probability parentage analysis*; Hadfield *et al.*, 2006):** comprende tecniche sviluppate principalmente in contesti nei quali l'analisi di parentela è più che altro un mezzo per inferire qualcosa su un processo a livello della popolazione (Nielsen *et al.*, 2001; Hadfield *et al.*, 2006). L'approccio valuta infatti vari schemi di parentela su base modellistica, stimando contemporaneamente diverse variabili di interesse relative alla popolazione. Il suo punto di forza è che consente un migliore utilizzo dei dati in quanto è in grado di incorporare diversi livelli di incertezza nell'analisi di parentela all'interno della stima delle variabili di interesse. Inoltre, in un contesto bayesiano, permette di includere informazioni a priori (*prior*), come la distribuzione spaziale dei genitori candidati, oppure ranghi di dominanza sociale, che accrescono le probabilità di successo dell'analisi (Neff *et al.*, 2001; Hadfield *et al.*, 2006). Jones *et al.* (2010) definiscono questo approccio promettente e motivano il fatto che non abbia ancora ricevuto ampia diffusione con le difficoltà che possono insorgere nello specificare il modello probabilistico qualora non si abbiano elementi a sufficienza per formulare assunzioni riguardo le relazioni tra particolari variabili di interesse ed il successo riproduttivo.
5. **Ricostruzione dei parentali (*Parental reconstruction*; DeWoody *et al.*, 2000a; 2000b; Jones, 2001):** questa tecnica è particolarmente efficace quando è possibile sapere a priori che un gruppo di individui appartiene alla stessa famiglia, e si utilizzano i genotipi della progenie per ricostruire quelli parentali. Essa può essere applicata sia a fratelli che condividono entrambi i genitori che a situazioni in cui c'è un solo genitore in comune

(fratellastri); il criterio è comunque quello che tutta la prole condividerà per lo meno madre o padre. Il genotipo del genitore condiviso può essere noto, o venire ricostruito identificando una coppia di alleli per i quali ogni figlio ha ereditato almeno uno dei membri della coppia. I genotipi di un genitore sconosciuto vengono invece determinati esaminando le associazioni di alleli presenti nei genitori potenziali sui vari loci. Inoltre, quando uno dei due genitori è noto, gli alleli dell'altro genitore possono essere determinati per sottrazione degli alleli del genitore noto dai genotipi della progenie. Il numero di alleli per locus nella generazione filiale attribuibili a genitori sconosciuti fornisce un'indicazione sul numero di genitori ignoti. Una volta che i genotipi attesi nella generazione parentale sono stati ricostruiti, vengono confrontati con quelli osservati nei genitori candidati per individuare i genitori reali. Va sottolineato però che, se il campionamento della progenie è sufficientemente completo, non è necessario avere un gruppo di genitori candidati (Emery *et al.*, 2001; Jones, 2005), per cui è teoricamente possibile ricostruire per inferenza i genotipi materni o paterni anche qualora non siano stati campionati affatto gli individui di uno dei due sessi. I metodi disponibili si basano sul principio di parsimonia, massima verosimiglianza o su approcci bayesiani. In generale, il successo di questo tipo di analisi di parentela dipende fortemente dal livello di polimorfismo dei marcatori caratterizzati e dalla numerosità del campione della generazione filiale, fattori questi che possono costituire un limite all'applicabilità del metodo. Analogamente, quando vi è un elevato numero di genitori all'interno di una famiglia (ad es. con alti livelli di poliandria), la ricostruzione dei parentali diventa meno efficace (Jones *et al.*, 2010). D'altra parte, più i genotipi osservati sono rari, maggiore sarà la confidenza con cui si attribuisce un genitore alla sua prole (Jones *et al.*, 2002). Una delle principali qualità della ricostruzione dei parentali risiede nel fatto che si analizzano i genotipi per gruppi familiari, e questo fornisce un meccanismo interno per identificare genotipi sospetti che potrebbero derivare da errori di assegnazione, mutazioni o alleli nulli e correggere così buona parte degli errori nel *data set* (Wang, 2004).

6. **Ricostruzione delle relazioni tra fratelli (*Sibship reconstruction*; Thomas & Hill 2002):** quando non è possibile identificare dei potenziali genitori e sapere a priori se la generazione filiale comprende individui completamente fratelli o almeno fratellastri, questo approccio rappresenta l'ultima risorsa nel campo dell'analisi parentela. Per applicarlo è sufficiente infatti un campione di individui, alcuni dei quali hanno uno o entrambi i genitori in comune. Questo metodo si rende quindi particolarmente utile nei

casi in cui sia possibile raccogliere grandi campioni della generazione filiale senza però poterli attribuire ad almeno un genitore o suddividerli in gruppi familiari. Gli algoritmi utilizzano modelli di parentela o tecniche di massima verosimiglianza per raggruppare gli individui, in base ai loro genotipi, in diverse classi, corrispondenti a determinate relazioni di parentela, che sono generalmente rappresentate da fratelli completi, fratellastri e individui non imparentati. I genotipi parentali vengono poi ricostruiti sulla base di quelli presenti nelle varie classi, e utilizzati per l'attribuzione di paternità/maternità. I recenti sviluppi del metodo permettono inoltre di usare i genotipi dei genitori candidati, quando disponibili, per guidare la procedura di ricostruzione delle relazioni tra fratelli (Almudevar & Field, 1999; Thomas & Hill, 2002; Ashley *et al.*, 2008). Le tecniche di *Sibship reconstruction* possono basarsi fondamentalmente su due approcci: quello probabilistico e quello basato sul calcolo combinatorio. Entrambi richiedono un notevole sforzo computazionale e tecniche di ottimizzazione stocastica per ridurre i tempi di analisi. Nel primo caso l'algoritmo tende a raggruppare gli individui in classi di parentela in modo da massimizzare la probabilità dei dati (Smith *et al.*, 2001; Thomas & Hill, 2002; Wang, 2004). Nel secondo caso l'obiettivo principale è quello di individuare gruppi di fratelli i cui genotipi rispettino al massimo le leggi di segregazione mendeliana (Almudevar & Field, 1999; Berger-Wolf *et al.*, 2007; Ashley *et al.*, 2008).

## **1.4.2. Aspetti pratici dell'analisi di parentela**

### **1.4.2.1. Il campionamento e la scelta dei metodi di analisi**

Come è ben noto, un buon campionamento degli individui è una delle componenti più importanti (e spesso più difficili da realizzare) che determinano l'efficacia di uno studio (Jones & Ardren, 2003; Pemberton, 2009). I fattori che influenzano la bontà del campionamento in un'analisi di parentela sono molteplici e devono essere valutati attentamente nella scelta dell'approccio metodologico più adeguato al sistema biologico e alle tematiche che si vogliono analizzare, così come al disegno sperimentale che si intende seguire. Anzitutto, è fondamentale capire se è possibile identificare e raccogliere un insieme di potenziali genitori, o se addirittura uno di essi è noto, come quando, ad esempio, si campiona la prole ancora in fase di sviluppo all'interno della madre, o uno dei genitori normalmente difende la nidiata. Mentre in questo caso infatti sono applicabili praticamente tutti i metodi di analisi di parentela, in altre condizioni sperimentali le opzioni si possono ridurre fortemente. Se è possibile identificare i gruppi di fratelli e fratellastri e le dimensioni di questi campioni sono relativamente grandi, c'è una buona probabilità di

ricostruire i genotipi dei genitori (*Parental reconstruction*). Se possono essere raccolti solo piccoli gruppi familiari, è ancora possibile ad esempio cercare prove di accoppiamento multiplo al loro interno con gli approcci di ricostruzione dei parentali (*Parental reconstruction*) o delle relazioni tra fratelli (*Sibship reconstruction*) (DeWoody *et al.*, 2000a-b; Neff *et al.*, 2002; Sefc & Koblmüller, 2009). Nei sistemi biologici in cui le dimensioni della progenie non sono elevate, la ricostruzione parentale non è applicabile ma, se è disponibile un buon numero di genitori candidati, i metodi di esclusione o di assegnazione restano dei validi approcci. Quando invece la prole non può essere raccolta in gruppi familiari, il metodo di *Sibship reconstruction* rimane l'unico approccio adeguato (Jones *et al.*, 2010). Come è facile intuire, qualunque tipo di analisi di parentela risulta molto più efficace quando ogni individuo della progenie è attribuito con certezza a uno dei genitori. Il campionamento ideale per uno studio di parentela vorrebbe quindi grandi gruppi familiari in cui la prole venga raccolta insieme ad un genitore noto, più un campione completo di tutti gli adulti della popolazione che si sono potenzialmente accoppiati con esso. Un simile campione, estremamente difficile da ottenere in popolazioni naturali, ma fattibile quando si lavora con esperimenti di incrocio controllato, permette di applicare qualunque tecnica di analisi di parentela, e di conseguenza le prospettive di successo sono più elevate. Riassumendo, quindi, i principali fattori che determinano l'efficacia di un'analisi di parentela e che guidano nella scelta del tipo di approccio statistico più efficace sono: la presenza di un campione di possibili genitori candidati e la proporzione con cui essi sono stati campionati all'interno della popolazione, la presenza di un genitore noto, la possibilità di raggruppare nella generazione filiale individui che sono tra loro fratelli e/o fratellastri (entrambi o uno solo dei genitori sono in comune), le dimensioni del campione della progenie e la proporzione di tale campione che è possibile analizzare.

#### **1.4.2.2. I marcatori molecolari**

Un altro aspetto fondamentale nella riuscita di un'analisi di parentela è la scelta di opportuni marcatori molecolari. La condizione ottimale è quella di disporre di numerosi loci con livelli di polimorfismo estremamente alti, che siano inoltre marcatori affidabili in termini di qualità e riproducibilità del dato (Jones & Ardren, 2003; Pemberton, 2009). In linea di principio, ogni marcatore genetico variabile che è stabilmente trasmesso dai genitori ai figli può essere utilizzato per l'analisi di parentela. Tuttavia, alcuni tipi di marcatori sono più adatti di altri per questa applicazione (DeWoody, 2005; Pemberton, 2009) e vale la regola generale che, più bassi sono i livelli di polimorfismo dei singoli loci, maggiore sarà il numero di loci che è necessario caratterizzare. Per questo motivo infatti, sebbene la rivoluzione dell'ecologia molecolare fosse

iniziata alla fine degli anni '60 del secolo scorso con l'elettroforesi di allozimi (Hubby & Lewontin, 1966), a quell'epoca l'analisi di parentela era un settore quasi inaccessibile, con qualche notevole eccezione (Ellstrand, 1984; Gowaty & Karlin, 1984), proprio a causa dei bassi livelli di polimorfismo caratteristici dei marcatori basati su proteine. Lo studio delle relazioni di parentela su base genetica ha iniziato a svilupparsi con la scoperta che sonde di DNA potevano essere utilizzate negli esseri umani e altri organismi per rivelare la variabilità di loci minisatelliti, producendo con un approccio multi-locus delle vere e proprie 'impronte digitali del DNA' (*DNA fingerprinting*; Jeffreys *et al.*, 1985). Questa tecnica fu rapidamente adottata dagli ecologi comportamentali in ornitologia (Burke & Bruford, 1987), portando a sorprendenti intuizioni sull'esistenza di accoppiamenti "extraconiugali" negli uccelli (Westneat & Sherman, 1997; Petrie & Kempenaers, 1998). Tuttavia, limiti tecnici e statistici hanno rallentato la diffusione delle applicazioni del *DNA fingerprinting* al di fuori di uccelli e mammiferi. È stato solo diversi anni dopo, con l'avvento dei marcatori microsatelliti (SSR, o sequenze semplici ripetute; Tautz, 1989), che è iniziata l'era d'oro degli studi sulle analisi di parentela, applicati diffusamente a qualunque taxon. Per la prima volta, infatti, i microsatelliti hanno offerto la possibilità di studiare loci genici ipervariabili, codominanti e analizzabili singolarmente in modo semplice e ripetibile, imponendo di conseguenza una revisione completa dei metodi di analisi di parentela (Awise, 2004; Pemberton, 2009). Il *DNA fingerprinting*, nonostante fosse relativamente semplice dal punto di vista metodologico della produzione dei dati, presentava una notevole complessità nell'interpretazione di quest'ultimi, in quanto i profili delle bande di ciascun individuo erano estremamente difficili da gestire dal punto di vista statistico, e ogni analisi di parentela doveva essere calibrata sul numero atteso di bande condivise tra le diverse classi di parentela, per ciascuna particolare popolazione o specie. Al contrario, per i microsatelliti, che seguono le semplici regole di segregazione mendeliana, le basi teoriche statistiche dell'analisi di parentela erano già in parte disponibili (Thompson, 1975, 1976; Meagher, 1986; Meagher & Thompson, 1986; Devlin *et al.*, 1988).

I marcatori molecolari più largamente impiegati per l'analisi di parentela sono dunque indiscutibilmente i microsatelliti (Pemberton, 2009). Sebbene il principale aspetto problematico nel loro utilizzo riguardi da sempre la fase iniziale di individuazione e messa a punto, le moderne tecnologie di sequenziamento genomico ed i relativi sviluppi nell'analisi bioinformatica hanno semplificato e velocizzato enormemente questo passaggio (Abdelkrim *et al.*, 2009). I motivi ripetuti maggiormente impiegati per l'analisi di parentela sono quelli di-, tri o tetra-nucleotidici. Quest'ultimi sono particolarmente efficienti perché gli alleli sono distanziati di almeno 4 paia di basi, e questo li rende più facilmente separabili con le tecniche elettroforetiche, e semplifica

l'interpretazione del segnale di genotipizzazione (Walsh *et al.*, 1996). Oltre ai microsatelliti esistono altri due tipi di marcatori che per loro caratteristiche sono adatti all'impiego nelle analisi di parentela: i polimorfismi basati su sostituzioni a singolo nucleotide (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), di tipo codominante come i microsatelliti, e quelli basati sulla lunghezza di frammenti amplificati (AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*), che presentano invece una trasmissione di tipo dominante. La principale differenza con i microsatelliti è che, lavorando con quest'ultimi si analizzano generalmente pochi loci altamente polimorfici, mentre SNP e AFLP richiedono la tipizzazione di elevati numeri di loci, in quanto presentano livelli di variabilità molto più bassi. La tecnica AFLP, ampiamente usata in passato per le analisi di parentela soprattutto in ambito botanico (Gerber *et al.*, 2000; Sezen *et al.*, 2009), ha il vantaggio di richiedere tempi di sviluppo rapidi e di essere applicabile a qualunque organismo, grazie a semplici *kit* disponibili in commercio. Di contro, la modalità di trasmissione della dominanza completa pone problemi di interpretazione del dato, in quanto non è possibile distinguere il genotipo eterozigote da uno dei genotipi omozigoti. I marcatori SNP richiedono invece la conoscenza di ampie regioni genomiche della specie in questione, e della posizione di siti nucleotidici polimorfici, per cui in passato sono stati impiegati soprattutto su organismi modello, e recentemente stanno ottenendo un'ampia diffusione grazie alla proliferazione dei dati di tipo genomico ottenuti dai sequenziamenti di nuova generazione. Grazie a queste tecnologie, è diventato possibile identificare in poco tempo elevatissimi numeri di SNP, che sono tra l'altro anche più semplici da caratterizzare rispetto ai microsatelliti, per cui è ragionevole pensare che saranno questi i marcatori d'elezione per le analisi di parentela nel futuro (Anderson & Garza, 2006). Va sottolineato però che alcuni metodi statistici dell'analisi di parentela (in particolare *Parental Reconstruction* e *Sibship Reconstruction*) si applicano male a loci poco variabili come SNP e AFLP, per cui è probabile che i microsatelliti resteranno i marcatori più impiegati per molti di questi studi ancora per un po' di tempo (Glaubitz *et al.*, 2003).

## Capitolo 2

### Materiali e metodi

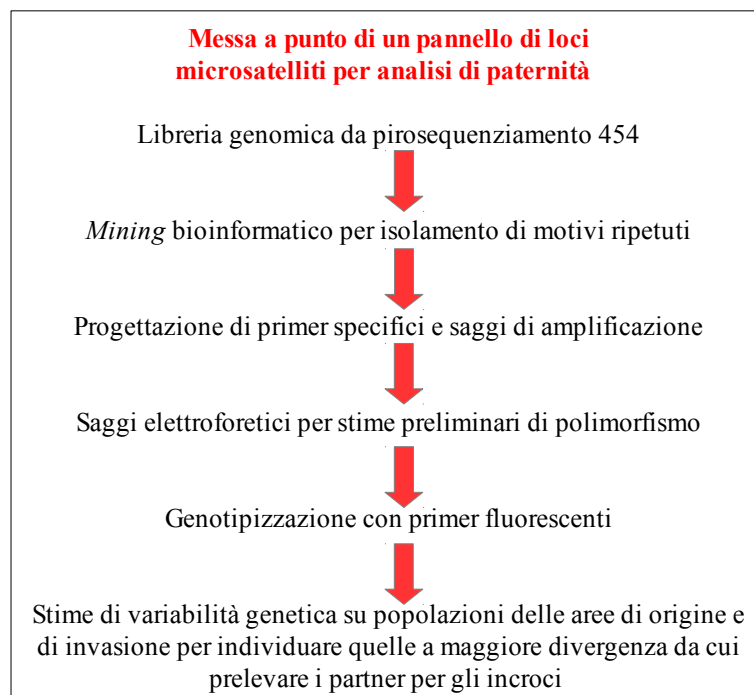
#### 2.1. Messa a punto *ex novo* di un pannello di microsatelliti per la specie *R. ferrugineus*

Non essendo *Rhyncophorus ferrugineus* una specie modello, sulla quale inoltre, all'inizio di questo studio, erano disponibili scarse informazioni genetiche, è stato necessario mettere a punto *ex novo* dei marcatori molecolari idonei agli scopi di questo progetto. Si è scelto pertanto di sviluppare un pannello di loci microsatelliti specifici per la specie in questione, che mostrassero livelli di polimorfismo adeguati per eseguire con efficacia analisi di paternità nell'ambito di incroci controllati.

I microsatelliti sono corti frammenti di DNA contenenti un modulo di 1-6 basi ripetuto fino a 60 volte. La lunghezza massima di questi frammenti è limitata, probabilmente da un meccanismo selettivo, ed i meccanismi di evoluzione dei microsatelliti sono tuttora oggetto di dibattito scientifico, per quanto una delle ipotesi più accreditate sia che essi debbano la loro variabilità nel numero di *repeat* a frequenti scivolamenti della polimerasi nel corso della replicazione del DNA (Tautz & Schlötterer, 1994). Grazie alla loro eccezionale variabilità e ad una relativa facilità di genotipizzazione, vengono generalmente reputati tra i marcatori genetici più potenti (Schlötterer, 2004). L'ampia distribuzione in tutti i genomi eucariotici, il tasso di mutazione elevato (circa  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  eventi di mutazione per generazione per genoma, Goldstein e Schlötterer, 1998), l'alto numero di alleli (fino a 50), gli elevati livelli di eterozigotità e la relazione di codominanza tra gli alleli costituiscono infatti alcune delle caratteristiche dei microsatelliti, grazie alle quali essi vengono attualmente considerati strumenti d'elezione in numerosissimi ambiti di ricerca, come ad esempio negli studi di variabilità genetica, genetica di popolazione, filogeografia, e nelle analisi di parentela e ricostruzione di *pedigree*.

Uno degli aspetti più problematici dell'impiego di microsatelliti è però la necessità di isolarli *ex novo* nella maggior parte delle specie che si intende studiare per la prima volta con questi marcatori. Il motivo risiede nel fatto che i microsatelliti sono in larga misura situati in regioni non codificanti del genoma, soggette quindi a tassi di sostituzione nucleotidica generalmente più elevati, per cui è bassa la probabilità di individuare regioni fiancheggiante sufficientemente conservate per disegnare *primer* universali (Zane *et al.*, 2002). L'utilizzo degli stessi *primer* su più taxa ha quindi successo solo raramente e di solito su poche specie strettamente imparentate. Le tecniche classiche per individuare microsatelliti prevedono la costruzione di librerie

genomiche tramite il clonaggio, la selezione di cloni con ibridazione di specifiche sonde, il sequenziamento Sanger degli inserti e la progettazione di *primer* per la successiva amplificazione delle regioni che includono i microsatelliti individuati (Zane, 2002). Si tratta di una procedura estremamente laboriosa e dispendiosa in termini di tempo e denaro, che può risultare inoltre inefficace in specie con basse frequenze di microsatelliti nel genoma. In questo studio, si è scelto invece di impiegare una strategia diversa affermatasi negli ultimi anni, che risulta estremamente innovativa, efficiente, veloce e tutto sommato economica (Abdelkrim *et al.*, 2009). Secondo questo approccio, i loci microsatelliti vengono isolati a partire da una libreria genomica generata tramite pirosequenziamento 454 (Margulis *et al.*, 2005), una tecnologia di sequenziamento di nuova generazione (*Next-Generation Sequencing*, NGS) che consente di ottenere, con elevata accuratezza ed in tempi brevissimi, sequenze di una considerevole porzione, tra l'altro casuale, del genoma dell'organismo in studio. I loci di interesse vengono poi individuati per via bioinformatica, mediante la ricerca di motivi ripetuti con caratteristiche selezionate dal ricercatore (tipologia di microsatellite e di *repeat*, numero minimo di ripetizioni, ecc.). I primi studi che hanno impiegato questo approccio ne evidenziano l'alto tasso di successo ed i numerosi vantaggi rispetto alle tecniche classiche (Allentoft *et al.*, 2009; Castoe *et al.* 2010; Perry & Rowe, 2010; Santana *et al.*, 2009). Nella figura 2.1 è illustrato schematicamente il flusso di lavoro seguito in questo progetto per la messa a punto di microsatelliti, tramite la metodologia appena descritta.



**Fig. 2.1.** Flusso di lavoro per lo sviluppo dei marcatori microsatelliti.  
*Workflow for microsatellite development.*



### 2.1.1. Pirosequenziamento 454:

#### Preparazione del campione di DNA genomico

Il campione di DNA genomico impiegato nel pirosequenziamento è stato estratto, secondo un protocollo standard Fenolo/Cloroformio (Appendice n°1), da un individuo di *R. ferrugineus* proveniente da una palma abbattuta nel giugno del 2010 all'interno della città universitaria dell'Università di Roma La Sapienza (campione RP04B01). I tessuti impiegati per la lisi cellulare sono stati le 6 zampe dell'insetto suddivise in 3 aliquote che, in seguito alla precipitazione dei *pellet*, sono state diluite ciascuna in 50  $\mu\text{L}$  di *buffer* TNE 1X, e poi unite per un totale di 150  $\mu\text{L}$  di DNA genomico.

È stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1.5% (1.5 g di agarosio in polvere in 100  $\mu\text{L}$  di *buffer* TAE + 20  $\mu\text{L}$  di bromuro di etidio [10 mg/mL]) caricando su pozzetti adiacenti 5  $\mu\text{L}$  di genomico e 5  $\mu\text{L}$  di *ladder* 1Kb Plus DNA *ladder* Invitrogen (Cat. N° 10787-026), per verificare il livello di frammentazione del DNA ed avere una stima quantitativa preliminare dell'esito dell'estrazione.

In seguito è stata eseguita una prima analisi spettrofotometrica (BioPhotometer 6131, Eppendorf) su 5  $\mu\text{L}$  di genomico diluiti ulteriormente in 75  $\mu\text{L}$  di *buffer* TNE 1X, per saggiare la qualità del campione tramite i rapporti di assorbanza  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ . Per mezzo dello spettrofotometro è stata anche misurata la concentrazione del DNA tramite la misura di assorbanza a 260 nm, ai fini di una più accurata quantificazione del campione da inviare per il sequenziamento.

Il campione è stato poi trattato con 5 U di *RNasi I, E. Coli* (10 U/ $\mu\text{L}$ , Epicentre Biotechnologies) per digerire l'RNA, che viene inevitabilmente estratto insieme al DNA e può influenzare significativamente le letture allo spettrofotometro. Si è proceduto quindi all'inattivazione dell'enzima tramite incubazione a 70 °C per 20' e aggiunta di DTT 10 mM.

Il DNA è stato fatto precipitare nuovamente per essere poi diluito in 400  $\mu\text{L}$  di TE *buffer* (PH=8). In seguito è stata necessaria la purificazione del campione dalla *RNasi I* e dai frammenti di RNA tramite filtraggio con Amicon Ultra 0.5 mL, 100 K (Millipore): sono state effettuate 2 centrifugazioni a 13000 g per 12', aggiungendo tra la prima e la seconda centrifugazione altri 400  $\mu\text{L}$  di TE *buffer* sul filtro; in seguito è stata condotta una centrifugazione di eluizione a 1000 g per 2', come da protocollo. Il genomico così eluito è stato poi ulteriormente diluito in 100  $\mu\text{L}$  di TE *buffer*.

Sono state nuovamente eseguite una corsa elettroforetica (stesso protocollo della precedente) ed un'analisi spettrofotometrica (BioPhotometer 6131, Eppendorf).

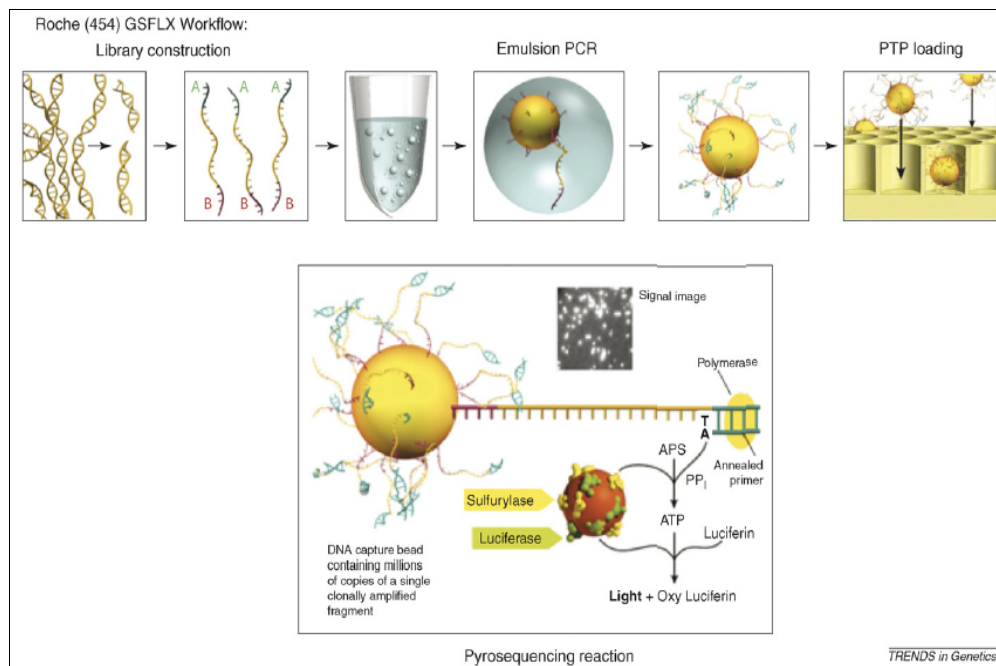
Il campione di DNA genomico così trattato, rispondendo a tutti i requisiti qualitativi e quantitativi, è stato inviato in ghiaccio secco presso il Centro di Sequenziamento BMR

Genomics dell'Università di Padova, per essere poi utilizzato come template nel pirosequenziamento.

### Creazione della libreria genomica

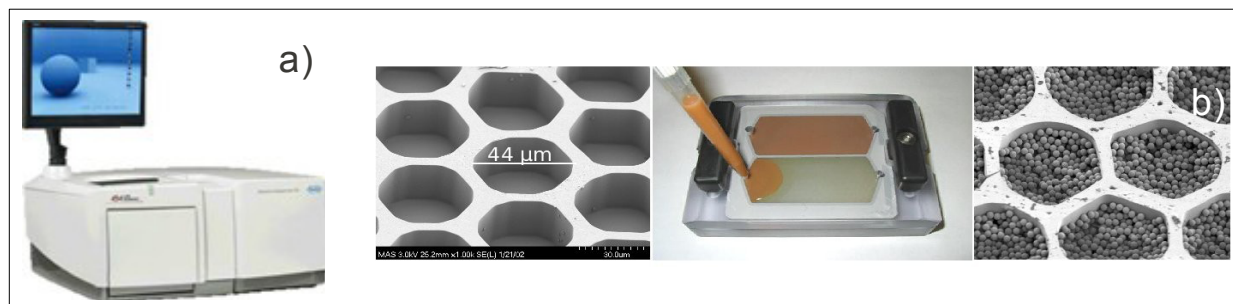
Il metodo del pirosequenziamento si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un deossinucleotide (dNTP) al filamento polimerizzato, attraverso un enzima chemiluminescente. Ciò permette di dedurre la sequenza di un filamento di DNA sintetizzandone il filamento complementare. L'intero processo è schematizzato nella figura 2.2 (Mardis, 2008).

Il DNA stampo destinato al pirosequenziamento deve essere precedentemente amplificato tramite PCR in emulsione (emPCR), un'innovativa tecnica di amplificazione che permette di processare contemporaneamente numerosi frammenti di DNA all'interno di uno stesso ambiente di reazione, perché mantenuti separati tra loro dal legame con delle speciali biglie metalliche, mediante specifici adattatori. L'aggiunta di olio minerale trasforma la miscela di reazione in un'emulsione che crea tanti microreattori fisicamente isolati, all'interno di ciascuno dei quali saranno presenti una sola biglia con il proprio frammento di DNA stampo, ed i relativi prodotti di amplificazione.



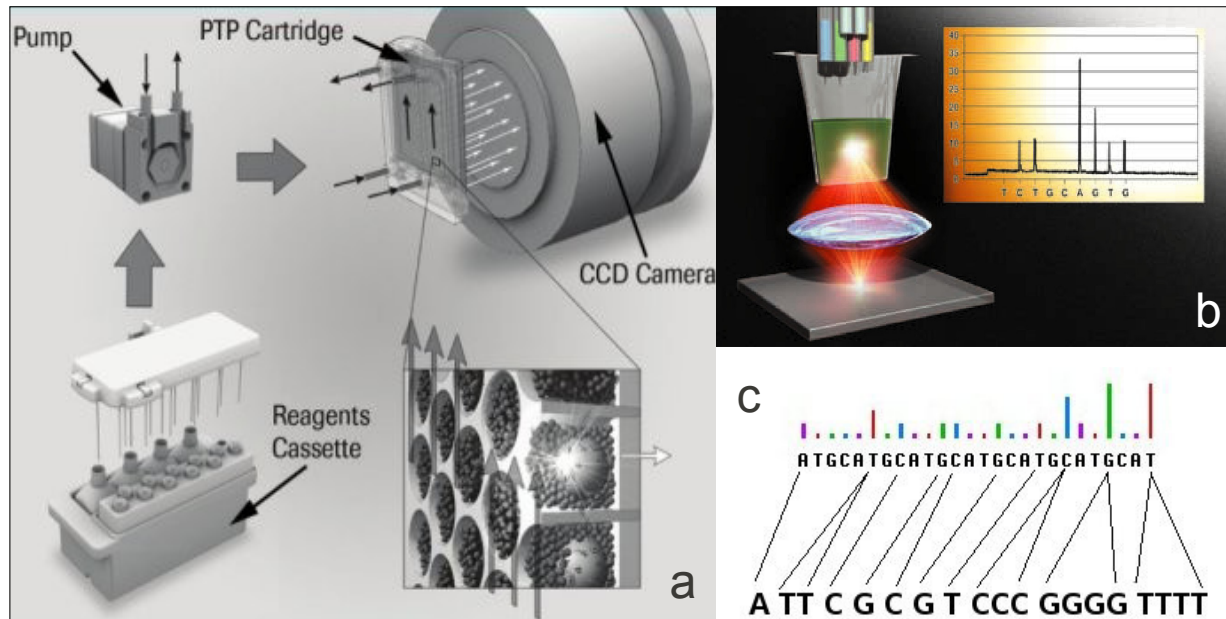
**Fig. 2.2.** Schema riassuntivo della metodologia del pirosequenziamento 454 (Mardis, 2008). *Synthetic representation of Pyrosequencing workflow (Mardis, 2008).*

I pozzetti della piastra di sequenziamento *PicoTiterPlate* (PTP) impiegata dalla piattaforma Roche 454 (Fig. 2.3) hanno dimensioni tali da poter contenere ciascuno un'unica biglia. In questo modo, quando il prodotto della emPCR viene caricato sulla piastra, in ciascun pozzetto verrà sequenziato un unico frammento che corrisponderà ad una *read*.



**Fig. 2.3.** a. Sequenziatore Roche Genome Sequencer FLX; b. particolari della piastra di caricamento FLX standard  
a. Roche Genome Sequencer FLX ; b. FLX standard loading plate.  
<http://www.symposcium.com/2013/05/roche-454-pyrosequencing/>

Al prodotto di amplificazione della emPCR in singola elica vengono aggiunti gli enzimi DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi e apirasi, e forniti adenosinolfosfato (ASP) e luciferina come substrati. Vengono poi introdotti ciclicamente i 4 dNTP uno alla volta. Quando il nucleotide è complementare al residuo del template, esso viene incorporato dalla DNA polimerasi con concomitante liberazione di pirofosfato inorganico (PPi). L'enzima ATP solforilasi catalizza allora la trasformazione di PPi in ATP, usando l'ASP come substrato. La luciferasi utilizza in seguito l'ATP prodotto per la conversione della luciferina ad ossiluciferina, con produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD camera), e registrato in forma di pirogramma (Fig. 2.4). Il segnale sarà proporzionale all'ATP prodotto e quindi al numero di nucleotidi inglobato, per cui se nello stesso ciclo sono stati incorporati 2 dNTP perché vi è una ripetizione della stessa base sul template, si avrà un picco di intensità doppia. L'ATP verrà poi degradato dall'enzima apirasi. Quando il nucleotide aggiunto alla miscela di reazione non viene incorporato perché non complementare alla sequenza stampo, esso viene degradato dall'apirasi e sarà registrato un segnale luminoso nullo. Solo allora si procede con l'aggiunta del nucleotide successivo. L'intero processo viene reiterato fino alla deduzione completa della sequenza. È da notare che, poiché l'ATP funge da substrato per la luciferasi, viene introdotta al suo posto come nucleotide per la polimerizzazione l'adenosina tiolfosfato, che è riconosciuta dalla DNA polimerasi ma non dalla luciferasi.



**Fig. 2.4.** Pirosequenziamento: i segnali luminosi emessi durante l'incorporazione dei nucleotidi nei pozzetti della PTP vengono rilevati in continuo ed in contemporanea dalla CCD camera (a) e tradotti in immagine (b). L'analisi delle immagini associata all'ordine dei flussi permette di costruire il fluogramma di ciascun pozzetto (c).

*Pyrosequencing: the PTP is seated opposite a CCD camera that continuously records the light emitted at each well (a) and translate it into a picture (b). Picture analysis compared to the sequential flow of nucleotides permit to create a fluogram for each well (c).*

<http://www.bmr-genomics.it/>

Durante un singolo ciclo di pirosequenziamento verranno prodotte contemporaneamente più di un milione di *read*, che dovranno essere poi elaborate tramite *software* dedicati ed assemblate in sequenze di consenso dette *contig*, per ricostruire porzioni quanto possibile estese del genoma dell'organismo in questione. Il numero e la dimensione dei *contig* dipenderà dal livello di *coverage* ottenuto e dalla presenza di regioni problematiche (ad es. ripetizioni). Il livello di *coverage* è dato dal numero totale di nucleotidi che nelle varie *read* si allineano in una data posizione e rappresenta quindi il numero medio di volte in cui una determinata base viene confermata da una *read*.

In questo lavoro il campione di DNA di *R. ferrugineus* è stato sottoposto ad un sequenziamento di tipo *shotgun* su un ottavo di piastra di un sequenziatore 454 Roche versione *Titanium* presso BMR Genomics (Padova). L'approccio *shotgun* si basa sul sequenziamento di frammenti casuali di dimensioni selezionate, generati dalla rottura del DNA di partenza. Per l'analisi delle immagini è stato impiegato il *software* GS-SEQUENCER v.2.5 (454 Life Sciences Corp., 2009), mentre la successiva analisi bioinformatica per l'assemblaggio *de novo* delle sequenze prodotte è

stata condotta con il *software* GS-ASSEMBLER (Newbler) v.2.5 (454 Life Sciences Corp.), utilizzando i parametri di *default*.

### 2.1.2. Mining bioinformatico dei microsatelliti e progettazione dei *primer* specifici

L'analisi bioinformatica per l'individuazione dei loci microsatelliti e la progettazione dei relativi *primer* sulle sequenze ottenute dal pirosequenziamento è stata condotta tramite il *software* QDD v.1 (Megléczy *et al.*, 2010).

L'analisi è articolata in 3 fasi fondamentali, durante la prima delle quali vengono selezionate tutte le sequenze con lunghezza maggiore di 75 bp, contenenti microsatelliti a motivo semplice e composto di 2-6 bp, con un minimo di 6 ripetizioni per i motivi di-nucleotidici, 5 per quelli tri- e tetra-nucleotidici e 4 per i penta- ed esa-nucleotidici.

Nella seconda fase di analisi, dedicata all'eliminazione della ridondanza tra le sequenze, il *software* effettua un BLAST “tutti contro tutti” (Altschul *et al.*, 1997; *e value* 1E-40) tramite il quale le sequenze che presentano una similarità a coppie nelle regioni fiancheggianti superiore al 95% sono raggruppate in *contig*. Per ciascun *contig* viene creata una sequenza di consenso applicando la 2/3 *majority rule*, mediante il programma CLUSTAL w2 (Larkin *et al.*, 2007). Le sequenze con similarità inferiore al 95% vengono invece scartate per evitare di includere copie multiple intra-genomiche di sequenze non omologhe. Le sequenze di consenso e quelle singole (ossia non allineate con nessun'altra durante il BLAST) vengono vagliate anche per la presenza di corte ripetizioni nelle regioni fiancheggianti.

Nella fase finale, attraverso QDD ci si serve del programma PRIMER3 (Rozen and Skaletsky, 2000) per disegnare i *primer* nelle regioni fiancheggianti i microsatelliti. In queste analisi sono stati applicati i seguenti criteri:

- lunghezza minima delle regioni fiancheggianti: 50 bp;
- lunghezza del prodotto PCR compresa tra 75 e 320 bp;
- lunghezza dei *primer* compresa tra 8 e 27 bp;
- massimo una ripetizione mononucleotidica di 4 bp e due ripetizioni di-esanucleotidiche consentite nelle regioni fiancheggianti;
- massima differenza nelle temperature di *melting* ( $T_m$ ) della coppia di *primer* di 3 °C;
- temperature di *melting* ( $T_m$ ) della coppia di *primer* comprese tra 57°C e 63°C ( $T$  di *default*) in una prima analisi e tra 45°C e 63°C in una seconda;
- contenuto in GC > 20%.

### 2.1.3. Selezione dei loci microsatelliti

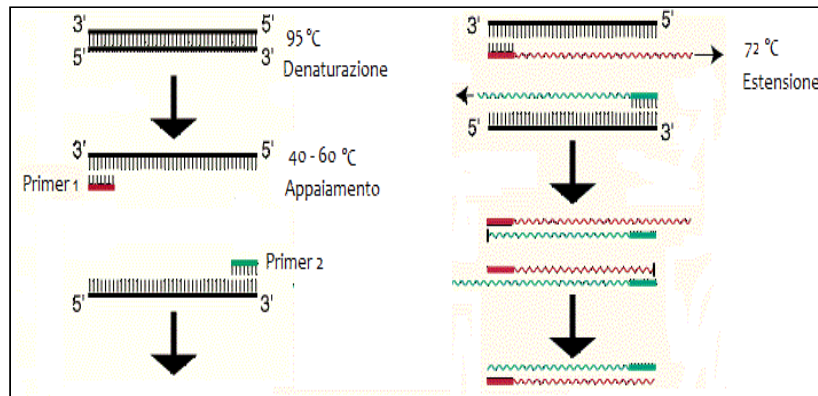
Dato l'elevato numero di microsatelliti individuati dal *mining* bioinformatico, si è deciso di

suddividere i loci da testare in più lotti e di sperimentarne un sottoinsieme alla volta per ottimizzare i costi ed i tempi di questa fase di messa a punto. In tutto sono stati analizzati due lotti di loci, rispettivamente da 29 e da 10, che hanno permesso di raggiungere un numero di marcatori variabili sufficiente per gli scopi delle elaborazioni previste. Il secondo gruppo di marcatori comprende anche 2 microsatelliti sviluppati da Capdevielle-Dulac *et al.* (2012) e specifici per la specie *R. ferrugineus* (RPW38 ed RPW39, rispettivamente denominati *P4C2* e *PIA3* nel lavoro originale).

#### **2.1.4. Saggi di amplificazione in vitro tramite PCR e verifica della presenza del microsatellite**

La tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR; Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988), consiste in una serie di reazioni di sintesi di DNA a catena attraverso un particolare ciclo termico costituito da tre fasi, ciascuna con tempi e temperature caratteristici (Fig. 2.5). Durante la prima fase si induce la denaturazione del DNA tramite riscaldamento a 94-95 °C, la temperatura è poi portata ad un valore specifico, compreso in genere tra 40 e 60 °C (temperatura di *annealing*), che permette a dei *primer* oligonucleotidici di ibridare con le regioni ad essi complementari sui filamenti opposti della sequenza bersaglio. In seguito, ad una temperatura ottimale di 72-74 °C, entra in azione una DNA polimerasi derivante dal batterio termofilo *Thermus aquaticus* ed espressa in *E. coli* (*Taq* polimerasi), che replica i filamenti complementari a partire dai due *primer*. Abbassando nuovamente la temperatura viene poi permesso ai filamenti complementari di riappaiarsi.

Visto che la *Taq* polimerasi è termostabile alle temperature impiegate durante il ciclo di duplicazione, è possibile ripetere il processo numerose volte senza bisogno di aggiungere nuovamente l'enzima, aumentando così esponenzialmente di un fattore pari a due la quantità di DNA sintetizzato ad ogni ciclo. In questo modo, a partire da teoricamente qualunque quantità di DNA stampo, è possibile amplificare una sequenza bersaglio fino a raggiungerne quantità dell'ordine dei microgrammi.



**Fig. 2.5.** Rappresentazione schematica del processo di amplificazione in vitro tramite reazione a catena della polimerasi (PCR).

*In vitro DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR).*

*Modified from: www.scoiattolorampante.wordpress.com.*

Per ciascuno dei *primer* dei loci selezionati è stata eseguita un'analisi strutturale della molecola tramite il programma GENE RUNNER v.3.05 (Copyright © 1994, Hastings *software*, Inc.), al fine di escludere eventuali oligonucleotidi per i quali risultasse possibile la formazione di strutture secondarie termodinamicamente stabili durante la fase di amplificazione.

In seguito sono stati sintetizzati in servizio esterno i *primer* specifici per i 39 marcatori selezionati nei due lotti, e con questi sono state eseguite delle prove di amplificazione tenendo conto delle temperature di *melting* ( $T_m$ ) calcolate dal *software* PRIMER3. È stata dunque condotta una prima ottimizzazione delle condizioni PCR relativa alle temperature di *annealing*, ed in seguito a questi esperimenti sono stati selezionati i loci che presentavano una buona efficienza e specificità di amplificazione. Per questi marcatori è stato sequenziato col metodo Sanger il prodotto PCR purificato (vedi protocollo in Appendice n°2), relativo all'individuo utilizzato nel pirosequenziamento, sempre presso il Centro di Sequenziamento BMR Genomics dell'Università di Padova. Tali sequenze sono state allineate tramite i *software* CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) e STADEN PACKAGE v.4.8.b1 (Staden *et al.*, 2000; Bonfield *et al.*, 2006) con le rispettive sequenze di riferimento ottenute dal pirosequenziamento 454. È stata quindi verificata per ciascun locus la presenza del microsatellite atteso e sono stati scartati quelli la cui posizione risultava troppo vicina ai *primer* di amplificazione, causando una cattiva qualità della sequenza nella regione del microsatellite, con conseguenti problemi di allineamento.

Nelle tabelle di seguito sono riportati la miscela di reazione (Tab. 2.1) ed il ciclo termico standard (Tab. 2.2) adoperati per l'amplificazione dei loci microsatelliti

**Tab. 2.1. Miscela di reazione (*Reaction Mix*)**

Acqua sterile distillata	a 25 $\mu$ L
<i>buffer</i> 10X	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.5 $\mu$ L
DNTPs (100 mM ciascuno)	2.5 $\mu$ L
<i>primer</i> F (10 pmoli/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
<i>primer</i> R (10 pmoli/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
<i>Taq</i> Bioline (5U/ $\mu$ L)	0.1 $\mu$ L
DNA stampo	0.5 $\mu$ L

**Tab. 2.2. Ciclo termico (*Thermal cycle*): standard**

Denaturazione iniziale:	5 min. a 94 °C	
Denaturazione:	1 min. a 94 °C	x 35 cicli
Appaiamento:	30 sec. a 57-60 °C	
Estensione:	1 min. a 72 °C	
Estensione finale:	7 min. a 72 °C	

Oltre agli esperimenti iniziali che hanno permesso di individuare le temperature di *annealing* più idonee per ciascun locus, sono state eseguite diverse prove di ottimizzazione delle condizioni PCR sui singoli marcatori, che hanno interessato prevalentemente la concentrazione di MgCl<sub>2</sub> nella miscela di reazione e l'impiego di due strategie di amplificazione alternative, illustrate rispettivamente nelle tabelle 2.3 e 2.4: la *Touch Down*, basata su un decremento graduale della temperatura di *annealing*, ed il *Gradient-Decreasing Annealing Time Program* (Yu *et al.*, 2010), che sfrutta invece un decremento graduale del tempo di *annealing*.

Tutti i cicli termici per le reazioni di PCR sono stati impostati ed automatizzati su una macchina PCR *Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400* e su una *Whatman Biometra Tpersonal*.



**Tab. 2.3. Ciclo termico (Thermal cycle): Touch down**

---

Denaturazione iniziale:	5 min. a 94 °C	
Denaturazione:	1 min. a 94 °C	 x 20 cicli
Appaiamento:	30 sec a 65 °C (-0.5 °C /ciclo)	
Estensione:	1 min a 72 °C	
Denaturazione:	1 min a 94 °C	 x 10 cicli
Appaiamento:	30 sec a 55 °C	
Estensione:	1 min a 72 °C	
Estensione finale:	7 min a 72 °C	

---

**Tab. 2.4. Ciclo termico (Thermal cycle): Gradient-Decreasing Annealing Time Program**

---

Denaturazione iniziale:	5 min. a 94 °C	
Denaturazione:	1 min. a 94 °C	 x 30 cicli
Appaiamento:	1min. e 30 sec -2 sec/ciclo a 57-60 °C	
Estensione:	1 min a 72 °C	
Denaturazione:	1 min a 94 °C	 x 5 cicli
Appaiamento:	30 sec a 57-60 °C	
Estensione:	1 min a 72 °C	
Estensione finale:	7 min a 72 °C	

---

### 2.1.5. Analisi elettroforetiche per la verifica dell'efficacia di amplificazione e la quantificazione del DNA

La tecnica dell'elettroforesi permette di effettuare una stima qualitativa e quantitativa dell'esito sia del processo di estrazione che di amplificazione del DNA.

Un apparato elettroforetico è costituito da una vaschetta di *plexiglas* provvista di elettrodi collegati ad un alimentatore e riempita con una soluzione elettrolitica (costituita generalmente da Tris Acetato EDTA [TAE *buffer* 1X]), in cui viene immerso un gel di agarosio.

Un'aliquota del prodotto PCR, in cui è presente il frammento amplificato, viene miscelata con un *buffer* di caricamento contenente un colorante pesante (*dye*) e caricata nel pozzetto del gel. Viene

applicato un potenziale elettrico di circa 70-120 V, che induce la migrazione del frammento di DNA, carico negativamente, verso il catodo dell'apparato, con una velocità inversamente proporzionale al logaritmo del peso molecolare del DNA. La migrazione è evidenziata dalla posizione, rispetto al pozzetto di partenza, della banda corrispondente al frammento di DNA: quanto più la banda è distante dal pozzetto, tanto più basso è il peso molecolare del frammento. Le bande di DNA presenti nel gel di elettroforesi vengono visualizzate tramite un trans-illuminatore a raggi ultravioletti (UV), grazie all'incorporazione nel gel di un agente intercalante in grado di emettere fluorescenza (bromuro di etidio) quando colpito dagli UV.

La lunghezza del frammento della regione amplificata viene di solito stimata facendo correre simultaneamente in un pozzetto adiacente un marcatore (*ladder*) costituito da una miscela di frammenti di peso molecolare noto. Comparando la posizione della banda di interesse con quella delle bande del *ladder*, di cui si conoscono le dimensioni, è quindi possibile determinare, almeno indicativamente, se il peso molecolare e quindi la lunghezza della regione amplificata corrispondono a quelli della regione *target* di DNA.

Durante la fase di ottimizzazione delle condizioni di amplificazione dei *primer* per i microsatelliti, i prodotti PCR dei relativi frammenti nucleotidici sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio concentrato al 1.7%.

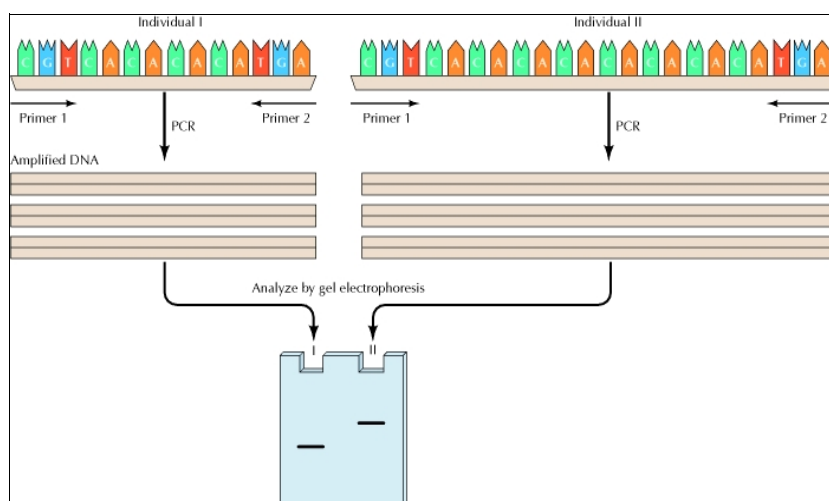
Sono stati utilizzati come *buffer* di caricamento il 6X MassRuler™ DNA Loading *dye* (Tris-HCl pH 7.6, 10 mM; bromofenolo blu 0.03%, glicerolo 60%, EDTA 60 mM) e come marcatore di peso molecolare il MassRuler™ DNA *ladder*, Low Range, ready-to-use, 80-1031 bp (Fermentas), che hanno permesso di visualizzare correttamente i prodotti PCR e di verificare con discreta precisione che le loro dimensioni corrispondessero a quelle attese sulla base dell'analisi bioinformatica.

Il *ladder* MassRuler™ è stato impiegato inoltre per quantificare la concentrazione di DNA dei prodotti PCR al fine di inviare in seguito una quantità di campione opportuna per la genotipizzazione dei microsatelliti, al servizio esterno presso il quale ci siamo appoggiati. Questo marcatore contiene infatti bande di luminosità differente, ciascuna corrispondente ad una diversa concentrazione di DNA, per cui è sufficiente confrontare l'intensità luminosa delle bande del proprio campione con quelle del *ladder* per avere una stima grossolana della concentrazione di ciascun prodotto PCR.

### 2.1.6. Saggi preliminari di polimorfismo

Per il primo lotto di 29 microsatelliti testati sono stati saggiati i livelli di polimorfismo direttamente tramite la genotipizzazione degli 11 loci che avevano mostrato una buona efficienza di amplificazione e per i quali era stata verificata la presenza del microsatellite tramite sequenziamento Sanger.

Per quanto riguarda il secondo lotto di 10 loci, sui marcatori amplificati con successo ed in modo ripetibile, e correttamente allineati con la sequenza di riferimento, sono stati condotti dei saggi preliminari di polimorfismo (Fig. 2.6) utilizzando due tecniche elettroforetiche diverse: corse orizzontali su gel di agarosio altamente concentrati e corse verticali su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti. La seconda tecnica consente un livello di risoluzione nella separazione dei frammenti estremamente superiore rispetto alla prima (anche dell'ordine di una sola posizione nucleotidica) ma, essendo più complessa e sofisticata, è anche molto più dispendiosa in termini di tempo e risorse, per cui è stata utilizzata laddove l'elettroforesi su agarosio non consentiva di stabilire con buona confidenza se vi fosse un polimorfismo o meno.



**Fig. 2.6.** Rappresentazione schematica del metodo elettroforetico per saggiare il polimorfismo di un marcatore microsatellite.  
*Electrophoretic method for testing microsatellite polymorphism.*

Questi saggi preliminari sono stati condotti su un sotto-campione dei 106 individui di *R. ferrugineus* a nostra disposizione. Nella tabella 2.5 sono riassunti i dati relativi a provenienza, periodo di raccolta e numero di individui di ciascun campione, mentre nell'Appendice n°3 sono riportati in modo più dettagliato i dati di raccolta per ogni singolo individuo. Tali esemplari costituiscono campioni di popolazioni naturali provenienti sia da aree di origine (Malesia e

Vietnam) che da aree di invasione della specie (diverse regioni italiane, Grecia, Spagna, Penisola arabica, Cina) e questo ci ha permesso di svolgere un'indagine discretamente ampia dei livelli di polimorfismo dei nostri marcatori, considerando che la variabilità genetica di una specie invasiva può presentare caratteristiche molto diverse tra l'areale primario e quello secondario.

Ad eccezione della maggior parte degli individui italiani, che sono stati raccolti direttamente dal nostro gruppo di ricerca, questi esemplari sono stati ottenuti grazie a diverse collaborazioni con ricercatori e studiosi italiani e stranieri.

**Tab. 2.5.** Dati di campionamento degli individui di *Rhynchophorus ferrugineus*.  
*Rhynchophorus ferrugineus* sampling informations.

<b>Nazione</b>	<b>Periodo di raccolta</b>	<b>N° di individui</b>
Italia	Novembre 2009-Gennaio 2014	22
Grecia	Giugno 2011-Dicembre 2012	17
Spagna	Giugno 2013	6
Arabia Saudita e Qatar	Marzo-Giugno 2012	23
Cina	Maggio 2011	4
Vietnam	Dicembre 2012- Giugno 2013	17
Malesia	Aprile 2013	17

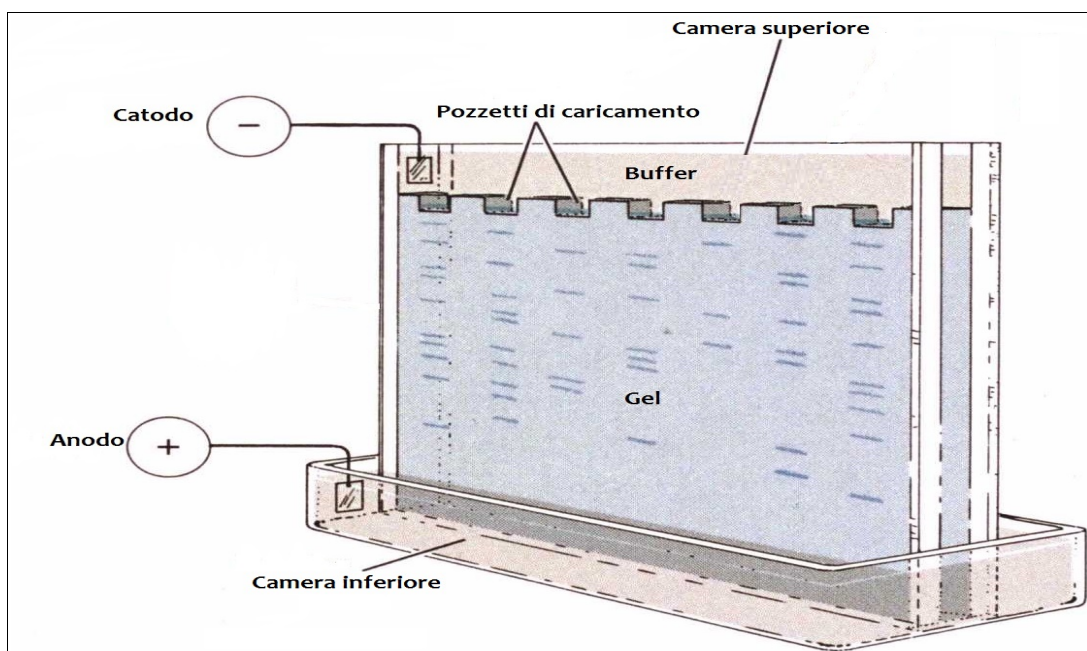
### **Elettroforesi su gel di agarosio concentrato**

I prodotti PCR dei 10 loci del secondo lotto, relativi a 46 individui di Punteruolo rosso provenienti da tutte le aree del nostro campionamento, sono stati sottoposti ad analisi elettroforetica su gel di agarosio concentrato al 3.5%, con un voltaggio costante di 6 V/cm per circa 10 cm di corsa, e colorato in una soluzione di bromuro di etidio in acqua distillata (0.5 µg/mL) per 20 minuti (Fig. 2.9). Sulla base delle dimensioni dei frammenti (100-300 bp), sono stati opportunamente scelti un *buffer* di caricamento (6X Orange DNA Loading *dye*, Fermentas: Tris-HCl pH 7.6 10 mM, orange G 0.15%, xilene cianolo FF 0.03%, glicerolo 60% ed EDTA 60 mM) ed un marcatore di peso molecolare (O'RangeRuler™ 20 bp DNA *ladder*, Fermentas) che hanno permesso di misurare con discreta precisione la dimensione dei frammenti e degli alleli alternativi di ciascun locus, laddove presenti.

### **Elettroforesi su gel di poliacrilammide denaturante**

Questo tipo di elettroforesi è stata eseguita su un apparato verticale (Fig. 2.7) Sigma-Aldrich (cod. Z33,985-7) che consente di produrre gel di dimensioni 20x20 cm dello spessore di 1 mm. Sono stati utilizzati gel denaturanti di acrilammide:bisacrilammide 29:1 concentrati all'8%,

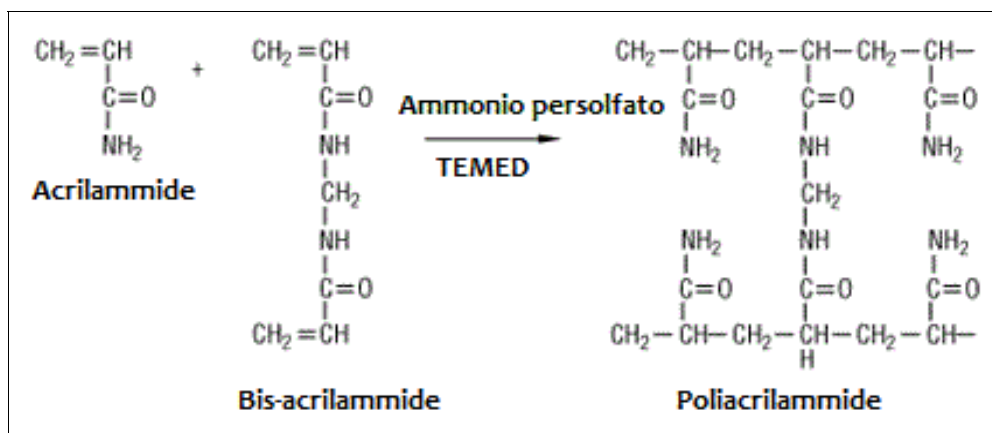
preparati secondo la ricetta riportata nella tabella 2.6 e lasciati polimerizzare per circa un'ora e mezza alla temperatura costante di 25° C (Fig. 2.8).



**Fig. 2.7.** Rappresentazione schematica di un apparato elettroforetico verticale.

*Representation of a vertical electrophoretic system.*

*Modified from: <http://biolaureatesociety.blogspot.it/2011/06/analyze-your-macromolecules.html>*



**Fig. 2.8.** Reazione di sintesi della poliacrilammide.

*Synthesis reaction of polyacrilamide.*

*Modified from: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Electroforesis/Electroforesis.html>*

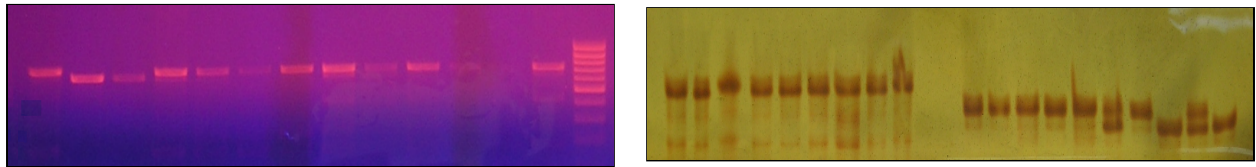
**Tab. 2.6.** Ricetta per la realizzazione di un gel di poliacrilammide 8%.  
*Reaction mix for preparing a 8% polyacrilamide gel.*

Reagente	Quantità per 30 mL
Acqua distillata	20.7 mL
Urea 7M	12.6 g
TBE <i>buffer</i> 10X	3 mL
Acrilammide:bisacrilammide 40%, 29:1	6 mL
APS 10%	225 µL
TEMED	30 µL

Tutte le corse sono state eseguite in TBE *buffer* 1X pH 8.3 (Tris pH 7.6, 89 mM; acido borico 89 mM; EDTA 2 mM). I gel sono stati sottoposti ad un *pre-run* di circa 60 minuti con una potenza costante di circa 60 W, allo scopo di surriscaldare la matrice del gel in modo che durante la corsa dei campioni mantenesse una temperatura compresa tra 45-55 °C, ottimale per evitare fenomeni di rinaturazione del DNA, che avrebbero falsato l'interpretazione dei risultati. La temperatura è stata costantemente monitorata tramite una termocoppia la cui sonda era fissata ad uno dei vetri del gel. Prima di ogni corsa i campioni relativi ad un locus microsatellite sono stati denaturati sottoponendo ad una temperatura di 95 °C per 5 minuti 3 µL di prodotto PCR, mescolati con 3 µL di *loading dye* (formammide 90%, EDTA 20 mM, bromofenolo blu 0.05%, glicerolo 10%). In seguito, i campioni sono stati trasferiti immediatamente su ghiaccio per prevenirne la rinaturazione e caricati nel gel. La presenza di urea 7M conferiva al gel la proprietà di mantenere lo stato di denaturazione del DNA al suo interno.

Le condizioni di corsa sono state impostate in modo che l'alimentatore fornisse una potenza costante di circa 25 W. I campioni hanno migrato per tutta la lunghezza del gel in un tempo variabile di 60-90 minuti, a seconda delle dimensioni dei frammenti, in modo da ottenere la loro massima separazione. A questo scopo ci si è serviti dello xilene cianolo come colorante del fronte della corsa, poiché nelle condizioni di elettroforesi impiegate, la sua velocità di migrazione è simile a quella dei frammenti analizzati.

In seguito i gel sono stati sottoposti ad una colorazione, che impiega come agente intercalante nelle molecole di DNA il nitrato d'argento ridotto in ioni metallici dalla formaldeide (in condizioni alcaline), seguendo il protocollo di Bembouza *et al.*, 2006 (Appendice n°4). I gel sono stati poi visualizzati su una lampada a luce bianca (Fig. 2.9) e fotografati su una griglia millimetrata per misurare la distanza tra gli alleli.



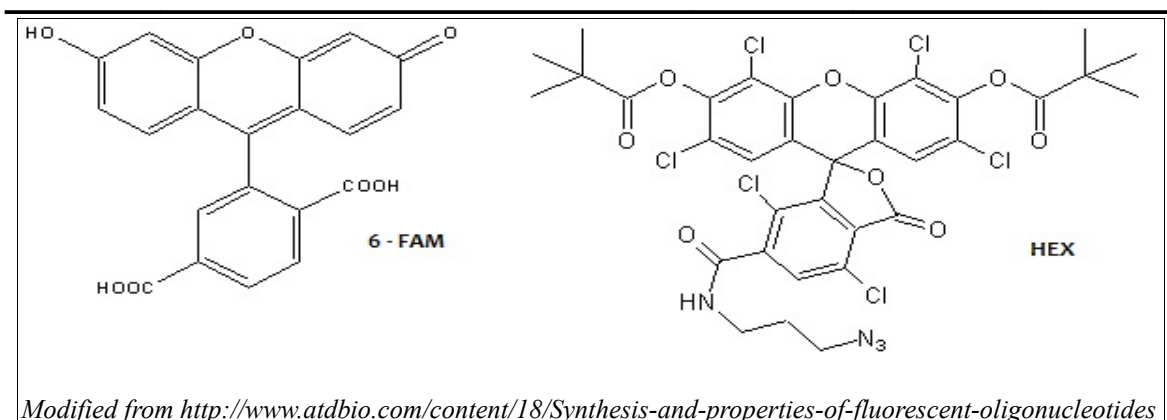
**Fig. 2.9.** Visualizzazione di un gel di agarosio colorato con bromuro di etidio (a sinistra) e di un gel di poliacrilammide colorato con nitrato d'argento ( a destra).  
*Visualisation of an agarose gel stained with ethidium bromide (on the left) and of a polyacrilamide gel coloured by silver staining (on the right).*

### 2.1.7. Genotipizzazione dei loci microsatelliti tramite elettroforesi capillare e *primer* fluorescenti

Per i loci del secondo lotto che hanno mostrato la presenza di due o più alleli durante lo *screening* elettroforetico, così come per i loci del primo lotto, sono stati nuovamente sintetizzati in servizio esterno i *primer forward* con l'aggiunta al 5' di un fluoroforo, ossia un marcatore fluorescente (*dye*). I *dye* impiegati sono 6'-FAM, di colore blu, o 6'-HEX, di colore verde (Tab. 2.7). La scelta del fluoroforo per ciascun *primer* è stata fatta tenendo in considerazione anche le dimensioni dei prodotti PCR di ciascun locus, nell'ottica di utilizzare la tecnica di *pseudomultiplexing*, che prevede di genotipizzare contemporaneamente più loci di uno stesso individuo, mescolandone i diversi prodotti PCR in modo che siano poi distinguibili tramite elettroforesi capillare sulla base di lunghezza del frammento e/o tipo di fluoroforo.

**Tab. 2.7.** Caratteristiche e struttura molecolare dei *dye* fluorescenti impiegati per marcare i *primer forward*.  
*Characteristics and molecular structure of fluorescent dyes added to the forward primers.*

Nome del fluoroforo	Composto chimico	Peso molecolare	Picco di assorbimento	Picco di emissione
6'-FAM	6'-Carbossifluorescina	376.32	495 nm	517 nm
6'-HEX	6'-Carbossi-2'',4,4'',5'',7,7''-esaclorofluorescina	582.98	533 nm	550 nm



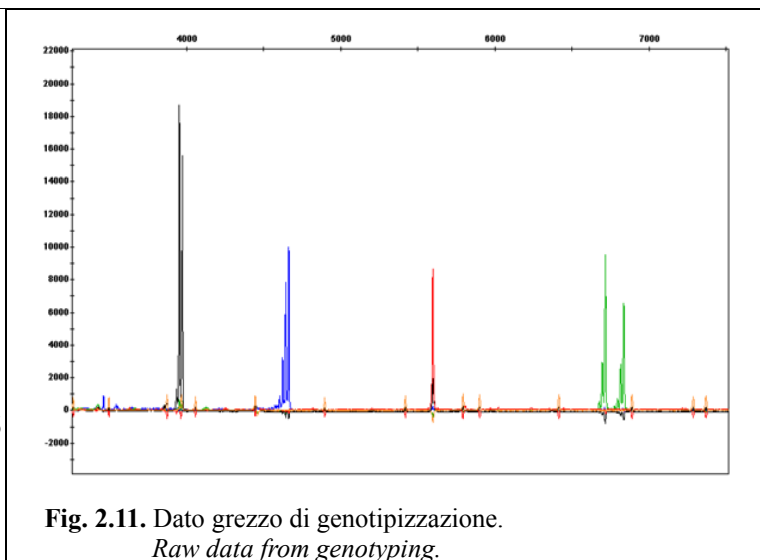
I loci microsatelliti sono stati dunque nuovamente amplificati con i *primer* fluorescenti (secondo le medesime condizioni di amplificazione descritte in precedenza) sul campione di 106 individui di *R. ferrugineus* (Tab. 2.5 e Appendice n°3). Gli individui sono stati quindi genotipizzati tramite il servizio esterno GeneScan presso Macrogen Inc., Korea.

Secondo la strategia di *pseudomultiplexing*, in fase di preparazione dei campioni sono stati opportunamente mescolati i prodotti PCR di più loci, appartenenti allo stesso individuo, permettendo un notevole risparmio di risorse. Sono stati inviati 20 ng di prodotto PCR allo stato liquido per ciascun locus.

I campioni sono stati dunque sottoposti ad elettroforesi capillare su un sequenziatore automatico a 96 capillari ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA; Fig. 2.10). In ogni pozzetto della piastra di caricamento è stato aggiunto un marcatore di peso molecolare noto (400HD-ROX, di colore rosso) per l'analisi delle dimensioni (altezza e area) dei picchi generati dalla corsa elettroforetica. Gli elettroferogrammi delle corse sono stati resi in formato “.fsa” (Fig. 2.11).



**Fig. 2.10.** Sequenziatore automatico a 96 capillari ABI 3730XL.  
*ABI 3730XL 96-capillary dna analyzer.*  
[https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/3730XL.](https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/3730XL)

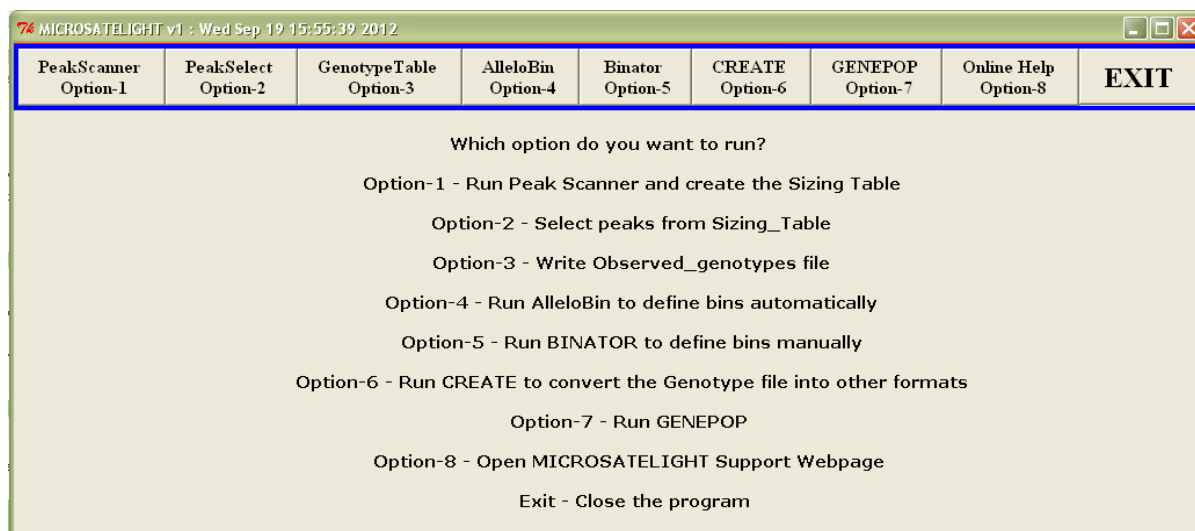


**Fig. 2.11.** Dato grezzo di genotipizzazione.  
*Raw data from genotyping.*



### 2.1.8. Attribuzione dei genotipi

L'attribuzione dei genotipi di ciascun individuo è stata realizzata tramite *MICROSATELIGHT* (Palero *et al.*, 2011), un pacchetto *software* che comprende diversi programmi ai quali ci si appoggia lungo un flusso di lavoro articolato in 7 fasi (Fig. 2.12).



**Fig. 2.12.** Flusso di lavoro del pacchetto *software* *MICROSATELIGHT* per l'attribuzione ed il *binning* degli alleli.  
*Workflow of software package MICROSATELIGHT for allele scoring and binning.*

Nella fase iniziale, *MICROSATELIGHT* analizza i dati grezzi provenienti dall'elettroforesi capillare (file .fsa) servendosi di *PEAK SCANNER* v1.0 (Applied Biosystem) per estrarre le informazioni relative ad altezza e area dei picchi, e quindi alle dimensioni dei frammenti, e importarle in una tabella che viene successivamente elaborata nella fase 2, per attribuire i picchi ai rispettivi loci microsatelliti. Questa operazione viene eseguita sulla base di parametri forniti dal ricercatore quali il “gruppo di *multiplex*” (laddove più loci vengano genotipizzati contemporaneamente su uno stesso campione), il tipo di fluoroforo e l'intervallo di dimensioni attese del prodotto PCR. La fase 3 genera una tabella di genotipi che riporta per ogni campione e locus la dimensione (in numeri decimali) dei frammenti attribuiti dal programma ai diversi alleli.

Il passo successivo prevede l'assegnazione di un numero intero agli alleli rilevati, in modo che i valori risultanti dalla corsa elettroforetica, relativi alle dimensioni dei frammenti, vengano ricondotti all'interno di intervalli discreti. Questa operazione, definita di “*binning*” può essere condotta mediante *MICROSATELIGHT* sia in forma del tutto automatica (tramite il *software* *ALLELOBIN*, Prasanth *et al.*, 2006), che in modo manuale, ma comunque guidato dal programma, attraverso il *software* *BINATOR*.R. L'opzione 4 applica quindi ai dati l'algoritmo di *least-square minimization* (Idury & Cardon, 1997) implementato in *ALLELOBIN*, producendo direttamente una

tabella di genotipi con un valore intero attribuito a ciascun allele. Tramite l'opzione 5 viene aperto invece un file eseguibile di R (R Development Core Team, 2005) dal quale è possibile lanciare lo script di BINATOR.R. Questo guida l'operatore nella definizione manuale degli intervalli di dimensione all'interno dei quali ricadono gli alleli di ciascun locus (i cosiddetti limiti di "bin"), attraverso il supporto visivo di istogrammi che rappresentano la distribuzione della dimensione degli alleli. Il ricercatore può scegliere così di recuperare eventuali "picchi perduti" che PEAK SCANNER ha escluso dalle analisi precedenti, comparando i picchi selezionati dal *software* con il dato grezzo di partenza, e valutando caso per caso. BINATOR.R produce inoltre una lista di alleli che non hanno una lunghezza congruente con il motivo di ripetizioni atteso ed una lista di cromatogrammi problematici.

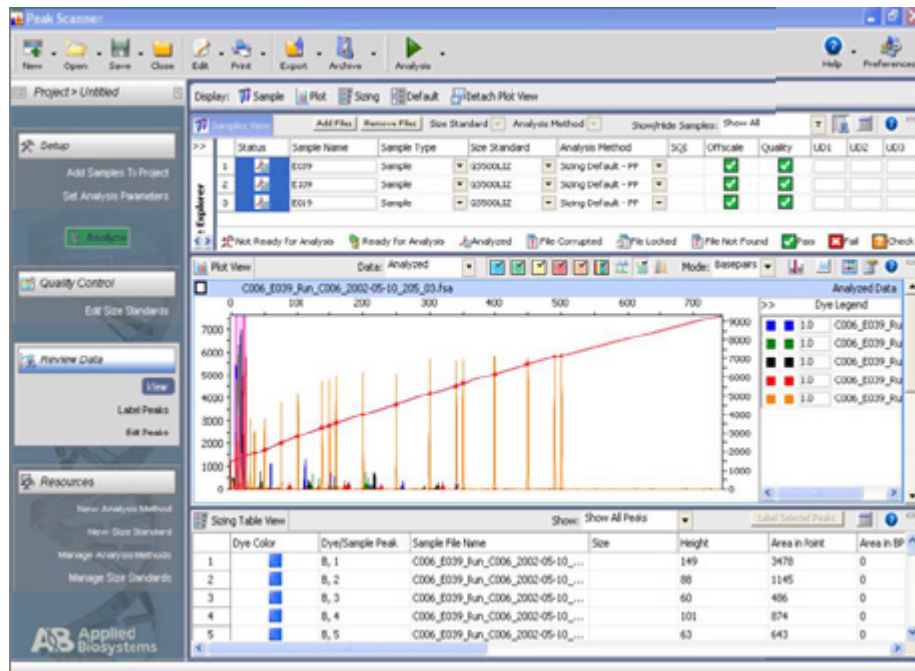
Tramite il passo numero 6 ci si può servire di CREATE (Coombs *et al.*, 2008) per convertire i file di output di MICROSATELIGHT nei formati dei file di input di 62 tra i più comuni programmi di analisi genetica. In questo studio, la tabella dei genotipi prodotta dall'analisi di MICROSATELIGHT è stata convertita nei formati dei file di input richiesti per i *software* ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2010) e MICROSATELLITE ANALYZER v.4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003), in vista delle successive analisi statistiche.

La fase 7, infine, permette di utilizzare il *software* GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) per analisi di genetica di popolazione sui dati ottenuti.

I risultati prodotti da MICROSATELIGHT sono stati inoltre verificati tramite un controllo visivo dei singoli dati grezzi di genotipizzazione mediante il programma PEAK SCANNER v.1.0 (Applied Biosystem, 2006; Fig. 2.13), al fine di individuare eventuali errori di genotipizzazione prodotti da problemi di interpretazione del segnale da parte del *software* (Fig. 2.14). Questo tipo di errori può essere generato da diversi fenomeni (Pompanon *et al.*, 2005), tra cui i più comuni sono:

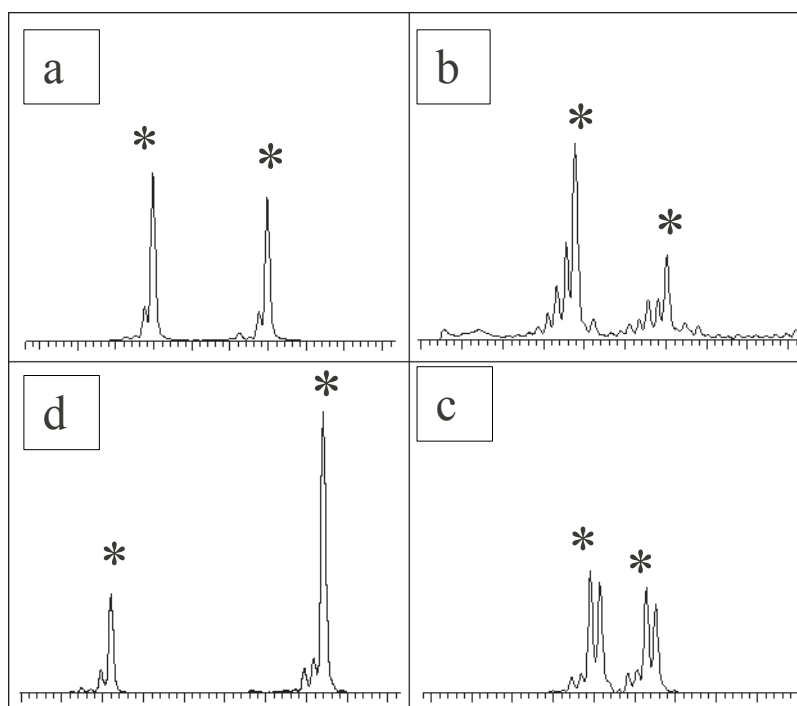
- **presenza di alleli nulli** per *allelic dropout* (Miller and Waits, 2003), ossia il fallimento o la riduzione dell'amplificazione di un allele a causa di errori stocastici di campionamento, spesso legati a basse concentrazioni del DNA template (Wandeler *et al.*, 2003) o alla presenza di mutazioni nei siti di *annealing* dei *primer* (Shaw *et al.*, 1999);
- **dominanza dell'allele corto**, o *large allele dropout* (Wattier *et al.*, 1998), dovuta all'amplificazione preferenziale degli alleli di minori dimensioni a discapito di quelli più lunghi;
- **stuttering**, ossia la presenza di numerosi frammenti che differiscono da quello che è l'allele reale per un numero di basi pari a un multiplo della lunghezza del motivo ripetuto

(Shinde *et al.*, 2003), rendendo così difficile l'individuazione dell'allele corretto, specialmente nel caso di microsatelliti di-nucleotidici. Questo fenomeno è in genere prodotto dallo scivolamento della polimerasi lungo lo stampo durante l'amplificazione.



**Fig. 2.13.** Analisi visiva dei dati grezzi di genotipizzazione tramite PEAK SCANNER v.1.0 (Applied Biosystems).  
*Visual inspection of genotyping raw data by PEAK SCANNER v.1.0, Applied Biosystems.*

Come ulteriore supporto per individuare e correggere possibili errori di genotipizzazione dovuti ad alleli nulli, dominanza dell'allele più corto e *stuttering*, è stato impiegato il programma MICRO-CHECKER (van Oosterhout *et al.*, 2004), che rileva errori di *scoring* sulla base delle frequenze alleliche, delle dimensioni degli alleli e dello scostamento dall'equilibrio di Hardy-Wienberg (HW). Il *software* è infatti in grado di distinguere deviazioni dall'equilibrio HW dovute alla presenza di questi fenomeni, da quelle prodotte dall'effetto Wahlund e dall'*inbreeding*. Ad esempio, quando viene rilevato per un determinato locus un eccesso di omozigoti uniformemente distribuito su tutte le classi alleliche presenti, MICRO-CHECKER indica la possibile presenza di alleli nulli e ne stima la frequenza attesa. Quando invece è presente un deficit di eterozigosi su alleli che differiscono nelle dimensioni per una singola ripetizione, associato ad un eccesso di omozigosi sugli alleli più lunghi, viene invocato il fenomeno di *stuttering*. Un eccesso di omozigosi sugli alleli che si collocano agli estremi della distribuzione delle dimensioni alleliche di un locus viene invece interpretato come segnale di dominanza dell'allele corto.



**Fig. 2.14.** Esempi di profili di SSR generati da un sequenziatore capillare e problemi di interpretazione più frequenti: (a) profilo corretto, (b) *stuttering*, (c) picchi sdoppiati, (d) basso rapporto nell'altezza di picchi eterozigoti per *allelic dropout*. Gli alleli corretti sono marcati con un asterisco.

*Examples of SSR profiles from capillary sequencing and most common problems of signal interpretation: (a) true profile, (b) stuttering, (c) double peaks; (d) allelic dropout. True alleles are marked with asterisk.*

### 2.1.9. Stime di variabilità genetica in aree di origine e di invasione e individuazione delle popolazioni sorgente per gli esperimenti di incrocio

Sono state condotte delle stime della variabilità genetica della specie *R. ferrugineus* su campioni provenienti da 7 regioni geografiche appartenenti sia all'areale primario (Malesia e Vietnam) che a quello secondario (Italia, Grecia, Spagna, penisola arabica, Cina), allo scopo di individuare le popolazioni con più alta variabilità e maggiormente differenziate tra loro, e attingere da queste gli individui destinati agli allevamenti per gli incroci. In tal modo si è cercato di aumentare la probabilità che i maschi coinvolti in ciascun esperimento portassero alleli diversi, incrementando così il potere di discriminazione genetica del pannello di loci microsatelliti.

I dati di genotipizzazione di 106 individui di *R. ferrugineus* sono stati analizzati con il *software* ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2010) per calcolare alcuni parametri descrittivi classici della variabilità dei microsatelliti (intervallo di dimensioni del frammento, numero di alleli e numero

medio di alleli per locus, eterozigosità attesa e osservata ed eterozigosità media attesa) e per eseguire il test di *Linkage disequilibrium* (LD) per locus e per popolazione. Un *Exact test* ed un *Global test* dell'equilibrio di Hardy-Wienberg (HW) sono stati inoltre eseguiti con GENEPOP v.3.4 (Raymond & Rousset, 1995). Per ciascun marcatore e su ogni popolazione campionata, oltre che sul *data set* totale, sono stati calcolati inoltre due parametri che descrivono la diversità genetica di un determinato locus: l'indice di ricchezza allelica (*Allelic richness*,  $A_r$ ), con il *software* MICROSATELLITE ANALYZER v.4.05 (Dieringer & Schlötterer 2003), e l'indice *Polymorphism Information Content* (PIC), per ogni locus e regione e mediato su tutti i loci per una data regione, tramite il programma CERVUS v.3.0.6 (Kalinovski *et al.*, 2007). La ricchezza allelica  $A_r$  (El Mousadik & Petit, 1996) indica il numero di alleli presenti in una popolazione indipendentemente dalla dimensione del campione, ed è calcolata in base al numero minimo di individui campionati per ogni locus; il PIC (Shete *et al.*, 2000) esprime invece la capacità di un locus di discriminare individui diversi sulla base della distinzione degli alleli presenti, ed è calcolato a partire dalle frequenze alleliche secondo la formula:

$$PIC = 1 - \sum x_i^2$$

dove  $x_i$  è la frequenza dell' $i$ esimo allele per il locus in questione. Marcatori che presentano  $PIC > 0.5$  sono generalmente considerati informativi.

E' stata condotta inoltre un'analisi filogenetica di tipo bayesiano, su una regione di 632 bp del marcatore mitocondriale Citocromo c ossidasi subunità I (*cox1*), in 58 individui, che costituiscono un sottocampione rappresentativo del campione totale di 106 esemplari analizzati per l'analisi del polimorfismo dei microsatelliti (34 individui dall'area mediterranea e 24 da quella asiatica). I campioni di genómico sono stati amplificati in vitro, ed in seguito i prodotti PCR sono stati purificati per via enzimatica tramite ExoSAP-IT (Esonucleasi I e Fosfatasi alcalina, © USB corporation, 2000) e sequenziati con metodo Sanger presso MacroGen Europe. La tabella 2.8 riporta la miscela di reazione, il ciclo termico e le sequenze dei *primer* impiegati per l'amplificazione del marcatore COI.

Le sequenze sono state confrontate col database GenBank tramite il programma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponibile sul sito del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), per verificare che appartenessero alla specie in questione e sono state poi allineate ed editate tramite il *software* STADEN PACKAGE v.4 (Staden *et al.*, 2003). L'analisi bayesiana sulla matrice delle sequenze allineate è stata condotta attraverso il programma MRBAYES v.3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Sotto il modello di sostituzione nucleotidica Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) selezionato tramite la funzione *reversible-jump*

*MCMC*, sono state impostate 2 corse simultanee e indipendenti con 4 catene di markov campionate ogni 500 generazioni, ed un numero di generazioni totali pari a 6 milioni. Sono state inoltre calcolate con il programma MEGA v.5.2 (Kumar *et al.*, 2001) le distanze genetiche k2p (*Kimura-2-parameter*, Kimura, 1980) sia tra i gruppi evidenziati dall'analisi filogenetica che al loro interno.

**Tab.2.8.** Miscela di reazione, ciclo termico e sequenze dei *primer* per l'amplificazione del marcatore *cox1*.  
*Reaction mix, thermal cycle and primer sequences for the amplification of cox1 marker.*

Miscela di reazione		Ciclo termico		
<b>Acqua ultrapura</b>	a 25 µL	<b>Denaturazione iniziale:</b>	5'	a 94° C
<b>MgCl<sub>2</sub> (50mM)</b>	1.5 µL			
<b>dNTPs (100 mM ciascuno)</b>	2.5 µL	<b>Denaturazione:</b>	1'	a 94° C
<b>Buffer 10x</b>	2.5 µL			
<b>primer forward (10 pmoli/µL)</b>	0.5 µL			
<b>primer reverse (10 pmoli/µL)</b>	0.5 µL	<b>Appaiamento:</b>	30"	a 55° C
<b>Taq Boline (5U/µL)</b>	0.2 µL	<b>Estensione :</b>	1'	a 72°C
<b>DNA stampo</b>	0.5 µL	<b>Estensione finale :</b>	7'	a 72°C

Nome del <i>primer</i>	Sequenza (5' – 3')	Fonte bibliografica
<b>Forward: TY-J-1460</b>	TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC	Simon <i>et al.</i> 1994
<b>Reverse: HC02198</b>	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> 1994

## 2.2. Analisi di paternità su esperimenti di incrocio programmati

### 2.2.1. Incroci ed allevamento degli individui

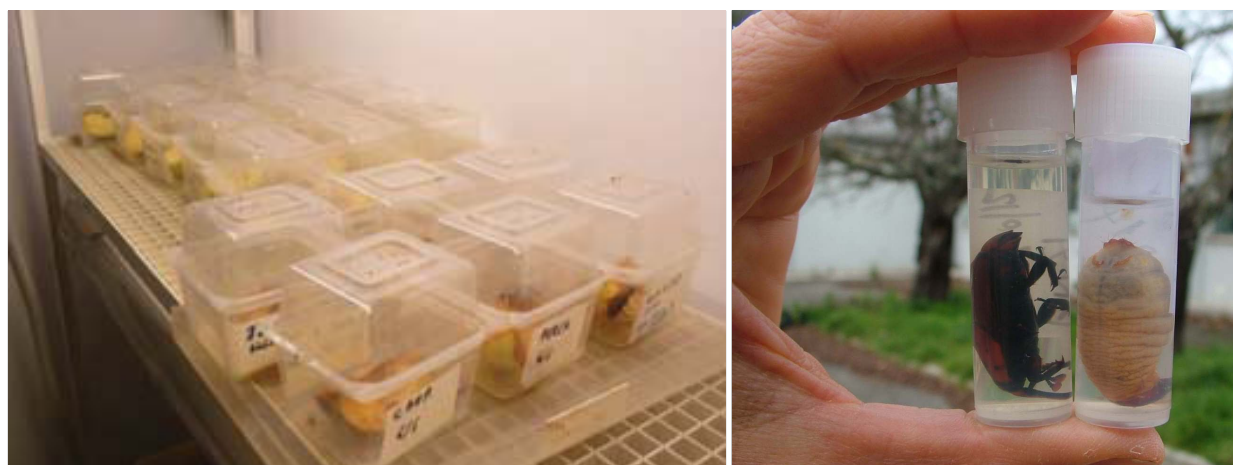
Per eseguire degli esperimenti incrocio in condizioni di laboratorio standardizzate ci siamo avvalsi della collaborazione del gruppo di ricerca del centro ENEA La Casaccia (S. Maria di Galeria, RM) coordinato dal dr. Massimo Cristofaro. Sono stati impiegati individui adulti sfarfallati da pochi giorni e tenuti in isolamento non appena emersi dal bozzolo in modo da garantirne la verginità. Tali esemplari provenivano da due distinte linee di allevamento, una italiana originaria del Lazio, e una vietnamita prodotta a partire da alcuni esemplari raccolti nella città di Hanoi ed ottenuti grazie ad una collaborazione esterna. In entrambi i casi sono stati utilizzati individui della seconda generazione di allevamento, per evitare un aumento di omozigosi dovuto al fenomeno di *inbreeding*, che avrebbe potuto ridurre il potere risolutivo dei marcatori nei test di paternità.

Per l'esecuzione degli incroci, ciascuna coppia è stata posta in una gabbia ed è stato osservato l'accoppiamento fino a che i *partner* non si sono separati spontaneamente. Negli esperimenti di accoppiamento multiplo, al termine della copula con il primo maschio, quest'ultimo è stato allontanato ed è stato offerto immediatamente alla femmina un secondo maschio, senza deposizione di uova tra una copula e l'altra. Sono inoltre stati registrati i tempi trascorsi prima della copula, quelli di inizio e di conclusione di ciascun accoppiamento. In seguito le femmine sono state isolate e lasciate libere di deporre, utilizzando come substrato di sostituzione uno spicchio di mela che fungeva anche da nutrimento, per un periodo variabile di circa 40 giorni. In condizioni di cattività è stato osservato infatti che la femmina di questa specie, una volta fecondata, ovidepone per un periodo prolungato con un tasso via via decrescente fino a deporre solamente poche uova non fecondate e quindi non vitali (Gindin *et al.*, 2006; Ju *et al.*, 2011). Per questo motivo, ciascun esperimento è stato protratto per circa 10 giorni dalla deposizione dell'ultimo uovo vitale, in modo da poter assumere che la femmina avesse esaurito le riserve di sperma o comunque concluso l'evento riproduttivo.

La schiusa delle uova è stata monitorata giornalmente e ciascuna larva è stata isolata e allevata su substrato di mela separatamente dalle altre, per evitare fenomeni di cannibalismo, fino al raggiungimento di dimensioni corporee adeguate per una facile estrazione del DNA. Mentre nei primi due esperimenti le larve sono state sacrificate una volta raggiunte le dimensioni di circa 1 cm, per l'esperimento n°2 si è scelto di ridurre il periodo di allevamento delle larve a soli 2 o 3 giorni, ottenendo esemplari di pochissimi millimetri. Il motivo di tale cambiamento di strategia è dovuto ad un problema sorto negli esperimenti zero e n°1 in fase di amplificazione del DNA, che

ha suggerito la presenza di sostanze inibitrici della *Taq* polimerasi, non meglio identificate. Vista l'insorgenza di tale fenomeno esclusivamente in larve di allevamento, si è ipotizzato che le putative sostanze inibenti possano essersi accumulate nei tessuti dell'organismo attraverso la dieta a base di mela cui questi insetti sono sottoposti, e che possano derivare dall'uso di pesticidi o altre sostanze chimiche impiegate nella coltivazione. Nonostante nei primi due esperimenti la bassa efficienza di amplificazione riscontrata fosse stata risolta tramite la diluizione del DNA genomico (e quindi delle sostanze contaminanti) o l'impiego in fase di amplificazione di un attivatore che coadiuvasse l'azione della polimerasi (BSA, *Bovine Serum Albumin*), si è scelto per il terzo esperimento di ottimizzare la fase di estrazione in modo da ottenere una sufficiente quantità di DNA anche da una ridottissima massa di tessuto, e di impiegare quindi larve esposte il meno possibile alla ipotetica fonte di contaminazione.

L'allevamento degli adulti e delle larve è stato condotto all'interno di camere climatiche ad una temperatura di  $29\pm 1$  °C, con un'umidità relativa del 100% ed un ritmo giorno-notte di 12 h (Arnone *et al.*, 2014). Raggiunte le dimensioni desiderate, le larve sono state uccise e conservate in acetone, analogamente ad entrambe le coppie parentali, in vista delle successive indagini genetiche (Fig. 2.15).



**Fig. 2.15.** Allevamento di individui di *R. ferrugineus* su mela all'interno di una camera climatica (a sinistra) ed esemplari di un individuo adulto e di una larva conservati in acetone (a destra).  
*R. ferrugineus* rearing on apple substrate within a climate chamber (on the left); adult and larva samples stored in acetone (on the right).



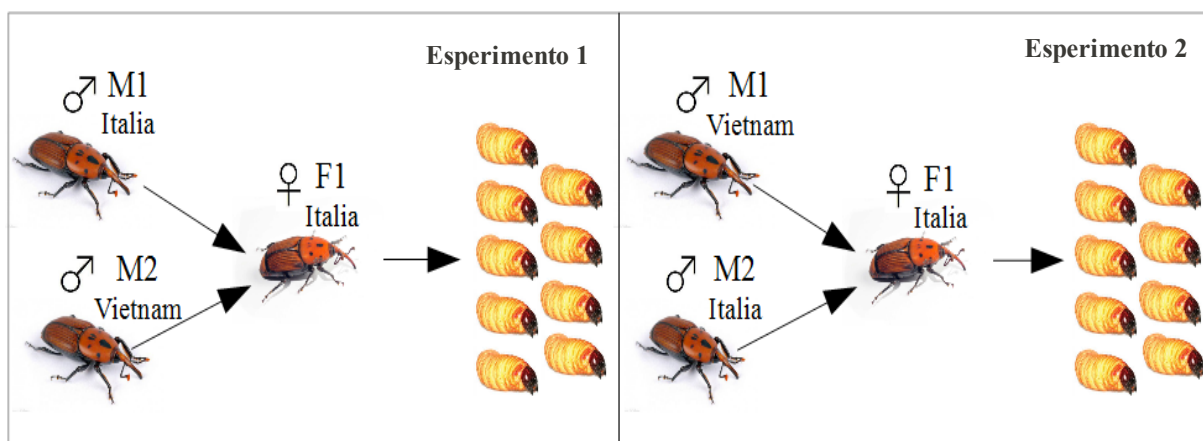
### **2.2.2. Esperimento preliminare di calibrazione del metodo di analisi: esperimento zero**

Al fine di saggiare la sensibilità del metodo di analisi proposto per l'esecuzione di test di paternità, e quindi verificare il potere risolutivo del pannello di marcatori genetici messo a punto, è stato programmato un esperimento di prova in cui solo i nostri collaboratori del centro ENEA La Casaccia, che hanno condotto gli allevamenti e gli incroci, erano a conoscenza dello schema di accoppiamenti e avevano traccia delle relazioni di parentela tra tutti gli individui. Lo scopo era quello di verificare se, genotipizzando “al buio” la generazione parentale e quella filiale, saremmo stati in grado di attribuire con successo ogni larva della progenie alla corretta coppia parentale, conoscendo solo il sesso dei genitori putativi. L'esperimento zero prevedeva quindi due accoppiamenti indipendenti tra una femmina italiana ed un maschio vietnamita, le cui larve ci sono state poi consegnate mescolate tra loro ma con un codice identificativo che permettesse ai nostri collaboratori di risalire ai rispettivi genitori per confermare i nostri risultati.

### **2.2.3. Esperimenti di accoppiamento multiplo**

Sono stati condotti due esperimenti in cui ad una femmina vergine è stata data la possibilità di accoppiarsi con due maschi, per verificare se ad un accoppiamento multiplo corrisponda effettivamente la progenie di più padri e si possa dunque parlare di reale poliandria in *R. ferrugineus*, seppur per il momento solo accertata in laboratorio. Come già accennato nell'introduzione (par. 1.2), è infatti documentato, tramite osservazioni sia in natura che in condizioni di cattività (Kaakeh, 2005; Mazza *et al.*, 2014a), che le femmine di questa specie si accoppiano frequentemente con più maschi alla volta. Con questi esperimenti si è voluto dunque chiarire se la femmina impieghi per la fertilizzazione della uova tutti i contributi spermatici ricevuti, ed eventualmente in che proporzioni.

Dopo l'accoppiamento con due maschi, sono state quindi raccolte giornalmente le uova prodotte dalla femmina, per poi allevare le larve da esse derivanti. Per ciascun uovo è stata registrata la data di deposizione e di schiusa in modo da tracciare la scala temporale di produzione della prole. Sono state inoltre contate il numero totale di uova deposte, il numero di uova schiuse ed il numero di larve allevate con successo per avere una stima dei tassi di mortalità della progenie e della proporzione di individui analizzati sul totale di quelli prodotti da ciascuna femmina.



**Fig. 2.16.** Schema di incrocio degli esperimenti n°1 e n°2.  
*Mating scheme of experiments n°1 and n°2.*

La femmina dell'esperimento n°1 è stata accoppiata prima con un maschio proveniente dall'allevamento italiano, e poi con un secondo di origine vietnamita, mentre la femmina dell'esperimento n°2 è stata accoppiata prima con un maschio proveniente dall'allevamento vietnamita e poi con uno italiano (Fig. 2.16).

Il motivo di sottoporre alle femmine il maschio italiano e quello vietnamita in un ordine diverso tra i due esperimenti sta nel voler considerare l'eventualità che la femmina possieda dei meccanismi di selezione dello sperma sulla base della somiglianza genetica con il maschio donatore. Tali meccanismi, seppur ancora poco studiati e chiarificati, sono infatti documentati in diverse specie di insetti, come forma di scelta criptica del *partner* sessuale finalizzata alla riduzione degli effetti dell'*inbreeding* (Mack *et al.*, 2002).

#### **2.2.4. Caratterizzazione genetica della generazione parentale e filiale**

Il DNA genomico di tutti gli individui è stato estratto con un protocollo classico fenolo/cloroformio (Appendice n°1). Il tessuto di partenza era costituito da due zampe nel caso degli adulti, dalla testa o da un lembo di cuticola e muscolatura sotto-cuticolare per le larve degli esperimenti zero e 2, e dall'intera larva nell'esperimento n°2.

Per ciascun esperimento si è proceduto quindi con la genotipizzazione della generazione parentale sui loci microsatelliti mostratisi polimorfici nelle popolazioni italiane e vietnamite. Tali marcatori sono stati amplificati tramite *primer* fluorescenti e sottoposti ad elettroforesi capillare come descritto nel paragrafo 2.1.7, per poi procedere con l'attribuzione dei genotipi (vedi par. 2.1.8) Dall'analisi dei dati di genotipizzazione è stato possibile individuare per ogni esperimento il sottoinsieme di loci maggiormente informativo ai fini di attribuire ciascuna larva ai rispettivi genitori e calcolare, sulla base delle leggi di Mendel, i genotipi attesi nella progenie di ciascuna

ipotetica coppia parentale. Per l'esperimento zero, sono stati esclusi quei loci che presentavano lo stesso allele in omozigosi nei quattro parentali, e quelli per cui i due maschi e/o le due femmine portavano un allele in comune. Per gli esperimenti di accoppiamento multiplo, i loci sono stati suddivisi in tre categorie:

- **non diagnostici**: i maschi condividono lo stesso genotipo;
- **parzialmente diagnostici**: i maschi hanno un allele in comune e/o la femmina condivide un allele con uno od entrambi i maschi, di conseguenza solo alcuni individui della progenie potranno essere correttamente attribuiti al padre;
- **totalmente diagnostici**: i maschi e la femmina non hanno alcun allele in comune, tutti gli individui della progenie possono essere univocamente attribuiti ad uno dei due maschi.

Successivamente, il DNA estratto dalla progenie è stato amplificato e genotipizzato, analogamente a come descritto in precedenza, su tutti i loci totalmente diagnostici e su alcuni di quelli parzialmente diagnostici, in modo da ottenere una buona robustezza dei dati che ammortizzasse possibili errori di genotipizzazione su alcuni loci. Sono stati poi esclusi dalle analisi di parentela quei marcatori che, attraverso il confronto tra genotipi attesi ed osservati ed un'accurata analisi visiva dei dati grezzi di genotipizzazione (vedi par. 2.1.8), hanno mostrato chiare evidenze della presenza di alleli nulli.

### 2.2.5. Analisi di parentela

Dopo un'attenta analisi dei genotipi, è stata attribuita la paternità a ciascuna larva confrontando i genotipi osservati con quelli attesi nei diversi accoppiamenti possibili. Come ulteriore riscontro dei risultati ottenuti, i genotipi della generazione parentale e di quella filiale sono stati sottoposti ad un'analisi di paternità mediante due *software* dedicati che sfruttano algoritmi diversi: PATRI (Nielsen *et al.*, 2001), che impiega un approccio bayesiano, ed il programma CERVUS v.3.0.6 (Kalinovski *et al.*, 2007) che adotta invece un metodo di *maximum likelihood*, derivante dall'approccio sviluppato da Marshall *et al.*, (1998).

#### Approccio bayesiano: PATRI (PaTernity Inference)

PATRI (PaTernity Inference) è un programma specifico per analisi di paternità in cui sia nota la relazione madre-figlio e debba essere identificato il padre tra un insieme di possibili candidati. Mediante l'approccio di analisi di parentela definito "*full probability*", vengono calcolate le probabilità a posteriori che un determinato maschio sia il padre di un dato individuo della progenie. Ovviamente viene assegnato il maschio con probabilità più alta e questo stesso valore

costituisce una misura della confidenza statistica del risultato. Il parametro principale richiesto a priori (*prior*) per l'analisi bayesiana è la dimensione effettiva della popolazione maschile ( $N_{em}$ ), ossia il numero di maschi potenzialmente in grado di riprodursi. La probabilità a priori che un maschio sia il vero padre sarà  $1/N$ , ossia si assume che tutti i maschi abbiano uguale probabilità di aver fecondato la femmina in questione. Quando  $N$  non sia conosciuto con esattezza, è possibile modellizzare l'incertezza su tale variabile secondo una distribuzione uniforme o gaussiana. Nell'ambito delle analisi condotte sugli esperimenti di incrocio di questo lavoro, la dimensione effettiva della popolazione maschile era chiaramente pari a 2 in quanto ciascuna femmina si è potuta accoppiare con solo due maschi.

L'algoritmo di PATRI è stato sviluppato con l'intento di gestire anche situazioni nelle quali non tutti i potenziali padri siano stati campionati, ed è possibile effettuare una stima di *maximum likelihood* di  $N$  basata sui dati genotipici di generazione parentale e filiale, assumendo che i maschi abbiano uguale fecondità e che siano stati campionati in modo omogeneo. Il *software* permette inoltre di suddividere la popolazione maschile in gruppi sulla base di informazioni ecologiche o comportamentali e di valutare ipotesi differenti circa il successo riproduttivo differenziale dei vari gruppi.

#### **Approccio di *maximum-likelihood*: CERVUS**

Il *software* CERVUS v.3.0.6 è uno dei più usati nell'ambito di analisi di parentela e permette di attribuire, sempre sulla base di dati genotipici, uno od entrambi i genitori alla rispettiva progenie tramite due approcci alternativi: il metodo di “*exclusion*” e quello definito “*categorical allocation*” (Jones *et al.*, 2010). L'analisi si svolge in tre fasi distinte: la stima delle frequenze alleliche nella popolazione da cui provengono i campioni, la simulazione di un'analisi di parentela sulla base delle frequenze alleliche prodotte, l'analisi di parentela vera e propria. Nella prima fase, oltre alla stima delle frequenze degli alleli individuati per ciascun locus nella popolazione di riferimento, vengono calcolati anche altri parametri statistici come il numero di omozigoti ed eterozigoti, l'eterozigosità attesa ed osservata, ed il *Polymorphism Information Content* (PIC) dei vari loci. Vengono inoltre stimate, per ciascun locus, le *non-exclusion probabilities*, ovvero le probabilità di non escludere, tra i possibili genitori, individui non realmente imparentati con la progenie. Le probabilità di non esclusione vengono stimate per una serie di diverse situazioni, come ad esempio se il secondo genitore è noto oppure no, o se sono entrambi da attribuire. Per questa analisi, il *data set* impiegato comprende i genotipi dei loci selezionati per ciascun esperimento, su tutti gli individui provenienti dall'Italia e dal Vietnam che erano stati precedentemente caratterizzati per le stime di variabilità genetica dei microsatelliti

sviluppati (vedi par. 2.1.9). La popolazione di riferimento, da cui virtualmente provengono gli adulti impiegati negli esperimenti di incrocio, consta dunque di 40 individui, 23 italiani e 17 vietnamiti.

Nello *step* successivo, CERVUS utilizza le frequenze alleliche calcolate, per simulare delle analisi di parentela, sulla cui base vengono stimati il potere di risoluzione dei loci analizzati ed il livello di confidenza delle analisi di parentela che saranno svolte sui dati reali. Vengono infatti applicati un livello di confidenza rilassato (80%) ed uno più stringente (95%) per i quali sono calcolati i valori critici di LOD (logaritmo naturale del *likelihood ratio*) o Delta (un valore derivato da LOD) ed i tassi di assegnazione sulla base di tali valori, previsti per ciascun tipo di analisi di parentela. Il *likelihood ratio* è, in questo contesto, la probabilità che un dato individuo sia il vero genitore in questione, diviso la probabilità che esso non lo sia, per cui maggiore è il suo valore (e quindi il LOD corrispondente assumerà valori positivi crescenti), più alta è la confidenza statistica nell'attribuzione di parentela. Il parametro Delta corrisponde al logaritmo del rapporto tra i due valori di *likelihood* più alti, ossia quelli dei due individui con la più alta probabilità di essere il vero genitore. Attraverso le simulazioni viene stabilita la significatività della differenza tra questi due valori stimando la distribuzione nulla di Delta. La simulazione permette inoltre di stimare, sulla base del livello di confidenza scelto, il numero di individui della progenie che potrebbero essere assegnati non correttamente.

Le simulazioni vengono condotte su 4 possibili analisi di parentela: assegnazione della madre, assegnazione del padre, assegnazione di entrambi i genitori nel caso in cui si conosca il sesso degli individui oppure no. Esse tengono conto di alcune variabili controllate dal ricercatore, quali il numero di possibili genitori e la proporzione con cui si stima che essi siano stati campionati, la proporzione di dati mancanti e di ipotetici errori di genotipizzazione.

Nel caso delle analisi eseguite sull'esperimento zero, vi erano 2 potenziali madri e 2 potenziali padri, mentre negli esperimenti n°1 e n°2 le madri erano note e sempre 2 gli individui considerati come potenziali padri. I genitori candidati sono stati ovviamente tutti campionati, la proporzione di dati mancanti era praticamente nulla (vi è un solo genotipo mancante ad un locus di una larva nell'esperimento n°2) ed è stato impostato un errore di genotipizzazione standard pari a 1%.

Nella fase finale, che rappresenta l'analisi di parentela vera e propria, vengono forniti i genotipi della progenie, degli individui candidati come potenziali genitori e dell'eventuale genitore noto. Per ogni individuo della generazione filiale viene calcolata la probabilità che ciascun genitore potenziale sia il genitore reale e gli viene attribuito il candidato con valore di LOD maggiore. Viene inoltre stimato il livello di confidenza nell'attribuzione di parentela sulla base dei valori critici di LOD (o Delta) prodotti durante la simulazione. Nei risultati vengono comparati i tassi

di assegnazione osservati con quelli attesi dalla simulazione. Quando uno dei due genitori è noto, la frequenza delle discordanze ingiustificate (valori di *mismatch*) tra il suo genotipo e quelli della progenie è usata per stimare il tasso di errori di genotipizzazione.

### **2.3. Power analysis dei loci microsatelliti sviluppati e simulazioni di analisi di paternità per le prospettive future di ricerca**

Gli esperimenti condotti in questo lavoro sono stati progettati con un duplice obiettivo: verificare il potere risolutivo dei microsatelliti messi a punto come strumento di analisi di paternità, e saggiare e calibrare tale strumento, in condizioni standardizzate, per studiare aspetti del comportamento riproduttivo delle femmine di *R. ferrugineus*, e formulare delle ipotesi riguardo ai meccanismi di utilizzo dello sperma da parte di queste ultime e la presenza di poliandria.

Senza dubbio le ipotesi sviluppate richiederebbero l'esecuzione di esperimenti di incrocio in condizioni più complesse di quelle testate, sia per ricevere ulteriore validazione, sia perché aprono la strada a ricerche più approfondite su questi aspetti del sistema di accoppiamento del Punteruolo rosso. Inoltre, l'utilizzo di analisi genetiche di parentela potrebbe certamente permettere di studiare molto più nel dettaglio il *mating system* di questa specie se applicato a popolazioni naturali.

A questo scopo sono state eseguite, tramite strumenti informatici, una *power analysis*, ovvero una stima del potere risolutivo dei microsatelliti a nostra disposizione, ed una serie di simulazioni di analisi di paternità nell'ambito di ipotetici scenari di accoppiamento via via più complessi. Contestualmente è stata studiata l'incidenza, sul tasso di attribuzione della progenie al rispettivo padre, di fattori come il numero di maschi coinvolti e la proporzione di maschi campionati rispetto a quelli presenti nella popolazione. Le simulazioni sono state quindi condotte con la finalità di valutare le potenzialità di successo di test di paternità in due ambiti distinti:

- esperimenti di laboratorio che coinvolgano più individui rispetto al sistema a 2 maschi studiato finora;
- esperimenti su popolazioni naturali in cui vengano campionati palma per palma individui adulti di entrambi i sessi ascrivibili ad una stessa popolazione, per poi allevare le femmine risultanti già gravide al momento della raccolta, e la prole da esse risultante. In questo modo si potrebbero condurre analisi di paternità su progenie di madre nota e utilizzare i maschi catturati come gruppo di potenziali padri, con cui confrontare geneticamente la prole delle diverse femmine. Questo tipo di esperimento permetterebbe dunque di verificare in natura i risultati degli esperimenti di laboratorio, producendo ulteriori evidenze per stimare il numero medio di contributi paterni per evento riproduttivo in questa specie.

Un aspetto importante da prendere in considerazione è che, negli esperimenti prodotti in questo studio, l'artificialità delle condizioni di laboratorio ha permesso di incrociare tra loro individui

italiani e vietnamiti, consentendo un notevole aumento del potere risolutivo dei marcatori impiegati, e quindi dell'affidabilità dei risultati. Inoltre, essendo molto ridotto il numero di padri candidati, è stato possibile, sulla base dei loro genotipi e di quelli materni, selezionare i marcatori genetici con più alto potere diagnostico nell'ambito di ciascun esperimento. In condizioni naturali si andrebbe ovviamente ad analizzare individui appartenenti alla stessa popolazione (quindi con una maggiore omogeneità genetica) e non sarebbe possibile conoscere a priori i loci maggiormente diagnostici in ciascun accoppiamento, ma sarebbe opportuno genotipizzare di volta in volta gli individui sull'intero pannello di microsatelliti a disposizione. Dato che l'interesse a comprendere il sistema di accoppiamento di questa specie dannosa è accresciuto dall'eventualità di impiegare la Tecnica dell'Insetto Sterile come strategia di controllo, è sembrato più opportuno (e più pratico) ipotizzare gli studi futuri nelle aree di invasione, visto anche che sono riportate differenze significative, rispetto all'areale di origine, nella densità di popolazione e nel successo riproduttivo, oltre che nei tempi di sviluppo e di generazione (Dembilio & Jacas, 2011). Di conseguenza, le simulazioni fatte al computer sono state finalizzate ad eventuali studi su popolazioni italiane, per cui le frequenze alleliche dei loci microsatelliti impiegate si riferiscono al campione di 22 individui raccolti in Italia a nostra disposizione.

Il *software* CERVUS v.3.0.6 è stato impiegato per produrre una stima preliminare del potere risolutivo dei microsatelliti risultati polimorfici nella popolazione italiana, nello scenario di un test di paternità dove la madre abbia genotipo noto, attraverso due parametri:

- il ***Polymorphism Information Content (PIC)*** di ogni locus ed il suo valore medio;
- la ***non-exclusion probability***, ossia la probabilità di considerare erroneamente come padre della progenie analizzata un individuo non imparentato con essa.

Con lo stesso programma sono state poi condotte due serie di simulazioni. Nella prima, volta a stimare l'efficacia di test di paternità su esperimenti di incrocio in laboratorio, è stata riprodotta la situazione in cui ad una femmina viene data la possibilità di accoppiarsi con più maschi e sono state così impostate le seguenti variabili:

- numero di padri potenziali (ossia di maschi con cui la femmina si è accoppiata) diverso in ciascuna simulazione: 2, 4, 6, 8, 10;
- quantità di prole prodotta: 150 larve (che rappresenta una stima veritiera del successo riproduttivo medio di una femmina allevata in laboratorio; Kaakeh, 2005);
- proporzione di padri potenziali campionata: 1.00 (poiché si presuppone di genotipizzare tutti i maschi coinvolti in un simile esperimento);



- proporzione di loci tipizzati: 0.99 (vista la quasi totale assenza di dati mancanti negli esperimenti precedenti, determinata dalla precedente ottimizzazione delle condizioni di estrazione e amplificazione del DNA);
- proporzione di errori di genotipizzazione: 0.01 (ossia il tasso di errore che viene stimato come standard nella produzione di dati genotipici di microsatelliti; Kalinowski *et al.*, 2007).

La seconda serie di simulazioni è stata rivolta a potenziali esperimenti su popolazioni naturali, analoghi a quelli discussi sopra. Le variabili in gioco sono allora state impostate nel seguente modo:

- quantità di prole prodotta: 150 larve (dato che le femmine e la loro prole verrebbero comunque allevate in laboratorio);
- proporzione di loci tipizzati: 0.99;
- proporzione di errori di genotipizzazione: 0.01;

È stato stimato l'effetto del diverso numero di padri potenziali (ossia di maschi catturati in natura) simulando 5 situazioni diverse, rispettivamente con 5, 10, 20, 30 e 40 maschi campionati, sulla base delle osservazioni fatte durante le nostre campagne di raccolta. Per ognuno di questi scenari sono state condotte simulazioni in cui si assumeva una diversa proporzione di maschi campionati rispetto al numero effettivo di maschi presenti nella popolazione: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00. Nel contesto di una popolazione naturale che soddisfi il criterio di panmissia, i potenziali padri di una determinata progenie sono infatti teoricamente tutti i maschi fertili presenti in essa. Va considerato che stimare il loro numero effettivo in una popolazione di Punteruolo rosso è piuttosto complesso, in quanto non sono noti ad oggi studi popolazionistici a riguardo, e la delimitazione spaziale dei confini di una popolazione può essere fatta solo in modo arbitrario considerando la distribuzione delle palme ospiti in una determinata area e la capacità di dispersione dell'insetto, senza però poter tenere conto di una eventuale struttura genetica della popolazione legata alla presenza di colonie più o meno isolate su palme diverse.

## Capitolo 3

### Risultati

#### 3.1. Messa a punto *ex novo* di un pannello di microsatelliti per la specie *R. ferrugineus*

##### 3.1.1. Pirosequenziamento 454:

###### Preparazione del campione di DNA genomico

La prima corsa elettroforetica effettuata sul genomico estratto dal campione RP04B01 ha evidenziato la presenza di una buona quantità di DNA nucleare e mitocondriale (mtDNA), visualizzati come due bande distinte ad elevato peso molecolare (inferiore nella banda ascrivibile al mtDNA) e di notevole intensità luminosa. Oltre a queste erano però presenti numerose altre bande di debole intensità e dimensioni varie, ed una luminosità diffusa lungo tutta la linea di corsa (*smearing*), che potevano indicare la presenza di elevate quantità di RNA o di un alto grado di frammentazione del DNA, condizione questa da evitare in vista di un pirosequenziamento.

Nella corsa elettroforetica successiva al trattamento con *RNasi*, lo *smearing* e le bande supplementari si sono drasticamente ridotti, permettendo di escludere che il DNA fosse fortemente degradato e di attribuire il primo risultato elettroforetico alla presenza di numerosi RNA di varie dimensioni. A conferma di ciò, la concentrazione di acidi nucleici, stimata tramite lo spettrofotometro, si è ridotta in seguito al trattamento con *RNasi* (da 716.8 ng/μL a 329.6 ng/μL), come atteso dopo la degradazione ed eliminazione di una rilevante quantità di RNA dal campione. Tale trattamento ha quindi permesso una stima ben più accurata della quantità di DNA puro ottenuta al termine del protocollo, pari a circa 30 μg, e nettamente superiore ai 5 μg richiesti come quantità minima dal centro di sequenziamento. I valori relativi ed i rapporti di assorbanza a diverse lunghezze d'onda, misurati dall'analisi spettrofotometrica precedente e successiva e al trattamento con *RNasi I* e alla purificazione del campione, sono riassunti nella tabella 3.1.

I rapporti di assorbanza  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$ , sono rimasti pressoché invariati durante le due letture e indicano l'assenza di contaminazioni consistenti da proteine e altri composti organici quali fenolo, EDTA, polisaccaridi, etanolo. Anche il valore di assorbanza a 320 nm, prossimo allo zero, suggerisce una buona purezza del campione.

**Tab. 3.1.** Valori e rapporti di assorbanza prima e dopo l'eliminazione dell'RNA dal campione di DNA genomico

*Absorbance values and ratios before and after RNA elimination from the genomic DNA sample*

	<b>pre-RNasi</b>	<b>post-RNasi</b>
<b>A<sub>230</sub></b>	0.593	0.193
<b>A<sub>260</sub></b>	1.303	0.412
<b>A<sub>280</sub></b>	0.644	0.216
<b>A<sub>320</sub></b>	0.020	0.016
<b>A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub></b>	2.030	1.910
<b>A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub></b>	2.200	2.130

### Creazione della libreria genomica

Il pirosequenziamento su 1/8 di piastra del sequenziatore 454 ha permesso di ottenere un totale di 97'704 sequenze (*read*), delle quali 70'522 con una lunghezza superiore a 75 bp e con una lunghezza media di 268.91 bp. In totale sono state prodotte 20'421'463 paia di basi (tabella 3.2). Considerando che il centro di sequenziamento BMR Genomics prevedeva di produrre per 1/8 di piastra un numero minimo di 70'000 *read*, ed eliminando quelle inferiori alle 75 bp, si può considerare che il pirosequenziamento sia andato a buon fine, con risultati entro i parametri attesi.

Nella tabella 3.3 sono presentati i risultati dell'assemblaggio *de novo*. Delle 97'704 *read* totali ne sono state assemblate e riunite in *contig* il 46.5%, mentre il 38.5% risulta come sequenze singole (*singleton*) non inserite nell'assemblaggio. La percentuale di *repeat* (*read* che il *software* non riesce a posizionare in maniera univoca nei *contig*) è piuttosto bassa (0.01%), mentre le sequenze di dimensioni inferiori alle 50 bp (*read* corte) rappresentano l'11% del totale.

L'assemblaggio ha prodotto 366 *contig* per un totale di 180'467 bp assemblate, di questi *contig* 78 hanno dimensioni superiori a 500 bp e una lunghezza media di 1'404 bp. Il *contig* maggiore assemblato ha una dimensione di ben 20'843 bp.

Visto che in letteratura o nelle banche dati non è disponibile alcuna stima delle dimensioni del genoma di *R. ferrugineus*, e che l'organismo più prossimo a questa specie del quale si ha questo tipo di informazioni (*Tribolium castaneum*, circa 210 Mb; *GenBank Assembly ID*: GCA\_000002335.2) può fornire solo indicazioni estremamente poco significative, non è stato possibile effettuare stime di *coverage* attendibili. Se si assumesse che il genoma di *R. ferrugineus* abbia dimensioni comparabili a quello di *T. castaneum* (cosa del tutto arbitraria vista la grande variabilità nelle dimensioni del genoma degli insetti), il *coverage* medio ottenuto sarebbe inferiore a 1X, ed in base alla distribuzione di *Poisson* applicata al sequenziamento *shotgun*, si potrebbe presumere che sia stato coperto il 9.5% del genoma dell'organismo. Come

suggerito dal centro di sequenziamento stesso, la stima del *software* assemblatore, riportata in tabella 3.3, è comunque diversa dall'atteso e non attendibile, perché il numero di *reads* è troppo basso. La copertura totale del genoma si ottiene invece generalmente con *coverage* maggiori di 6X, e solo con *coverage* di almeno 20–25X si ritiene di avere un assemblaggio *de novo* affidabile. In ogni caso, l'obiettivo del pirosequenziamento per gli scopi di questo studio era di ottenere una libreria che rappresentasse semplicemente una porzione casuale del genoma della specie, con sequenze di dimensioni sufficienti da contenere microsatelliti e regioni fiancheggianti abbastanza lunghe da poter disegnare dei *primer* al loro interno, senza esigenze particolari riguardo i livelli di *coverage* raggiunti e la frazione di genoma sequenziata.

**Tab. 3.2.** Risultati del sequenziamento 454  
*Results from 454 sequencing*

Sequenze ottenute	97'704 (70'522*)
Totale basi prodotte	20'421'463 bp
Lunghezza media delle <i>read</i>	209.01 bp (268.91 bp**)

\* Sequenze > di 75 basi; \*\* lunghezza media delle sequenze > di 75 basi

**Tab. 3.3.** Risultati dell'assemblaggio *de novo*  
*Results from de novo assembly*

<b>READ</b>	
<i>read</i> assemblate	46.50%
<i>Singleton</i>	38.50%
<i>Repeat</i>	0.01%
<i>read</i> corte	11.00%
<b>CONTIG</b>	
n° di grandi <i>contig</i> (>500bp)	78
Totale basi nei grandi <i>contig</i>	109'586 bp
n° totale dei <i>contig</i> (compresi quelli < di 500 bp)	366
Totale basi nei <i>contig</i>	180'467 bp
Lunghezza media grandi <i>contig</i>	1'404 bp
<i>Contig</i> maggiore	20'843 bp
<b>GENOMA</b>	
Dimensione stimata	8.9 Mb
<i>Coverage</i> stimato	2.3 X

### 3.1.2. Mining bioinformatico dei microsatelliti e progettazione dei primer specifici

Utilizzando le temperature di *melting* ( $T_m$ ) di *default*, il programma Q<sub>DD</sub> v.1 (Megléczy *et al.*, 2010) ha individuato 98 microsatelliti semplici, mentre impostando temperature più basse ( $T_m$  minima = 45 °C,  $T_m$  ottimale = 55 °C) ne sono stati individuati in tutto 119. Visto l'elevato numero di potenziali marcatori isolato da entrambe le analisi, e dato che il *mining* effettuato con le temperature di *melting* più basse ha prodotto gli stessi risultati di quello alle temperature di *default*, con l'aggiunta di soli 21 loci, si è scelto di utilizzare l'*output* della prima analisi (57 °C <  $T_m$  < 63 °C), per lavorare con *primer* che avessero temperature di *annealing* mediamente più alte, e quindi condizioni di amplificazione tendenzialmente più stringenti. Nella tabella 3.4 sono elencate le percentuali di abbondanza dei diversi tipi di motivi ripetuti nel campione dei 98 microsatelliti isolati. L'analisi con Q<sub>DD</sub> ha individuato inoltre 38 microsatelliti a motivo composto utilizzando le temperature di *melting* ( $T_m$ ) di *default*, e 43 impostando temperature più basse ( $T_m$  minima = 45 °C,  $T_m$  ottimale = 55 °C). Si è scelto tuttavia di saggiare in prima battuta l'ampio numero di microsatelliti semplici disponibile, in quanto quelli a motivo composto presentano maggiori problematiche in fase di genotipizzazione (Bull *et al.*, 1999).

Nelle appendici n°5 e 6 sono riportati i risultati del *mining* bioinformatico di microsatelliti a motivo semplice, identificati tramite il codice della rispettiva *read* o *contig* prodotti dal 454. In particolare, nell'Appendice n°5 sono indicati, per ciascun locus, le caratteristiche del microsatellite (lunghezza, sequenza e numero di ripetizioni del motivo), la sua posizione e quella dei *primer* all'interno della *read* o del *contig* sul quale sono stati disegnati, e le dimensioni attese del prodotto PCR corrispondente. Nell'Appendice n°6 sono invece presentate le sequenze e le caratteristiche dei *primer* di amplificazione di ciascun locus (lunghezza, temperatura di *melting*, contenuto in GC).

**Tab. 3.4.** Abbondanza relativa dei vari tipi di motivo ripetuto individuati dal *mining* bioinformatico  
*Relative frequency of repetitive motifs individuated by bioinformatic mining*

Tipologia di motivo ripetuto	Abbondanza relativa
Di-nucleotidico	51%
Tri-nucleotidico	37%
Quadri-nucleotidico	9%
Penta-nucleotidico	2%
Esa-nucleotidico	1%

### 3.1.3. Selezione dei loci microsatelliti

Del totale di 98 marcatori isolati dalla libreria genomica del 454 ne sono stati saggiati 37, cui sono stati aggiunti 2 loci (RPW38 ed RPW39) tratti da un lavoro di Capdevielle-Dulac *et al.*, (2012), i cui *primer* di amplificazione sono riportati nella tabella 3.5.

**Tab. 3.5.** Sequenza e dimensioni dei *primer* di amplificazione dei 2 loci tratti da Capdevielle-Dulac *et al.*, 2012  
*Primer sequences and dimensions for the amplification of the 2 loci from Capdevielle-Dulac et al., 2012*

Locus	Sequenza <i>primer</i> L	<i>Primer</i> L (bp)	Sequenza <i>primer</i> R	<i>primer</i> R (bp)
RPW38	ACAACATTTTCACCAAATTCA	21	TCTTGTTCTTGATAAACCCAACT	23
RPW39	CACCTTTAATAGTTCTTCTGACAT	24	AAAAGACAAGGAAATCCACA	20

Dei 39 loci scelti in totale, 20 sono costituiti da microsatelliti di-nucleotidici, 7 da motivi tri-nucleotidici, 9 quadri-nucleotidici, 2 penta-nucleotidici e 1 a motivo esa-nucleotidico.

L'impiego di microsatelliti per la maggior parte di-nucleotidici è stato motivato da riferimenti bibliografici che indicavano una maggiore variabilità di questa categoria di motivi ripetuti (Chakraborty *et al.*, 1997). Nella tabella 3.6 sono elencati, per ciascun locus isolato tramite QDD, la sequenza e le dimensioni dei *primer* di amplificazione, mentre nella tabella 3.7 sono riportate le temperature di *melting* dei *primer*, la loro posizione e la posizione del motivo ripetuto sulla sequenza di riferimento prodotta dal pirosequenziamento, e la dimensione attesa del relativo prodotto PCR.

**Tab. 3.6.** Sequenza e dimensioni dei *primer* di amplificazione dei 37 loci microsatelliti selezionati dall'*output* del *mining* bioinformatico  
*Primer sequences and dimensions for the amplification of the 37 loci selected from in silico mining output*

<b>Locus</b>	<b>Sequenza primer Forward (F)</b>	<b>primer F (bp)</b>	<b>Sequenza primer Reverse (R)</b>	<b>primer R (bp)</b>
RPW01	AAGGATTA AAAACCCGCGACT	20	CAATCCGTCATAATGTTTATAGGGT	25
RPW02	TCCGATTCTGTTTCAGACCAA	20	TCCTTTATACCGCGGAAGTG	20
RPW03	TCCCATGCCATTGCTATTTT	20	GAAACGGGAAACGACTACCA	20
RPW04	CAGTTTGTATGGTGGCGTTG	20	GGTCTAGTCGATATTGGCCG	20
RPW05	TGATTAACCCAAAGTTGTTTCG	21	TGCGGTTGTCAACAATAAGTG	21
RPW06	AACCTCCGGAATCGTACCTT	20	CTCATCCATCGTCCATTTCG	19
RPW07	CGGCCATTTGCTTCATGTTA	20	GTTTTAAGCTGCTGTTGATTTGAG	24
RPW08	TCAGCTGTTTCAACGTTCTCTT	22	GGTTTCAAAGCCACGTTTTT	20
RPW09	TTCTTACGTCTCCTCTTGCTCC	22	AAGTACAGATCGTTATCGACGGA	23
RPW10	ACCAGTCGTCATTTCCCTTG	20	TTGTATAGGTATCAGGTAAAAGCAATG	27
RPW11	TCGTCAGTTAGATCCCATGAT	21	GAAAGCTTTTAATTTATCATAACACGC	26
RPW12	CCTGGTGAATTGACCGATTT	20	GGGTTTGGGTTTGGTTAGGT	20
RPW13	GTCTGTTTGGTGGAGCGATG	20	CCTGTCATTGCTTCTGCTGT	20
RPW14	CTCCAATATGCAAGTGACGC	20	GCGACCTGTATGGAATTCGT	20
RPW15	CGTCGGGAAAACATGAACTT	20	TGATTTATTTCCGACCGAGC	20
RPW16	AAGGGCTTCGAAAGAGGAAC	20	CCTGCTCTAATTCCCACAGC	20
RPW17	AAACGGCTCGATATACGTGG	20	ACAAATGGTCCGAGAACGAC	20
RPW18	TTTAATTTGTTTCGATCATCGGTT	23	CAAAACAAACCAAACCAAAC	21
RPW19	TTGTTTCAGCAAATCCTTCCC	20	CAAAACCAAACCCAAAACC	20
RPW20	GCCGTTGATGTTGATACACG	20	TGCAAGACTTTTGTTCGTCA	21
RPW21	TTATCTGCCTCTCGGCTCAT	20	CGCTTTGACGACCTCCTAAG	20
RPW22	AAGCGTTCCCGGTTTACTTT	20	TGATGATGCAAGTGTGAAACG	21
RPW23	CATGGGGAGGCATTATTTCA	20	CAAAACTACAATCGTCGCCA	20
RPW24	GCCTATGCTACACAAAATAACAGC	24	GGCAAACCTTATGAATGCAGGA	21
RPW25	TGATATTCGAAGACTGGTATAACAAA	26	GCGTCGTATCAACAAACCAA	20
RPW26	CAACTGATGTGGCCGATAGA	20	GACCCTAAGCAATCAATTTTCTG	23
RPW27	AAAATTACCAACTTCCTAAATATGGAC	27	AGCCTGAGCTATGGGAATCA	20
RPW28	AGCGTATCTAGCGTGTGGCT	20	TGATGAGCTGCGTTAGGATG	20
RPW29	TTGGACAGTTCTCGTATCAA	20	AGACTTGAAACAAATACACTAGG	23
RPW30	GTCGAGATATAGCGTCCCCA	20	CCGTTCCGGTTTTGGTACAAT	20
RPW31	GTTCGAACACATCCCAGTT	20	GAGGCTTACCATGTGACCGT	20
RPW32	ACGACGACATTCATCGAACA	20	CATCAGTAGGAACAAAGATGCG	22
RPW33	GCTGTTGATGGTCCCTTCTT	20	CAACCGTAATAAACCCGAGG	20
RPW34	ATATTATGCGGCTGTCCTCG	20	AAGAGATATGCACGCCTTGG	20
RPW35	TTGCTGGCAGTGTATTTCG	20	ACCATAATGAAAGCGATGCC	20
RPW36	CAGCTACAAACAGTGCCTTTATC	23	GCTGGAAAAGGCAAGGAAAT	20
RPW37	GGAAAGGAACCCTCGAAATG	20	CCTCGTCGTGAAACCAATTT	20

**Tab. 3.7.** Caratteristiche dei *primer* dei 37 loci microsatelliti selezionati dall'*output* del *mining* bioinformatico  
*Characteristics of the 37 microsatellite loci selected from in silico mining output*

<b>Locus</b>	<b>T<sub>m</sub> primer Forward (F)</b>	<b>T<sub>m</sub> primer Reverse (R)</b>	<b>P<sub>start</sub> primer F</b>	<b>P<sub>start</sub> microsatellite</b>	<b>P<sub>end</sub> primer R</b>	<b>Prodotto PCR</b>
RPW01	59.966	59.474	42	118	208	167
RPW02	59.215	60.089	41	192	340	300
RPW03	60.289	59.971	200	228	411	212
RPW04	60.027	59.551	187	264	334	148
RPW05	57.679	59.641	202	236	312	111
RPW06	59.827	60.015	272	302	351	80
RPW07	61.900	59.515	3	43	114	112
RPW08	59.169	59.111	1	30	79	79
RPW09	60.019	60.035	46	71	122	77
RPW10	59.966	59.062	169	221	263	95
RPW11	57.060	58.847	42	99	200	159
RPW12	59.790	59.955	35	142	210	176
RPW13	61.669	59.037	181	229	350	170
RPW14	59.301	59.962	2	35	96	95
RPW15	59.971	60.038	62	215	256	195
RPW16	59.827	59.836	266	352	493	228
RPW17	59.982	59.973	124	191	345	222
RPW18	59.741	57.128	378	421	471	94
RPW19	60.051	59.198	251	299	343	93
RPW20	59.995	59.497	63	96	152	90
RPW21	59.939	60.008	47	251	300	254
RPW22	60.001	60.715	319	441	481	163
RPW23	60.660	59.729	11	266	314	304
RPW24	59.298	60.089	33	62	131	99
RPW25	58.299	59.590	83	117	180	98
RPW26	59.673	59.175	337	428	477	141
RPW27	58.469	59.797	196	224	301	106
RPW28	60.067	59.972	68	123	299	232
RPW29	54.190	52.322	295	327	380	86
RPW30	60.059	59.724	292	359	470	179
RPW31	59.827	59.997	200	254	331	132
RPW32	60.120	59.769	166	233	404	239
RPW33	59.141	59.334	179	249	295	117
RPW34	60.081	60.235	215	313	352	138
RPW35	59.879	59.929	208	270	312	105
RPW36	58.163	60.562	102	165	247	146
RPW37	60.797	59.971	295	371	424	130

T<sub>m</sub>, temperatura di *melting* (°C); P<sub>start</sub>, posizione di inizio sulla *read* prodotta dal 454 (bp); P<sub>end</sub>, posizione di fine sulla *read* prodotta dal 454 (bp); **Prodotto PCR**, dimensioni del prodotto PCR atteso (bp).



### 3.1.4. Saggi di amplificazione in vitro tramite PCR e verifica della presenza del microsatellite

Le analisi strutturali dei *primer* condotte con il *software* GENE RUNNER v.3.05 (Copyright © 1994, Hastings *software*, Inc.) non hanno evidenziato, come atteso, possibili strutture secondarie delle molecole che fossero termodinamicamente stabili durante la fase di amplificazione.

Su un totale di 39 marcatori saggiati, 24 sono stati amplificati con successo ed in condizioni ripetibili, e sono dunque stati sequenziati sullo stesso genómico impiegato per il pirosequenziamento (individuo RP04B01). Delle 24 sequenze ottenute, 22 sono state allineate correttamente con la sequenza di riferimento, confermando la presenza del microsatellite atteso, mentre 2 hanno dato problemi di allineamento dovuti probabilmente all'eccessiva vicinanza del microsatellite con uno dei *primer*, per cui nella regione di interesse la sequenza risultava di scarsa qualità per poter individuare con affidabilità il motivo ripetuto. Questi marcatori sono stati quindi scartati dalle analisi successive.

Dei 15 loci esclusi per problemi di amplificazione, 6 hanno mostrato amplificazioni aspecifiche non risolvibili con gli approcci classici di ottimizzazione delle condizioni PCR (variazione della concentrazione di MgCl<sub>2</sub>, aumento della temperatura di *annealing*, ciclo termico di *Touch Down*), mentre 9 hanno dato amplificazioni nulle o di scarsa efficienza sulla maggior parte dei campioni saggiati, nonostante siano state esplorate diverse temperature di *annealing* e concentrazioni di MgCl<sub>2</sub>.

Su diversi campioni l'amplificazione dei loci RPW16 ed RPW32 ha presentato, oltre al frammento *target*, prodotti aspecifici che sono stati eliminati aumentando la temperatura di *annealing* rispettivamente a 60 e 63 °C, ed inoltre dimezzando la concentrazione di MgCl<sub>2</sub> nel caso del locus RPW32. Analogamente, anche per il locus RPW22 è stato necessario dimezzare la concentrazione di MgCl<sub>2</sub> nella miscela di reazione. Una diversa concentrazione di magnesio è stata inoltre impiegata per quei campioni che non venivano correttamente amplificati per il locus RPW23, a causa di uno *smearing* diffuso sotto la banda *target*. In questo caso sono stati usati 0.5 µL di MgCl<sub>2</sub> in 25 µL di miscela di reazione. Il locus RPW13 è stato invece amplificato aggiungendo 1 µL di BSA (*Bovine Serum Albumine*, Promega), il che ha permesso di migliorare notevolmente l'efficienza della PCR, che precedentemente aveva prodotto bande di intensità non soddisfacente.

In generale, per i vari loci, laddove l'amplificazione in condizioni standard non ha prodotto una quantità adeguata di DNA, le strategie di amplificazione alternative adottate (*Touch Down e Gradient-Decreasing Annealing Time Program*) hanno permesso di risolvere efficacemente i campioni problematici.

### 3.1.5. Saggi preliminari di polimorfismo

Sul secondo lotto di 10 loci si è deciso di eseguire dei saggi preliminari di polimorfismo tramite corse elettroforetiche su gel di poliacrilammide denaturanti e su gel di agarosio altamente concentrati, al fine di ottimizzare gli elevati costi di genotipizzazione per elettroforesi capillare. Questi saggi hanno suggerito l'esclusione dalle analisi successive di altri 3 loci che sono risultati, con buona affidabilità, monomorfici.

In tutto quindi sono stati scelti 19 microsatelliti su cui eseguire le stime dei livelli di polimorfismo e variabilità genetica della specie. Per questi loci sono stati pertanto sintetizzati nuovamente i *primer forward* con l'aggiunta dei marcatori fluorescenti, indicati nella tabella 3.8. Nella stessa tabella sono anche riportate, per questi 19 loci, le sequenze dei *primer* e le temperature di *annealing* ottimali messe a punto nel corso dell'ottimizzazione delle condizioni di amplificazione.

### 3.1.6. Attribuzione dei genotipi

Tramite il programma MICROSATELIGHT (Palero *et al.*, 2011), i dati grezzi provenienti dall'elettroforesi capillare sono stati analizzati e trasformati in una tabella di genotipi (riportata nell'Appendice n°7) in cui a ciascun individuo sono stati attribuiti, per ogni locus caratterizzato, due alleli corrispondenti alle dimensioni del frammento di DNA amplificato. È stato attribuito il valore zero agli alleli per cui è fallita più volte l'amplificazione o la genotipizzazione. Analizzando il *data set* dei genotipi dei 106 individui caratterizzati, tramite MICRO-CHECKER (van Oosterhout *et al.*, 2004) è stato possibile individuare diversi errori di genotipizzazione legati prevalentemente alla presenza di alleli nulli.

Inoltre, il locus RPW32 ha mostrato chiaramente la presenza del fenomeno di *large allele drop-out*, in quanto l'allele corrispondente ad un frammento di 238 bp, quando presente in eterozigosi assieme all'allele lungo 218 bp, produce un segnale di intensità molto più bassa dell'allele corto, per cui spesso non viene individuato dal *software* MICROSATELIGHT. L'ispezione visiva di tutti i cromatogrammi ha permesso quindi di recuperare molti alleli perduti.

**Tab. 3.8.** 19 loci microsatelliti selezionati sulla base dell'efficacia di amplificazione e dei saggi elettroforetici di polimorfismo  
*19 microsatellite loci selected for amplification success and electrophoretic polymorphism essay*

<b>Locus</b>	<b>Motivo ripetuto</b>	<b>Sequenze dei primer (5'-3') e marcatori fluorescenti</b>	<b>T<sub>A</sub> (°C)</b>
RPW02	(TA) <sub>11</sub>	F: TCCGATTCTGTTCAGACCAA (HEX) R: TCCTTTATACCGCGGAAGTG	57
RPW03	(TA) <sub>11</sub>	F: TCCCATGCCATTGCTATTTT (6-FAM) R: GAAACGGGAAACGACTACCA	59
RPW06	(TA) <sub>9</sub>	F: AACCTCCGGAATCGTACCTT (6-FAM) R: CTCATCCATCGTCCATTCG	59
RPW11	(ATT) <sub>8</sub>	F: TCGTCAGTTAGATCCCATGAT (6-FAM) R: GAAAGCTTTTAATTTATCATAACGCG	57
RPW13	(GTG) <sub>7</sub>	F: GTCTGTTTGGTGGAGCGATG (6-FAM) R: CCTGTCATTGCTTCTGCTGT	59
RPW15	(TTA) <sub>6</sub>	F: CGTCGGGAAAACATGAACTT (HEX) R: TGATTTATTTCCGACCGAGC	57
RPW16	(CGG) <sub>6</sub>	F: AAGGGCTTCGAAAGAGGAAC (HEX) R: CCTGCTCTAATTCCCACAGC	59
RPW17	(GTT) <sub>6</sub>	F: AAACGGCTCGATATACGTGG (HEX) R: ACAAATGGTCGGAGAACGAC	58
RPW20	(AGAT) <sub>5</sub>	F: GCCGTTGATGTTGATACACG (6-FAM) R: TGCAAGACTTTTGTTCGTCA	58
RPW21	(GAAG) <sub>5</sub>	F: TTATCTGCCTCTCGGCTCAT (HEX) R: CGCTTTGACGACCTCCTAAG	57
RPW22	(TTTG) <sub>5</sub>	F: AAGCGTTCCCGTTTACTTT (6-FAM) R: TGATGATGCAAGTGTGAAACG	57
RPW23	(CAGA) <sub>5</sub>	F: CATGGGGAGGCATTATTTCA (6-FAM) R: CAAAACACTACAATCGTCGCCA	57
RPW24	(CTAA) <sub>5</sub>	F: GCCTATGCTACACAAAATAACAGC (HEX) R: GGCAAACCTTATGAATGCAGGA	57
RPW25	(TGAA) <sub>5</sub>	F: TGATATTCGAAGACTGGTATAACAAA (6-FAM) R: GCGTCGTATCAACAAACCAA	58
RPW26	(ATTC) <sub>5</sub>	F: CAACTGATGTGGCCGATAGA (6-FAM) R: GACCCTAAGCAATCAATTTTCTG	57
RPW32	(AT) <sub>7</sub>	F: ACGACGACATTCATCGAACA (HEX) R: CATCAGTAGGAACAAAGATGCG	63
RPW36	(TA) <sub>7</sub>	F: CAGCTACAAACAGTGCCTTTATC (HEX) R: GCTGGAAAAGGCAAGGAAAT	58
RPW38	(TG) <sub>16</sub>	F: ACAACATTTTCACCAAATTCA (6-FAM) R: TCTTGTTCTTGATAAACCCAACT	55
RPW39	(GT) <sub>14</sub>	F: CACCTTTAATAGTTCTTCTGACAT (HEX) R: AAAAGACAAGGAAATCCACA	55

**F**, primer forward; **R**, primer reverse; **T<sub>A</sub>**, temperatura di annealing.

## **3.2. Stime di variabilità genetica in aree di origine e di invasione ed individuazione delle popolazioni sorgente per gli esperimenti di incrocio**

I loci mostratisi polimorfici nel campione analizzato sono in tutto 16. Di questi, 14 sono stati messi a punto *ex novo* in questo lavoro e sono riportati nell'Appendice n°8, con la sequenza nucleotidica e le dimensioni del relativo prodotto PCR, ed i codici di accesso tramite i quali sono stati depositati in *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

### **3.2.1. Indici di variabilità genetica e test statistici**

Nella tabella 3.9 sono riassunti alcuni parametri descrittivi classici della variabilità di marcatori microsatelliti, calcolati sull'intero campione di 106 individui a nostra disposizione: intervallo di dimensione degli alleli, numero di alleli ( $N_A$ ), *Allelic richness* ( $A_r$ ), e *Polimorphism Information Content* (PIC). È inoltre riportato il motivo ripetuto per un confronto tra i diversi tipi di ripetizioni. Complessivamente, i microsatelliti più variabili, ossia con più alleli e maggiori valori degli indici  $A_r$  e PIC, sono quelli a motivo di-nucleotidico. Il numero di alleli per locus varia da un minimo di 2 a un massimo di 15 (RPW06). Il locus con il più alto valore di *Allelic richness* è RPW38 ( $A_r = 5.23$  [ $\sigma^2=1.10$ ]), seguito da RPW39, RPW06 ed RPW02. Per quanto riguarda l'indice PIC, calcolato complessivamente su tutto il campione, i loci a più elevato potere informativo (PIC > 0.500) sono RPW06 (risultato informativo in tutte le aree studiate), RPW02, RPW03, RPW36, RPW38 ed RPW39, evidenziati nella tabella 3.9.

**Tab. 3.9.** Variabilità complessiva dei 16 loci microsatelliti sull'intero *data set**Summary of variability indexes for the 16 microsatellite loci on the overall data set*

<b>Locus</b>	<b>Motivo ripetuto</b>	<b>Dimesioni (bp)</b>	<b>N<sub>A</sub></b>	<b>A<sub>r</sub> [varianza]</b>	<b>PIC</b>
RPW02	(TA) <sub>11</sub>	292-324	10	3.64 [1.00]	0.624
RPW03	(TA) <sub>11</sub>	186-232	11	1.73 [0.20]	0.696
RPW06	(TA) <sub>9</sub>	78-108	15	4.50 [0.76]	0.861
RPW11	(ATT) <sub>8</sub>	155-167	5	2.34 [0.38]	0.401
RPW13	(GTG) <sub>7</sub>	169-175	3	1.15 [0.14]	0.037
RPW16	(CGG) <sub>6</sub>	226-229	2	1.68 [0.22]	0.203
RPW17	(GTT) <sub>6</sub>	219-222	2	1.66 [0.23]	0.192
RPW20	(AGAT) <sub>5</sub>	82-86	2	1.94 [0.05]	0.330
RPW22	(TTTG) <sub>5</sub>	159-163	2	1.83 [0.14]	0.263
RPW24	(CTAA) <sub>5</sub>	87-95	3	1.66 [0.30]	0.186
RPW25	(TGAA) <sub>5</sub>	95-103	3	2.03 [0.04]	0.381
RPW26	(ATTC) <sub>5</sub>	132-140	3	1.79 [0.27]	0.230
RPW32	(AT) <sub>7</sub>	218-238	3	2.55 [0.30]	0.460
RPW36	(TA) <sub>7</sub>	139-147	4	2.84 [0.25]	0.551
RPW38	(TG) <sub>16</sub>	149-173	11	5.23 [1.10]	0.756
RPW39	(GT) <sub>14</sub>	179-207	13	4.85 [1.09]	0.801

N<sub>A</sub>, numero di alleli; A<sub>r</sub>, *Allelic richness*; PIC, *Polimorphism Information Content*.

Il test per il *Linkage Disequilibrium* (LD), condotto con il programma ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2010) su ogni coppia di loci all'interno di ciascuna area geografica, ha prodotto evidenze di associazione non casuale tra alleli di alcune coppie di marcatori (*p-value* < 0.01) nei campioni arabi, vietnamiti e malesi (riportate nella tabella 3.10). Solamente la coppia di loci RPW02 ed RPW36 appare in *Linkage Disequilibrium* sia nella Penisola araba che in Vietnam, mentre tutte le altre coppie mostrano evidenze di LD in un'unica regione di campionamento. Tutte le restanti coppie di loci analizzate (non riportate in tabella) presentano in ciascuna area geografica *p-value* maggiori di 0.01, per cui è possibile considerarle con buona confidenza statistica non associate (ossia su cromosomi diversi o a sufficiente distanza da segregare indipendentemente).

**Tab. 3.10.** Risultati *LD test*: coppie di loci con *p-value* < 0.01 nelle aree geografiche analizzate  
*LD test results: pairs of loci showing p-value < 0.01 in the analyzed geographical regions*

Area geografica	Locus #1	Locus #2
Penisola araba	RPW02	RPW03
Penisola araba	RPW03	RPW06
Penisola araba	RPW02	RPW36
Penisola araba	RPW11	RPW32
Penisola araba	RPW20	RPW25
Penisola araba	RPW20	RPW26
Vietnam	RPW02	RPW24
Vietnam	RPW02	RPW36
Vietnam	RPW02	RPW38
Vietnam	RPW06	RPW26
Vietnam	RPW06	RPW38
Vietnam	RPW17	RPW36
Vietnam	RPW24	RPW36
Malesia	RPW06	RPW24
Malesia	RPW36	RPW38

La tabella 3.11 mostra i risultati dell'*Exact test* di Hardy-Weinberg (HW), su ciascun locus in ognuna delle aree geografiche campionate, ed i risultati del *Global test* che indica se vi è equilibrio di Hardy-Weinberg nelle singole regioni geografiche considerando complessivamente le frequenze alleliche di tutti i loci (entrambi eseguiti con GENEPOP v.3.4; Raymond & Rousset, 1995). La sigla “eq” indica le situazioni di equilibrio (*p-value* > 0.05), mentre gli asterischi rappresentano i livelli di significatività statistica del test secondo la legenda in fondo alla tabella. Per i loci risultati monomorfici in una data area geografica è riportato un trattino ad indicare che non è possibile eseguire il test. I risultati del *Global test* mostrano come le uniche regioni geografiche che si possono considerare in equilibrio HW siano la Grecia, la Spagna e la Cina, mentre l'Italia si discosta solo leggermente dall'equilibrio. I risultati relativi alla Cina sono ovviamente poco significativi a causa del ridottissimo numero di campioni che è stato possibile analizzare (solo 4), e per il fatto che la maggior parte dei loci è monomorfica in questi individui. Penisola arabica, Vietnam e Malesia risultano invece non in equilibrio HW (*p-value*<0.001).

**Tab. 3.11.** Risultati e significatività statistica dell'*Exact test* e del *Global test* di Hardy-Weinberg  
*Results and statistical significance of Hardy-Weinberg Exact test and Global test*

Locus	Italia	Grecia	Spagna	Penisola arabica	Cina	Vietnam	Malesia
<b>RPW02</b>	eq	-	-	eq	-	**	*
<b>RPW03</b>	eq	eq	*	***	-	***	**
<b>RPW06</b>	eq	eq	eq	*	eq	***	*
<b>RPW11</b>	eq	eq	-	-	-	eq	eq
<b>RPW13</b>	-	-	-	-	-	eq	-
<b>RPW16</b>	eq	eq	-	eq	-	-	-
<b>RPW17</b>	-	-	-	-	eq	eq	eq
<b>RPW20</b>	***	*	eq	eq	-	*	-
<b>RPW22</b>	eq	-	-	eq	-	eq	eq
<b>RPW24</b>	-	-	-	eq	-	*	-
<b>RPW25</b>	eq	eq	eq	eq	-	eq	eq
<b>RPW26</b>	eq	eq	eq	eq	-	eq	-
<b>RPW32</b>	eq	eq	eq	eq	eq	eq	*
<b>RPW36</b>	eq	eq	eq	eq	-	*	eq
<b>RPW38</b>	**	eq	eq	eq	-	**	**
<b>RPW39</b>	**	eq	eq	eq	-	**	**
<b>Global test</b>	*	eq	eq	***	eq	***	***

eq, in equilibrio di HW; \*,  $p\text{-value}<0.05$ ; \*\*,  $p\text{-value}<0.01$ ; \*\*\*,  $p\text{-value}<0.001$ ; -. locus monomorfo nella regione considerata.

Nella tabella 3.12 sono mostrati i valori di eterozigosità attesa ( $H_e$ ) media in ciascuna area, ossia la media aritmetica dell'eterozigosità attesa calcolata su tutti i loci tramite ARLEQUIN v.3.11. Questo indice si può intendere come la probabilità che un genotipo estratto a caso da una popolazione in equilibrio sia eterozigote, e ha il duplice significato di proporzione di individui eterozigoti per ciascun locus nella popolazione, e di proporzione di loci eterozigoti per individuo. Esso si può quindi riferire sia alla variabilità genetica esistente nella popolazione che alla variabilità genetica presente in ciascun individuo. Questo parametro indica il Vietnam come la regione a più elevata variabilità genetica ( $H_e$  media = 0.48), mentre le aree di invasione mostrano i livelli di variabilità più bassi, eccetto la Penisola arabica, la cui eterozigosità media attesa è pari a quella della regione malese ( $H_e$  media = 0.40).

**Tab. 3.12.** Eterozigosità attesa media nelle regioni geografiche analizzate  
*Mean expected heterozygosity among the analyzed geographical regions*

	Italia	Grecia	Spagna	Pen. araba	Cina	Vietnam	Malesia
<b>H<sub>e</sub> media [s.d.]</b>	0.37 [0.23]	0.31 [0.24]	0.33 [0.26]	0.40 [0.28]	0.19 [0.31]	0.48 [0.29]	0.40 [0.29]

H<sub>e</sub>, eterozigosità attesa; **s.d.**, deviazione standard.

Nella tabella 3.13 è riportato, per ogni regione geografica campionata e per ciascun locus, il confronto tra i valori dell'eterozigosità attesa, sulla base dell'equilibrio HW, e dell'eterozigosità osservata nei campioni, sempre stimate tramite ARLEQUIN v.3.11. Sono evidenziati i valori più alti di eterozigosità ( $H > 0.50$ ).

**Tab. 3.13.** Confronto tra eterozigosità attesa (H<sub>e</sub>) e osservata (H<sub>o</sub>) per locus suddiviso per aree geografiche  
*Comparison between per locus expected (H<sub>e</sub>) and observed (H<sub>o</sub>) heterozygosity divided by geographical region*

Locus	Motivo ripetuto	Italia	Grecia	Spagna	Penisola arabica	Cina	Vietnam	Malesia
		H <sub>e</sub> /H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> /H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> /H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> /H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> /H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> /H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> /H <sub>o</sub>
RPW02	(TA) <sub>11</sub>	0.43/0.32	0.06/0.06	0.17/0.17	0.73/0.61	0.25/0.25	0.83/0.47	0.74/0.47
RPW03	(TA) <sub>11</sub>	0.45/0.41	0.17/0.18	0.67/0.33	0.62/0.20	1.00/1.00	0.82/0.47	0.44/0.13
RPW06	(TA) <sub>9</sub>	0.77/0.62	0.78/0.76	0.74/0.67	0.79/0.68	0.73/0.33	0.87/0.44	0.76/0.56
RPW11	(ATT) <sub>8</sub>	0.24/0.18	0.40/0.29	0.17/0.17	0.04/0.04	-	0.53/0.59	0.49/0.59
RPW13	(GTG) <sub>7</sub>	-	0.06/0.06	-	-	-	0.17/0.18	-
RPW16	(CGG) <sub>6</sub>	0.46/0.59	0.43/0.47	0.17/0.17	0.09/0.09	-	-	-
RPW17	(GTT) <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.43/0.50	0.40/0.41	0.45/0.41
RPW20	(AGAT) <sub>5</sub>	0.50/0.86	0.49/0.76	0.53/0.83	0.50/0.70	-	0.30/0.12	-
RPW22	(TTTG) <sub>5</sub>	0.24/0.27	0.06/0.06	-	0.46/0.26	-	0.17/0.06	0.51/0.41
RPW24	(CTAA) <sub>5</sub>	-	-	-	0.26/0.13	-	0.39/0.24	0.06/0.06
RPW25	(TGAA) <sub>5</sub>	0.41/0.27	0.21/0.24	0.30/0.33	0.53/0.52	-	0.26/0.18	0.40/0.41
RPW26	(ATTC) <sub>5</sub>	0.38/0.32	0.30/0.24	0.53/0.50	0.26/0.13	-	0.22/0.24	-
RPW32	(AT) <sub>7</sub>	0.43/0.32	0.49/0.29	0.53/0.83	0.23/0.26	0.43/0.50	0.30/0.35	0.67/0.71
RPW36	(TA) <sub>7</sub>	0.38/0.41	0.49/0.29	0.41/0.50	0.52/0.39	0.25/0.25	0.70/0.41	0.57/0.47
RPW38	(TG) <sub>16</sub>	0.70/0.50	0.46/0.47	0.45/0.50	0.75/0.74	-	0.86/0.53	0.60/0.41
RPW39	(GT) <sub>14</sub>	0.51/0.36	0.61/0.53	0.56/0.50	0.69/0.74	-	0.80/0.53	0.71/0.53



Nella tabella 3.14 sono riassunti il numero di alleli osservati per ciascun locus ed il loro numero medio in ogni area geografica. Dato che questo indice di diversità genetica dipende strettamente dalla dimensione del campione tipizzato, e quindi il confronto fra popolazioni diverse ha senso se i campioni sono almeno approssimativamente uguali, i valori riportati per Spagna e Cina, dove è stato possibile analizzare solo un numero esiguo di individui (rispettivamente 6 e 4), sono estremamente poco significativi. Dal calcolo del numero medio di alleli per locus emerge come l'area vietnamita ( $N_{A \text{ medio/locus}} = 4.56$ ), seguita da quella araba ( $N_{A \text{ medio/locus}} = 3.31$ ) e da quella malese ( $N_{A \text{ medio/locus}} = 2.94$ ), siano le maggiormente variabili sotto questo aspetto. Le regioni dell'area mediterranea risultano invece quelle con il più basso numero di alleli per locus.

**Tab. 3.14.** Numero di alleli ( $N_A$ ) per locus suddiviso per aree geografiche  
*Per locus allele number ( $N_A$ ) divided by geographical region*

Locus	Motivo ripetuto	Italia	Grecia	Spagna	Penisola arabica	Cina	Vietnam	Malesia
RPW02	(TA) <sub>11</sub>	3	2	2	6	2	7	6
RPW03	(TA) <sub>11</sub>	4	2	3	6	2	9	4
RPW06	(TA) <sub>9</sub>	7	7	4	8	3	10	6
RPW11	(ATT) <sub>8</sub>	2	2	2	2	1	5	3
RPW13	(GTG) <sub>7</sub>	1	2	1	1	1	3	1
RPW16	(CGG) <sub>6</sub>	2	2	2	2	1	1	1
RPW17	(GTT) <sub>6</sub>	1	1	1	1	2	2	2
RPW20	(AGAT) <sub>5</sub>	2	2	2	2	1	2	1
RPW22	(TTTG) <sub>5</sub>	2	2	1	2	1	2	2
RPW24	(CTAA) <sub>5</sub>	1	1	1	2	1	3	2
RPW25	(TGAA) <sub>5</sub>	2	2	2	3	1	2	2
RPW26	(ATTC) <sub>5</sub>	2	2	3	2	1	3	1
RPW32	(AT) <sub>7</sub>	2	2	2	2	2	2	3
RPW36	(TA) <sub>7</sub>	2	2	2	3	2	4	3
RPW38	(TG) <sub>16</sub>	4	4	4	7	-	9	4
RPW39	(GT) <sub>14</sub>	5	4	4	4	1	9	6
<b>N° medio alleli/locus</b>		2.63	2.44	2.25	3.31	1.38	4.56	2.94

Nella tabella 3.15 sono mostrate le stime del *Polymorphism Information Content* (PIC), calcolate mediante il *software* CERVUS v.3.0.6, per ciascun locus e in ogni area geografica, ed i valori mediati su tutti i loci, sempre per area di provenienza del campione. Come già accennato nel capitolo 2, i valori di questo parametro variano da 0 a 1, e più il PIC si avvicina all'intero, maggiore viene considerato il potere informativo del locus, tanto che si giudicano “informativi” quei marcatori che presentano valori del PIC superiori a 0.50. Sono stati pertanto evidenziati i valori al di sopra di questa soglia. Dai risultati emerge come l'area geografica con un PIC medio maggiore (e con il più alto numero di loci informativi) è il Vietnam (PIC = 0.43), seguito da Penisola arabica (PIC = 0.35) e Malesia (PIC = 0.34), mentre la regione dell'areale secondario con PIC medio più elevato è l'Italia (PIC = 0.31). Va considerato che i valori medi del PIC non raggiungono mai la soglia di 0.50 in parte a causa del fatto che sono mediati anche sui loci risultati monomorfici in alcune regioni (PIC = 0.00).

**Tab. 3.15.** *Polymorphism Information Content* (PIC) per locus e medio suddiviso per aree geografiche  
*Per locus and mean Polymorphism Information Content (PIC) divided by geographical region*

Locus	Motivo ripetuto	Italia	Grecia	Spagna	Arabia	Cina	Vietnam	Malesia
RPW02	(TA) <sub>11</sub>	0.36	0.06	0.14	0.67	0.20	0.77	0.68
RPW03	(TA) <sub>11</sub>	0.41	0.15	0.54	0.54	0.38	0.77	0.39
RPW06	(TA) <sub>9</sub>	0.71	0.72	0.62	0.74	0.54	0.83	0.71
RPW11	(ATT) <sub>8</sub>	0.21	0.31	0.14	0.04	-	0.48	0.42
RPW13	(GTG) <sub>7</sub>	-	0.06	-	-	-	0.16	-
RPW16	(CGG) <sub>6</sub>	0.35	0.33	0.14	0.08	-	-	-
RPW17	(GTT) <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.31	0.31	0.34
RPW20	(AGAT) <sub>5</sub>	0.37	0.36	0.37	0.37	-	0.25	-
RPW22	(TTTG) <sub>5</sub>	0.21	0.06	-	0.35	-	0.15	0.37
RPW24	(CTAA) <sub>5</sub>	-	-	-	0.23	-	0.34	0.06
RPW25	(TGAA) <sub>5</sub>	0.32	0.19	0.24	0.41	-	0.22	0.31
RPW26	(ATTC) <sub>5</sub>	0.31	0.25	0.42	0.23	-	0.20	-
RPW32	(AT) <sub>7</sub>	0.33	0.36	0.37	0.20	0.31	0.25	0.04
RPW36	(TA) <sub>7</sub>	0.31	0.36	0.31	0.45	0.20	0.62	0.48
RPW38	(TG) <sub>16</sub>	0.62	0.39	0.39	0.69	-	0.81	0.53
RPW39	(GT) <sub>14</sub>	0.47	0.54	0.48	0.62	-	0.76	0.64
<b>PIC medio</b>		0.31	0.26	0.26	0.35	0.12	0.43	0.34

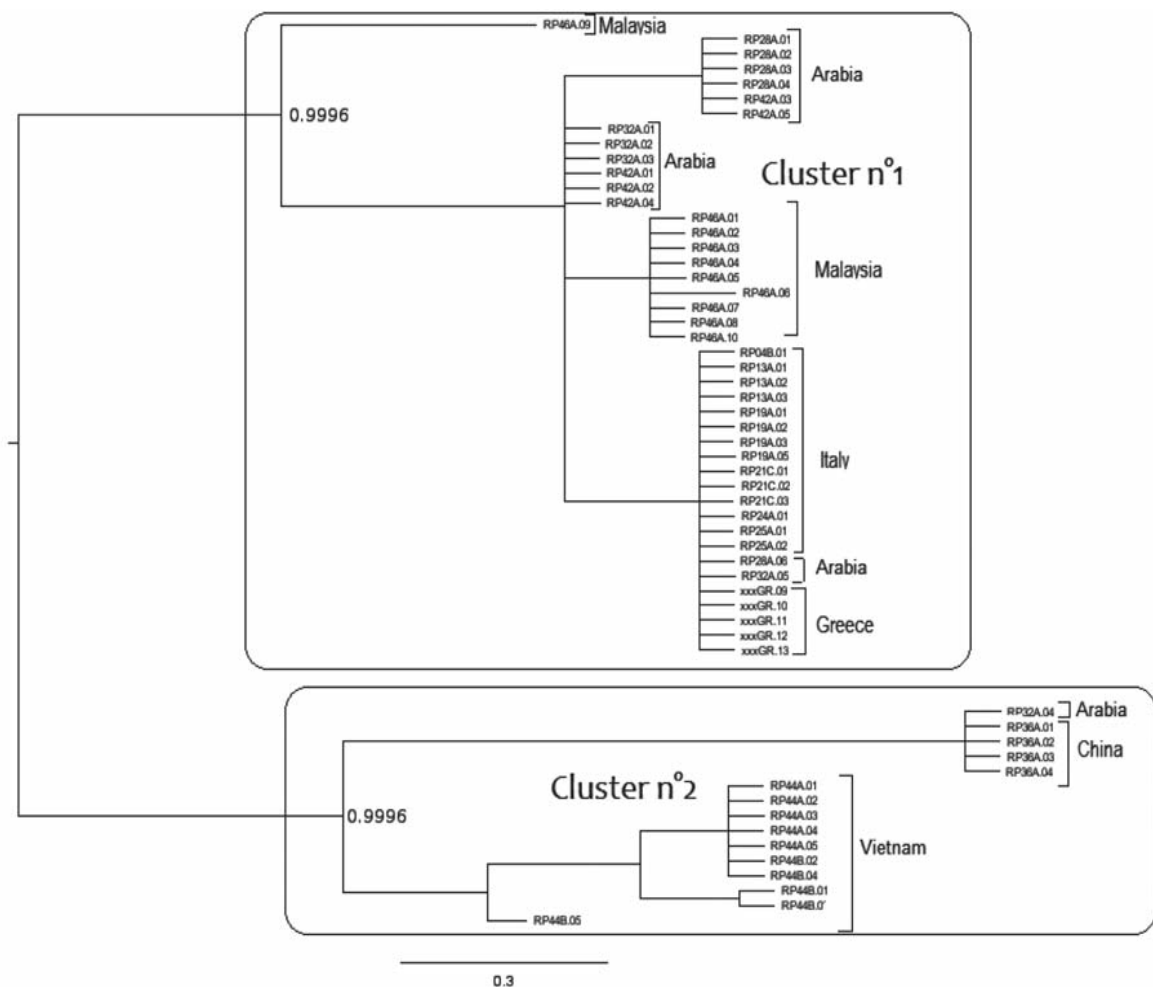
I valori dell'indice *Allelic richness* ( $A_r$ ) con le rispettive varianze (tra parentesi quadre) sono mostrati nella tabella 3.16, calcolati per locus e per area geografica mediante il *software* MICROSATELLITE ANALYZER (MSA). Il calcolo della ricchezza allelica media per regione geografica (sempre mostrato in tab. 3.16) indica ancora una volta il Vietnam come la regione con la più alta variabilità genetica ( $A_r=2.74$ ), seguita da Arabia ( $A_r=2.22$ ) e Malesia ( $A_r=2.20$ ). Tra i paesi del bacino del Mediterraneo, tutti con ricchezze alleliche inferiori rispetto a quelli dell'areale primario, l'Italia presenta il valore più alto ( $A_r=1.99$ ).

**Tab. 3.16.** *Allelic richness* ( $A_r$ ) calcolata per locus e per regione geografica (varianza tra parentesi quadre)  
Per locus *Allelic richness* ( $A_r$ ) divided by geographical region (variance values in square brackets)

Locus	Motivo	Italia	Grecia	Spagna	Arabia	Cina	Vietnam	Malesia
<b>RPW02</b>	(TA) <sub>11</sub>	2.23 [0.30]	1.24 [0.18]	1.67 [0.22]	3.71 [0.59]	2.00 [0.00]	4.60 [0.75]	3.89 [0.70]
<b>RPW03</b>	(TA) <sub>11</sub>	1.45 [0.25]	1.17 [0.14]	1.67 [0.22]	1.62 [0.24]	2.00 [0.00]	1.82 [0.15]	1.44 [0.25]
<b>RPW06</b>	(TA) <sub>9</sub>	3.57 [0.72]	3.64 [0.70]	3.23 [0.38]	3.81 [0.81]	3.00 [0.00]	4.42 [0.76]	3.64 [0.73]
<b>RPW11</b>	(ATT) <sub>8</sub>	1.72 [0.20]	1.94 [0.06]	1.67 [0.22]	1.17 [0.14]	1.00 [0.00]	3.03 [0.74]	2.48 [0.30]
<b>RPW13</b>	(GTG) <sub>7</sub>	1.00 [0.00]	1.24 [0.18]	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	1.66 [0.41]	1.00 [0.00]
<b>RPW16</b>	(CGG) <sub>6</sub>	1.98 [0.02]	1.96 [0.04]	1.67 [0.22]	1.32 [0.22]	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]
<b>RPW17</b>	(GTT) <sub>6</sub>	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	2.00 [0.00]	1.94 [0.06]	1.97 [0.03]
<b>RPW20</b>	(AGAT) <sub>5</sub>	1.99 [0.01]	1.99 [0.01]	2.00 [0.00]	1.99 [0.01]	1.00 [0.00]	1.83 [0.14]	1.00 [0.00]
<b>RPW22</b>	(TTTG) <sub>5</sub>	1.72 [0.20]	1.24 [0.18]	1.00 [0.00]	1.98 [0.02]	1.00 [0.00]	1.57 [0.25]	2.00 [0.00]
<b>RPW24</b>	(CTAA) <sub>5</sub>	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	1.00 [0.00]	1.76 [0.18]	1.00 [0.00]	2.25 [0.36]	1.24 [0.18]
<b>RPW25</b>	(TGAA) <sub>5</sub>	1.94 [0.06]	1.68 [0.22]	1.91 [0.08]	2.17 [0.15]	1.00 [0.00]	1.76 [0.18]	1.94 [0.06]
<b>RPW26</b>	(ATTC) <sub>5</sub>	1.92 [0.07]	1.83 [0.14]	2.65 [0.23]	1.76 [0.18]	1.00 [0.00]	1.80 [0.41]	1.00 [0.00]
<b>RPW32</b>	(AT) <sub>7</sub>	1.96 [0.04]	1.99 [0.01]	2.00 [0.00]	1.71 [0.21]	2.00 [0.00]	1.83 [0.14]	2.90 [0.09]
<b>RPW36</b>	(TA) <sub>7</sub>	1.92 [0.07]	1.99 [0.01]	1.98 [0.02]	2.59 [0.29]	2.00 [0.00]	3.26 [0.34]	2.64 [0.25]
<b>RPW38</b>	(TG) <sub>16</sub>	3.45 [0.27]	2.69 [0.45]	4.00 [0.00]	4.58 [0.84]	n.d.	6.23 [1.02]	3.41 [0.37]
<b>RPW39</b>	(GT) <sub>14</sub>	2.93 [0.70]	3.08 [0.45]	3.24 [0.44]	3.28 [0.40]	1.00 [0.00]	4.81 [1.06]	3.62 [0.76]
<b><math>A_r</math> medio</b>		1.99	1.85	1.98	2.22	1.47	2.74	2.20

### 3.2.2. Analisi filogenetica sul gene mitocondriale Citocromo c ossidasi subunità I (COI)

L'albero prodotto dall'analisi bayesiana sotto il modello sulle sequenze del marcatore mitocondriale *cox1* (Figura 3.1) mostra una chiara suddivisione del campione in due gruppi principali, supportata da probabilità a posteriori dei nodi molto prossime a 1. Il *cluster* n°1 comprende gli individui provenienti dall'area mediterranea (Italia, Grecia, Penisola araba) e dall'area malese, mentre il *cluster* n°2 include l'area cinese, quella vietnamita ed un individuo appartenente alla regione araba. L'unità di misura della lunghezza dei rami dell'albero è espressa in termini di numero di cambiamenti attesi per sito nucleotidico. Le distanze genetiche *k2p* tra i due *cluster* ammontano al 2.6% mentre, all'interno dei singoli *cluster*, è stata stimata una distanza pari a 0.3% per il *cluster* n°1, e pari a 1.3% all'interno del *cluster* n°2.



**Fig. 3 1.** Albero di consenso (50% majority rule) prodotto dall'analisi bayesiana. Le cifre ai nodi dei cluster principali indicano i valori di supporto della probabilità a posteriori. *Bayesian phylogenetic consensus tree (50% majority rule). Node figures refer to posterior probability support.*

Nel complesso, le regioni del bacino del Mediterraneo mostrano livelli di diversità genetica sensibilmente più bassi rispetto alle aree di origine, compatibilmente con l'ipotesi che la colonizzazione di queste regioni da parte del Punteruolo rosso sia stata accompagnata da perdita di variabilità legata ad effetto del fondatore. Nella Penisola araba sono invece presenti livelli di variabilità genetica comparabili a quelli dell'areale primario, se non addirittura superiori a quelli osservati in Malesia. Questo dato sembra supportare l'ipotesi che quest'area, anche considerando la sua posizione geografica, abbia avuto e forse abbia ancora un ruolo di “testa di ponte” nelle rotte di invasione del Punteruolo rosso verso il bacino del Mar Mediterraneo, e abbia subito eventi di colonizzazione multipla da diverse regioni dell'areale primario. Tutti gli indici di diversità genetica presi in considerazione suggeriscono che le popolazioni provenienti dal Vietnam siano quelle maggiormente variabili all'interno del nostro campionamento, inoltre, l'analisi di tipo filogenetico sul marcatore mitocondriale Citocromo ossidasi I indica come le popolazioni maggiormente differenziate tra loro siano quelle dell'area mediterranea e del Vietnam. Alla luce di questi dati, si è scelto pertanto di impiegare per gli esperimenti di incrocio individui provenienti dall'Italia (tra l'altro facilmente reperibili per ovvi motivi logistici) e individui vietnamiti, entrambi provenienti da due distinte linee di allevamento create nei laboratori del centro ENEA La Casaccia. Nel caso dei campioni vietnamiti l'allevamento è stato avviato a partire da esemplari ottenuti vivi grazie ad una collaborazione esterna, come descritto nel paragrafo 2.2.1 del capitolo 2.

### **3.3. Analisi di paternità su esperimenti di incrocio programmati**

#### **3.3.1. Esperimento preliminare di calibrazione del metodo di analisi: esperimento zero**

##### **Incroci ed allevamento degli individui**

Gli accoppiamenti di questo primo esperimento (due femmine italiane ciascuna con un diverso maschio vietnamita) sono avvenuti in modo spontaneo e praticamente immediato dall'introduzione degli individui nella gabbia, a conferma del fatto che la diversa origine geografica dei *partner* sessuali non sembra influenzare in modo evidente i comportamenti pre-copulatori, o perlomeno attivare, in un simile contesto, forme di discriminazione del maschio da parte della femmina basate su eventuali differenze fenotipiche legate alla provenienza geografica. La progenie dei due incroci è stata allevata con successo in modo da ottenere un campione consistente di larve di 1-1.5 cm di lunghezza, al fine di una facile estrazione del DNA. Da ciascun accoppiamento sono state dunque ottenute rispettivamente 74 e 64 larve delle dimensioni desiderate.

##### **Caratterizzazione genetica della generazione parentale e filiale**

I genotipi dei 4 individui adulti *cox*/*nvolti* negli accoppiamenti sono riportati nella tabella 3.17 e sono raggruppati in base al potere discriminatorio dei rispettivi loci nell'ambito dello schema di incrocio di questo esperimento. Pertanto, sono indicati come non diagnostici quei loci che presentano lo stesso genotipo nei due maschi e nelle due femmine, e come parzialmente diagnostici i marcatori nei quali i due maschi e/o le due femmine portano un allele in comune e si differenziano per il secondo allele. In questo caso il locus permette una corretta attribuzione alla madre o al padre solo negli individui della progenie cui sono stati trasmessi gli alleli non in comune tra le due femmine o i due maschi. Il locus RPW16 è risultato invece totalmente diagnostico per l'attribuzione materna, in quanto le due femmine portavano genotipi completamente diversi, e analogamente i loci RPW02, RPW03 e RPW06 sono risultati totalmente diagnostici per l'attribuzione paterna. Si è scelto pertanto di analizzare questi 4 loci con maggior potere risolutivo (RPW02, RPW03, RPW06 e RPW16), più i due marcatori parzialmente diagnostici RPW26 e RPW36. È stato quindi genotipizzato un totale di 24 larve della progenie dei due incroci dopo aver chiesto ai nostri collaboratori di campionarne in modo casuale 12 da ciascun accoppiamento.

**Tab. 3.17.** Criteri di selezione dei loci diagnostici nell'assegnazione di paternità per l'esperimento zero  
*Selection criteria for diagnostic loci in paternity assignment of experiment number zero*

---

**SSR non diagnostici per i quali i due maschi e le due femmine hanno lo stesso genotipo:**

---

ID	RPW22	RPW32	RPW38
<b>F1</b>	163 163	218 218	157 163
<b>F2</b>	163 163	218 218	157 163
<b>M1</b>	163 163	218 218	163 165
<b>M2</b>	163 163	218 218	163 165

---

**SSR parzialmente diagnostici per i quali i due maschi e/o le due femmine hanno un allele diverso:**

---

ID	RPW11	RPW17	RPW20	RPW24	RPW25	RPW26	RPW36	RPW39
<b>F1</b>	158 161	222 222	82 86	95 95	95 95	140 140	140 145	205 207
<b>F2</b>	161 161	222 222	86 86	95 95	95 95	136 140	140 145	205 207
<b>M1</b>	158 158	219 222	86 86	87 95	99 99	132 140	140 147	185 201
<b>M2</b>	158 158	222 222	86 86	95 95	95 99	136 140	140 153	181 185

---

**SSR diagnostici per la madre (no alleli in comune tra le femmine)**

---

ID	RPW16
<b>F1</b>	226 226
<b>F2</b>	229 229
<b>M1</b>	226 226
<b>M2</b>	226 226

---

**SSR diagnostici per il padre (no alleli in comune tra i maschi)**

---

ID	RPW02	RPW03	RPW06
<b>F1</b>	300 300	214 214	78 96
<b>F2</b>	300 300	214 214	96 96
<b>M1</b>	302 302	214 214	96 98
<b>M2</b>	306 306	228 228	88 102

---

**F1**, femmina n°1; **F2**, femmina n°2; **M1**, maschio n°1; **M2**, maschio n°2. I numeri si riferiscono alla lunghezza dei frammenti in bp.

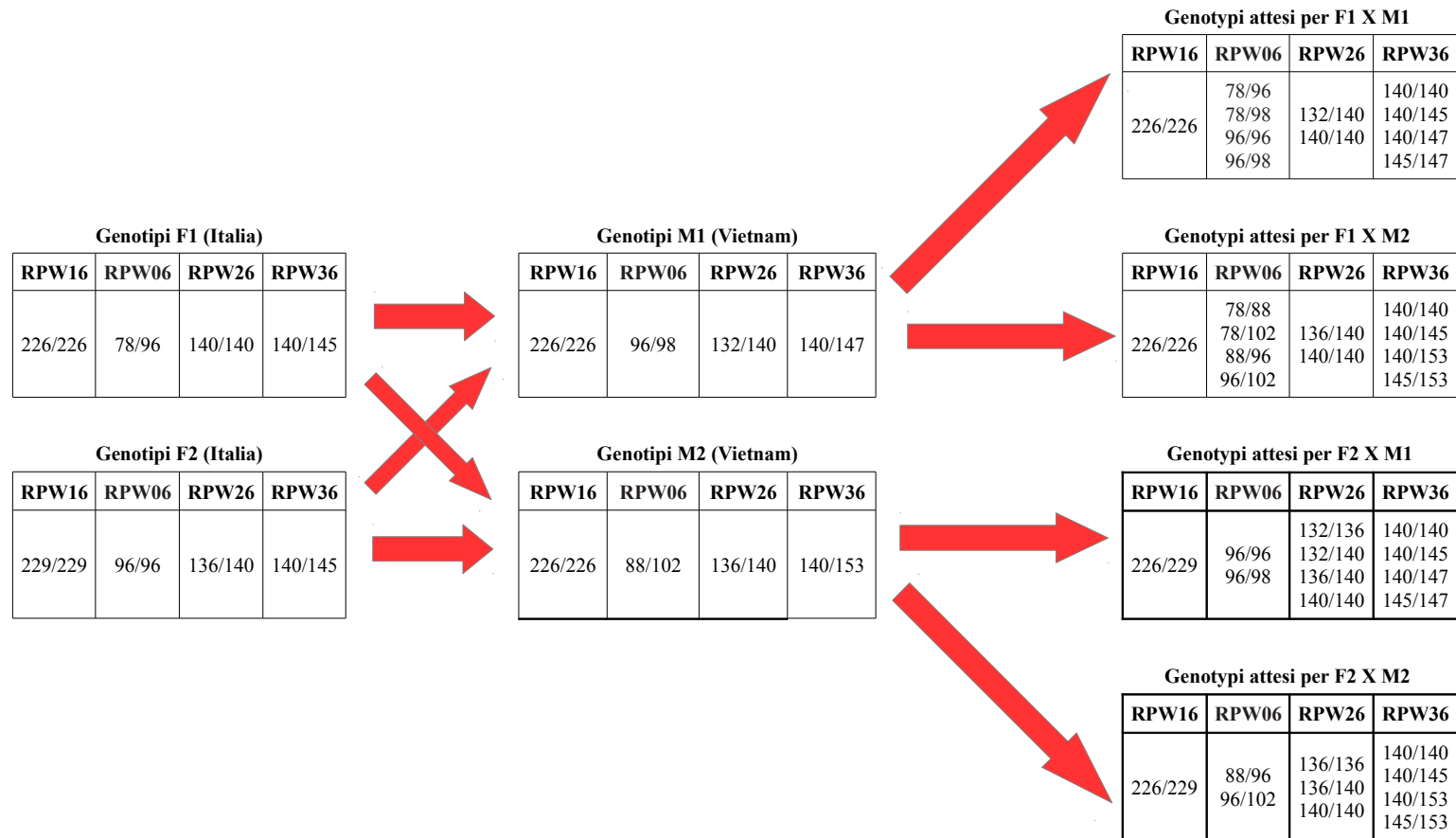
Dopo un'accurata analisi visiva dei dati grezzi di genotipizzazione, coadiuvata dal supporto dei software PEAK SCANNER (Applied Biosystems, 2006) e MICROSATELIGHT, si è deciso di eliminare dalle analisi di paternità successive i loci RPW02 e RPW03, a causa di nette discordanze tra i genotipi attesi e quelli osservati nella progenie. Per escludere possibili errori di interpretazione del segnale dei genotipi della generazione parentale, il DNA dei 4 individui adulti è stato

nuovamente amplificato e genotipizzato su questi due loci, confermando i risultati precedenti. Tali incongruenze sono invece pienamente spiegabili con la presenza di alleli nulli, che si manifestano a causa di una mancata o estremamente ridotta amplificazione quando l'allele in questione è presente in eterozigosi. Gli alleli che hanno mostrato questo fenomeno sono l'allele "306" per il locus RPW02 e l'allele "228" per il locus RPW03, entrambi presenti in omozigosi nel maschio n°2. È da notare inoltre che questi due alleli hanno probabilmente una bassa frequenza nelle popolazioni vietnamite, in quanto sono stati riscontrati solo nel maschio n°2 di questo esperimento e in nessuno degli altri 17 individui vietnamiti analizzati per le stime di polimorfismo e variabilità genetica, così come non sono presenti in nessuno dei 22 campioni di origine italiana.

Nella tabella 3.18 sono mostrati i genotipi parentali e quelli attesi nella prole potenziale delle quattro possibili combinazioni di incrocio (F1xM1; F1xM2; F2xM1; F2xM2), sui 4 loci scelti come maggiormente affidabili per questa analisi di paternità/maternità. I genotipi delle 24 larve analizzate su questi 4 microsatelliti sono riportati nell'Appendice n°9.



**Tab. 3.18.** Genotipi delle due femmine (F1 e F2), dei due maschi (M1 e M2) e genotipi attesi nella progenie dell'esperimento zero  
*Genotypes of the female (F1), of the males she mated (M1 e M2) and expected genotypes of the progeny of experiment n° zero*



## Analisi di parentela

I risultati ottenuti con CERVUS sull'analisi delle frequenze alleliche dei 4 loci impiegati sono mostrati nella tabella 3.19. Il valore medio del *Polymorphism Information Content* (PIC) risulta di 0.476, quindi vicino alla soglia di 0.5 al di sopra della quale i loci vengono considerati informativi. Il locus RPW06 è quello maggiormente informativo, specialmente in virtù del suo elevato numero di alleli ( $N_A=14$ ). Questo fa sì che la discordanza tra eterozigosità attesa ed osservata nel locus RPW06 sia probabilmente dovuta anche al basso numero di individui. Il motivo principale di tale scostamento, risiede però soprattutto nel fatto che il campione di riferimento, da cui sono calcolate le frequenze alleliche, non deriva da una popolazione naturale, ma è composto da individui con origini geografiche diverse (Italia e Vietnam), e questo vale ovviamente anche per gli altri loci e gli altri esperimenti. Nella tabella 3.19 sono elencate anche le varie probabilità di non esclusione per ciascun locus e quelle combinate per i 4 marcatori. Quella che interessa maggiormente per questo esperimento è la probabilità di non escludere erroneamente una coppia di genitori putativi che in realtà non sono imparentati con la prole (NE-PP). Tale probabilità è stata stimata del 3.8%, quindi piuttosto bassa e confortante.

**Tab. 3.19.** Parametri ricavati dalle frequenze alleliche dei 4 microsatelliti analizzati nell'esperimento zero  
*Parameters derived from allelic frequencies of the four microsatellites analyzed in experiment zero*

Locus	$N_A$	N	$H_o$	$H_e$	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
RPW16	2	43	0.302	0.321	0.267	0.950	0.867	0.785	0.517	0.721
RPW26	3	43	0.326	0.344	0.296	0.942	0.844	0.743	0.480	0.700
RPW06	14	41	0.561	0.849	0.823	0.472	0.307	0.130	0.042	0.341
RPW36	5	43	0.442	0.575	0.517	0.828	0.672	0.503	0.237	0.525
<b>PIC medio:</b>					0.476					
<b>NE-1P combinata:</b>					0.349					
<b>NE-2P combinata:</b>					0.151					
<b>NE-PP combinata:</b>					0.038					
<b>NE-I combinata:</b>					0.002					
<b>NE-SI combinata:</b>					0.090					

$N_A$ , numero di alleli; N, numero di genotipi analizzati;  $H_o$ , eterozigosità osservata;  $H_e$ , eterozigosità attesa; PIC, *Polymorphism Information Content*; NE-1P, probabilità di non-esclusione per un falso genitore; NE-2P, probabilità di non-esclusione per un falso genitore noto il genotipo dell'altro; NE-PP, probabilità di non-esclusione per una falsa coppia di genitori; NE-I, probabilità di non-esclusione per identità tra due individui non imparentati; NE-SI, probabilità di non-esclusione per identità tra due fratelli.

I tassi (attesi ed osservati) di assegnazione della progenie al solo padre, alla sola madre o a entrambi i genitori, sempre derivanti dall'analisi con CERVUS, sono mostrati in Appendice n°10. Ricordando che era noto il sesso dei potenziali parentali, e assumendo il 95% di soglia di confidenza statistica, è stato assegnato ad una coppia di genitori il 100% delle larve analizzate in questo esperimento, superando l'atteso sulla base delle simulazioni, che indicava l'82%. Nello scenario in cui si avesse voluto attribuire alle larve solo il padre, senza conoscere i possibili genotipi materni, il tasso di assegnazione sarebbe stato del 85% mentre, dovendo attribuire la madre con genotipi paterni ignoti, sarebbe stato assegnato il 75% della progenie. In ogni modo, i tassi di assegnazione calcolati superano, o in un caso eguagliano, quelli attesi sulla base delle simulazioni, che si rifanno alle frequenze alleliche calcolate sull'intera popolazione da cui vengono gli individui analizzati (nel caso degli esperimenti di questo lavoro il campione della popolazione “sorgente” è costituito dai 23 individui italiani e dai 17 vietnamiti descritti in precedenza).

La tabella 3.20 mostra i risultati, ottenuti mediante CERVUS, delle attribuzioni di maternità e paternità per ogni larva, riguardanti il trio madre-padre-figlio nel suo complesso. Nell'Appendice n°11 è riportato invece lo stesso tipo di risultato suddiviso per le coppie madre-figlio (11a) e padre-figlio (11b). Dalle prime tre colonne della tabella 3.20 si evince che le prime 12 larve (con prefisso IV1 nella sigla identificativa) sono state attribuite all'accoppiamento del maschio n°1 con la femmina n°1, mentre le altre 12 (con prefisso IV2 nella sigla identificativa) risultano dall'incrocio del maschio n°2 con la femmina n°2. I loci comparati per ciascun trio sono sempre tutti e 4 quelli analizzati, tranne che per due larve sulle quali è fallita l'amplificazione di uno dei due alleli del locus RPW06 (indicato con “0” nella tabella dei genotipi). Non sono emerse discordanze tra i genotipi osservati nella progenie e quelli attesi sulla base dei genotipi parentali (loci con *mismatch* = 0). I valori di LOD e Delta sono tutti positivi e variano tra 2.11 e 10.76. Il fatto che per ogni attribuzione i valori di LOD e Delta *coincidano* sta a significare che il valore LOD del secondo genitore più probabile (in questo caso necessariamente l'altro maschio o l'altra femmina presenti nell'esperimento) è pari a 0, quindi è nulla la probabilità che esso sia il vero genitore. Delta viene infatti calcolato come la differenza tra i due LOD più alti (Kalinovski *et al.*, 2007). Analogamente, sono positivi e uguali tra loro i valori LOD e Delta per ciascuna coppia madre-figlio e padre figlio (Appendice n°11a e b). Per tutte le assegnazioni di madre e padre, l'asterisco nell'ultima colonna della tabella indica un elevato livello di confidenza statistica.

**Tab. 3.20.** Attribuzioni di parentela dell'esperimento zero eseguite con il programma CERVUS: risultati relativi al trio madre-padre-figlio  
*CERVUS parentage assignments of experiment zero: results refer to the mother-father-son trio*

ID larva	ID madre	ID padre	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD complessivo	Delta complessivo	Livello di confidenza
IV1.L01	F1	M1	4	0	2.151	2.151	*
IV1.L04	F1	M1	4	0	2.401	2.401	*
IV1.L09	F1	M1	4	0	2.401	2.401	*
IV1.L11	F1	M1	4	0	2.151	2.151	*
IV1.L13	F1	M1	4	0	4.543	4.543	*
IV1.L14	F1	M1	4	0	2.114	2.114	*
IV1.L15	F1	M1	3	0	2.666	2.666	*
IV1.L16	F1	M1	4	0	4.256	4.256	*
IV1.L17	F1	M1	4	0	2.114	2.114	*
IV1.L18	F1	M1	4	0	4.256	4.256	*
IV1.L19	F1	M1	3	0	2.666	2.666	*
IV1.L20	F1	M1	4	0	2.401	2.401	*
IV2.L01	F2	M2	4	0	7.611	7.611	*
IV2.L03	F2	M2	4	0	3.686	3.686	*
IV2.L04	F2	M2	4	0	1.003	1.003	*
IV2.L05	F2	M2	4	0	8.335	8.335	*
IV2.L06	F2	M2	4	0	1.076	1.076	*
IV2.L11	F2	M2	4	0	9.027	9.027	*
IV2.L12	F2	M2	4	0	3.686	3.686	*
IV2.L13	F2	M2	4	0	5.409	5.409	*
IV2.L15	F2	M2	4	0	9.333	9.333	*
IV2.L16	F2	M2	4	0	5.102	5.102	*
IV2.L19	F2	M2	4	0	8.610	8.610	*
IV2.L20	F2	M2	4	0	7.532	7.532	*

**F1**, femmina n°1; **F2**, femmina n°2; **M1**, maschio n°1; **M2**, maschio n°2; \*, livello di confidenza statistica elevato.

Nella tabella 3.21 sono riportate, per ciascuna larva, le *non-exclusion probability* per un genitore (NE-1P) e per la coppia di parentali (NE-PP), ovvero la probabilità di non escludere come genitore un individuo che in realtà non è imparentato con la progenie, quando si sta attribuendo un genitore senza che l'altro sia noto (NE-1P), e quando si attribuiscono madre e padre insieme (NE-PP). I valori di probabilità sono compresi tra 0.06 e 0.79 per NE-1P e tra 0.00 e 0.10 per NE-PP. Quest'ultimo valore indica che, nel contesto di questo esperimento, la larva con la probabilità di non-esclusione più alta mostra circa il 10% di probabilità che la coppia di genitori assegnata sia falsa. L'interpretazione di questo parametro tuttavia si ridimensiona molto alla luce del fatto che la *cox* Incidenza tra i valori di LOD e Delta mostra che la coppia di genitori assegnata sia l'unica possibile, ossia l'unica con una probabilità diversa da zero.

**Tab. 3.21.** Probabilità di non esclusione nell'analisi di parentela dell'esperimento zero  
*Non-exclusion-probabilities of parentage analysis of experiment n° zero*

ID larva	ID madre	ID padre	NE-1P	NE-PP
IV1.L01	F1	M1	3.02984286686729E-0001	9.17994779790662E-0002
IV1.L04	F1	M1	4.00635615006235E-0001	7.59349219183191E-0002
IV1.L09	F1	M1	4.00635615006235E-0001	7.59349219183191E-0002
IV1.L11	F1	M1	3.02984286686729E-0001	9.17994779790662E-0002
IV1.L13	F1	M1	4.13155477975179E-0001	1.21495875069310E-0002
IV1.L14	F1	M1	4.75344069257757E-0001	9.66643405381620E-0002
IV1.L15	F1	M1	7.99440988174131E-0001	9.61534523443277E-0002
IV1.L16	F1	M1	4.90198571422062E-0001	1.54662944861059E-0002
IV1.L17	F1	M1	4.75344069257757E-0001	9.66643405381620E-0002
IV1.L18	F1	M1	4.90198571422062E-0001	1.54662944861059E-0002
IV1.L19	F1	M1	7.99440988174131E-0001	9.61534523443277E-0002
IV1.L20	F1	M1	4.00635615006235E-0001	7.59349219183191E-0002
IV2.L01	F2	M2	3.34091307714782E-0001	3.92202534514600E-0004
IV2.L03	F2	M2	3.45539594855938E-0001	1.42746800807451E-0002
IV2.L04	F2	M2	1.68319966201189E-0001	1.12081821644024E-0004
IV2.L05	F2	M2	3.65052870053609E-0001	4.75762367146555E-0004
IV2.L06	F2	M2	5.94140479842789E-0002	4.53358495237088E-0005
IV2.L11	F2	M2	3.49208561457532E-0001	2.39717246991868E-0004
IV2.L12	F2	M2	3.45539594855938E-0001	1.42746800807451E-0002
IV2.L13	F2	M2	4.15061698296247E-0001	7.25425753542583E-0003
IV2.L15	F2	M2	1.75956988261134E-0001	2.22446709398711E-0004
IV2.L16	F2	M2	3.61174870641274E-0001	8.72479576115155E-0003
IV2.L19	F2	M2	1.61033387577761E-0001	1.83377604546288E-0004
IV2.L20	F2	M2	1.34067773489178E-0001	7.44934240909030E-0004

**NE-1P**, probabilità di non esclusione per un genitore (con il secondo sconosciuto); **NE-PP**, probabilità di non esclusione per la coppia di genitori.

Nonostante il programma PATRI (Nielsen *et al.*, 2001) sia ideato per eseguire analisi di paternità su progenie che abbia madre nota, si è scelto di impiegarlo ugualmente sui dati di questo esperimento, indicando come madre di ciascuna larva quella assegnata tramite l'analisi fatta con CERVUS, per avere un'ulteriore conferma delle attribuzioni paterne e del loro livello di confidenza statistica, tramite un approccio bayesiano, alternativo a quello di *Maximum-likelihood* adottato da CERVUS. I risultati dell'analisi condotta con PATRI sono riportati nell'Appendice n°12 e confermano pienamente quelli di CERVUS per quanto riguarda le attribuzioni di paternità, con una probabilità a posteriori pari a 1 per ciascuna delle 24 coppie madre-figlio. Nell'*output* di PATRI vengono inoltre riportate le probabilità che un dato maschio appartenga a ciascuno dei gruppi che sono stati eventualmente indicati durante l'impostazione dell'analisi, e la probabilità di aver campionato dalla popolazione

sorgente il padre della progenie analizzata. Ovviamente, visto il disegno sperimentale su cui poggia l'analisi, i maschi sono riuniti in un unico gruppo e la probabilità di campionamento è pari a 1.

Dai risultati emerge quindi che il maschio n°1 si è accoppiato con la femmina n°1 e che a questa coppia sono attribuibili le 12 larve con il prefisso IV1 nella sigla identificativa, mentre il maschio n°2 e la femmina n°2 sono i genitori delle 12 larve che portano nella sigla identificativa il prefisso IV2. Simulando la situazione in cui non vi era alcuna informazione pregressa su quale maschio si fosse accoppiato con quale femmina, e mescolando la progenie dei due incroci in modo da non conoscere virtualmente l'appartenenza delle larve al primo o al secondo accoppiamento, è stato dunque possibile verificare l'efficacia del metodo messo a punto nell'attribuire correttamente ciascuna larva alla propria coppia parentale.

### **3.3.2 Esperimenti di accoppiamento multiplo**

#### **3.3.2.1. Esperimento n°1: femmina italiana x maschio italiano x maschio vietnamita**

##### **Incroci ed allevamento degli individui**

Durante l'esperimento n°1 la prima copula è avvenuta dopo 6 minuti dall'ingresso del maschio nella gabbia, mentre la seconda dopo solo un minuto dall'introduzione del secondo maschio e non vi è stata come previsto alcuna deposizione di uova tra un accoppiamento e l'altro. In entrambi i casi la copula ha avuto una durata di circa 2 minuti, dopo i quali i *partner* si sono separati spontaneamente. La femmina ha poi deposto uova fertili per un arco di 29 giorni suddiviso in 14 ovature distinte sulla base della data di deposizione. Su un totale di 175 uova prodotte, 127 si sono schiuse e 81 di queste sono state allevate con successo fino al raggiungimento delle dimensioni desiderate, e successivamente uccise e conservate in acetone. I principali parametri del successo riproduttivo della femmina durante tutto il periodo di deposizione delle uova sono mostrati nella tabella 3.22. Il numero di larve raccolte corrisponde al numero di individui trovati vivi ciascuno all'interno di uno spicchio di mela usato come substrato alimentare, e poi uccisi in acetone per le successive analisi genetiche. L'elevato tasso di mortalità delle larve (pari a circa il 36%) potrebbe essere attribuibile alla presenza di sostanze nocive legate alla coltivazione delle mele di cui si sono nutrite, come argomentato nel paragrafo 2.2.1. Tutte le 81 larve a disposizione sono state analizzate.

**Tab. 3.22.** Principali parametri del successo riproduttivo della femmina *cox*/nvolta nell'esperimento n°1  
*Reproductive success parameters of the female of experiment n°1*

Ovatura	Data di deposizione	n°di uova deposte	n°di uova schiuse	% di schiusa	n°di larve raccolte
I	27.IX.13	10	7	70	3
II	30.IX.13	6	5	83	4
III	03.X.13	19	7	37	6
IV	04.X.13	8	7	88	4
V	07.X.13	29	28	97	21
VI	08.X.13	16	16	100	6
VII	10.X.13	6	4	67	3
VIII	11.X.13	8	4	50	4
IX	14.X.13	7	7	100	2
X	16.X.13	6	6	100	2
XI	18.X.13	12	11	92	9
XII	21.X.13	13	11	85	9
XIII	23.X.13	8	7	88	2
XIV	25.X.13	10	7	70	6

### Caratterizzazione genetica della generazione parentale e filiale

I genotipi degli adulti *cox*/nvolti negli accoppiamenti sono riportati in tabella 3.23, suddivisi in base al potere diagnostico dei loci secondo i criteri descritti nel paragrafo 2.2.4 del capitolo 2. Dei 16 marcatori analizzati, 4 sono stati esclusi perché non diagnostici, mentre 9 sono risultati parzialmente diagnostici e 3 totalmente risolutivi. Si è scelto pertanto di genotipizzare la progenie su questi 3 loci (RPW02, RPW06 e RPW32) più altri due parzialmente diagnostici (RPW11 e RPW39), al fine di incrementare la robustezza dei dati. Dall'analisi dei dati grezzi di genotipizzazione, sia visiva che tramite *software* (PEAK SCANNER e MICROSATELIGHT), sono emerse per i loci RPW02 e RPW39 evidenti incongruenze tra i genotipi attesi e quelli osservati nella progenie. Anche in questo caso, come per l'esperimento zero, la ripetizione delle fasi di amplificazione e genotipizzazione dei campioni della generazione parentale e filiale sui loci in questione ha permesso di escludere eventuali errori nella produzione e interpretazione del segnale. Le discordanze osservate sono invece state attribuite con buona certezza alla presenza di alleli nulli, per cui i loci RPW02 e RPW39 sono stati eliminati dalle analisi successive. L'allele nullo per il locus RPW02 è in questo caso l'allele materno "300", piuttosto frequente nelle popolazioni italiane ma raro nel campione vietnamita e presente in eterozigosi con l'allele "292" solo in pochi individui delle popolazioni naturali del nostro *data set*. Il genotipo "292/300" è presente invece nella progenie dell'esperimento n°1 (che, ricordiamo, deriva dall'incrocio tra individui con diverse origini

geografiche) e mostra un'amplificazione ridotta dell'allele "292", che occasionalmente fallisce. Analogamente, il locus RPW39 è stato escluso perché produce in maniera ripetitiva segnali di bassa qualità e difficile interpretazione quando sono presenti in eterozigosi l'allele "185" e "205".

Nella tabella 3.24 sono mostrati i genotipi della generazione parentale e quelli attesi nella potenziale progenie di entrambi i padri putativi, sui 3 loci scelti come informativi per questa analisi di paternità. Nella Appendice n°13 sono riportati invece i genotipi che sono stati osservati nella progenie dell'esperimento n°1.

**Tab. 3.23.** Criteri di selezione dei loci diagnostici nell'assegnazione di paternità per l'esperimento n°1  
*Selection criteria for diagnostic loci in paternity assignment of experiment n°1*

**SSR non diagnostici per i quali i due maschi hanno lo stesso genotipo:**

ID	RPW03	RPW13	RPW24	RPW25
<b>M1</b>	214 214	172 172	95 95	99 99
<b>M2</b>	214 214	172 172	95 95	99 99

**SSR parzialmente diagnostici per i quali i due maschi hanno un allele in comune:**

ID	RPW16	RPW17	RPW20	RPW22	RPW26	RPW36	RPW38
<b>M1</b>	226 229	222 222	82 86	159 163	140 140	143 145	157 163
<b>M2</b>	226 226	219 222	86 86	159 159	132 140	145 145	157 157

**SSR parzialmente diagnostici per i quali i maschi non hanno alleli in comune e la femmina ha alleli in comune con entrambi i maschi:**

ID	RPW11	RPW39
<b>M1</b>	161 161	193 205
<b>M2</b>	158 164	185 185
<b>F1</b>	158 161	185 205

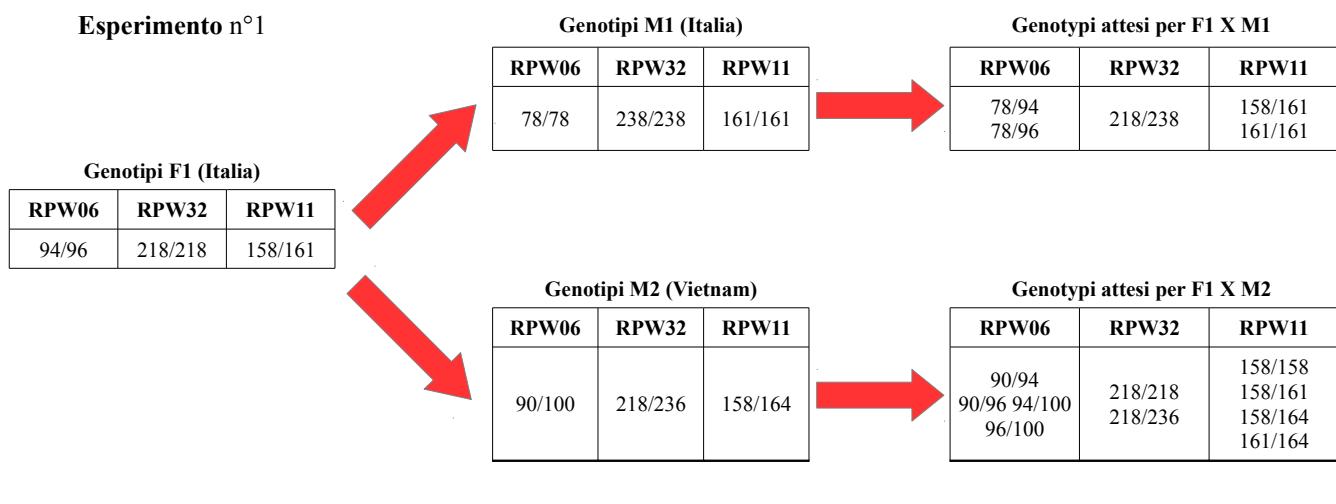
**SSR diagnostici per i quali la femmina non ha alleli in comune con entrambi i maschi e i maschi non hanno alleli comuni tra loro:**

ID	RPW02	RPW06	RPW32
<b>M1</b>	300 300	78 78	238 238
<b>M2</b>	292 292	90 100	218 236
<b>F1</b>	300 300	94 96	218 218

**M1**, maschio n°1, **M2**, maschio n°2; **F1**, femmina. I numeri si riferiscono alla lunghezza dei frammenti in bp.



**Tab. 3.24.** Genotipi della femmina (F1), dei due maschi con cui si è accoppiata (M1 e M2) e genotipi attesi nella progenie dell'esperimento n°1  
*Genotypes of the female (F1), of the males she mated (M1 e M2) and expected genotypes of the progeny of experiment n°1*



## **Analisi di paternità**

Dal confronto dei dati di genotipizzazione con i possibili genotipi attesi nella prole, emerge immediatamente come la progenie dell'esperimento n°1 sia interamente attribuibile al secondo maschio intervenuto nell'accoppiamento, mentre sembra che lo sperma del primo sia stato completamente escluso dalla fecondazione delle uova. Anche i risultati delle analisi condotte con i *software* PATRI e CERVUS confermano pienamente le attribuzioni di paternità effettuate a mano, con livelli di confidenza statistica rispettivamente pari al 100% e al 95%.

Nella situazione prodotta dal disegno sperimentale, ossia quella di un test di paternità con genotipo della madre noto e due maschi candidati come potenziali padri, già nella fase di simulazione, sulla base delle frequenze alleliche nella popolazione virtuale Italia-Vietnam, è stato stimato un tasso di assegnazione del 94%, al 95% di livello di confidenza statistica. L'analisi di paternità ha poi superato le aspettative assegnando il 100% delle 81 larve (risultati riportati in Appendice n°14). Nella tabella 3.25 sono mostrati i risultati del *software* CERVUS derivanti dall'analisi delle frequenze alleliche dei 3 loci esaminati. Il valore medio del *Polymorphism Information Content* (PIC) risulta di 0.562, per cui nel complesso il set di loci analizzati viene, a buon diritto, considerato informativo. Il locus RPW06 nuovamente quello a più alto potere risolutivo (PIC = 0.823), specialmente in virtù del suo elevato numero di alleli ( $N_A=13$ ). Per interpretare la discordanza tra eterozigosità attesa ed osservata sui loci valgono le stesse considerazioni fatte per l'esperimento zero. Nella tabella sono elencate anche le varie probabilità di non esclusione, calcolate per locus e combinando i 3 marcatori. Quella rilevante nel contesto di questo esperimento è la probabilità di non escludere erroneamente un putativo genitore che in realtà non è imparentato con la progenie, quando sia noto il genotipo del secondo genitore (NE-2P). Tale probabilità, se si combinano le informazioni derivanti dai 3 microsatelliti è stata stimata di circa il 17%.

**Tab. 3.25.** Parametri ricavati dalle frequenze alleliche dei 3 microsatelliti analizzati nell'esperimento n°1  
*Parameters derived from allelic frequencies of the three microsatellites analyzed in experiment n°1*

Locus	N <sub>A</sub>	N	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	NE-I	NE-SI
RPW06	13	38	0.553	0.850	0.823	0.472	0.307	0.130	0.042	0.341
RPW11	5	40	0.375	0.599	0.514	0.816	0.684	0.530	0.245	0.515
RPW32	3	40	0.325	0.391	0.349	0.925	0.803	0.676	0.414	660
<b>PIC medio:</b>					0.562					
<b>NE-1P combinata:</b>					0.357					
<b>NE-2P combinata:</b>					0.168					
<b>NE-PP combinata:</b>					0.047					
<b>NE-I combinata:</b>					0.004					
<b>NE-SI combinata:</b>					0.116					

N<sub>A</sub>, numero di alleli; N, numero di genotipi analizzati; H<sub>o</sub>, eterozigosità osservata; H<sub>e</sub>, eterozigosità attesa; PIC, *Polymorphism Information Content*; NE-1P, probabilità di non-esclusione per un falso genitore; NE-2P, probabilità di non-esclusione per un falso genitore noto il genotipo dell'altro; NE-PP, probabilità di non-esclusione per una falsa coppia di genitori; NE-I, probabilità di non-esclusione per identità tra due individui non imparentati; NE-SI, probabilità di non-esclusione per identità tra due fratelli.

Nella tabella 3.26 sono riportati i risultati di CERVUS delle attribuzioni di paternità per ciascuna larva, riguardanti il trio madre-padre-figlio nel suo complesso. Nell'Appendice n°15 è mostrato invece lo stesso tipo di risultato suddiviso per le coppie madre-figlio (15a) e padre-figlio (15b) rispettivamente. Dalle prime tre colonne della tabella 3.26 si evince che tutte le 81 larve analizzate risultano dall'incrocio della femmina con il maschio n°2 (M2). I valori di *non-exclusion probability* NE-2P, ossia la probabilità di non escludere un falso genitore noto il genotipo dell'altro, variano tra 0.00 e 0.19. Per ciascun trio sono stati comparati i genotipi su tutti e 3 i loci selezionati (non ci sono dati mancanti) e non sono emerse discordanze tra i genotipi osservati nella progenie e quelli attesi sulla base dei genotipi parentali (loci con *mismatch* = 0). I valori di LOD sono sempre positivi (compresi tra 1.04 e 8.45) e coincidenti con quelli del parametro Delta, a indicare che il valore di *likelihood* relativo alla paternità del maschio n°1 è praticamente nullo. Analogamente sono positivi e uguali tra loro i valori LOD e Delta per ciascuna coppia madre-figlio e padre figlio (Appendice n°15a e 15b). Per tutte le attribuzioni di paternità, l'asterisco nell'ultima colonna della tabella indica un elevato livello di confidenza statistica.

**Tab. 3.26.** Attribuzioni di paternità dell'esperimento n°1 eseguite con il programma CERVUS: risultati relativi al trio madre-padre-figlio  
*CERVUS paternity assignments of experiment n°1: results refer to the mother-father-son trio*

ID larva	NE-2P	ID padre assegnato	n°loci comparati	n°loci con mismatch	LOD complessivo	Delta complessivo	Livello di confidenza
IV3.L01	5.93E-003	M2	3	0	4.56	4.56	*
IV3.L02	5.93E-003	M2	3	0	4.56	4.56	*
IV3.L03	1.50E-002	M2	3	0	3.49	3.49	*
IV3.L04	2.30E-003	M2	3	0	5.78	5.78	*
IV3.L05	1.22E-003	M2	3	0	6.17	6.17	*
IV3.L06	7.32E-002	M2	3	0	1.89	1.89	*
IV3.L07	2.44E-002	M2	3	0	2.65	2.65	*
IV3.L08	1.81E-002	M2	3	0	3.32	3.32	*
IV3.L09	3.73E-003	M2	3	0	4.93	4.93	*
IV3.L10	3.73E-003	M2	3	0	4.93	4.93	*
IV3.L11	7.32E-002	M2	3	0	1.88	1.88	*
IV3.L12	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L13	2.44E-002	M2	3	0	2.65	2.65	*
IV3.L14	1.81E-002	M2	3	0	3.33	3.33	*
IV3.L15	2.30E-003	M2	3	0	5.77	5.77	*
IV3.L16	1.22E-003	M2	3	0	6.17	6.17	*
IV3.L17	1.22E-003	M2	3	0	6.18	6.18	*
IV3.L18	1.12E-002	M2	3	0	4.17	4.17	*
IV3.L19	5.93E-003	M2	3	0	4.55	4.55	*
IV3.L20	1.12E-002	M2	3	0	4.16	4.16	*
IV3.L21	1.12E-002	M2	3	0	4.17	4.17	*
IV3.L22	1.50E-002	M2	3	0	3.49	3.49	*
IV3.L23	2.30E-003	M2	3	0	5.77	5.77	*
IV3.L24	1.81E-002	M2	3	0	3.32	3.32	*
IV3.L25	9.07E-004	M2	3	0	6.83	6.83	*
IV3.L26	9.07E-004	M2	3	0	6.85	6.85	*
IV3.L27	5.93E-003	M2	3	0	4.55	4.55	*
IV3.L28	1.22E-003	M2	3	0	6.17	6.17	*
IV3.L29	1.86E-004	M2	3	0	8.45	8.45	*
IV3.L30	2.30E-003	M2	3	0	5.78	5.78	*
IV3.L31	2.44E-002	M2	3	0	2.65	2.65	*
IV3.L32	2.30E-003	M2	3	0	5.78	5.78	*
IV3.L33	3.73E-003	M2	3	0	4.93	4.93	*
IV3.L34	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L35	7.32E-002	M2	3	0	1.89	1.89	*
IV3.L36	1.22E-003	M2	3	0	6.17	6.17	*
IV3.L37	1.86E-004	M2	3	0	8.44	8.44	*
IV3.L38	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L39	9.07E-004	M2	3	0	6.85	6.85	*
IV3.L40	5.93E-003	M2	3	0	4.57	4.57	*
IV3.L41	1.22E-003	M2	3	0	6.17	6.17	*

ID larva	NE-2P	ID padre assegnato	n°loci comparati	n°loci con mismatch	LOD complessivo	Delta complessivo	Livello di confidenza
IV3.L42	2.44E-002	M2	3	0	2.65	2.65	*
IV3.L43	1.86E-004	M2	3	0	8.46	8.46	*
IV3.L44	1.50E-002	M2	3	0	3.49	3.49	*
IV3.L45	5.93E-003	M2	3	0	4.56	4.56	*
IV3.L46	1.50E-002	M2	3	0	3.49	3.49	*
IV3.L47	2.30E-003	M2	3	0	5.77	5.77	*
IV3.L48	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L49	5.93E-003	M2	3	0	4.55	4.55	*
IV3.L50	2.44E-002	M2	3	0	2.65	2.65	*
IV3.L51	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L52	1.81E-002	M2	3	0	3.33	3.33	*
IV3.L53	1.50E-002	M2	3	0	3.49	3.49	*
IV3.L54	9.07E-004	M2	3	0	6.85	6.85	*
IV3.L55	9.07E-004	M2	3	0	6.85	6.85	*
IV3.L56	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L57	2.30E-003	M2	3	0	5.77	5.77	*
IV3.L58	1.86E-004	M2	3	0	8.44	8.44	*
IV3.L59	5.93E-003	M2	3	0	4.56	4.56	*
IV3.L60	1.50E-002	M2	3	0	3.49	3.49	*
IV3.L61	5.93E-003	M2	3	0	4.57	4.57	*
IV3.L62	5.93E-003	M2	3	0	4.55	4.55	*
IV3.L63	1.86E-004	M2	3	0	8.45	8.45	*
IV3.L64	3.73E-003	M2	3	0	4.93	4.93	*
IV3.L65	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L66	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L67	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L68	7.32E-002	M2	3	0	1.89	1.89	*
IV3.L69	1.12E-002	M2	3	0	4.16	4.16	*
IV3.L70	1.22E-003	M2	3	0	6.18	6.18	*
IV3.L71	1.12E-002	M2	3	0	4.17	4.17	*
IV3.L72	7.32E-002	M2	3	0	1.89	1.89	*
IV3.L73	1.81E-002	M2	3	0	3.32	3.32	*
IV3.L74	9.07E-004	M2	3	0	6.83	6.83	*
IV3.L75	1.22E-003	M2	3	0	6.18	6.18	*
IV3.L76	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L77	1.19E-001	M2	3	0	1.04	1.04	*
IV3.L78	1.22E-003	M2	3	0	6.17	6.17	*
IV3.L79	3.73E-003	M2	3	0	4.93	4.93	*
IV3.L80	1.81E-002	M2	3	0	3.32	3.32	*
IV3.L81	1.22E-003	M2	3	0	6.18	6.18	*

**NE-2P**, probabilità di non esclusione del secondo genitore (noto il primo); **LOD complessivo**, *Log-likelihood ratio* per la relazione di parentela tra la madre nota, il padre assegnato e la larva; \*, alto livello di confidenza.

I risultati dell'analisi di paternità condotta con il programma PATRI sono riportati nell'Appendice n°16 e concordano pienamente con quelli prodotti mediante il *software* CERVUS, con una probabilità a posteriori pari a 1 per ciascuna delle 81 coppie madre-figlio considerate. Analogamente all'analisi svolta per l'esperimento zero, i maschi sono stati riuniti in un unico gruppo (quindi la probabilità che appartengano al suddetto gruppo è pari a 1) e la probabilità di campionamento è pari a 1, visto il tipo di esperimento condotto.

Complessivamente, dunque, i risultati di questo esperimento indicano che la femmina ha impiegato per la fertilizzazione delle uova esclusivamente il contributo spermatico del secondo maschio con cui si è accoppiata, e quindi il valore  $P_2$ , ossia la proporzione di individui della progenie attribuiti al secondo maschio, è pari a 1.00.

### **3.3.2.2. Esperimento n°2: femmina italiana x maschio vietnamita x maschio italiano**

#### **Incroci ed allevamento degli individui**

Nel corso dell'esperimento n°2 la prima copula è avvenuta dopo 9 minuti dall'ingresso del maschio nella gabbia e ha avuto una durata di circa 5 minuti, al termine dei quali i *partner* si sono separati spontaneamente. Il secondo accoppiamento è iniziato dopo 4 minuti dall'introduzione del maschio e sono stati osservati 3 atti copulatori della durata di circa un minuto ciascuno, a distanza di circa 7 minuti l'uno dall'altro. Vista la brevità di queste copule, si è scelto infatti di non separare la coppia immediatamente dopo il primo accoppiamento per avere maggiore sicurezza che avvenisse un reale trasferimento di sperma, e affinché i tempi di durata delle copule fossero comparabili tra i due maschi. Anche in questo esperimento non vi è stata alcuna deposizione di uova tra un accoppiamento e l'altro.

Sono state deposte uova fertili per un arco di 28 giorni suddiviso in 17 ovature distinte per data di deposizione. Su un totale di 192 uova prodotte, se ne sono schiuse 132 e 7 larve sono morte durante l'allevamento. Il tasso di mortalità della fase larvale (5%) risulta dunque drasticamente ridotto rispetto all'esperimento precedente (36%) in quanto riferito solamente ai primi 2-4 giorni di vita. Ciò ci ha permesso di abbattere quel fattore di mortalità riscontrato nell'esperimento n°1 che abbiamo ritenuto artificiale, in quanto imputato a contaminanti presenti nella dieta a base di mela. Le restanti 125 larve a disposizione sono state analizzate interamente. I principali parametri del successo riproduttivo della femmina *cox*/nvolta nell'esperimento n°2, suddivisi per ovatura nell'arco dell'intero periodo di ovideposizione, sono riportati nella tabella 3.27.

**Tab. 3.27.** Principali parametri del successo riproduttivo della femmina dell'esperimento n°2  
*Reproductive success parameters of the female of experiment n°2*

Ovatura	data di deposizione	n°di uova deposte	n°di uova schiuse	% di schiusa	n°di larve raccolte
I	17.I.14	13	8	100	8
II	20.I.14	40	31	97	30
III	21.I.14	9	9	100	9
IV	22.I.14	8	6	100	6
V	23.I.14	8	4	100	4
VI	24.I.14	1	1	100	1
VII	27.I.14	22	15	87	13
VIII	28.I.14	11	8	88	7
IX	30.I.14	14	3	100	3
X	31.I.14	4	3	67	2
XI	03.II.14	24	20	95	19
XII	04.II.14	7	5	80	4
XIII	05.II.14	6	2	100	2
XIV	10.II.14	13	10	100	10
XV	11.II.14	7	5	100	5
XVI	12.II.14	2	1	100	1
XVII	13.II.14	1	1	100	1

### **Caratterizzazione genetica della generazione parentale e filiale**

Come per l'esperimento precedente, i genotipi degli adulti *cox* involti negli accoppiamenti (tabella 3.28), sui 16 marcatori analizzati, sono stati suddivisi in base al potere diagnostico dei loci secondo i criteri descritti nel paragrafo 2.2.4 del capitolo 2. In questo caso sono stati esclusi 5 loci perché non diagnostici (stesso genotipo nei due maschi), a fronte di 9 parzialmente diagnostici e di solo 2 loci risultati totalmente risolutivi. La progenie è stata dunque genotipizzata sui 2 microsatelliti completamente diagnostici (RPW02 e RPW39) e su 3 loci parzialmente informativi (RPW06, RPW32, e RPW38) in modo da ottenere una buona robustezza dei dati ed ammortizzare l'effetto di possibili errori di genotipizzazione. Dopo accurata analisi visiva, coadiuvata dal *software* PEAK SCANNER, dei dati grezzi prodotti dall'elettroforesi capillare, non sono emerse discordanze tra i genotipi attesi e quelli osservati nella progenie, per cui sono stati impiegati nelle analisi di paternità tutti i loci selezionati. Nella tabella 3.29 sono mostrati i genotipi della generazione parentale e quelli attesi nella potenziale progenie di entrambi i padri putativi, relativamente ai 5 loci selezionati. I genotipi osservati nella progenie dell'esperimento n°2 sono invece riportati in Appendice n°17.

**Tab. 3.28.** Criteri di selezione dei loci diagnostici nell'assegnazione di paternità per l'esperimento n°2  
*Selection criteria for diagnostic loci in paternity assignment of experiment n°2*

**SSR non diagnostici per i quali i due maschi hanno lo stesso genotipo:**

ID	RPW03		RPW13		RPW24		RPW25		RPW26	
<b>M1</b>	212	214	172	172	95	95	99	99	140	140
<b>M2</b>	212	214	172	172	95	95	99	99	140	140

**SSR parzialmente diagnostici per i quali i due maschi hanno un allele in comune e la femmina ha un allele in comune con entrambi i maschi:**

ID	RPW06		RPW16		RPW17		RPW20		RPW22		RPW32		RPW38	
<b>M1</b>	98	98	226	226	218	221	86	86	159	163	218	236	163	165
<b>M2</b>	78	98	226	229	221	221	82	86	163	163	218	238	157	163
<b>F1</b>	78	98	226	226	221	221	82	86	163	163	218	238	161	163

**SSR parzialmente diagnostici per i quali i due maschi hanno un allele in comune e la femmina non ha un allele in comune con entrambi i maschi:**

ID	RPW11		RPW36	
<b>M1</b>	157	157	143	145
<b>M2</b>	157	160	145	145
<b>F1</b>	160	160	143	143

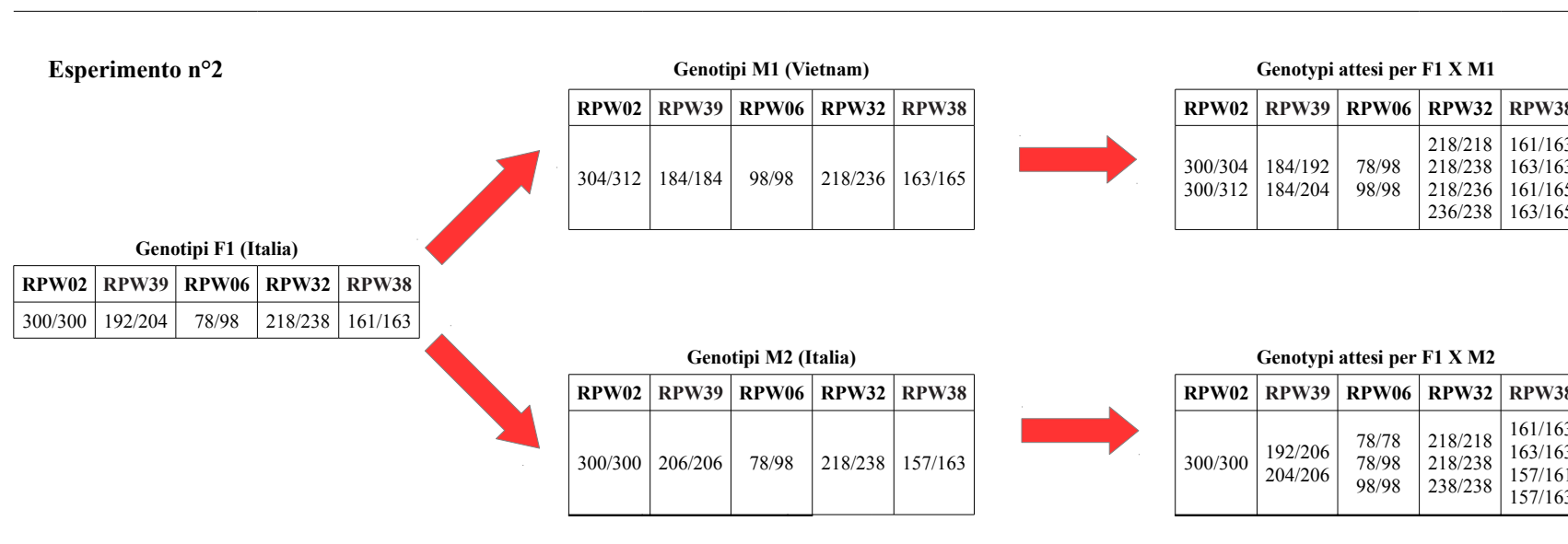
**SSR diagnostici per i quali i maschi non hanno alleli in comune e la femmina non ha alleli in comune con entrambi i maschi:**

ID	RPW02		RPW39	
<b>M1</b>	304	312	185	185
<b>M2</b>	300	300	207	207
<b>F1</b>	300	300	193	205

**M1**, maschio n°1; **M2**, maschio n°2; **F1**, femmina. I numeri si riferiscono alla lunghezza dei frammenti in bp.



**Tab. 3.29.** Genotipi della femmina (F1), dei due maschi con cui si è accoppiata (M1 e M2) e genotipi attesi nella progenie dell'esperimento n°2  
*Genotypes of the female (F1), of the males she mated (M1 e M2) and expected genotypes of the progeny of experiment n°2*



## **Analisi di paternità**

Già dal semplice confronto (sulla base delle leggi di Mendel) tra i genotipi attesi per ciascuno dei due padri potenziali e quelli osservati, è stato possibile attribuire con buona certezza ciascuna larva ad uno dei due maschi *cox* involti nell'accoppiamento.

Anche i risultati delle analisi condotte con i *software* PATRI e CERVUS confermano pienamente le attribuzioni di paternità effettuate a mano, con livelli di affidabilità rispettivamente pari al 100% e al 95%. Il tasso di assegnazione di paternità, stimato durante la fase di analisi in cui il *software* effettua delle simulazioni sulla base delle frequenze alleliche calcolate, ammonta al 98%, con il 95% di confidenza statistica. L'analisi di paternità vera e propria è stata condotta con pieno successo raggiungendo addirittura il 100% di tasso di assegnazione (risultati riportati in Appendice n°18).

Nella tabella 3.30 sono mostrati i risultati del *software* CERVUS derivanti dall'analisi delle frequenze alleliche dei 5 loci esaminati. Il valore medio del PIC risulta di 0.672 confermando, nel complesso, che il pannello di loci utilizzati è da considerarsi informativo. Solo il locus RPW32 presenta un basso numero di alleli e un PIC moderato ( $N_A = 3$ ;  $PIC = 0.360$ ), mentre gli altri sono tutti piuttosto variabili ed informativi. È infatti su questi loci che si verificano le maggiori discordanze tra eterozigosità attesa e osservata, attribuibili al basso numero di campioni ma soprattutto, come detto in precedenza, al fatto che il campione di riferimento da cui sono calcolate le frequenze alleliche non deriva da una popolazione naturale ma è composto da individui con origini geografiche diverse (Italia e Vietnam). Nella tabella sono elencate anche le varie probabilità di non esclusione calcolate per locus e combinando i 5 marcatori. La *non-exclusion probability* che riflette il disegno sperimentale di questo incrocio (NE-2P) indica la probabilità di non escludere erroneamente un putativo genitore che in realtà non è imparentato con la progenie, quando sia noto il genotipo del secondo genitore. Tale probabilità, se si combinano le informazioni derivanti da tutti e 5 i loci è stimata intorno al 2%, quindi molto bassa.

**Tab. 3.30.** Parametri ricavati dalle frequenze alleliche dei 5 microsatelliti analizzati nell'esperimento n°2  
*Parameters derived from allelic frequencies of the five microsatellites analyzed in exp. n°2*

<b>Locus</b>	<b>N<sub>A</sub></b>	<b>N</b>	<b>H<sub>o</sub></b>	<b>H<sub>e</sub></b>	<b>PIC</b>	<b>NE-1P</b>	<b>NE-2P</b>	<b>NE-PP</b>	<b>NE-I</b>	<b>NE-SI</b>
RPW02	7	38	0.368	0.711	0.665	0.696	0.516	0.318	0.125	0.431
RPW39	13	40	0.450	0.816	0.789	0.525	0.351	0.157	0.055	0.361
RPW06	13	38	0.553	0.847	0.820	0.478	0.311	0.132	0.043	0.343
RPW32	3	40	0.350	0.406	0.360	0.919	0.796	0.668	0.400	0.649
RPW38	9	38	0.500	0.772	0.726	0.628	0.450	0.263	0.093	0.392
<b>PIC medio:</b>				0.672						
<b>NE-1P combinata:</b>				0.101						
<b>NE-2P combinata:</b>				0.020						
<b>NE-PP combinata:</b>				0.001						
<b>NE-I combinata:</b>				0.000						
<b>NE-SI combinata:</b>				0.014						

N<sub>A</sub>, numero di alleli; N, numero di genotipi analizzati; H<sub>o</sub>, eterozigosità osservata; H<sub>e</sub>, eterozigosità attesa; PIC, *Polymorphism Information Content*; NE-1P, probabilità di non-esclusione per un falso genitore; NE-2P, probabilità di non-esclusione per un falso genitore noto il genotipo dell'altro; NE-PP, probabilità di non-esclusione per una falsa coppia di genitori; NE-I, probabilità di non-esclusione per identità tra due individui non imparentati; NE-SI, probabilità di non-esclusione per identità tra due fratelli.

Nella tabella 3.31 sono riportati i risultati di CERVUS delle attribuzioni di paternità per ciascuna larva, riguardanti il trio madre-padre-figlio nel suo complesso. Lo stesso tipo di risultato, suddiviso per le coppie madre-figlio e padre-figlio, è mostrato invece rispettivamente nell'Appendice n°19a e 19b. Dalle prime tre colonne della tabella 3.31 si evince che solo due individui della progenie (IV4.L39 e IV4.L85) sono stati assegnati al maschio n°1 (M1), mentre le restanti 123 larve risultano dall'incrocio della femmina con il maschio n°2 (M2). I valori di *non-exclusion probability* NE-2P, ossia la probabilità di non escludere un falso genitore noto il genotipo dell'altro, variano tra 0.00 e 0.20. Per ciascun trio sono stati comparati i genotipi su tutti e 5 i loci selezionati (non ci sono dati mancanti) e non sono emerse discordanze tra i genotipi osservati nella progenie e quelli attesi sulla base dei genotipi parentali (loci con *mismatch* = 0). Anche per questo esperimento i valori di LOD sono sempre positivi (compresi tra 1.88 e 7.14) e coincidono con i rispettivi valori del parametro Delta, a indicare che il valore di *likelihood* relativo alla paternità del maschio alternativo è praticamente nullo. Analogamente, sono positivi e uguali tra loro i valori di LOD e Delta per ciascuna coppia madre-figlio e padre figlio (Appendice n°19a e 19b). L'asterisco nell'ultima colonna della tabella indica un elevato livello di confidenza statistica nelle attribuzioni di paternità.

**Tab. 3.31.** Attribuzioni di paternità dell'esperimento n°2 eseguite con il programma CERVUS: risultati relativi al trio madre-padre-figlio

*CERVUS paternity assignments of experiment n°2: results refer to the mother-father-son trio*

<b>ID larva</b>	<b>NE-2P</b>	<b>ID padre assegnato</b>	<b>n°loci comparati</b>	<b>n°loci con mismatch</b>	<b>LOD complessivo</b>	<b>Delta complessivo</b>	<b>Livello di confidenza</b>
IV4.L01	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L02	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L03	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L04	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L05	2.34E-002	M2	5	0	4.27	4.27	*
IV4.L06	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L07	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L08	1.56E-001	M2	5	0	3.09	3.09	*
IV4.L09	1.36E-002	M2	5	0	4.85	4.85	*
IV4.L10	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L11	1.36E-002	M2	5	0	4.85	4.85	*
IV4.L12	2.34E-002	M2	5	0	4.27	4.27	*
IV4.L13	2.27E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L14	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L15	7.74E-003	M2	5	0	5.49	5.49	*
IV4.L16	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L17	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L18	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L19	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L20	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L21	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L22	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L23	4.11E-002	M2	5	0	3.62	3.62	*
IV4.L24	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L25	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L26	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L27	1.36E-002	M2	5	0	4.85	4.85	*
IV4.L28	6.87E-002	M2	5	0	2.83	2.83	*
IV4.L29	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L30	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L31	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L32	7.29E-002	M2	5	0	3.31	3.31	*
IV4.L33	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L34	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L35	7.29E-002	M2	5	0	3.30	3.30	*
IV4.L36	1.36E-002	M2	5	0	4.85	4.85	*
IV4.L37	2.27E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L38	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L39	1.69E-003	M1	5	0	7.14	7.14	*

<b>ID larva</b>	<b>NE-2P</b>	<b>ID padre assegnato</b>	<b>n°loci comparati</b>	<b>n°loci con mismatch</b>	<b>LOD complessivo</b>	<b>Delta complessivo</b>	<b>Livello di confidenza</b>
IV4.L40	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L41	7.29E-002	M2	5	0	3.30	3.30	*
IV4.L42	6.87E-002	M2	5	0	2.83	2.83	*
IV4.L43	3.99E-002	M2	5	0	3.41	3.41	*
IV4.L44	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L45	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L46	4.11E-002	M2	5	0	3.62	3.62	*
IV4.L47	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L48	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L49	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L50	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L51	4.11E-002	M2	5	0	3.62	3.62	*
IV4.L52	3.99E-002	M2	5	0	3.41	3.41	*
IV4.L53	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L54	4.23E-002	M2	5	0	3.89	3.89	*
IV4.L55	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L56	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L57	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L58	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L59	4.11E-002	M2	5	0	3.62	3.62	*
IV4.L60	1.36E-002	M2	5	0	4.85	4.85	*
IV4.L61	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L62	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L63	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L64	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L65	7.74E-003	M2	5	0	5.49	5.49	*
IV4.L66	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L67	2.27E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L68	4.23E-002	M2	5	0	3.89	3.89	*
IV4.L69	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L70	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L71	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L72	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L73	2.27E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L74	2.41E-002	M2	5	0	4.53	4.53	*
IV4.L75	1.21E-001	M2	5	0	2.18	2.18	*
IV4.L76	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L77	4.23E-002	M2	5	0	3.89	3.89	*
IV4.L78	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L79	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L80	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L81	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L82	1.56E-001	M2	5	0	3.09	3.09	*

<b>ID larva</b>	<b>NE-2P</b>	<b>ID padre assegnato</b>	<b>n°loci comparati</b>	<b>n°loci con mismatch</b>	<b>LOD complessivo</b>	<b>Delta complessivo</b>	<b>Livello di confidenza</b>
IV4.L83	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L84	4.11E-002	M2	5	0	3.62	3.62	*
IV4.L85	1.77E-003	M1	5	0	6.83	6.83	*
IV4.L86	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L87	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L88	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L89	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L90	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L91	1.21E-001	M2	5	0	2.18	2.18	*
IV4.L92	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L93	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L94	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L95	2.34E-002	M2	5	0	4.26	4.26	*
IV4.L96	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L97	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L98	1.56E-001	M2	5	0	3.09	3.09	*
IV4.L99	4.11E-002	M2	5	0	3.62	3.62	*
IV4.L100	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L101	4.11E-002	M2	5	0	3.62	3.62	*
IV4.L102	1.56E-001	M2	5	0	3.10	3.10	*
IV4.L103	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L104	1.21E-001	M2	5	0	2.19	2.19	*
IV4.L105	2.86E-002	M2	5	0	4.70	4.70	*
IV4.L106	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L107	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L108	6.87E-002	M2	5	0	2.83	2.83	*
IV4.L109	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L110	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L111	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L112	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L113	5.02E-002	M2	5	0	4.06	4.06	*
IV4.L114	8.39E-002	M2	5	0	3.27	3.27	*
IV4.L115	1.36E-002	M2	5	0	4.85	4.85	*
IV4.L116	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L117	2.04E-001	M2	4	0	1.88	1.88	*
IV4.L118	1.47E-001	M2	5	0	2.62	2.62	*
IV4.L119	2.41E-002	M2	5	0	4.53	4.53	*
IV4.L120	8.90E-002	M2	5	0	3.74	3.74	*
IV4.L121	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*
IV4.L122	2.34E-002	M2	5	0	4.26	4.26	*
IV4.L123	6.87E-002	M2	5	0	2.83	2.83	*
IV4.L124	2.41E-002	M2	5	0	4.53	4.53	*
IV4.L125	1.28E-001	M2	5	0	2.66	2.66	*

<b>ID larva</b>	<b>NE-2P</b>	<b>ID padre assegnato</b>	<b>n°loci comparati</b>	<b>n°loci con mismatch</b>	<b>LOD complessivo</b>	<b>Delta complessivo</b>	<b>Livello di confidenza</b>
-----------------	--------------	---------------------------	-------------------------	----------------------------	------------------------	--------------------------	------------------------------

**NE-2P**, probabilità di non esclusione del secondo genitore (noto il primo); **LOD complessivo**, *Log-likelihood ratio* per la relazione di parentela tra la madre nota, il padre assegnato e la larva; \*, alto livello di confidenza.

Anche in questo caso i risultati dell'analisi di paternità eseguita con il programma PATRI (riportati nell'Appendice n°20) confermano pienamente quelli prodotti mediante il *software* CERVUS, con una probabilità a posteriori pari a 1 per ciascuna delle 125 coppie madre-figlio considerate. Come per i due esperimenti precedenti, il disegno sperimentale estremamente semplificato non dava motivo di suddividere i maschi in più gruppi (quindi la probabilità che appartengano all'unico gruppo esistente è ovviamente pari a 1) ed anche la probabilità di campionamento è pari a 1.

Complessivamente, dunque, anche i risultati di questo esperimento indicano un forte squilibrio nell'utilizzazione dei contributi spermatici da parte della femmina, sempre a favore del secondo maschio con cui è avvenuto l'accoppiamento, con un valore  $P_2$  pari a 0.98.

### 3.4. Simulazioni e *power analysis* dei loci microsatelliti sviluppati in vista di prospettive future di ricerca

Nella tabella 3.32 sono riportati i risultati dello studio preliminare sul potere risolutivo dei 13 loci microsatelliti risultati polimorfici negli individui di origine italiana, condotto con il *software* CERVUS. Per ogni marcatore sono indicati il *Polymorphism Information Content* (PIC) ed i valori di *non-exclusion probability* NE-2P (probabilità di non escludere come padre un individuo non imparentato con la progenie), simulando un test di paternità dove la madre abbia genotipo noto.

**Tab. 3.32.** Potere risolutivo dei 13 microsatelliti polimorfici in Italia  
*Diagnostic power of the 13 microsatellites polymorphic in Italy*

Locus	N <sub>A</sub>	N	PIC	NE-2P
RPW02	3	22	0.360	0.802
RPW03	4	22	0.405	0.758
RPW06	7	21	0.712	0.467
RPW11	2	22	0.208	0.896
RPW16	2	22	0.348	0.826
RPW20	2	22	0.370	0.815
RPW22	2	22	0.208	0.896
RPW25	2	22	0.318	0.841
RPW26	2	22	0.305	0.848
RPW32	2	22	0.330	0.835
RPW36	2	22	0.305	0.848
RPW38	4	22	0.617	0.593
RPW39	5	22	0.473	0.698

N<sub>A</sub>, numero di alleli; N, numero di individui; PIC, *Polymorphism Information Content*; NE-2P, *non-exclusion probability* con un genitore noto.

Analizzando i valori del PIC per i singoli loci, emerge come solo 2 microsatelliti (RPW06 ed RPW38) superino la soglia di 0.5, oltre la quale un marcatore viene generalmente considerato informativo, mentre il PIC del locus RPW39 risulta molto vicino a tale soglia. Il valore medio del PIC calcolato sull'intero pannello di loci è invece pari a 0.381.

Le probabilità di non esclusione per i singoli loci sono risultate tutte estremamente elevate (comprese tra 46.7% e 89.6%), come è logico aspettarsi nel caso in cui si prenda in considerazione un singolo marcatore molecolare per eseguire un test di paternità. La probabilità di non esclusione calcolata sull'intero insieme dei microsatelliti a disposizione è invece



estremamente bassa (0.3%), ad indicare che, analizzando i 13 microsatelliti nell'ambito di test di paternità su popolazioni italiane dove sia possibile conoscere i genotipi materni, sarebbe estremamente poco probabile attribuire la progenie a maschi che in realtà non sono i reali padri applicando il metodo di esclusione.

Nella tabella 3.33 vengono brevemente sintetizzati i parametri adottati per compiere la prima serie di simulazioni di test di paternità, che riguardano lo scenario in cui vengano ripetuti degli esperimenti programmati di incrocio in laboratorio, analoghi a quelli eseguiti in questo lavoro, ma impiegando individui tutti di origine italiana e accoppiando la femmina con un numero via via crescente di maschi. Le 5 diverse simulazioni sono indicate per comodità con una sigla identificativa (1a-1e).

<b>Tab. 3.33.</b> Simulazioni test di paternità della serie I <i>Paternity analysis simulations of series I</i>					
<b>Parametri comuni</b>					
Numero larve prodotte dalla femmina:	150				
Proporzione di padri potenziali campionata:	1.00				
Proporzione di loci tipizzata:	0.99				
Proporzione di errori di genotipizzazione:	0.01				
Tasso di errore nei calcoli di <i>likelihood</i> :	0.01 ( <i>default</i> )				
Numero minimo di loci tipizzati per individuo:	8.00				
<b>Parametri variabili</b>					
ID simulazione	1a	1b	1c	1d	1e
Numero di padri potenziali:	2	4	6	8	10

I risultati mostrati in tabella 3.34 mostrano immediatamente come, sempre conoscendo a priori i genotipi materni, la percentuale di individui della generazione filiale che sarebbe possibile attribuire ad un ipotetico padre con un livello di confidenza statistica del 95% è estremamente alta nelle prime quattro simulazioni (1a-1d) e raggiunge addirittura il 100% nelle prime tre (1a-1c). Questo significa che, se nel corso di esperimenti di incrocio una singola femmina si accoppiasse con fino ad 8 maschi diversi (simulazione 1d), si avrebbe una probabilità molto elevata di attribuire con buona certezza tutte le larve da essa prodotte al rispettivo padre, o ai rispettivi padri, valutando dunque l'entità dei contributi spermatici di tutti i maschi coinvolti nell'esperimento.

**Tab. 3.34.** Percentuale di attribuzioni di paternità con il 95% di confidenza statistica nelle simulazioni della serie 1  
*Assignment rate of paternity for simulations of series 1 at 95% confidence interval*

ID simulazione	1a	1b	1c	1d	1e
% di assegnazione	100	100	100	99	89

Sulla base dei risultati ottenuti negli esperimenti di accoppiamento multiplo fin qui condotti, va considerato che un maschio di questa specie può contribuire alla progenie di una data femmina anche in proporzioni ridottissime quindi, un tasso di assegnazione del 89%, come quello stimato per la simulazione 1e (accoppiamento con 10 maschi) potrebbe non essere sufficiente a rilevare tutti i contributi paterni presenti nella progenie. Di conseguenza si può stimare intorno a 8 il numero massimo di maschi con cui una femmina può essere accoppiata se si vogliono studiare con precisione le dinamiche di utilizzo dello sperma durante accoppiamenti multipli in cattività. Le simulazioni della serie 2 riguardano invece potenziali esperimenti in cui vengano prelevate in natura femmine gravide (e quindi anche in questo caso è noto il genotipo materno) e siano condotti test di paternità sulla loro progenie analizzando come padri candidati i maschi adulti campionati nei pressi delle femmine. Sono state condotte 20 simulazioni (identificate dalle sigle 2a-2v) secondo i parametri descritti nella tabella 3.35. Le variabili che discriminano ciascuna simulazione sono il numero di padri potenziali (ossia il numero di maschi catturati) e la proporzione di padri potenziali campionata rispetto alla dimensione effettiva della popolazione maschile.

**Tab. 3.35.** Simulazioni test di paternità della serie 2  
*Paternity analysis simulations of series 2*

<b>Parametri comuni</b>						
Numero larve prodotte dalla femmina:		150				
Proporzione di loci tipizzata:		0.99				
Proporzione di errori di genotipizzazione:		0.01				
tasso di errore nei calcoli di <i>likelihood</i> :		0.01 ( <i>default</i> )				
Numero minimo di loci tipizzati per individuo:		8.00				
<b>Parametri variabili</b>		<b>Numero di padri potenziali:</b>				
ID simulazione		5	10	20	30	40
<b>Proporzione di padri potenziali campionata:</b>	<b>0.25</b>	2a	2b	2c	2d	2e
	<b>0.50</b>	2f	2g	2h	2i	2l
	<b>0.75</b>	2m	2n	2o	2p	2q
	<b>1.00</b>	2r	2s	2t	2u	2v

I tassi di assegnazione paterna mostrati nella tabella 3.36 mostrano come l'unico scenario in cui sarebbe possibile condurre dei test di paternità con precisione e buona confidenza statistica sia quello in cui si abbia la certezza di aver campionato tutti i maschi con cui la femmina potrebbe essersi accoppiata in natura, ed il numero di tali maschi sia pari a 5 (o inferiore). Una simile condizione, del tutto analoga ad un esperimento di laboratorio in cui una femmina venga incrociata con 5 maschi, sembra piuttosto irrealistico nell'ambito di una popolazione naturale, visto l'elevato numero di individui che compongono generalmente una colonia di Punteruolo rosso, ed era stata presa in considerazione per queste simulazioni solo come situazione estrema di riferimento.

In tutti gli altri scenari presi in esame, i tassi di assegnazione della progenie al rispettivo padre decrescono drasticamente all'aumentare del numero di padri potenziali e con il diminuire della proporzione di padri potenziali campionata. Sebbene l'impatto di questi due fattori sul tasso di attribuzione sia stato analizzato in via del tutto preliminare e grossolana nel corso di queste 20 simulazioni, i risultati ottenuti danno un'indicazione immediata di quanto sarebbero poco risolutivi dei test di paternità condotti con il disegno sperimentale sopra descritto, per cui è parso inutile proseguire con simulazioni più approfondite e dettagliate.

**Tab. 3.36.** Percentuale di attribuzioni di paternità con il 95% di confidenza statistica nelle simulazioni della serie 2  
*Assignment rate of paternity for simulations of series 2 at 95% confidence interval*

% di assegnazione	Numero di padri potenziali:				
	5	10	20	30	40
<b>0.25</b>	33	19	18	15	5
<b>0.50</b>	55	33	29	24	13
<b>0.75</b>	75	59	57	49	28
<b>1.00</b>	100	89	67	49	32

Nel complesso dunque, mentre i risultati delle simulazioni sembrano incoraggianti nell'ottica di esperimenti di incrocio programmato con un maggior numero di maschi rispetto a quelli analizzati finora, la prospettiva di applicare lo strumento del test di paternità in natura sembra poco percorribile, per lo meno su popolazioni italiane dove la variabilità del pannello di loci microsatelliti messo a punto appare ridotta rispetto a quella nelle aree di origine, probabilmente a causa dei fenomeni di collo di bottiglia caratteristici di una specie invasiva come *R. ferrugineus*.

## Capitolo 4

### Discussione

#### **4.1. Messa a punto *ex novo* di un pannello di microsatelliti per la specie *R. ferrugineus***

Il primo obiettivo di questo progetto era di sviluppare un certo numero di marcatori genetici specifici per la specie *Rhynchophorus ferrugineus* che fossero adatti all'impiego come strumenti di diagnosi nell'attribuzione di paternità. Ci si è posti dunque la sfida di mettere a punto un pannello di loci microsatelliti che, come già menzionato, sono considerati i marcatori d'elezione nelle analisi di parentela (Jones *et al.*, 2010), impiegando un approccio innovativo rispetto alle tecniche classiche di isolamento (Zane *et al.*, 2002). La strategia adottata, che ha ricevuto ampia diffusione negli ultimi anni (Allentoft *et al.*, 2009; Castoe *et al.* 2010; Perry & Rowe, 2010; Santana *et al.*, 2009), si è basata sulla creazione di una libreria genomica tramite un sequenziamento di nuova generazione di tipo 454, e sulla ricerca di motivi ripetuti, corrispondenti a precise caratteristiche, mediante strumenti bioinformatici. Nel complesso si può affermare che questa tecnica è risultata vincente, in quanto ha richiesto tempi tutto sommato ridotti e permesso un notevole risparmio economico (Abdelkrim *et al.*, 2009), rispetto ai protocolli tradizionali basati su clonaggio, ibridazione con sonde e sequenziamento Sanger (Zane *et al.*, 2002), il cui tasso di successo è tra l'altro affetto da una forte componente di casualità. Il pirosequenziamento 454 ha inoltre prodotto un'enorme mole di dati nucleotidici (oltre 70 mila sequenze, per un totale di più di 20 milioni di basi) che contribuiscono alla conoscenza del genoma di questa specie, e possono costituire una banca dati di partenza per altre ricerche di tipo genetico. Non di meno, i microsatelliti semplici che sono stati saggiati in questo lavoro rappresentano poco più di un terzo di quelli isolati sull'intera libreria genomica, per non contare quelli a motivo composto che non sono stati analizzati affatto. Il pirosequenziamento ha quindi reso disponibile una importante sorgente di marcatori genetici specifici per la specie in questione, che potranno sicuramente trovare ampio impiego nelle ricerche future.

Va precisato però che questo tipo di approccio è caratterizzato da una modalità di selezione dei microsatelliti utili che potremmo definire “a imbuto”. Infatti, a fronte dell'elevato numero di motivi ripetuti che vengono generalmente individuati dalla ricerca bioinformatica (sull'enorme quantità di sequenze prodotte dal pirosequenziamento), una larga proporzione di loci viene scartata via via nelle fasi successive del protocollo di messa a punto (Abdelkrim *et al.*, 2009), perché non corrisponde ai criteri necessari di efficacia di amplificazione e polimorfismo. In

questo lavoro, ad esempio, su oltre 70500 sequenze nucleotidiche prodotte, sono stati isolati 98 potenziali microsatelliti a motivo semplice, che costituiscono già di per sé un sottoinsieme del totale dei motivi ripetuti individuati, in quanto sono quelli per i quali erano presenti delle regioni fiancheggianti utili per disegnare dei *primer*. Per ovvie ragioni di tempo e risorse è stata studiata solo una parte di questi loci, ossia un campione di 37 marcatori, ai quali ne sono stati aggiunti due presi in letteratura (Capdevielle-Dulac *et al.*, 2012). Di questi 39 loci saggiati, ben 15 sono stati scartati perché non venivano amplificati in modo soddisfacente, 2 perché, analizzandone la sequenza prodotta col metodo Sanger, vi erano dubbi sulla presenza del microsatellite atteso, e altri 3 loci sono stati eliminati perché sono risultati monomorfici. Sono stati dunque ottenuti in tutto 16 microsatelliti che presentano più di un allele, relativamente al campione di 106 individui che abbiamo analizzato. Di questi, 13 risultano polimorfici nelle popolazioni italiane a nostra disposizione (Tabella 4.1). Nonostante il numero di marcatori utili si sia ridotto, come prevedibile, nel corso delle varie fasi di selezione, è stato ottenuto alla fine un soddisfacente pannello di microsatelliti, adeguato agli scopi di questo progetto.

**Tab. 4.1.** Selezione e protocollo di messa a punto dei loci microsatelliti  
*Selection and steps of developing for microsatellite loci*

N° di sequenze nucleotidiche* della libreria genomica da 454	70522
N° di potenziali microsatelliti semplici individuati dal <i>mining</i> bioinformatico	98
N° di microsatelliti tratti dalla letteratura**	2
N° totale di loci saggiati	39
N° di loci amplificabili con successo	24
N° di loci con motivo ripetuto corrispondente all'atteso	22
N° di loci polimorfici sull'intero <i>data set</i>	16
N° di loci polimorfici sul campione italiano	13

\*: lunghezza > 75 bp; \*\*: Capdevielle-Dulac *et al.*, 2012

Essendo stato questo il primo approccio personale ad un sequenziamento di nuova generazione, è stato ritenuto opportuno acquisire l'esperienza e le competenze necessarie procedendo con un pirosequenziamento di tipo *standard*, su un campione di DNA proveniente da un unico individuo. Questa scelta è stata fatta tuttavia nella consapevolezza che un sequenziamento più complesso, di tipo *tagged*, ossia eseguito contemporaneamente sul DNA di più campioni opportunamente marcati tramite etichette molecolari (Glenn, 2011), avrebbe certamente consentito di individuare più rapidamente i microsatelliti polimorfici. Inoltre, sarebbe stato

possibile disegnare *primer* di amplificazione che tenessero conto di una eventuale variabilità genetica nei siti di *annealing*, tra campioni provenienti da diverse regioni geografiche, e questo avrebbe semplificato la fase di ottimizzazione delle condizioni di amplificazione dei singoli loci. Va detto tuttavia che l'esigenza di analizzare campioni popolazionistici provenienti da più regioni, sia dell'areale primario che secondario, è sorta successivamente all'esecuzione del pirosequenziamento. Questo perché solo dopo aver analizzato i livelli di polimorfismo del primo lotto di loci è emersa la forte omogeneità genetica presente nelle popolazioni italiane, ed in quelle invasive dell'area Mediterranea in generale. Di conseguenza, si è scelto di usare negli esperimenti di accoppiamento multiplo maschi di origine geografica diversa, in modo che fossero geneticamente il più possibile distanti tra loro, rendendo così più robuste le attribuzioni di paternità. Da qui è sorta dunque l'esigenza di stimare i livelli di variabilità genetica del pannello di loci in costruzione su diverse popolazioni, in modo da poter individuare quelle maggiormente differenziate e da lì attingere gli individui destinati agli incroci.

Uno dei risvolti collaterali positivi dell'aver eseguito dei test di paternità, in condizioni di estremo controllo dei genotipi della generazione parentale, è stata l'opportunità di individuare diversi alleli nulli grazie al confronto tra i genotipi attesi sulla base di quelli dei genitori, e quelli osservati nella progenie. Tali alleli non sarebbero infatti potuti essere smascherati altrimenti, e la loro mancata individuazione avrebbe probabilmente falsato le stime delle frequenze alleliche e genotipiche, e le successive analisi basate su di esse. La presenza di alleli soggetti ad un'amplificazione ridotta o assente, e che quindi producono segnali di difficile rilevazione e valutazione, è infatti un fenomeno molto diffuso nella genotipizzazione di microsatelliti, che può alterare pesantemente i risultati (Pompanon *et al.*, 2005). Gli alleli in questione sono per lo più alleli rari nelle popolazioni in cui il fenomeno si è verificato, e spesso è stato possibile identificarli perché la mancata amplificazione avveniva prevalentemente in condizioni di “eterozigosi non naturale”, ossia quando, incrociando una femmina italiana con un maschio vietnamita, venivano a trovarsi in eterozigosi alleli che normalmente non coesistono nella stessa popolazione. Questo ha permesso così di individuare tali “alleli deboli” e di ricontrollare l'intero *data set* alla ricerca di altri segnali ambigui da essi prodotti, o comunque di avere delle indicazioni che permetteranno in futuro, qualora i dati genotipici venissero impiegati per ulteriori analisi, di stimare più correttamente l'errore di genotipizzazione atteso per quei loci.

## 4.2. Stime di variabilità genetica in aree di origine e di invasione ed individuazione delle popolazioni sorgente per gli esperimenti di incrocio

Le stime dei livelli di polimorfismo dei microsatelliti condotte su un campione di 106 individui provenienti da diverse regioni dell'areale primario e secondario hanno permesso di ottenere un quadro interessante, seppur parziale, della variabilità genetica di questa specie invasiva, suggerendo tra l'altro alcune ipotesi di natura filogeografica sulle dinamiche di colonizzazione del Medio Oriente e del Mediterraneo. È emersa infatti una forte disparità tra le aree di origine analizzate (Vietnam e Malesia), a variabilità genetica decisamente superiore, e le popolazioni invasive del Mediterraneo (Italia, Grecia, Spagna), che sono risultate piuttosto omogenee, compatibilmente con l'ipotesi di uno o pochi eventi originari di colonizzazione, accompagnati molto probabilmente dall'effetto del fondatore. Sulla base dei diversi indici di diversità genetica stimati dai dati dei microsatelliti (eterozigosità, numero di alleli e ricchezza allelica, *Polymorphism Information Content*), i cui valori medi sono riassunti nella tabella 4.2, e dell'analisi filogenetica sul marcatore mitocondriale *cox1*, l'Italia ed il Vietnam sono state individuate come le aree maggiormente differenziate tra loro dal punto di vista genetico, tra quelle campionate. Merita un discorso a parte la Penisola araba, nella quale sono stati riscontrati livelli di variabilità genetica decisamente superiori rispetto a quelli della regione mediterranea, e per la quale esistono evidenze a favore di ipotesi di introduzioni multiple da diverse aree di origine e di un probabile ruolo di “testa di ponte” nell'invasione del bacino del Mediterraneo.

**Tab. 4.2.** Indici di variabilità genetica dei microsatelliti mediati sulle diverse regioni geografiche campionate  
*Mean genetic variability indexes of microsatellites over the geographical regions analyzed*

Indice/regione	Italia	Grecia	Spagna	Arabia	Cina	Vietnam	Malesia
<b>Eterozigosità attesa media</b> [s.d.]	0.37 [0.23]	0.31 [0.24]	0.33 [0.26]	0.40 [0.28]	0.19 [0.31]	0.48 [0.29]	0.40 [0.29]
<b>N° medio alleli/locus</b>	2.63	2.44	2.25	3.31	1.38	4.56	2.94
<b>Allelic richness medio</b>	1.99	1.85	1.98	2.22	1.47	2.74	2.20
<b><i>Polymorphism Information Content</i> medio</b>	0.31	0.26	0.26	0.35	0.12	0.43	0.34

La scelta di selezionare un numero prevalente di microsatelliti a motivo di-nucleotidico si è rilevata tutto sommato vincente, in quanto quasi la metà (7) dei 16 loci risultati polimorfici è di questo tipo e senza dubbio i microsatelliti di-nucleotidici sono anche quelli con maggiore numero di alleli e potere risolutivo. Di contro, l'impiego di questo tipo di ripetizione estremamente corta ha richiesto uno sforzo molto maggiore nell'assicurare una corretta

interpretazione del segnale di genotipizzazione.

Oltre alle stime dei vari indici di diversità genetica, sono stati eseguiti, sui dati di genotipizzazione suddivisi per area di origine, dei test di *Linkage Disequilibrium* (LD) e dell'equilibrio di Hardy-Wienberg (HW). Loci che sono in *Linkage Disequilibrium* dovrebbero infatti essere scartati perché le statistiche impiegate nelle analisi di parentela tipicamente assumono l'indipendenza tra loci (Devlin *et al.*, 1988; Jones & Ardren, 2003). Nel test LD eseguito sono emerse diverse coppie di loci con evidenze di associazione non casuale tra gli alleli. Tuttavia, questi risultati indicherebbero che le coppie di loci in questione siano associate solamente in una, o in un caso due, delle regioni geografiche campionate (Penisola araba, Vietnam e Malesia). Questo ridimensiona molto l'attendibilità di simili risultati, in quanto è inverosimile che due regioni genomiche siano associate e trasmesse insieme solo in alcune popolazioni di una specie. È ben documentato tuttavia che il *Linkage disequilibrium* può anche verificarsi come risultato della deriva genetica casuale all'interno di singole popolazioni (Hill & Robertson, 1968; Ohta & Kimura, 1969a, 1969b; Hill, 1975), in popolazioni suddivise (Nei & Li, 1973; Li & Nei, 1974; Christiansen, 1989; Ohta, 1982) e per effetto del fondatore (Avery & Hill, 1979). Quest'ultima causa potrebbe essere particolarmente plausibile per i campioni della Penisola araba, per i quali sono emerse tra l'altro alcune evidenze di eventi di colonizzazione multipla (vedi par 3.2.2).

Il test HW viene invece normalmente eseguito poiché la presenza di frequenze genotipiche in equilibrio è una forte indicazione a favore di un *data set* robusto e privo di errori di genotipizzazione (van Oosterhout *et al.*, 2004), per quanto il verificarsi dei vari assunti previsti dall'equilibrio HW all'interno di popolazioni naturali venga spesso meno, e per molte delle regioni geografiche analizzate non sia possibile considerare gli individui a disposizione come un campione rappresentativo della popolazione di origine. Di conseguenza, l'assenza di equilibrio di Hardy-Wienberg in alcune regioni e su alcuni loci non deve essere interpretata come particolarmente allarmante. Dopo un'accurata revisione dei dati di genotipizzazione, e alla luce dell'analisi eseguita con il *software* MICRO-CHECKER (par. 3.1.6, capitolo 3), lo scostamento dall'equilibrio HW nella Penisola arabica, in Vietnam ed in Malesia per i loci RPW02 ed RPW03 potrebbe essere imputabile ad alleli nulli che non è stato possibile individuare, ma la cui presenza è stata già fortemente suggerita, almeno per quanto riguarda il campione vietnamita, dai confronti fatti tra genotipi attesi e osservati nella progenie degli incroci. Diversamente, per i loci RPW06 ed RPW38, se si analizzano attentamente i genotipi nelle popolazioni non in equilibrio, si nota che l'elevato numero di alleli presenti in questi microsatelliti, rapportato alla numerosità del campione analizzato, potrebbe produrre per alcuni di essi frequenze particolarmente basse



per semplice effetto di un *bias* di campionamento legato al caso. Per il locus RPW39, lo scostamento dall'equilibrio sembrerebbe invece attribuibile più ad una combinazione di questi due fattori. Il fenomeno degli alleli nulli potrebbe inoltre essere più consistente nei campioni vietnamiti e malesi a causa del fatto che i *primer* impiegati per l'amplificazione dei microsatelliti sono stati originariamente disegnati su sequenze dell'individuo italiano utilizzato per il pirosequenziamento, per cui non si può escludere la presenza, in popolazioni geograficamente distanti dall'Italia, di mutazioni nelle regioni di appaiamento dei *primer*, che causano una ridotta efficienza di amplificazione e quindi più frequenti alleli nulli.

Per quanto riguarda la Penisola arabica, va inoltre considerato che, se fossero verificate le ipotesi sugli eventi di colonizzazione multipla e sul ruolo di “testa di ponte” della regione nelle rotte di invasione del Punteruolo rosso verso il bacino del Mediterraneo, questi fattori potrebbero certamente avere un forte peso sulle frequenze alleliche delle popolazioni arabe e quindi sugli scostamenti dall'equilibrio HW osservati.

### 4.3. Analisi di paternità su esperimenti di incrocio programmati

Lo scopo generale di questo progetto di dottorato era di indagare la presenza di poliandria e di mettere in luce eventuali fenomeni di selezione sessuale post-copulatoria nella specie *Rhynchophorus ferrugineus*. I risultati degli esperimenti di accoppiamento multiplo, per quanto richiederebbero di essere validati da un maggior numero di repliche, indicano in modo molto chiaro la presenza di un meccanismo di selezione post-copula che, alla luce delle ricerche fin qui condotte, sembrerebbe plausibile attribuire a fenomeni di precedenza spermatica dell'ultimo maschio, documentati peraltro in un grande numero di insetti (Gwynne, 2012; Parker, 1984). Queste evidenze aprono la strada a svariati possibili temi di ricerca, in quanto impongono di rispondere a diversi quesiti sul *mating system* della specie. Innanzitutto, sarebbe opportuno verificare se il meccanismo di *last male sperm precedence* osservato sia valido anche quando il numero di accoppiamenti aumenta. Come accennato nel capitolo introduttivo, infatti, questo fattore può incidere sulle modalità di utilizzo dello sperma determinando che la precedenza dell'ultimo maschio si manifesti in modo discontinuo (Zeh & Zeh, 1994). In secondo luogo, sebbene i risultati di questo lavoro mettano in evidenza un fenomeno di selezione sessuale basato sull'ordine di accoppiamento, non è possibile avanzare ipotesi concrete circa il meccanismo che lo controlla senza studi più approfonditi. I valori  $P_2$  (proporzione di progenie figlia del secondo maschio) sono risultati molto elevati in entrambe le repliche, ossia rispettivamente pari a 1.00 e a 0.98, ad indicare una precedenza dell'ultimo maschio estremamente marcata, e quindi attribuibile ad uno o più meccanismi certamente ben controllati e precisi. Sarebbe quindi interessante cercare di stabilire se la precedenza del secondo maschio sia il risultato della competizione spermatica dei maschi, o derivi da una forma di scelta criptica operata dalla femmina. Esistono infatti diverse strategie attraverso le quali un maschio può impedire che i contributi spermatici di accoppiamenti precedenti al suo vengano utilizzati per la fecondazione (paragrafo 1.3.2.1), ma non si può escludere che nei due esperimenti compiuti sia stata la femmina a dettare le regole del gioco, e che magari il secondo maschio incontrato fosse entrambe le volte quello reputato di qualità migliore per puro caso. Tuttavia, è possibile riflettere su alcune considerazioni e quantomeno individuare i meccanismi di selezione sessuale post-copula meno probabili nel sistema nuziale del Punteruolo rosso, alla luce di quanto emerso.

I valori  $P_2$  estremamente alti farebbero ad esempio escludere una strategia di competizione spermatica basata sulla semplice diluizione dello sperma eterologo mediante il trasferimento di grosse quantità di eiaculato. In questo caso, infatti, il contributo del primo maschio dovrebbe

comunque concretizzarsi in una certa proporzione, seppur ridotta, di prole attribuibile ad esso, mentre in uno solo degli esperimenti sono stati individuati appena due figli del primo *partner*. In ogni modo, studi sul volume di eiaculato trasferito durante accoppiamenti multipli e non, ed osservazioni minuziose dell'atto copulatorio, potrebbero essere utili a vagliare l'ipotesi, più verosimile, di una forma di rimozione fisica dello sperma, basata piuttosto sul risciacquo, ossia sul provocare la fuoriuscita dello sperma eterologo mediante grandi volumi di eiaculato. Dato il successo dello strumento di caratterizzazione genetica messo a punto in questo lavoro, sarebbe inoltre estremamente interessante riuscire ad estrarre il DNA dallo sperma contenuto nella spermateca di femmine accoppiatesi più volte, in modo da usare la genotipizzazione di microsatelliti per stabilire se il contributo di alcuni maschi sia stato eliminato prima della fecondazione delle uova, o se al termine del periodo di ovideposizione permanga nella spermateca lo sperma inutilizzato.

Un altro aspetto molto interessante dei risultati delle analisi di paternità su cui riflettere, è che nel terzo esperimento le uniche due larve attribuibili al primo accoppiamento risultano da uova deposte rispettivamente dopo 5 e 18 giorni dalla copula, quindi all'interno di ovature ben distinte. Questo suggerisce che alcuni spermatozoi del maschio sfavorito sono stati in grado di restare vitali all'interno della spermateca per un periodo molto lungo. Di conseguenza, nell'ipotesi di una competizione spermatica, è meno probabile che la strategia di esclusione del maschio precedente sia particolarmente invasiva e distruttiva, come lo è ad esempio la rimozione meccanica. È inoltre poco probabile che una forma di rimozione meccanica sia talmente rapida e criptica da non essere mai stata notata durante le numerose osservazioni di accoppiamenti in cattività condotte sia dal nostro gruppo di ricerca che da altri (Inghilesi *et al.*, 2014; 2015). Se invece la precedenza fosse data da un meccanismo di stratificazione dello sperma all'interno dell'organo di immagazzinamento femminile, sarebbe difficile spiegare come un rimescolamento accidentale, che normalmente avviene in funzione del tempo trascorso dalla copula (Siva-Jothy & Tsubaki, 1989; 1994), sia avvenuto anche dopo solo 5 giorni, specialmente se si pensa che solamente 2 uova su 125, che rappresentano la quasi totalità delle uova vitali deposte (132), siano state fecondate dallo sperma immagazzinato per primo. Ipotizzando un meccanismo di stratificazione per un insetto con un periodo di deposizione delle uova di diverse settimane come il Punteruolo rosso, ci si dovrebbe infatti aspettare che la precedenza dell'ultimo maschio si indebolisca col trascorrere del tempo e che venga fecondato con spermatozoi degli accoppiamenti precedenti un numero di uova via via crescente man mano che ci si avvicina al termine dell'ovideposizione. Purtroppo, non è stato possibile reperire in bibliografia informazioni circa la forma della

spermateca di *R. ferrugineus*, che potrebbe fornire ulteriori indicazioni sull'eventuale responsabilità di un sistema di stratificazione nella precedenza spermatica. È stato infatti dimostrato che spermateche di forma allungata favoriscono la stratificazione dello sperma rispetto a quelle di forma tondeggiante (Walker, 1980). Va ricordato inoltre che, tenendo conto dell'esistenza di meccanismi di impiego sequenziale degli eiaculati, per cui è possibile che il primo sperma introdotto nella spermatica sia l'ultimo ad essere utilizzato, è stato di fondamentale importanza, nel corso degli esperimenti, accertarsi che le femmine avessero concluso la fertilizzazione e deposizione delle uova. A tale scopo, la raccolta della progenie è stata interrotta solo dopo diversi giorni nei quali veniva registrata la sola produzione di poche uova non vitali, e quindi non fecondate, potendo così assumere che le femmine avessero esaurito la riserva di spermatozoi, o perlomeno di quelli che avevano intenzione di impiegare.

Sono inoltre da prendere in considerazione le strategie di competizione spermatica su base chimica, che per questa specie non si possono certo escludere, per quanto richiederebbero studi mirati di tipo fisiologico e biochimico. Nulla si sa infatti sulla possibilità che i maschi del Punteruolo rosso trasferiscano alle femmine, mediante lo sperma, sostanze in grado di annientare gli spermatozoi di competitori precedenti, o di indurne l'espulsione (Otronen & Siva-Jothy, 1991). Analogamente, risulta molto difficile anche esplorare l'ipotesi di una scelta criptica femminile, per quanto il disegno sperimentale degli incroci condotti fornisce già alcune indicazioni sul fatto che una eventuale selezione della femmina non sembrerebbe guidata dalla somiglianza genetica (Bretman *et al.*, 2004; Jehle *et al.*, 2007; Mack *et al.*, 2002; Olsson *et al.*, 1996; Pusey & Wolf, 1996; Simmons *et al.*, 2006; Stockley, 1999; Thuman & Griffith, 2005). Le femmine dei due esperimenti di accoppiamento multiplo avrebbero infatti “scelto” di riprodursi in un caso con un maschio molto simile e appartenente alla stessa popolazione, e nell'altro con uno proveniente da un pool genetico ben differenziato e da un'area geografica molto distante. Come già accennato, resta tuttavia la possibilità di una selezione femminile basata piuttosto sulla qualità genetica o fenotipica del maschio, che potrebbe essere risultata entrambe le volte maggiore nell'ultimo *partner* incontrato solo per effetto del caso.

Sicuramente i nostri risultati e le osservazioni compiute sia in laboratorio che in natura sulla tendenza di questa specie ad effettuare accoppiamenti multipli (Inghilesi *et al.*, 2014; 2015) sono in linea con le conclusioni di Ridley (1989) secondo cui nelle specie in cui si verifica *last male sperm precedence* è selezionata una maggiore frequenza di accoppiamento.

Inoltre, nel considerare la presenza di due eccezioni nella precedenza dell'ultimo maschio osservata nei nostri esperimenti, va senza dubbio tenuto presente che si sta studiando un

fenomeno biologico soggetto ad imperfezioni. La struttura dell'apparato riproduttore femminile non è certo un sistema di comparti stagni, e le strategie di competizione spermatica possono occasionalmente fallire, anche perché la loro efficienza dipende dalla variabilità intraspecifica tra un individuo e l'altro. Se si pensa quindi che solamente due spermatozoi (o poco più) sono sfuggiti al meccanismo di selezione che evidentemente si è evoluto in questa specie, appare chiaro come tale meccanismo sia estremamente sofisticato ed efficace.

La tabella 4.3. pone l'accento su come i marcatori genetici impiegati per le analisi di paternità siano stati selezionati in maniera mirata per ottenere la maggiore capacità diagnostica nell'ambito di ciascun incrocio. Essi sono infatti stati scelti non sulla base del loro potere risolutivo complessivo (calcolabile tramite il livello di polimorfismo all'interno della popolazione di riferimento ed esprimibile mediante indici statistici quali il PIC o la ricchezza allelica), ma analizzando la condivisione di alleli tra i genotipi specifici degli individui coinvolti negli accoppiamenti, in modo che fosse massimo il differenziamento atteso nella potenziale progenie del primo e del secondo maschio. Il motivo del generale aumento del tasso di assegnazione ottenuto rispetto all'atteso sta dunque nel fatto che i loci da studiare sono stati scelti non per il loro potere risolutivo assoluto nell'ambito dell'intera popolazione, ma sulla base della conoscenza preliminare dei genotipi degli individui coinvolti negli incroci. Questa strategia ha quindi permesso di incrementare considerevolmente il tasso di successo nell'attribuzione della parentela, consentendo inoltre di analizzare un numero esiguo di marcatori con il massimo dei risultati.

**Tab. 4.3.** Selezione dei marcatori microsattelliti sulla base del loro potere diagnostico nell'ambito di ciascun esperimento di accoppiamento multiplo

*Selection of microsatellite markers based on their diagnostic power within each multiple mating experiment*

Locus	Esperimento n°1						Esperimento n°2					
	Femmina		Maschio n°1		Maschio n°2		Femmina		Maschio n°1		Maschio n°2	
RPW02	300	300	300	300	292	292	300	300	304	312	300	300
RPW03	-	-	214	214	214	214	-	-	212	214	212	214
RPW06	94	96	78	78	90	100	78	98	98	98	78	98
RPW11	158	161	161	161	158	164	161	161	158	158	158	161
RPW13	-	-	172	172	172	172	-	-	172	172	172	172
RPW16	-	-	226	229	226	226	226	226	226	226	226	229
RPW17	-	-	222	222	219	222	222	222	219	222	222	222
RPW20	-	-	82	86	86	86	82	86	86	86	82	86
RPW22	-	-	159	163	159	159	163	163	159	163	163	163
RPW24	-	-	95	95	95	95	-	-	95	95	95	95
RPW25	-	-	99	99	99	99	-	-	99	99	99	99
RPW26	-	-	140	140	132	140	-	-	140	140	140	140
RPW32	218	218	238	238	218	218	218	238	218	236	218	238
RPW36	-	-	143	145	145	145	143	143	143	145	145	145
P1A3	184	204	192	204	184	184	192	204	184	184	206	206
P4C2	-	-	157	163	157	157	161	163	163	165	157	163

- Loci totalmente diagnostici: nessun allele condiviso tra i maschi e tra la femmina ed entrambi i maschi
- Loci parzialmente diagnostici: un allele condiviso tra i maschi e/o tra la femmina ed uno di loro
- Loci non diagnostici: i maschi condividono lo stesso genotipo
- Locus non genotipizzato perché escluso dalle analisi successive

I numeri sono riferiti alle dimensioni degli alleli in bp

Nel complesso è possibile affermare che gli incroci n°1 e 2 sono da considerarsi come repliche piuttosto simili tra loro di uno stesso disegno sperimentale. Il successo riproduttivo delle due femmine coinvolte è risultato infatti assolutamente comparabile, in termini di durata del periodo di ovideposizione e numero di ovature, numero totale di uova deposte e percentuale di schiusa (tabella 4.4). Questi parametri appaiono inoltre in linea con quelli riportati in alcuni studi inerenti l'allevamento del Punteruolo rosso in condizioni di laboratorio simili alle nostre (Cristofaro *et al.*, 2010; 2013). Va infatti ricordato, come già menzionato nel paragrafo 1.1.5, che sono presenti in letteratura stime dei parametri del ciclo vitale e riproduttivo di questa specie estremamente variabili ed eterogenee, e che tali misure rispecchiano in larga parte un'accentuata variabilità di *R. ferrugineus* nella risposta a condizioni di allevamento diverse (principalmente temperatura, umidità, fotoperiodo, dieta o pianta ospite), come evidenziato dal lavoro di Dembilio e Jacas (2011).

**Tab. 4.4.** Parametri del successo riproduttivo degli esperimenti n°1 e n°2  
*Reproductive success parameters of experiments n°1 and n°2*

	Esperimento n°1	Esperimento n°2
Periodo di ovideposizione (giorni)	29	28
N° di ovature	14	17
N° di uova deposte	175	198
N° di uova schiuse (%)	127 (72.6%)	132 (66.7%)
N° di uova sopravvissute (%)	81 (63.8%)	125 (94.7%)

Va considerato che i due esperimenti di accoppiamento multiplo differiscono, volutamente, nell'ordine in cui il maschio italiano e quello vietnamita sono stati offerti alla femmina. Nell'incrocio n°1, infatti, il secondo maschio, ossia quello che ha inseminato la totalità delle uova che hanno dato prole vitale, era di origine vietnamita, mentre nell'esperimento n°2 il secondo maschio, risultato il padre del 98.4% della prole analizzata, era di origine italiana. Il motivo di questa variazione nel disegno sperimentale dei due incroci sta nel tentativo di cogliere eventuali differenze nel successo riproduttivo legate non all'ordine con cui sono avvenute le copule, ma al fatto che le femmine (sempre italiane) hanno avuto modo di accoppiarsi sia con un *partner* dal *pool* genico molto simile (anch'esso italiano), sia con uno proveniente da una popolazione geneticamente ben differenziata dalla propria (quella vietnamita). Durante gli esperimenti sono stati per questo monitorati i tempi trascorsi tra l'introduzione del maschio nella gabbia e l'accoppiamento (attribuibili alla fase di corteggiamento) e quelli di durata della copula. I tempi misurati, mostrati nella tabella 4.5, sono risultati piuttosto variabili e non sono state riscontrate differenze evidenti nel comportamento dei maschi vietnamiti e italiani, o nella propensione delle femmine ad accettare gli uni o gli altri. Non sono inoltre evidenti differenze nei tempi impiegati tra primo e secondo maschio.

**Tab. 4.5.** Durata delle fasi di corteggiamento e delle copule negli esperimenti n°1 e 2  
*Duration of courtship and copula during experiments n°1 and n°2*

	Tempo pre-copula (min.)		Durata copula (min.)	
	Esperimento n°1	Esperimento n°2	Esperimento n°1	Esperimento n°2
Maschio n°1	6	9	2	5
Maschio n°2	1	4+7+7	2	1+1+1

In azzurro è evidenziato il maschio italiano ed in arancione quello vietnamita.

Sebbene non siano state riscontrate differenze significative tra i due esperimenti legate all'origine dei maschi nelle tempistiche degli accoppiamenti, non è tuttavia possibile escludere l'ipotesi che una eventuale incompatibilità genetica tra popolazioni invasive italiane e popolazioni indigene vietnamite si sia tradotta nell'elevata mortalità larvale dell'esperimento n°1 (36.2%). Se infatti assumiamo che in questa specie esista un meccanismo di precedenza spermatica dell'ultimo maschio, potrebbe essere verosimile che nell'incrocio n°1, dove è prevalso lo sperma del maschio vietnamita, una percentuale consistente della prole avesse una *fitness* ridotta legata ad incompatibilità genetica dei genitori, per cui è morta prematuramente e costituisce una forte componente del tasso di mortalità osservato. Al contrario, è altrettanto verosimile che nell'esperimento n°2, dove il maschio vietnamita è stato quasi interamente escluso dalla fecondazione delle uova perché era il primo *partner*, la mortalità larvale nei primi giorni di vita (5.3%) rientri perfettamente nei valori di normalità per un incrocio tra individui della stessa popolazione, considerando anche il contesto artificiale di allevamento.

La differenza di mortalità larvale nei due esperimenti potrebbe tuttavia essere interpretata in modo diverso. In prima battuta, infatti, era stata ipotizzata la presenza di sostanze nocive all'interno delle mele impiegate come dieta sostitutiva, verosimilmente legate all'uso di pesticidi durante le pratiche agricole e accumulate poi nel frutto. L'evidenza indiretta che ha suggerito la presenza di tali composti è data dalla marcata inibizione della reazione a catena della polimerasi (PCR), che è stata osservata solamente su campioni di larve da allevamento (paragrafo 2.2.1) e non su quelle catturate in natura. Di conseguenza, si è scelto di allevare le larve dell'esperimento n°2 per un tempo molto inferiore (2-3 giorni, anziché 1-2 settimane impiegate per l'incrocio n°1), ossia il minimo necessario a raggiungere una massa di tessuto sufficiente all'estrazione del DNA, per ridurre l'accumulo di questi putativi inibitori della PCR nel campione di DNA genomico. Ovviamente sarebbe stato possibile tentare di risolvere il problema anche impiegando mele da coltivazione biologica, ma per motivi logistici ed economici è risultato più opportuno ricorrere a questa strategia e all'impiego, in fase di amplificazione, di un reagente particolare che attenua gli effetti negativi di possibili inibitori della PCR, coadiuvando l'attività polimerasica (BSA, Bovine Serum Albumin). Questo ha reso tuttavia i tassi di sopravvivenza post-natale dei due esperimenti, calcolati come la proporzione di larve vive (al momento in cui sono state sacrificate per la caratterizzazione genetica) su quelle nate, non comparabili, in quanto riferiti a durate della vita delle larve completamente diverse. Una stima della reale mortalità della progenie delle due



femmine legata solamente alla loro *fitness* non sarebbe stata peraltro attendibile, dato il sospetto della presenza di sostanze tossiche nella dieta delle larve.

Queste ipotesi andrebbero senza dubbio verificate con ulteriori esperimenti di incrocio e allevamento delle larve. È da notare però che, negli esperimenti qui condotti, le percentuali di schiusa delle uova sono molto simili ed, anzi, maggiori nell'incrocio n°1. Se fosse vera l'ipotesi di incompatibilità genetica legata alla diversa origine geografica, sarebbe quindi interessante indagare sul fatto che la riduzione di *fitness* legata al fenomeno sembra riguardare la vitalità dello stadio larvale ma non quella dello stadio precedente di uovo. In ogni caso, il verificarsi di un simile fenomeno non interferisce con quelli che sono gli obiettivi primari di questo studio, ossia indagare la presenza di meccanismi di selezione sessuale post-copula.

Va comunque tenuto presente che, anche nella prole dell'esperimento n°1, è possibile che una ridottissima proporzione di larve fosse attribuibile al primo maschio e che la loro elevata mortalità abbia impedito di analizzarle ed individuarle. In ogni caso, il campionamento della progenie di entrambi gli incroci è avvenuto in maniera assolutamente uniforme lungo tutto il periodo di ovideposizione, così come è apparsa uniformemente distribuita nel tempo anche la mortalità larvale. Ciò ha consentito di analizzare esemplari appartenenti a tutte le ovature registrate ed è possibile affermare con buona fiducia che nell'esperimento n°1, se anche tra le larve morte per fattori esterni fossero state presenti delle figlie del primo maschio accoppiato, queste avrebbero certamente rappresentato una minima proporzione rispetto a quelle attribuite al secondo maschio, come riscontrato anche nell'esperimento n°2, dove solo sette larve tra quelle nate non sono state analizzate perché morte molto prematuramente.

L'ipotesi sulla presenza di precedenza spermatica dell'ultimo maschio in *R. ferrugineus* è supportata anche da alcuni recenti studi che sono stati condotti dal gruppo di ricerca del centro ENEA La Casaccia, col quale abbiamo collaborato ad uno studio preliminare sulla fattibilità di applicazione della Tecnica dell'Insetto Sterile (SIT), nell'ambito di un programma *area wide* per il controllo del Punteruolo (Cristofaro *et al.*, 2011). Questi esperimenti hanno infatti verificato che, quando una femmina di Punteruolo rosso si accoppia prima con un maschio sterilizzato artificialmente tramite raggi gamma e poi con uno selvatico, essa produce normalmente prole vitale, mentre quando si accoppia prima con un maschio fertile e poi con uno sterile depone uova che non schiudono (Musmeci *et al.*, 2014). Nel corso di questi studi è stato inoltre comparato il tasso di ovideposizione delle femmine accoppiate secondo i due schemi con quello di femmine vergini, che depongono fisiologicamente un numero di uova non vitali, sensibilmente inferiore

rispetto a quello di femmine inseminate. Tale confronto ha mostrato in maniera interessante che in entrambe le combinazioni di accoppiamento con maschi sterili e non era avvenuta una stimolazione alla produzione (e probabilmente fecondazione) delle uova. Questo suggerisce nuovamente che la femmina impieghi per fertilizzare le uova solo lo sperma ricevuto per ultimo, anche quando questo non è vitale come nel caso dei maschi sterilizzati. Si indebolisce di conseguenza l'ipotesi che le femmine della specie siano in grado di valutare preventivamente la qualità degli spermatozoi ed operare una scelta criptica su queste basi, mentre resta percorribile l'ipotesi alternativa che la selezione sia guidata da caratteri fenotipici maschili.

Uno dei possibili scopi applicativi di questo progetto di dottorato era quello di contribuire alla conoscenza della biologia riproduttiva di *R. ferrugineus* con nozioni che possano essere impiegate per valutare l'efficacia di azioni di controllo del Punteruolo, mirate appunto ad attaccarne l'enorme successo riproduttivo. Tra queste vi è senza dubbio la strategia SIT, che tuttavia presenta diversi aspetti problematici per l'applicazione su questa specie dannosa, legati al presunto comportamento poliandrico delle femmine e al comportamento gregario e criptico dell'insetto. I risultati di questo lavoro e del gruppo del centro ENEA offrono però spunti interessanti di dibattito e suggeriscono un approfondimento degli studi, in quanto il rilascio di un adeguato numero di maschi sterili potrebbe ugualmente impedire la fecondazione di una buona percentuale delle femmine, anche nel caso in cui queste si siano precedentemente accoppiate con maschi selvatici (Cristofaro *et al.*, 2012). Va sottolineato anche che le ricerche condotte presso l'ENEA hanno permesso di mettere a punto un protocollo di allevamento e irraggiamento con raggi gamma che produce maschi sterili del tutto simili a quelli selvatici per morfologia e comportamento riproduttivo (Musmeci *et al.*, 2014).

Una delle obiezioni più frequenti che vengono fatte agli studi sul sistema di accoppiamento di una specie effettuati in condizioni di cattività è che queste ultime possono alterare fortemente il comportamento riproduttivo, falsando i risultati. Questo lavoro si pone tuttavia come un primo contributo alla comprensione dei meccanismi di selezione sessuale nel Punteruolo rosso, e ha come scopo fondamentale quello di verificare l'esistenza e la possibilità di fenomeni come la competizione spermatica e la scelta criptica femminile nella specie. Per quanto ci si possa aspettare che in condizioni naturali le dinamiche del corteggiamento e della copula possano essere diverse da quelle che avvengono all'interno di una gabbia tra individui allevati in laboratorio e isolati da un contesto sociale, va sottolineato che la tendenza ad accoppiamenti multipli nelle femmine di Punteruolo è un fatto che è stato osservato ampiamente sia in cattività

che in natura (Inghilesi *et al.*, 2014; 2015). Partendo da questo presupposto, ciò che si voleva comprovare era la presenza effettiva di una strategia poliandrica, ossia capire se un tale comportamento promiscuo si traduce in una prole attribuibile a più padri. Certamente i risultati ottenuti richiedono ulteriori conferme e sarebbe interessante un riscontro con situazioni naturali.

#### **4.4. Simulazioni e *power analysis* dei loci microsatelliti sviluppati in vista di prospettive future di ricerca**

Uno degli scopi aggiuntivi di questo studio era di indagare il potere risolutivo del pannello di loci microsatelliti messo a punto, nell'ottica di impiegarlo per future ricerche di approfondimento sul sistema nuziale del Punteruolo rosso. Nello specifico, l'idea era quella di valutare la fattibilità dell'uso dei microsatelliti come strumenti per analisi di paternità, condotte su due tipi di progenie: da esperimenti di laboratorio analoghi a quelli già effettuati, ma con un numero superiore di maschi coinvolti, e da femmine accoppiatesi in condizioni selvatiche e fortuitamente campionate in natura già gravide. Questo secondo scenario permetterebbe infatti di confrontare i risultati ottenuti in cattività con quelli in condizioni naturali, prevedendo un campionamento massivo degli individui adulti di una o più colonie, volto a catturare sia un certo numero di femmine casualmente già fecondate, sia la maggiore quantità possibile di maschi potenzialmente candidati ad essere i padri della loro progenie, la quale verrebbe poi allevata in laboratorio e analizzata per le attribuzioni di paternità. È stato a tal fine ipotizzato di condurre le ricerche future su campioni italiani, sia per motivi logistici di reperibilità degli esemplari, sia per l'interesse di studiare più nel dettaglio le dinamiche del sistema di accoppiamento del Punteruolo nel contesto di popolazioni invasive, e quindi potenzialmente soggette a condizioni climatiche e demografiche diverse da quelle dell'areale di origine. Di conseguenza, le simulazioni sono state basate sui dati genotipici del campione italiano a nostra disposizione, in modo da poter valutare precisamente quanto la bassa variabilità genetica riscontrata in ambito mediterraneo potesse costituire un limite per la risoluzione delle attribuzioni di paternità.

Considerando che nell'esperimento di accoppiamento multiplo n°2 è emerso un contributo del primo maschio accoppiato estremamente ridotto (circa del 1.6%) e che ci si potrebbe aspettare che il fenomeno ricompaia con una simile entità anche in futuro, è da assumere che il disegno sperimentale di ulteriori ricerche dovrebbe prevedere solamente scenari di accoppiamento con un tasso di assegnazione di paternità atteso quanto possibile prossimo al 100%. Se così non fosse, infatti, sarebbe alta la probabilità di non rilevare contributi paterni secondari di piccola entità.

Le simulazioni riguardanti esperimenti di incrocio via via più complessi suggeriscono che, usando l'intero pannello dei 13 microsatelliti che sono risultati polimorfici in Italia, si otterrebbe un tasso di assegnazione ottimale anche se la femmina si accoppiasse con fino ad 8 maschi diversi. Questo risultato apre le prospettive a tutta una serie di possibili esperimenti di incrocio in laboratorio che permetterebbero di studiare più a fondo i fenomeni di selezione post-copula e più in generale il *mating system* della specie. Sarebbe infatti interessante in prima battuta verificare se i meccanismi di utilizzo dello sperma mantengono la priorità dell'ultimo maschio anche

offrendo alla femmina un numero crescente di maschi in successione, in modo da avere tutti maschi diversi lungo la linea temporale di accoppiamento. Ma sarebbe ancora più utile creare delle arene nelle quali siano presenti contemporaneamente più maschi, in modo che i *partner* sessuali siano più liberi nelle dinamiche di accoppiamento e a quel punto cercare di correlare fattori come la frequenza, la durata, la sequenza ed il numero di accoppiamenti con il successo riproduttivo dei vari maschi. È ovvio come le variabili in gioco siano numerose, date anche le scarse conoscenze su questi aspetti del sistema nuziale del Punteruolo rosso. Il contesto controllato dell'incrocio in laboratorio, avendo in mano uno strumento di diagnosi relativamente rapido come quello dei microsatelliti qui sviluppati, potrebbe offrire in tal senso delle valide opportunità di indagine, dato che il disegno sperimentale degli accoppiamenti potrebbe essere variato secondo un gran numero di schemi, che permetterebbero di studiare in modo sistematico singoli fattori o combinazioni di essi.

La seconda serie di simulazioni, ossia quelle di analisi di paternità nel contesto di accoppiamenti avvenuti in natura, ma con madre nota, ha confermato i sospetti preesistenti sulle criticità di un simile tipo di esperimento. Le due variabili analizzate, ossia il numero di padri potenziali e la proporzione con cui si stima di poterli campionare in natura, incidono infatti pesantemente sui tassi di assegnazione di paternità attesi, non consentendo di ipotizzare il raggiungimento di risultati attendibili. Questi risultati suggeriscono fortemente che la variabilità genetica presente nelle popolazioni italiane, analogamente a quella riscontrata in Grecia e in Spagna, sia troppo bassa affinché un pannello di microsatelliti come quello impiegato abbia un potere risolutivo sufficiente a distinguere tra loro, con una buona confidenza statistica e nelle condizioni ipotizzate, i figli di diversi maschi della stessa popolazione.

Va precisato che, per compiere queste simulazioni, non è stata impiegata una stima esatta del numero di potenziali padri riscontrabili in natura. Il motivo è che non esistono ancora ad oggi studi specifici di tipo popolazionistico su *R. ferrugineus*, ed in particolare su quelle che potrebbero essere le dimensioni effettive delle sue popolazioni. Le simulazioni condotte considerando un numero di potenziali candidati paterni compreso tra 5 e 40 avevano carattere del tutto esplorativo e si basano per lo più sull'esperienza di osservazioni delle dimensioni di colonie del fitofago effettuate in campo nel corso di abbattimenti di palme infestate (Cristofaro *et al.*, 2010). Tra l'altro, è molto probabile che il numero di maschi fertili e in età riproduttiva che una femmina potrebbe potenzialmente incontrare in condizioni naturali (o comunque che verrebbero catturati in una popolazione) sia maggiore di quelli presi in considerazione ma, visti i risultati scoraggianti di questa serie di simulazioni, è apparso inutile condurne di più approfondite e con un maggior numero di padri potenziali.

## Capitolo 5

### Conclusioni

L'obiettivo fondamentale di questo progetto di dottorato era di indagare alcuni aspetti del sistema nuziale della specie invasiva *Rhynchophorus ferrugineus*, ritenuti importanti per una conoscenza più approfondita della biologia di questo organismo nocivo, specialmente nell'ottica di fornire un contributo all'individuazione di strategie di controllo ed eradicazione efficaci. Uno dei principali fattori responsabili dell'enorme e rapida diffusione dell'insetto in Medio Oriente ed in tutto il bacino del Mediterraneo negli ultimi trent'anni, è infatti il suo elevato successo riproduttivo, ma sono finora scarse le informazioni sul *mating system* che potrebbero rivelarsi utili a progettare interventi mirati a colpire nello specifico il tasso di accrescimento delle sue popolazioni.

Il presente lavoro ha permesso di mettere in luce forti evidenze a favore dell'esistenza in questa specie di una forma di selezione sessuale che si attua dopo la copula, probabilmente attraverso uno o più meccanismi di competizione spermatica operata dai maschi, o forse mediante un qualche tipo di controllo sulla fecondazione delle uova mediato cripticamente dalle femmine.

Mediante dei test di paternità condotti sulla prole di esperimenti di incrocio programmati, in cui le femmine hanno copulato in sequenza con due *partner* distinti ed erano noti i genotipi della madre e dei potenziali padri, è emerso infatti che le uova sono state quasi esclusivamente fecondate dall'ultimo maschio con cui le femmine si erano accoppiate (valore  $P_2$  medio =99.2%). Questo risultato, per quanto necessita di un maggior numero di repliche dell'esperimento e di ulteriori approfondimenti, suggerisce la presenza in questa specie di un fenomeno ben noto nel mondo degli insetti (e non solo) col nome di *last male sperm precedence*. Questo fenomeno, qualora venisse confermato, è sicuramente un fattore che dovrebbe essere attentamente preso in considerazione nella valutazione dell'eventuale efficacia di interventi di controllo biologico come la Tecnica dell'Insetto Sterile, che mira ad abbattere i tassi di natalità mediante accoppiamenti con maschi sterilizzati. Se da un lato infatti un comportamento poliandrico appare come un elemento di forte criticità per l'impiego di questa strategia (Whitten & Mahon, 2005), la presenza di *last male sperm precedence* potrebbe suggerire la possibilità di ottenere buoni risultati aumentando la probabilità che l'ultimo maschio con cui si accoppiano le femmine sia uno di quelli sterilizzati, agendo ad esempio in modo oculato su una maggiore proporzione tra maschi sterili rilasciati in natura e maschi fertili selvatici (Cristofaro *et al.*, 2012). La fattibilità di tali interventi richiede ovviamente attente valutazioni, che comprendono tra l'altro il contesto territoriale (e non solo) sul quale si intende agire, particolarmente in termini di distribuzione

spaziale delle palme, dimensioni e livello di isolamento dell'area geografica considerata (Musmeci *et al.*, 2014). La presenza di precedenza spermatica dell'ultimo maschio porta inoltre con sé numerose implicazioni, legate in particolare all'evoluzione della poliandria, che sarebbe interessante approfondire in futuro con ulteriori ricerche.

Nell'ambito di questo progetto è stato inoltre sviluppato *ex novo* un pannello di marcatori microsatelliti polimorfici, specifici per *R. ferrugineus*. A questo scopo, è stata impiegata con successo una strategia innovativa per l'isolamento dei loci di interesse, che accoppia analisi molecolari e bioinformatiche. Tale approccio ha previsto tra l'altro la creazione di una libreria genomica di notevoli dimensioni, mediante un pirosequenziamento 454, che potrà costituire un contributo alla conoscenza del genoma della specie e alla messa a punto di numerosi altri marcatori genetici.

Nel corso della valutazione dei livelli di polimorfismo dei loci microsatelliti, è stata effettuata una stima preliminare della variabilità genetica di diverse popolazioni di Punteruolo rosso provenienti sia dall'areale primario che da quello secondario. Ciò ha messo in luce una consistente omogeneità genetica delle popolazioni invasive in ambito mediterraneo, riconducibile all'effetto del fondatore, a fronte di una variabilità, molto più marcata, riscontrata nelle aree di origine di Vietnam e Malesia. È emersa inoltre una singolare eterogeneità genetica nel campione proveniente dalla Penisola arabica, compatibile con l'ipotesi di introduzioni multiple e di un ruolo di “testa di ponte” di questa regione nella colonizzazione dei paesi del bacino del Mediterraneo. Attraverso le stime di vari indici di diversità genetica ed un'analisi filogenetica aggiuntiva su un marcatore mitocondriale classico, è stato possibile quindi identificare gli individui vietnamiti e quelli provenienti dai paesi del Mediterraneo (Italia, Grecia, Spagna) come i campioni reciprocamente più differenziati tra loro dal punto di vista genetico. Questo ha permesso di ottimizzare il potere risolutivo del sistema di marcatori genetici messo a punto, in quanto negli esperimenti di incrocio sono stati impiegati maschi provenienti dall'Italia e dal Vietnam, in modo da aumentare la probabilità che portassero alleli diversi e fossero dunque più facilmente distinguibili i reciproci contributi all'interno della progenie delle femmine.

Certamente i microsatelliti sviluppati in questo lavoro, rivelatisi efficaci per le attribuzioni di paternità fin qui condotte, costituiscono un valido strumento diagnostico per approfondire gli studi sul sistema nuziale del Punteruolo rosso, nonché per numerosi altri possibili ambiti di ricerca sul fitofago, come ad esempio studi di tipo demografico e di dinamica di popolazione, o di tipo filogeografico. Tramite simulazioni bioinformatiche, sono state ad esempio esplorate le potenzialità di impiego del *set* di microsatelliti messo a punto, nel contesto di esperimenti di

incrocio, sempre controllati in laboratorio, ma più complessi di quelli già effettuati. Da queste simulazioni sono emersi risultati promettenti circa la possibilità di condurre con successo analisi di paternità sulla progenie di femmine accoppiatesi con un maggior numero di maschi, per cui si potrebbero riprodurre in cattività numerosi altri scenari e combinazioni di accoppiamento, per studiare l'influenza di fattori, come ad esempio numero, ordine, durata e frequenza delle copule, sui meccanismi di utilizzo dello sperma. Meno percorribile appare invece l'ipotesi di eseguire analisi di paternità su popolazioni naturali italiane, anche rendendo le attribuzioni molto più semplici tramite un disegno sperimentale che permetta di conoscere a priori il genotipo materno (ossia catturando in natura femmine gravide per poi allevarne la prole). Le maggiori criticità in questo senso sono dovute al fatto che la bassa variabilità genetica riscontrata in Italia, e nelle popolazioni invasive mediterranee in generale, determina un potere risolutivo dei microsatelliti troppo basso per poter distinguere i figli di padri diversi con buona confidenza statistica, laddove non vi sia la possibilità di campionare tutti gli individui candidati come potenziali padri e laddove il numero di tali candidati sia elevato (indicativamente superiore a 8).



## Capitolo 6

### Bibliografia

- Abbas, M. S. T. (2010). IPM of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. In: *Integrated management of arthropod pests and insect borne diseases*. Springer, Netherlands. pp. 209-233.
- Abdelkrim, J., Robertson, B.C., Stanton, J.A.L., & Gemmell, N.J. (2009). Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*, 46, 185–191.
- Abozuhairah, R. A., Vidyasagar, P. S. P. V. & Abraham, V. A. (1996). Integrated management of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* F., in date palm plantations of the Kingdom of Saudi Arabia. August, 1996. 20<sup>th</sup> International Congress of Entomology, Florence, Italy. Paper 17-033.
- Abraham, V. A., Al Shuaibi, M. A., Faleiro, J. R., Abozuhairah, R. A., & Vidyasagar, P. S. P. V. (1998). An integrated management approach for red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. a key pest of date palm in the Middle East. *Agricultural Science* 3, 77–83.
- Abraham, V. A., Faleiro, J. R., Nair, C. P. R., & Nair, S. S. (2002). Present management technologies for red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) in palms and future thrusts. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 8(2), 69-82.
- Abulyazid, I., Kamel, I. K. E., Sharawi, F. A. & El-Bermawy, S. (2002). Comparison between different populations of Red Palm Weevils *Rhynchophorus* species using RAPD-PCR. *Journal Egyptian German Society Of Zoology*, 38(E), 1-16.
- Afzelius, B. A. (1970). Thoughts on comparative spermatology. *Comparative Spermatology*, 565-573.
- Al-Ayied, H. Y., Alswailem, A. M., Shair, O. & Al Jabr, A. M. (2006). Evaluation of phylogenetic relationship between three phenotypically different forms of Red date palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. using PCR-based RAPD technique. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(4), 303-309.
- Al-Eryan, M. A. S., El-Ghariani, I. M., Massry, A., Agleyo, H. A., Mohamed, S. A., Ikraem, A. A. & Ismail, S. S. (2010). First record of the red palm weevil [*Rhynchophorus ferrugineus* OLIV. (Coleoptera: Curculionidae)] in Libya. *Acta Horticulturae*, 882, 413-418.
- Alcock, J., Eickwort, G. C., & Eickwort, K. R. (1977). The reproductive behavior of *Anthidium maculosum* (Hymenoptera: Megachilidae) and the evolutionary significance of multiple copulations by females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2(4), 385-396.
- Alhudaib, K. A. (2010). First report of RPW in Caribbean. Accessed 30 Sep 2011. <http://www.redpalmweevil.com/newlook/RPWReport/Caribbean.htm>.
- Allentoft, M.E., Schuster, S.C., Holdaway, R.N., Hale, M.L., McLay, E., Oskam, C., Gilbert, M.T.P., Spencer, P., Willerslev, E., Bunce, M. (2009). Identification of microsatellites from an

- extinct moa species using highthroughput (454) sequence data. *BioTechniques*, 46, 195–200.
- Almudevar, A., & Field, C. (1999). Estimation of single-generation sibling relationships based on DNA markers. *Journal of agricultural, biological, and environmental statistics*, 136-165.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Anderson, E. C., & Garza, J. C. (2006). The power of single-nucleotide polymorphisms for large-scale parentage inference. *Genetics*, 172(4), 2567-2582.
- Applied Biosystems. (2006). Peak Scanner Software, Version 1.0. Reference Guide. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4381867>.
- Arnone, S., Musmeci, S., Catarci, S., Sasso, R., Nobili, P., & Cristofaro, M. (2014). Allevamento del punteruolo rosso delle palme: un contributo per la sperimentazione. June 9-14<sup>th</sup>, 2014. XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Orosei (NU), Italy.
- Arnqvist, G., & Nilsson, T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal behaviour*, 60(2), 145-164.
- Ashley, M. V., Berger-Wolf, T. Y., Caballero, I. C., Chaovalitwongse, W., DasGupta, B., & Sheikh, S. I. (2008). Full sibling reconstruction in wild populations from microsatellite genetic markers. *Computational Biology: New Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, 231-258.
- Avery, P. J., & Hill, W. G. (1979). Distribution of linkage disequilibrium with selection and finite population size. *Genetical Research*, 33(1), 29-48.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Baccetti, B., & Afzelius, B. A. (1976). The biology of the sperm cell. *Monographs in developmental biology*, 10, 1-254.
- Baccetti, B., Dallai, R., Pallini, V., Rosati, F., & Afzelius, B. A. (1977). Protein of insect sperm mitochondrial crystals. Crystallomitin. *The Journal of cell biology*, 73(3), 594-600.
- Barranco, P., De la Peña, J., & Cabello, T. (1995). Un nuevo curculionido tropical para la fauna europea, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier 1790)(Coleoptera, Curculionidae). *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 20, 257-258.
- Barranco, P., De la Peña, J. & Cabello, T. (1996). El picudo rojo de las palmeras, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), nueva plaga en Europa (Coleoptera, curculionidae). *Phytoma España*, 67, 36-40.
- Barranco, P., De la Peña, J. A., Martín, M. M., & Cabello, T. (1998). Eficacia del control químico de la nueva plaga de las palmeras *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790). (Col.:Curculionidae). *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 24, 301-306.
- Barranco, P., Lorente-Moreno, F., Alcàzar-Alba, M. D., & Peña-Méndez, Y. J. (2006). Control de *Rhynchophorus ferrugineus* en España, ensayos y aplicaciones en campo. November 28-29<sup>th</sup>,

2005. I Jornada Internacional sobre el Picudo Rojo de las Palmeras. Fundacion Agroalimed, Moncada, Spain.

- Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2(Pt. 3), 349-368.
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., & Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *Journal of medical entomology*, 50(2), 317-325.
- Bembouza, H., Jacquemin, J., Baudoin, J., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy Society and Environment*, 10(2), 77-81.
- Berger-Wolf, T. Y., Sheikh, S. I., DasGupta, B., Ashley, M. V., Caballero, I. C., Chaovalitwongse, W., & Putrevu, S. L. (2007). Reconstructing sibling relationships in wild populations. *Bioinformatics*, 23(13), i49-i56.
- Bertone, C., Michalak, P. S. & Roda, A. (2010). New pest response guidelines - red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. United States Department of Agriculture, Riverdale, USA.
- Birkhead, T. R., & Hunter, F. M. (1990). Mechanisms of sperm competition. *Trends in Ecology & Evolution*, 5(2), 48-52.
- Bissoondath, C. J., & Wiklund, C. (1996). Male butterfly investment in successive ejaculates in relation to mating system. *Behavioral ecology and Sociobiology*, 39(5), 285-292.
- Blackith, R. E. (1973). Clues to the Mesozoic evolution of the Eumastacidae. *Acrida*, 2, 5-28.
- Blouin, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(10), 503-511.
- Bonfield, J., Beal, K., Jordan, M., Cheng, Y., & Staden, R. (2006). The StadenPackage Manual. Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K.
- Boorman, E., & Parker, G. A. (1976). Sperm (ejaculate) competition in *Drosophila melanogaster*, and the reproductive value of females to males in relation to female age and mating status. *Ecological Entomology*, 1(3), 145-155.
- Bretman, A., Wedell, N., & Tregenza, T. (2004). Molecular evidence of post-copulatory inbreeding avoidance in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(1535), 159-164.
- Bull, L. N., Pabón-Peña, C. R., & Freimer, N. B. (1999). Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. *Genome research*, 9(9), 830-838.
- Burke, T., & Bruford, M. W. (1987). DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327(6118), 149-152.
- Butani, D.K. (1975) Insect pests of fruit crops and their control, sapota-11. *Pesticides Research Journal*, 9, 40-42.
- Capdevielle-Dulac, C., El-Mergawy, R. A. A. M., Avand-Faghieh, A., Rochat, D., & Silvain, J. F.

- (2012) *Rhynchophorus ferrugineus*. In: Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2011–30 September 2011. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 185-189.
- Castoe, T. A., Poole, A. W., Gu, W., de Koning, A. P. J., Daza, J. M., Smith, E. N., & Pollock, D. D. (2010). Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resource*, 10, 341–347.
- Chakraborty, R. A. N. A. J. I. T., Shaw, M., & Schull, W. J. (1974). Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics*, 26(4), 477.
- Chakraborty, R., Kimmel, M., Stivers, D. N., Davison, L. J., & Deka, R. (1997). Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 1041-1046.
- Chapman, T., Liddle, L. F., Kalb, J. M., Wolfner, M. F., & Partridge, L. (1995). Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature*, 373(6511), 241-244.
- Cirio, U. (1975). The Procida Medfly pilot experiment. Status of The Medfly control after two years of the Sterile Insect release. IAEA, *Panel Proceedings Series*, STI/PUB/392, 39-49.
- Clark, A. G., Aguadé, M., Prout, T., Harshman, L. G., & Langley, C. H. (1995). Variation in sperm displacement and its association with accessory gland protein loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 139(1), 189-201.
- Cook, P. A., & Gage, M. J. (1995). Effects of risks of sperm competition on the numbers of eupyrene and apyrene sperm ejaculated by the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36(4), 261-268.
- Cook, P. A., & Wedell, N. (1996). Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximizing fertilization success?. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1373), 1047-1051.
- Coombs, J. A., Letcher, B. H., & Nislow, K. H. (2008). CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 578-580.
- Cox, M. L. (1993). Red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in Egypt. *FAO Plant Protection Bulletin*, 41(1), 30-31.
- Christiansen, F. B. (1989). The effect of population subdivision on multiple loci without selection. *Mathematical evolutionary theory*, 71-85.
- Cristofaro, M., Colazza, S., De Biase, A., Belvedere, S., Arnone, S., Di Ilio, V., Isidoro, N., Musmeci, S., Sasso, R., & Barlattani, M. (2010). Preliminary studies of the biological cycle of the Red Palm Weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) in Italy, aimed to the application of Sterile Insect Technique. December 12-15<sup>th</sup>, 2010. *ESA 58TH Annual Meeting*, San Diego, CA, USA.
- Cristofaro, M., Sasso, R., Musmeci, S., Arnone, S., Di Ilio, V., De Biase, A., & Belvedere, S.

- (2011). Primi risultati relativi ad uno studio di fattibilità della tecnica dell'insetto sterile per il controllo di *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. June 13-16<sup>th</sup>, 2011. *Atti XXIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, Genova, Italy. p. 292.
- Cristofaro, M., Arnone, S., Musmeci, S., Sasso, R., Lai, A., De Biase, A., La Marca, A., Belvedere, S., Marcari, V., Senia, G., & Catarci, S. (2012). Feasibility of SIT to control red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier): An integrated physiological, ecological and genetic approach. November 11-14<sup>th</sup>, 2012. *ESA 60TH Annual Meeting*, Knoxville, Tennessee, USA.
- Cristofaro, M., Arnone, S., Sasso, R., Musmeci, S., Lai, A., La Marca, A., Belvedere, S., De Biase A., Catarci, S., Inghilesi, A. F., Mazza, G., Cervo, R. (2013). Mating Behavior bioassays in an Integrated SIT Project for the Control of the Red Palm Weevil in Italy. March 15-18<sup>th</sup>, 2013. *International Conference on Research and Management Strategies for the Red Palm Weevil*, King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia.
- Cunningham, E. J., & Russell, A. F. (2000). Egg investment is influenced by male attractiveness in the mallard. *Nature*, 404(6773), 74-77.
- Curtis, C. F. & Andreason, M. H. (1999). Large-scale control of mosquito vectors of disease. In: *Area-wide control of fruit flies and other insect pests*. Tan K. H. ed., Penerbit Universiti Sains, Malaysia, Penang, pp. 135–142.
- Curtsinger, J. W. (1991). Sperm competition and the evolution of multiple mating. *American Naturalist*, 93-102.
- Dakin, E. E., & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5), 504-509.
- Dallai, R. (1979). An overview of atypical spermatozoa in insects. In: *The spermatozoon*. Urban & Schwarzenberg Baltimore. pp. 253-265.
- Daly, M. (1978). The cost of mating. *American Naturalist*, 771-774.
- Danielsson, I. (1998). Mechanisms of sperm competition in insects. *Annales Zoologici Fennici*, 35, 241-257
- Davies, N. B. (1991). Mating systems. *Behavioural ecology*, 263-294.
- De Biase, A., Belvedere, S., Senia, G., Marcari, V., La Marca, A., Vu, L. V., & Cristofaro, M. (2014). Preliminary analysis of genetic variability and differentiation of Asian and Mediterranean populations of Red Palm Weevil. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia. Rendiconti*, 61, 193-200.
- De Jong, P. W., Verhoog, M. D., & Brakefield, P. M. (1993). Sperm competition and melanic polymorphism in the 2-spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera, Coccinellidae). *Heredity*, 70(2), 172-178.
- De Woody, J. A. (2005). Molecular approaches to the study of parentage, relatedness, and fitness: practical applications for wild animals. *Journal of Wildlife Management*, 69(4), 1400-1418.
- Dembilio, O. & Jacas, J. A. (2011). Basic bio-ecological parameters of the invasive Red Palm

- Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in *Phoenix canariensis* under Mediterranean climate. *Bulletin of Entomological Research*, 101, 153–163.
- Dembilio, Ó. & Jacas, J. A. (2012). Bio-ecology and integrated management of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in the region of Valencia (Spain). *Hellenic Plant Protection Journal*, 5(1), 1-11.
- Dembilio, Ó., Jacas, J. A., & Llácer, E. (2009). Are the palms *Washingtonia filifera* and *Chamaerops humilis* suitable hosts for the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Col. Curculionidae)?. *Journal of Applied Entomology*, 133(7), 565-567.
- Dembilio, Ó., Llácer, E., Martínez de Altube, M. D. M., & Jacas, J. A. (2010). Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest management science*, 66(4), 365-370.
- Dembilio, Ó., Tapia, G. V., Téllez, M. M. & Jacas, J. A. (2011). Lower temperature thresholds for oviposition and egg hatching of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in a Mediterranean climate. *Bulletin of entomological research*, 102(01), 97-102.
- Denk, A. G., Holzmann, A., Peters, A., Vermeirssen, E. L., & Kempnaers, B. (2005). Paternity in mallards: effects of sperm quality and female sperm selection for inbreeding avoidance. *Behavioral Ecology*, 16(5), 825-833.
- Destephano, D. B., & Brady, U. E. (1977). Prostaglandin and prostaglandin synthetase in the cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology*, 23(7), 905-911.
- Devlin, B., Roeder, K., & Ellstrand, N. C. (1988). Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 76(3), 369-380.
- Dewoody, J. A., Dewoody, Y. D., Fiumera, A. C., & Avise, J. C. (2000). On the number of reproductives contributing to a half-sib progeny array. *Genetical Research*, 75(01), 95-105.
- DeWoody, J. A., Walker, D., & Avise, J. C. (2000a). Genetic parentage in large half-sib clutches: theoretical estimates and empirical appraisals. *Genetics*, 154(4), 1907-1912.
- Dewsbury, D. A. (1982). Ejaculate cost and male choice. *American Naturalist*, 601-610.
- Dickinson, J. L., & Rutowski, R. L. (1989). The function of the mating plug in the chalcidon checkerspot butterfly. *Animal Behaviour*, 38(1), 154-162.
- Dieringer, D., & Schlötterer, C. (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3(1), 167-169.
- Dybas, L. K., & Dybas, H. S. (1981). Coadaptation and taxonomic differentiation of sperm and spermathecae in featherwing beetles. *Evolution*, 168-174.
- Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A. S. (2005). Joint FAO/IAEA Programme, Vienna, Austria. Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer.

- Eady, P. E. (1991). Sperm competition in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): a comparison of two methods used to estimate paternity. *Ecological Entomology*, 16(1), 45-53.
- Eady, P. E., Wilson, N., & Jackson, M. (2000). Copulating with multiple mates enhances female fecundity but not egg-to-adult survival in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Evolution*, 54(6), 2161-2165.
- Eberhard, W. G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press.
- El Mousadik, A., & Petit, R. J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92(7), 832-839.
- El-Ezaby, F. (1997). A biological in-vitro study on the red Indian date palm weevil. *Arab Journal of Plant Protection*, 15(2), 84-87.
- El-Mergawy, R. A. A. M., Al-Ajlan, A. M., Abdallah, N. A., Nasr, M. I. & Silvain, J. F. (2011a). Determination of different geographical populations of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) using RAPD-PCR. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(2), 227-232.
- El-Mergawy, R. A. A. M., Faure, N., Nasr, M. I., Faghieh, A. A., Rochat, D. & Silvain, J. F. (2011b). Mitochondrial genetic variation and invasion history of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in Middle-East and Mediterranean Basin. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13, 631-637.
- El-Mergawy, R. A. A. M., Al Ajlan, A. M., Abdallah, N. A., Nasr, M. I. & Silvain, J. F. (2011c). Genetic comparison among *Rhynchophorus ferrugineus* and four *Rhynchophorus* species. *Journal of Agricultural Science and Technology*, B(1), 610-615.
- El-Mergawy, R. A. A. M., & Al-Ajlan, A. M. (2011). Red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier): Economic importance, biology, biogeography and integrated pest management. *Journal of Agricultural Science and Technology*, A(1), 1-23.
- Ellstrand, N. C. (1984). Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist*, 819-828.
- Emery, A. M., Wilson, I. J., Craig, S., Boyle, P. R., & Noble, L. R. (2001). Assignment of paternity groups without access to parental genotypes: multiple mating and developmental plasticity in squid. *Molecular Ecology*, 10(5), 1265-1278.
- EPPO. (2005). Data sheets on quarantine pests – *Rhynchophorus palmarum*. *EPPO Bulletin*, 35, 468–471.
- EPPO. (2007). EPPO standard PM 7/83 Diagnostics. *Rhynchophorus ferrugineus* and *Rhynchophorus palmarum*. *EPPO Bulletin*, 37, 571–579.
- EPPO. (2008). Data sheets on quarantine pests *Rhynchophorus ferrugineus*. *EPPO Bulletin*, 38, 55-59.

- EPPO. (2009). First record of *Rhynchophorus ferrugineus* in Curaçao, Netherlands Antilles. European and Mediterranean Plant Protection Organization Reporting Service. Pests & Diseases. 2009/002. [on line]. Available in <http://archives.eppo.org/EPPOReporting/2009/Rse-0901.pdf>. January 25<sup>th</sup>, 2010.
- EPPO. (2010). EPPO Reporting Service. 2010/176 - First record of *Rhynchophorus ferrugineus* in the USA, November 1st, 2010.
- EPPO (2014) <http://www.eppo.int/QUARANTINE/listA2.htm>. Accessed December 19<sup>th</sup>, 2014.
- Evans, J. P., Brooks, R. C., Zajitschek, S. R., & Griffith, S. C. (2008). Does genetic relatedness of mates influence competitive fertilization success in guppies?. *Evolution*, 62(11), 2929-2935.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Faghih, A. A. (1996). The biology of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera, Curculionidae) in Saravan region (Sistan & Balouchistan province, Iran). *Applied Entomology and Phytopathology*, 63(1/2), 16-18.
- Fairbairn, D. J. (1993). Costs of loading associated with mate-carrying in the waterstrider, *Aquarius remigis*. *Behavioral Ecology*, 4(3), 224-231.
- Faleiro, J. R. (2006). A review of the issues and management of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years. *International journal of tropical Insect Science*, 26(03), 135-154.
- FAO. (2005). Provisional additions, glossary of phytosanitary terms. *Secretariat of the International Plant Protection Convention (IPPC)*, FAO, Rome, Italy.
- Feldmann, U., & Hendrichs, J. (2001). Integrating the sterile insect technique as a key component of area-wide tsetse and trypanosomiasis intervention. PAAT (Programme Against African Trypanosomiasis). *Technical and Scientific Series*, No. 3. FAO, Rome, Italy.
- Ferry, M., & Gomez, S. (2002). The red palm weevil in the Mediterranean area. *Journal of the International Palm Society*, 46, 172-178.
- Fincke, O. M. (1984). Sperm competition in the damselfly *Enallagma hageni* Walsh (Odonata: Coenagrionidae): benefits of multiple mating to males and females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14(3), 235-240.
- Fowler, K., & Partridge, L. (1989). A cost of mating in female fruitflies. *Nature*, 338(6218), 760-761.
- Gack, C., & Peschke, K. (1994). Spermathecal morphology, sperm transfer and a novel mechanism of sperm displacement in the rove beetle, *Aleochara curtula* (Coleoptera, Staphylinidae). *Zoomorphology*, 114(4), 227-237.
- Gadelhak, G. G. & Enan, M. R. (2005). Genetic diversity among populations of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae), determined by random



- amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(3), 395-399.
- Gage, M. J. (1991). Risk of sperm competition directly affects ejaculate size in the Mediterranean fruit fly. *Animal Behaviour*, 42(6), 1036-1037.
- Gage, M. J. (1992). Removal of rival sperm during copulation in a beetle, *Tenebrio molitor*. *Animal Behaviour*, 44, 587-589.
- Gage, M. J. (1994). Associations between body size, mating pattern, testis size and sperm lengths across butterflies. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 258(1353), 247-254.
- Gage, A. R., & Barnard, C. J. (1996). Male crickets increase sperm number in relation to competition and female size. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 38(5), 349-353.
- Garant, D., & Kruuk, L. E. (2005). How to use molecular marker data to measure evolutionary parameters in wild populations. *Molecular Ecology*, 14(7), 1843-1859.
- García-González, F., & Simmons, L. W. (2005). The evolution of polyandry: intrinsic sire effects contribute to embryo viability. *Journal of evolutionary biology*, 18(4), 1097-1103.
- Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodenes, C., & Kremer, A. (2000). Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology*, 9(8), 1037-1048.
- Gillespie, J. H. (1977). Natural selection for variances in offspring numbers: a new evolutionary principle. *The American Naturalist*, 111(981), 1010-1014.
- Gindin, G., Levski, S., Glazer, I., & Soroker, V. (2006). Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, 34(4), 370-379.
- Glaubitz, J. C., Rhodes, O. E., & DeWoody, J. A. (2003). Prospects for inferring pairwise relationships with single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, 12(4), 1039-1047.
- Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources*, 11(5), 759-769.
- Gowaty, P. A., & Karlin, A. A. (1984). Multiple maternity and paternity in single broods of apparently monogamous eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 15(2), 91-95.
- Gregory, G. E. (1965). The formation and fate of the spermatophore in the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* Reiche and Fairmaire. *Transactions of the Royal entomological Society of London*, 117(2), 33-66.
- Gush, H. (1997). Date with disaster. *The Gulf Today*. September 29<sup>th</sup>, 1997. p. 16.
- Gwynne, D. T. (2012). Male mating effort, confidence of paternity, and insect sperm competition. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*, R. L. Smith ed., Academic

Press, London, GB. p.117.

- Hadfield, J. D., Richardson, D. S., & Burke, T. (2006). Towards unbiased parentage assignment: combining genetic, behavioural and spatial data in a Bayesian framework. *Molecular Ecology*, 15(12), 3715-3730.
- Hallett, R. H., Crespi, B. J., & Borden, J. H. (2004). Synonymy of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), 1790 and *R. vulneratus* (Panzer), 1798 (Coleoptera, Curculionidae, Rhynchophorinae). *Journal of Natural History*, 38(22), 2863-2882.
- Halliday, T., & Arnold, S. J. (1987). Multiple mating by females: a perspective from quantitative genetics. *Animal Behaviour*, 35(3), 939-941.
- Hardesty, B. D., Hubbell, S. P., & Bermingham, E. (2006). Genetic evidence of frequent long-distance recruitment in a vertebrate-dispersed tree. *Ecology Letters*, 9(5), 516-525.
- Harshman, L. G., & Prout, T. (1994). Sperm displacement without sperm transfer in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 758-766.
- Hendrichs, J., Franz, G., & Rendon, P. (1995). Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male only release for control of Mediterranean fruit-flies during fruiting seasons. *Journal of Applied Entomology*, 119, 371-377.
- Hendrichs, J. (2000). Use of the sterile insect technique against key insect pests. *Sustainable Development International*, 2, 75-79.
- Hess, J. E., Campbell, N. R., Docker, M. F., Baker, C., Jackson, A., Lampman, R., McIlraith, B., Moser, M. L., Statler, D. P., Young, W. P., Wildbill, A. J., & Narum, S. R. (2015). Use of genotyping by sequencing data to develop a high-throughput and multifunctional SNP panel for conservation applications in Pacific lamprey. *Molecular ecology resources*, 15(1), 187-202.
- Hill, W. G., & Robertson, A. (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38(6), 226-231.
- Hill, W. G. (1975). Linkage disequilibrium among multiple neutral alleles produced by mutation in finite population. *Theoretical population biology*, 8(2), 117-126.
- Hinton, H. E. (1964). Sperm transfer in insects and the evolution of haemocoelic insemination. In: *Insect Reproduction Symposium No.2*, K.C. Highnam ed., Royal Entomological Society, London, GB. pp. 95-107.
- Hubby, J. L., & Lewontin, R. C. (1966). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54(2), 577.
- Hunter, F. M., Petrie, M., Otronen, M., Birkhead, T. & Mollar, A. P. (1993). Why do females copulated repeatedly with one male? *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 21-26.
- Idury, R.M. & Cardon, L.R. (1997). A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. *Genome Research*, 7, 1104-1109.

- Inghilesi, A., Mazza, G., Cini, A., & Cervo, R. (2014). Comportamento sociale e riproduttivo del punteruolo rosso delle palme: approfondire le conoscenze per contrastare questo flagello. Il Punteruolo rosso delle palme: nuove acquisizioni e possibilità di controllo demografico. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia. Rendiconti*, *61*, 189-192.
- Inghilesi, A. F., Mazza, G., Cervo, R., & Cini, A. (2015). A network of sex and competition: The promiscuous mating system of an invasive weevil. *Current Zoology*, *61*, 85-97.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, *314*, 67-73.
- Jehle, R., Sztatecsny, M., Wolf, J. B., Whitlock, A., Hödl, W., & Burke, T. (2007). Genetic dissimilarity predicts paternity in the smooth newt (*Lissotriton vulgaris*). *Biology letters*, *3*(5), 526-528.
- Jennions, M. D., Hunt, J., Graham, R., & Brooks, R. (2004). No evidence for inbreeding avoidance through postcopulatory mechanisms in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Evolution*, *58*(11), 2472-2477.
- Jones, A. G., & Avise, J. C. (2001). Mating systems and sexual selection in male-pregnant pipefishes and seahorses: insights from microsatellite-based studies of maternity. *Journal of Heredity*, *92*(2), 150-158.
- Jones, A. G. (2001). GERUD1.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from progeny arrays using multilocus DNA data. *Molecular Ecology Notes*, *1*(3), 215-218.
- Jones, A. G., & Ardren, W. R. (2003). Methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular ecology*, *12*(10), 2511-2523.
- Jones, A. G. (2005). GERUD 2.0: a computer program for the reconstruction of parental genotypes from half-sib progeny arrays with known or unknown parents. *Molecular Ecology Notes*, *5*(3), 708-711.
- Jones, A. G., Small, C. M., Paczolt, K. A., & Ratterman, N. L. (2010). A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular ecology resources*, *10*(1), 6-30.
- Ju, R. T., Wang, F., Wan, F. H., & Li, B. (2011). Effect of host plants on development and reproduction of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of pest science*, *84*(1), 33-39.
- Kaakeh, W. (1998). The mating behavior of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Curculionidae). *Emirates Journal of Agricultural Sciences*, *10*, 24-46.
- Kaakeh, W. (2005). Longevity, fecundity, and fertility of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) on natural and artificial diets. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *17*(1), 23-33.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, *16*(5), 1099-1106.

- Kehat, M. (1999). Threat to date palms in Israel, Jordan and the Palestinian Authority by the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, 27(3), 241-242.
- Keller, L., & Reeve, H. K. (1995). Why do females mate with multiple males? The sexually selected sperm hypothesis. *Advances in the Study of Behavior*, 24, 291-315.
- Kempnaers, B., Verheyen, G. R., Van den Broeck, M., Burke, T., Van Broeckhoven, C., & Dhondt, A. (1992). Extra-pair paternity results from female preference for high-quality males in the blue tit. *Nature*, 357(6378), 494-496.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Klassen, W. (2000). Area-wide approaches to insect pest interventions: history and lessons. In: Proceedings: area-wide control of fruit flies and others insects pests. Tan K. H. ed., *International conference on area-wide control of insect pests, and 5th International symposium on fruit flies of economic importance*. 28<sup>th</sup> May-5<sup>th</sup> June, 1998. Penang, Malaysia. Penerbit University Sains, Malaysia, Pulau Pinang. pp. 21-38.
- Klassen, W. (2005). Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In: *Sterile Insect Technique*. Springer, Netherlands. pp. 39-68.
- Knowlton, N. & Greenwell, S. R. (1984). Male sperm competition avoidance mechanisms: the influence of female interests. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*, R. L. Smith ed., Academic Press, New York. pp. 62-84.
- Kontodimas, D. C., Milonas, P., Vassiliou, V., Thymakis, N. & Economou, D. (2006). The occurrence of *Rhynchophorus ferrugineus* in Greece and Cyprus and the risk against the native greek palm tree *Phoenix theophrasti*. *Entomologia Hellenica*, 16, 11-15.
- Kotiaho, J. S., Simmons, L. W., Hunt, J., & Tomkins, J. L. (2003). Males influence maternal effects that promote sexual selection: a quantitative genetic experiment with dung beetles *Onthophagus taurus*. *The American Naturalist*, 161(6), 852-859.
- Krishnakumar, R., & Maheswari, P. (2007). Assessment of the Sterile Insect Technique to manage Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* in coconut. In: *Area-Wide Control of Insect Pests*, Vreysen M. J. B., Robinson A. S., Hendrichs J. ed. pp. 475-485.
- Kukuk, P. (1985). Evidence for an antiaphrodisiac in the sweat bee *Lasioglossum (Dialictus) zephyrum*. *Science*, 227(4687), 656-657.
- Kruuk, L. E., Clutton-Brock, T. H., Slate, J., Pemberton, J. M., Brotherstone, S., & Guinness, F. E. (2000). Heritability of fitness in a wild mammal population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 698-703.
- LaMunyon, C. W., & Eisner, T. (1994). Spermatophore size as determinant of paternity in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7081-7084.
- Lance, D. R., & McInnis, D. O. (2005). Biological Basis of the Sterile Insect Technique. In: *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Dyck V. A., Hendrichs J., Robinson A. S. ed.; Dordrech, The Netherlands, Springer. pp. 69-94.

- Lane, J. E., Boutin, S., Gunn, M. R., Slate, J., & Coltman, D. W. (2007). Genetic relatedness of mates does not predict patterns of parentage in North American red squirrels. *Animal Behaviour*, 74(3), 611-619.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lefevre Jr, G., & Jonsson, U. B. (1962). Sperm transfer, storage, displacement, and utilization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 47(12), 1719.
- Lewis, S. M., & Austad, S. N. (1994). Sexual selection in flour beetles: the relationship between sperm precedence and male olfactory attractiveness. *Behavioral Ecology*, 5(2), 223-224.
- Li, W. H., & Nei, M. (1974). Stable linkage disequilibrium without epistasis in subdivided populations. *Theoretical population biology*, 6(2), 173-183.
- Lindquist, D. A., Abusowa, M., & Hall, M. J. (1992). The New World screw worm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Journal of Medical and Veterinary Entomology*, 6, 2-8.
- Longo, S., (2006). Note sul Punteruolo rosso delle palme pericoloso fitofago delle palme di recente introduzione in Sicilia. "Memorie e Rendiconti" dell'Accademia di Scienze Lettere e Belle Arti degli Zelanti e dei Dafnici di Acireale – Serie V – 4, 351-365.
- Longo, S. & Colazza, S. (2009). Il Punteruolo rosso delle palme e il Canistide delle palme. In: *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia*. Regione Siciliana. Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali, Servizi allo Sviluppo, Centro Stampa Rubino, Marsala, 1, 7-11.
- Longo, S., Gugliotta, G., Pappalardo, V., & Suma, P. (2009). Note biologiche sul Punteruolo rosso delle palme in Sicilia. In: *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia*. Regione Siciliana. Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali - Servizi allo Sviluppo, Centro Stampa Rubino, Marsala, 1, 45-47.
- Mack, P. D., Hammock, B. A., & Promislow, D. E. (2002). Sperm competitive ability and genetic relatedness in *Drosophila melanogaster*: similarity breeds contempt. *Evolution*, 56(9), 1789-1795.
- Manachini, B., Billeci, N., & Palla, F. (2013). Exotic insect pests: the impact of the Red Palm Weevil on natural and cultural heritage in Palermo (Italy). *Journal of Cultural Heritage*, 14(3), e177-e182.
- Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics*, 24(3), 133-141.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-380.
- Marshall, T. C., Slate, J. B. K. E., Kruuk, L. E. B., & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular ecology*, 7(5), 639-655.

- Martin, M. M. & Cabello Garcia, T. (2006) Manejo de la cría del picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthoridae), en dieta artificial y efectos en su biometría y biología. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 32, 631–641.
- Massa, B. & Lo Verde G. (2009). Gli antagonisti naturali del Punteruolo rosso delle palme. In: *La ricerca scientifica sul punteruolo rosso e gli altri fitofagi delle palme in Sicilia*. Regione Siciliana. Assessorato Agricoltura e Foreste Dipartimento Interventi Infrastrutturali - Servizi allo Sviluppo, Centro Stampa Rubino, Marsala, 1, 7-11.
- Matsuura, H. (1993). Weevils associated with palms. *Kobe Plant Protection*, 901, 46-47.
- Mazza, G., Francardi, V., Inghilesi, A. F., Stasolla, G., Benvenuti, C., Cini, A., Barzanti, G. P., Cito, A., Arnone, S., Cristofaro, M., Musmeci, S., Sasso, R., Camerota, M., Cervo, R., & Roversi, P. F. (2014a). Analisi del comportamento sociale e riproduttivo dei maschi sterili di *Rhynchophorus ferrugineus*: implicazioni per il controllo biologico con agenti entomopatogeni. June 9-14th, 2014. *XXIV Congresso Nazionale Italiano di Entomologia*, Orosei (NU), Italy.
- Mazza, G., Francardi, V., Simoni, S., Benvenuti, C., Cervo, R., Faleiro, J. R., ... & Roversi, P. F. (2014b). An overview on the natural enemies of *Rhynchophorus* palm weevils, with focus on *R. ferrugineus*. *Biological Control*, 77, 83-92.
- McCauley, D. E., & Reilly, L. M. (1984). Sperm storage and sperm precedence in the milkweed beetle *Tetraopes tetraophthalmus* (Forster)(Coleoptera: Cerambycidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 77(5), 526-530.
- McVey, M. E., & Smittle, B. J. (1984). Sperm precedence in the dragonfly *Erythemis simplicicollis*. *Journal of Insect Physiology*, 30(8), 619-628.
- Meagher, T. R. (1986). Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. *American Naturalist*, 199-215.
- Meagher, T. R., & Thompson, E. (1986). The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology*, 29(1), 87-106.
- Meglécz, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., & Martin, J.F. (2010). QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*, 26, 403–404.
- Miller, C. R., & Waits, L. P. (2003). The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 4334-4339.
- Moore, J. A., Draheim, H. M., Etter, D., Winterstein, S., & Scribner, K. T. (2014). Application of large-scale parentage analysis for investigating natal dispersal in highly vagile vertebrates: a case study of american black bears (*Ursus americanus*). *PloS one*, 9(3), e91168.
- Mousseau, T. A., & Fox, C. W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(10), 403-407.
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G.T., & Erlich, H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor*

*Symposium on Quantitative Biology*, 51, 263-273.

- Murphy, S. T. & Briscoe, B. R. (1999). The red palm weevil as an alien invasive: biology and the prospects for biological control as a component of IPM. *Biocontrol News and Information*, 20, 35N-46N.
- Neff, B. D. (2001). Genetic paternity analysis and breeding success in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Journal of Heredity*, 92(2), 111-119.
- Neff, B. D., Pitcher, T. E., & Repka, J. (2002). A Bayesian model for assessing the frequency of multiple mating in nature. *Journal of Heredity*, 93(6), 406-414.
- Nei, M., & Li, W. H. (1973). Linkage disequilibrium in subdivided populations. *Genetics*, 75(1), 213-219.
- Nielsen, R., Mattila, D. K., Clapham, P. J., & Palsbøll, P. J. (2001). Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. *Genetics*, 4, 1673-1682.
- Nirula, K. K. (1956) Investigations on the pests of coconut palm. Part IV. *Rhynchophorus ferrugineus*. *Indian Coconut Journal*, 9, 229-247.
- Olsson, M., Shine, R., Madsen, T., Gullberg, A., & Tegelström, H. (1996). Sperm selection by females. *Nature*, 383(6601), 585-585.
- Ono, T., Siva-Jothy, M. T., & Kato, A. K. I. (1989). Removal and subsequent ingestion of rivals' semen during copulation in a tree cricket. *Physiological Entomology*, 14(2), 195-202.
- Ohta, T. (1982). Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(6), 1940-1944.
- Ohta, T., & Kimura, M. (1969a). Linkage disequilibrium due to random genetic drift. *Genetical Research*, 13(01), 47-55.
- Ohta, T., & Kimura, M. (1969b). Linkage disequilibrium at steady state determined by random genetic drift and recurrent mutation. *Genetics*, 63(1), 229.
- Otronen, M. (1994). Fertilisation success in the fly *Dryomyza anilis* (Dryomyzidae): effects of male size and the mating situation. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 35(1), 33-38.
- Otronen, M., & Siva-Jothy, M. T. (1991). The effect of postcopulatory male behaviour on ejaculate distribution within the female sperm storage organs of the fly, *Dryomyza anilis* (Diptera: Dryomyzidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 29(1), 33-37.
- Palero, F., González-Candelas, F., & Pascual, M. (2011). MICROSATELIGHT - Pipeline to Expedite Microsatellite Analysis. *Journal of Heredity*, 102(2), 247-249.
- Parker, G. A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 45(4), 525-567.
- Parker, G. A. (1979). Sexual selection and sexual conflict. *Sexual selection and reproductive*

*competition in insects*, 123-166.

- Parker, G. A. (1984). Sperm competition and the evolution of animal mating strategies. *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*, 1-60.
- Parker, G. A. (1990a). Sperm competition games: sneaks and extra-pair copulations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 242(1304), 127-133.
- Parker, G. A. (1990b). Sperm competition games: raffles and roles. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 242(1304), 120-126.
- Parker, G. A. (1998). Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory base. *Sperm competition and sexual selection*, 3, 54.
- Parker, G. A., & Begon, M. E. (1993). Sperm competition games: sperm size and number under gametic control. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 253(1338), 255-262.
- Parker, G. A., & Simmons, L. W. (1991). A model of constant random sperm displacement during mating: evidence from *Scatophaga*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 246(1316), 107-115.
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R., & Barrett, J. A. (1995). Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular ecology*, 4(2), 249-252.
- Pemberton, J. M. (2009). Evolution of quantitative traits in the wild: mind the ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1552), 2431-2438.
- Perotti, M. E. (1973). The mitochondrial derivative of the spermatozoon of *Drosophila* before and after fertilization. *Journal of ultrastructure research*, 44(3), 181-198.
- Perry, J.C. & Rowe, L. (2011). Rapid microsatellite development for water striders by Next-Generation Sequencing. *Journal of Heredity*, 102(1), 125-129.
- Petrie, M., & Kempnaers, B. (1998). Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(2), 52-58.
- Pitnick, S., & Markow, T. A. (1994). Male gametic strategies: sperm size, testes size, and the allocation of ejaculate among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila pachea* and its relatives. *American Naturalist*, 785-819.
- Planes, S., Jones, G. P., & Thorrold, S. R. (2009). Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5693-5697.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., & Taberlet, P. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 847-846.
- Prabhu, S. T., & Patil, R. S. (2010). Studies on the biological aspects of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 22(3), 732-733.



- Prasanth, V., Chandra, S., Jayashree, B., & Hoisington, D. (2006). AlleloBin-a program for allele binning of microsatellite markers based on the algorithm of Idury and Cardon (1997). *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, India.*
- Pusey, A., & Wolf, M. (1996). Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology & Evolution*, *11*(5), 201-206.
- Qvarnström, A., & Price, T. D. (2001). Maternal effects, paternal effects and sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(2), 95-100.
- Radwan, J. (1996). Intraspecific variation in sperm competition success in the bulb mite: a role for sperm size. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *263*(1372), 855-859.
- Rahalkar, G. W., Harwalkar, M. R., Ranavavare, H. D., Kurgan, C., Abrham, V. A., & Koya K. M. A. (1977). Preliminary field studies on the control of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* using radio sterilized males. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, *6*, 65-68.
- Ramachandran, C. P. (1991). Effects of gamma radiation on various stages of *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, *20*, 218-221.
- Reginald, C. (1973). Principal insect pests. *Coconuts. Tropical Agriculture Series*. Longmans, London, GB.
- Rice, W. R. (1996). Sexually antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature*, *381*(6579), 232-234.
- Riddiford, L. M., & Ashenhurst, J. B. (1973). The switchover from virgin to mated behavior in female *Cecropia* moths: the role of the bursa copulatrix. *Biological bulletin*, 162-171.
- Ridley, M. (1988). Mating frequency and fecundity in insects. *Biological Reviews*, *63*(4), 509-549.
- Ridley, M. (1989). The incidence of sperm displacement in insects: four conjectures, one corroboration. *Biological Journal of the Linnean Society*, *38*(4), 349-367.
- Roda, A., Kairo, M., Damian, T., Franken, F., Heidweiller, K., Johanns, C. & Mankin, R. (2011). Red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*), an invasive pest recently found in the Caribbean that threatens the region. *EPPO Bulletin*, *41*(2), 116-121.
- Ross, K. G. (2001). Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology*, *10*(2), 265-284.
- Rowe, L. (1994). The costs of mating and mate choice in water striders. *Animal Behaviour*, *48*(5), 1049-1056.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, *132*, 365-386.
- Rugman-Jones, P. F., Hoddle, C. D., Hoddle, M. S., & Stouthamer, R. (2013). The lesser of two weevils: molecular-genetics of pest palm weevil populations confirm *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a valid species distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and reveal the

global extent of both. *PloS one*, 8(10), e78379.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Salama, H. S. & Abdel-Razek, A. S. (2002). Development of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), (Coleoptera, Curculionidae) on natural and synthetic diets. *Anzeiger für Schädlingskunde*, 75(5), 137-139.
- Salama, H. S. & Saker, M. M. (2002). DNA fingerprints of three different forms of the red palm weevil collected from Egyptian date palm orchards. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 35(4), 299-306.
- Salama, H. S., Zaki, F. N., & Abdel-Razek, A. S. (2009). Ecological and biological studies on the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(4), 392-399.
- Santana, Q.C., Coetzee, M.P.A., Steenkamp, E.T., Mlonyeni, O.X., Hammond, G.N.A., Wingfield, M.J., & Wingfield, B.D. (2009). Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *BioTechniques*, 46, 217–223.
- Sefc, K. M., & Koblmüller, S. (2009). Assessing parent numbers from offspring genotypes: the importance of marker polymorphism. *Journal of Heredity*, 100(2), 197-205.
- Sezen, U. U., Chazdon, R. L., & Holsinger, K. E. (2009) Proximity is not a proxy for parentage in an animal-dispersed Neotropical canopy palm. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 276, 2037–2044.
- Shaw, P. W., Pierce, G. J., & Boyle, P. R. (1999). Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 8(3), 407-417.
- Sheldon, B. C. (2000). Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(10), 397-402.
- Shete, S., Tiwari, H., & Elston, R. C. (2000). On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. *Theoretical population biology*, 57(3), 265-271.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., & Arnheim, N. (2003). Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis:(CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 31(3), 974-980.
- Sichlau, M. H., Nielsen, E. E., Thygesen, U. H., & Kiørboe, T. (2015). Mating success and sexual selection in a pelagic copepod, *Temora longicornis*: Evidence from paternity analyses. *Limnology and Oceanography*, 60(2), 600-610.
- Sierra, J. R., Woggon, W. D., & Schmid, H. (1976). Transfer of cantharidin (1) during copulation from the adult male to the female *Lytta vesicatoria* ('Spanish flies'). *Experientia*, 32(2), 142-144.
- Silberglied, R. E., Shepherd, J. G., & Dickinson, J. L. (1984). Eunuchs: the role of apyrene sperm in

Lepidoptera? *American Naturalist*, 255-265.

- Simmons, L. W. (1987a). Sperm competition as a mechanism of female choice in the field cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 21(3), 197-202.
- Simmons, L. W. (1987b). Female choice contributes to offspring fitness in the field cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 21(5), 313-321.
- Simmons, L. W. (2001). *Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects*. Princeton University Press.
- Simmons, L. W. (2005). The evolution of polyandry: sperm competition, sperm selection, and offspring viability. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 125-146.
- Simmons, L. W., & Parker, G. A. (1992). Individual variation in sperm competition success of yellow dung flies, *Scatophaga stercoraria*. *Evolution*, 366-375.
- Simmons, L. W., & Siva-Jothy, M. T. (1998). Sperm competition in insects: mechanisms and the potential for selection. In: *Sperm competition and sexual selection*. T. R. Birkhead & A. P. Møller ed., Academic Press, London, GB. pp. 341-434.
- Simmons, L. W., Stockley, P., Jackson, R. L., & Parker, G. A. (1996). Sperm competition or sperm selection: no evidence for female influence over paternity in yellow dung flies *Scatophaga stercoraria*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 38(3), 199-206.
- Simmons, L. W., Beveridge, M., Wedell, N., & Tregenza, T. (2006). Postcopulatory inbreeding avoidance by female crickets only revealed by molecular markers. *Molecular Ecology*, 15(12), 3817-3824.
- Siva-Jothy, M. T. (1984). Sperm competition in the family Libellulidae (Anisoptera) with special reference to *Crocothemis erythraea* (Brulle) and *Orthetrum cancellatum* (L.). *Advances in Odonatology*, 2, 195-207.
- Siva-Jothy, M. T. (1987). Variation in copulation duration and the resultant degree of sperm removal in *Orthetrum cancellatum* (L.) (Libellulidae: Odonata). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(2), 147-151.
- Siva-Jothy, M. T., & Tsubaki, Y. (1994). Sperm competition and sperm precedence in the dragonfly *Nanophya pygmaea*. *Physiological Entomology*, 19(4), 363-366.
- Siva-Jothy, M. T., Blake, D. E., Thompson, J., & Ryder, J. J. (1996). Short-and long-term sperm precedence in the beetle *Tenebrio molitor*: a test of the 'adaptive sperm removal' hypothesis. *Physiological Entomology*, 21(4), 313-316.
- Sivinski, J. (1980). Sexual selection and insect sperm. *Florida Entomologist*, 99-111.
- Sivinski, J. (1984). Sperm in competition. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*, R. L. Smith ed., Academic Press, London, GB. pp. 85-115.
- Smith, J. M. (1989). *Evolutionary genetics*. Oxford University Press.

- Snook, R. R., Markow, T. A., & Karr, T. L. (1994). Functional nonequivalence of sperm in *Drosophila pseudoobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(23), 11222-11226.
- Speranza, S., Alilla, R., Pesolillo, S. & Severini, M. (2007). Modello previsionale del rischio di attacco del punteruolo rosso delle palme (*Rhynchophorus ferrugineus*) nel Lazio: ipotesi di lavoro. March 27-29<sup>th</sup>, 2007. *Quarte giornate studio su metodi numerici, statistici e informatici nella difesa delle colture agrarie e delle foreste*, Viterbo (RM), Italy. pp. 29-31.
- Staden, R., Beal, K.F., & Bonfield, J.K. (2000). The Staden Package, (1998). *Methods in Molecular Biology*, 132, 115-130.
- Stanley-Samuelson, D. W., & Loher, W. (1986). Prostaglandins in insect reproduction. *Annals of the Entomological Society of America*, 79(6), 841-853.
- Stanley-Samuelson, D. W., Peloquin, J. J., & Loher, W. (1986). Egg-laying in response to prostaglandin injections in the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Physiological entomology*, 11(2), 213-219.
- Stockley, P. (1997). No evidence of sperm selection by female common shrews. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1387), 1497-1500.
- Stockley, P. (1999). Sperm selection and genetic incompatibility: does relatedness of mates affect male success in sperm competition?. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1429), 1663-1669.
- Svärd, L., & Wiklund, C. (1989). Mass and production rate of ejaculates in relation to monandry/polyandry in butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 24(6), 395-402.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 512-526.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), 6463-6471.
- Tautz, D. & Schlötterer, C. (1994). Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4, 832-837.
- Thomas, S. C., & Hill, W. G. (2002). Sibship reconstruction in hierarchical population structures using Markov chain Monte Carlo techniques. *Genetical research*, 79(03), 227-234.
- Thompson, E. A. (1975). The estimation of pairwise relationships. *Annals of human genetics*, 39(2), 173-188.
- Thompson, E. A. (1976). Inference of genealogical structure. *Social Science Information*, 15(2-3), 477-526.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.

- Thornhill, R. (1976). Sexual selection and paternal investment in insects. *American naturalist*, 153-163.
- Thornhill, R. (1980). Rape in *Panorpa scorpionflies* and a general rape hypothesis. *Animal Behaviour*, 28(1), 52-59.
- Thornhill, R. (1984). Alternative hypotheses for traits believed to have evolved by sperm competition. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*, R. L. Smith ed., Academic Press, London, GB. pp. 151-178.
- Thornhill, R., & Alcock, J. (1983). *The evolution of insect mating systems*. Harvard University Press.
- Thuman, K. A., & Griffith, S. C. (2005). Genetic similarity and the nonrandom distribution of paternity in a genetically highly polyandrous shorebird. *Animal Behaviour*, 69(4), 765-770.
- Tregenza, T., & Wedell, N. (2000). Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology*, 9(8), 1013-1027.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
- Vidyasagar, P. S. P. V., Al Saihati, A. A., Al Mohanna, O. E., Subbei, A. I. & Mohsin, A. A. (2000). Management of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv., a serious pest of date palm in Al Qatif, Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of Plantation Crops*, 28(1), 35-43.
- Waage, J. K. (1979). Dual function of the damselfly penis: sperm removal and transfer. *Science*, 203(4383), 916-918.
- Wade, M. J. (1985). The influence of multiple inseminations and multiple foundresses on social evolution. *Journal of theoretical biology*, 112(1), 109-121.
- Walker, W. F. (1980). Sperm utilization strategies in nonsocial insects. *American Naturalist*, 780-799.
- Walsh, P. S., Fildes, N. J., & Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research*, 24(14), 2807-2812.
- Wandeler, P., Smith, S., Morin, P. A., Pettifor, R. A., & Funk, S. M. (2003). Patterns of nuclear DNA degeneration over time—a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology*, 12(4), 1087-1093.
- Wang, J. (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166(4), 1963-1979.
- Ward, P. I. (1993). Females influence sperm storage and use in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32(5), 313-319.
- Ward, P. I. (1998). Intraspecific variation in sperm size characters. *Heredity*, 80(6), 655-659.

- Wattanapongsiri, A. 1966. A Revision of the Genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Bangkok, Thailand. *Department of Agriculture Science Buletin*. pp. 1-329.
- Wattier, R., Engel, C. R., Saumitou-Laprade, P., & Valero, M. (1998). Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, 7(11), 1569-1573.
- Wedell, N. (1991). Sperm competition selects for nuptial feeding in a bushcricket. *Evolution*, 1975-1978.
- Wedell, N., Gage, M. J., & Parker, G. A. (2002). Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(7), 313-320.
- Westneat, D. F., & Sherman, P. W. (1997). Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(4), 205-215.
- Whitten, M., & Mahon, R. (2005). Misconception and constraints. In: *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*; Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. ed.; Dordrech, The Netherlands, Springer. pp. 601-626.
- Williams, G. C. (1975). *Sex and evolution* (No. 8). Princeton University Press.
- Worden, B. D., & Parker, P. G. (2001). Polyandry in grain beetles, *Tenebrio molitor*, leads to greater reproductive success: material or genetic benefits?. *Behavioral Ecology*, 12(6), 761-767.
- Yasui, Y. (1997). A "good-sperm" model can explain the evolution of costly multiple mating by females. *American Naturalist*, 573-584.
- Yasui, Y. (1998). The genetic benefits of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(6), 246-250.
- Yasui, Y. (2001). Female multiple mating as a genetic bet-hedging strategy when mate choice criteria are unreliable. *Ecological Research*, 16(4), 605-616.
- Yu, S. L., Tang, Y. Q., Li, Y., Zhang, H., & Wu, X. L. (2010). Gradient decrement of annealing time can improve PCR with fluorescent-labeled primers. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(4), 500-504.
- Zada, A., Soroker, V., Harel, M., Nakache, J. & Dunkelblum, E. (2002). Quantitative GC analysis of secondary alcohol pheromones: determination of release rate of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, pheromone from lures. *Journal of chemical ecology*, 28(11), 2299-2306.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.
- Zeh, J. A., & Zeh, D. W. (1994). Last-male sperm precedence breaks down when females mate with three males. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 257(1350), 287-292.
- Zeh, J. A., & Zeh, D. W. (1996). The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic

incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1377), 1711-1717.

Zimmerman, E. C. (1993). *Australian Weevils. Volume III. CSIRO*, Melbourne, 854pp.

# Appendici

# Appendice n°1

## Protocollo di estrazione del DNA

I campioni biologici, sia allo stadio larvale che adulto, sono stati sottoposti all'estrazione del DNA genomico per mezzo di un protocollo standard basato sull'utilizzo di Fenolo/Cloroformio. I tessuti utilizzati per la lisi cellulare sono stati prevalentemente di tipo muscolare, provenienti dalle zampe per quanto riguarda gli individui adulti, mentre nel caso delle larve sono stati prelevati i fasci muscolari aderenti la parete interna della cuticola, il contenuto della capsula cefalica o l'intero individuo nel caso di larve di piccole dimensioni (2-3 mm).

### Lisi cellulare

Dopo aver fatto evaporare eventuali residui dell'acetone in cui è stato conservato, il campione biologico viene immerso in 200 µL di tampone (proteinasasi K *buffer*) e tenuto a -20°C per circa 10 minuti. In seguito viene omogeneizzato meccanicamente su ghiaccio mediante l'uso di un pestello automatico. All'omogenato vengono aggiunti 5 µL di proteinasasi K in soluzione (20 mg/mL) ed il tutto viene incubato a 50-55°C su un blocco termostato per almeno 8 ore, oppure a 65°C per 3 ore.

### Estrazione del DNA tramite fenolo/cloroformio

Viene aggiunto al prodotto della lisi un volume di fenolo equilibrato pari al volume del campione. Si mescola il tutto fino ad ottenere un'emulsione e si centrifuga per 15 secondi a 12000 rotazioni per minuto (r.p.m.) in una microcentrifuga. Il supernatante viene trasferito in una nuova provetta, e si ripete eventualmente il ciclo fino ad ottenere la fase acquosa completamente trasparente. Viene aggiunto in seguito un volume (1:1) di fenolo/cloroformio, e si mescola fino ad ottenere un'emulsione. Si centrifuga la nuova miscela per 15 secondi a 12000 r.p.m. e la fase acquosa viene trasferita in una nuova provetta. Viene aggiunto un volume di cloroformio pari al volume del campione, si mescola nuovamente il tutto fino ad ottenere un'emulsione e si centrifuga per 15 secondi a 12.000 r.p.m. in una microcentrifuga.

### Precipitazione del DNA

La fase acquosa (supernatante) viene trasferita in una nuova provetta e a questa viene aggiunto un doppio volume di etanolo 95° e 1/10 di volume di acetato di sodio (NaAc) 3M pH 5.2. Si mescola e si lascia riposare a -20°C per almeno 2 ore. Il DNA viene fatto precipitare mediante centrifugazione a 12000 r.p.m. per 15 minuti. Il supernatante viene rimosso, mentre il DNA



precipitato (*pellet*) rimane sul fondo della provetta.

**Lavaggio con etanolo e diluizione del *pellet***

Vengono aggiunti circa 750  $\mu\text{L}$  di etanolo 70°, si mescola e si ripete la precipitazione centrifugando per 5 minuti a 12000 r.p.m. L'etanolo viene rimosso e il precipitato di DNA viene fatto asciugare a 37°C su un blocco termostato. Infine il DNA viene sospeso in 75-100  $\mu\text{L}$  di tampone TE 1X, e conservato a +4°C.

## Appendice n°2

### Purificazione dei prodotti PCR

Ai fini di ottimizzare il rendimento della PCR, di norma la miscela di reazione viene preparata con una quantità di *primer* e nucleotidi lievemente in eccesso, che devono essere però rimossi prima della fase di sequenziamento, con la quale potrebbero interferire negativamente. In particolare i *primer* rimanenti nel prodotto della PCR tendono a formare dimeri tra loro creando talvolta frammenti di lunghezza tale da poter costituire un segnale di interferenza e aumentare il cosiddetto “rumore di fondo” nel cromatogramma delle sequenze.

Per la purificazione dei prodotti PCR è stato utilizzato il kit ExoSAP-IT (Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase in *buffer*, © USB corporation 2000), un sistema enzimatico basato sull'azione congiunta di due enzimi idrolitici: una esonucleasi I, che degrada eventuali molecole di DNA rimaste a singolo filamento ed i *primer* residui, ed una fosfatasi alcalina, che idrolizza i dNTPs ancora presenti nella miscela.

Al termine del processo di purificazione è possibile effettuare una nuova corsa elettroforetica su gel di agarosio, al fine riquantificare il prodotto PCR purificato e verificare che non siano presenti ulteriori bande di basso peso molecolare costituite da dimeri di *primer*.

## Appendice n°3

### Provenienza e periodo di raccolta dei 106 individui di *R. ferrugineus* analizzati

Nazione	Regione/Provincia	Località	Periodo di raccolta	ID individuo
<b>Grecia</b>	Creta	Iraklion	14-18.VI.2011	GR01xxx
				GR04xxx
				GR09xxx
				GR10xxx
				GR11xxx
				GR12xxx
				GR13xxx
				RP26A03
				RP26A04
				RP26A05
		Maleme, Mistral Hotel	09.V.2012	RP38A01
				RP38A02
				RP38A03
		Pano Elounda	V.2012	RP39A01
				RP39A02
		Tavronitis	19.V.2012	RP40A01
		Chania	2.X.2012	RP41A01
<b>Italia</b>	Lazio	Roma, Università La Sapienza	04.VI.2010	RP04B01
		C.R. ENEA La Casaccia, S. Maria di Galera (RM)	29.X.2010	RP21C01
			24.IX.2013	RP21C02
			16.I.2014	RP21C03
				IV3.M1
			IV4.M2	
		Roma, Bioparco	27.X.2010	RP14A05
	Roma, zona Cecchignola	27.I.2010	RP11A01	
	Ostia, V. delle Azorre (RM)	20.XI.2009	RP06A01	
			RP06A03	
	Lavinio (RM)	03.XII.2009	RP08A04	
			RP08A05	
Puglia	SS 16 tra Molfetta e Giovinazzo (BA)	15.IX.2010	RP13A01	
			RP13A02	
			RP13A03	
Campania	Portici, Parco Gussone (NA)	16.IX.2010	RP19A01	
			RP19A02	
			RP19A03	
			RP19A05	

<b>Nazione</b>	<b>Regione/Provincia</b>	<b>Località</b>	<b>Periodo di raccolta</b>	<b>ID individuo</b>
	Sicilia	Palermo	01.XII.2010	RP24A01
		Cinisi (PA)	01.XII.2010	RP25A01 RP25A02
<b>Spagna</b>	Andalusia	Trafalgar (Cadiz)	VI.2013	RP52A01 RP52A02 RP52A03 RP52A04 RP52A05 RP52A06
<b>Qatar</b>	Ad Dawhah	Doha	14.III.2012	RP28A01 RP28A02 RP28A03 RP28A04 RP28A06 RP28A07 RP28A08 RP28A09 RP28A10
<b>Arabia Saudita</b>	Al Sharqiyya	Al Ahsa	6-20.III.2012	RP32A01 RP32A02 RP32A03 RP32A04 RP32A05
	Central Province	Diriyah, Al Amaria Road, vicino Ryhad	VI.2012	RP42A01 RP42A02 RP42A03 RP42A04 RP42A05
	Eastern Province	Umm Al Hamam (Qatif)	VI.2012	RP43A01 RP43A02 RP43A03 RP43A04
<b>Cina</b>	Fujian Province	Fuzhou	15.IV.2011	RP36A01 RP36A02 RP36A03 RP36A04

<b>Nazione</b>	<b>Regione/Provincia</b>	<b>Località</b>	<b>Periodo di raccolta</b>	<b>ID individuo</b>
<b>Vietnam</b>	Hanoi	Hanoi, Nghia Do	8-15.XII.2012	RP44A01 RP44A02 RP44A03 RP44A04 RP44A05
		Hanoi, My Dihn	14-18.XII.2012	RP44B01 RP44B02 RP44B03 RP44B04 RP44B05 IV3.M2 IV4.M1
	Tuyen Quang	Tuyen Quang	5-6.VI.2013	RP53A01 RP53A02 RP53A03 RP53A04 RP53A05
<b>Malesia</b>	Kelantan	Kota Bharu	IV.2013	RP46A01 RP46A02 RP46A03 RP46A04 RP46A05 RP46A06 RP46A07 RP46A08 RP46A09 RP46A10 RP46A11 RP46A12 RP46A13 RP46A14 RP46A15 RP46A16 RP46A17

## Appendice n°4

### Protocollo di *silver staining* per la colorazione di gel di poliacrilammide (Bembouza *et al.*, 2006)

Ogni fase di immersione del gel è eseguita in una vaschetta di plastica posta su un agitatore.

1. Immergere il gel in 0.25 L di *fixing solution* fredda (10-12 °C) per 5 minuti.
2. Immergere il gel in 0.25 L di *impregnation solution* a temperatura ambiente (22-24 °C) per 6-7 minuti.
3. Sciacquare velocemente (10-15 s) il gel in 0.25 L di acqua distillata.
4. Immergere il gel in 0.25 L di *developing solution* a temperatura ambiente (22-24 °C) fino a che le bande non acquistino l'intensità desiderata (3-5 minuti).
5. Immergere il gel in 0.25 L di *stop solution* per 2 minuti.
6. Visualizzare il gel su di un trans-illuminatore a luce bianca.

#### ***Fixing solution*** (1 L):

- 100 mL etanolo assoluto
  - 5 mL acido acetico
- portare a volume con acqua distillata.

#### ***Impregnation solution*** (1 L):

- 1.5 g nitrato d'argento
  - 998.5 mL acqua distillata
  - 1.5 mL formaldeide 37%
- Aggiungere la formaldeide alla soluzione solo prima dell'utilizzo.

#### ***Developer solution*** (1 L):

- 15 g idrossido di sodio
  - 998 mL acqua distillata
  - 2 mL formaldeide 37%
- Aggiungere la formaldeide alla soluzione solo prima dell'utilizzo.

#### ***Stop solution*** (1 L):

- 100 mL etanolo assoluto
  - 5 mL acido acetico
- portare a volume con acqua distillata.

## Appendice n°5

### Caratteristiche dei 98 microsatelliti individuati tramite *mining* bioinformatico e posizione del motivo ripetuto e dei suoi *primer* sulla sequenza prodotta dal 454

Codice read o contig 454	Lunghezza SSR (bp)	Numero ripetizioni	Motivo ripetuto	prodotto PCR (bp)	primer L (bp)	SSR (bp)	primer R (bp)
G1RQ0Q003CX8HH	51	17	tta	167	42	118	208
G1RQ0Q003C6KHH	22	11	ta	300	41	192	340
G1RQ0Q003DA9H4	22	11	ta	212	200	228	411
G1RQ0Q004D5QFR	20	10	at	148	187	264	334
G1RQ0Q003C98CU	18	9	gt	111	202	236	312
G1RQ0Q003CY8XR	18	9	ta	80	272	302	351
G1RQ0Q003CZSXI	18	9	tg	154	228	257	381
G1RQ0Q004ERLPG	18	9	ta	112	3	43	114
G1RQ0Q004EUH5H	18	9	tc	79	1	30	79
cons18_3_A	18	9	tc	77	46	71	122
cons22_2_A	24	8	att	159	42	99	200
G1RQ0Q003C2F9O	16	8	tg	95	169	221	263
G1RQ0Q004D7478	16	8	ca	83	0	35	82
contig00190	35	7	ccaaa	176	35	142	210
G1RQ0Q003C0AQH	21	7	tga	147	246	318	392
G1RQ0Q003C4XH7	21	7	gtg	170	181	229	350
G1RQ0Q003DGCXF	21	7	cga	95	2	35	96
G1RQ0Q003C1QSO	14	7	ac	179	292	359	470
G1RQ0Q003CXLNA	14	7	ta	95	352	403	446

<b>Codice read o contig 454</b>	<b>Lunghezza SSR (bp)</b>	<b>Numero ripetizioni</b>	<b>Motivo ripetuto</b>	<b>Lunghezza prodotto PCR (bp)</b>	<b>Posizione inizio primer L (bp)</b>	<b>Posizione inizio SSR (bp)</b>	<b>Posizione fine primer R (bp)</b>
G1RQ0Q003CZQBN	14	7	ac	78	363	387	440
G1RQ0Q003DJHC8	14	7	ta	281	120	158	400
G1RQ0Q004D5HU8	14	7	ta	103	168	207	270
G1RQ0Q004EIC80	14	7	tg	96	7	64	102
G1RQ0Q004ER8MM	14	7	at	117	179	249	295
cons16_2_A	14	7	ta	146	102	165	247
cons17_3_A	14	7	at	239	166	233	404
G1RQ0Q003C9SKG	18	6	gtt	148	199	247	346
G1RQ0Q003CVXZJ	18	6	gtt	222	124	191	345
G1RQ0Q003DCNU6	18	6	att	98	17	71	114
G1RQ0Q003DD4UV	18	6	cga	82	92	128	173
G1RQ0Q003DJU6Y	18	6	tta	158	289	374	446
G1RQ0Q004D26HV	18	6	tta	195	62	215	256
G1RQ0Q004D8CCZ	18	6	cgg	228	266	352	493
G1RQ0Q004D8TDH	18	6	aac	206	24	163	229
G1RQ0Q004EMPDC	18	6	atg	155	34	137	188
G1RQ0Q004ER9VZ	18	6	tca	127	226	261	352
G1RQ0Q004ETNCN	18	6	cat	160	229	254	388
cons24_4_A	18	6	tat	241	28	191	268
G1RQ0Q003C1U2M	12	6	ca	91	15	73	105
G1RQ0Q003C3J3Y	12	6	at	178	13	152	190
G1RQ0Q003CXIB8	12	6	ta	77	22	49	98
G1RQ0Q003CY0GZ	12	6	ac	101	167	195	267
G1RQ0Q003CZXGA	12	6	at	118	9	91	126



<b>Codice read o contig 454</b>	<b>Lunghezza SSR (bp)</b>	<b>Numero ripetizioni</b>	<b>Motivo ripetuto</b>	<b>Lunghezza prodotto PCR (bp)</b>	<b>Posizione inizio primer L (bp)</b>	<b>Posizione inizio SSR (bp)</b>	<b>Posizione fine primer R (bp)</b>
G1RQ0Q003DAZ1O	12	6	ta	138	17	53	154
G1RQ0Q003DB2UP	12	6	ga	138	215	313	352
G1RQ0Q003DGZ3P	12	6	ta	130	295	371	424
G1RQ0Q003DJKMG	12	6	ta	100	32	72	131
G1RQ0Q003DKBJQ	12	6	at	75	161	182	235
G1RQ0Q003DM94T	12	6	ta	255	67	102	321
G1RQ0Q003DOESY	12	6	ac	132	200	254	331
G1RQ0Q004D380I	12	6	gt	105	208	270	312
G1RQ0Q004D8CL1	12	6	at	90	102	151	191
G1RQ0Q004D983G	12	6	ct	259	143	353	401
G1RQ0Q004EBXMH	12	6	ga	80	376	420	455
G1RQ0Q004EDMYU	12	6	ca	107	40	92	146
G1RQ0Q004EI1YR	12	6	ac	95	157	217	251
G1RQ0Q004EMSQO	12	6	tc	88	26	54	113
G1RQ0Q004ESM5V	12	6	ga	90	328	348	417
concat16_A	12	6	ta	207	99	130	305
cons26_2_A	12	6	at	125	27	60	151
cons29_2_A	12	6	at	117	0	60	116
G1RQ0Q003DLVBY	30	5	ggtttg	94	378	421	471
G1RQ0Q003DEJ6E	25	5	ggttt	93	251	299	343
G1RQ0Q003C1FPB	20	5	agat	90	63	96	152
G1RQ0Q003CWOA2	20	5	gaag	254	47	251	300
G1RQ0Q003CY6I6	20	5	tttg	163	319	441	481
G1RQ0Q003DA04O	20	5	caga	304	11	266	314

<b>Codice read o contig 454</b>	<b>Lunghezza SSR (bp)</b>	<b>Numero ripetizioni</b>	<b>Motivo ripetuto</b>	<b>Lunghezza prodotto PCR (bp)</b>	<b>Posizione inizio primer L (bp)</b>	<b>Posizione inizio SSR (bp)</b>	<b>Posizione fine primer R (bp)</b>
G1RQ0Q003DP7AQ	20	5	ctaa	99	33	62	131
G1RQ0Q004D2MB9	20	5	tgaa	98	83	117	180
G1RQ0Q004D632Y	20	5	attc	141	337	428	477
G1RQ0Q004ES0WJ	20	5	taaa	106	196	224	301
G1RQ0Q004ES69O	20	5	attd	232	68	123	299
G1RQ0Q003C2KK8	15	5	ttc	89	187	239	275
G1RQ0Q003C5YNK	15	5	cac	136	182	280	317
G1RQ0Q003CZXJA	15	5	cat	173	196	242	368
G1RQ0Q003DLSNH	15	5	cag	89	25	72	113
G1RQ0Q003DOGPF	15	5	tca	153	269	291	421
G1RQ0Q003DQN9V	15	5	atc	117	185	265	301
G1RQ0Q004EBS8U	15	5	atc	320	128	314	447
G1RQ0Q004EDZ2X	15	5	gaa	114	295	343	408
G1RQ0Q004EIRDK	15	5	gtg	132	174	233	305
G1RQ0Q004EK3YZ	15	5	tcc	77	237	268	313
G1RQ0Q004ENLHX	15	5	tct	142	210	234	351
G1RQ0Q004EOIK6	15	5	tcg	135	154	242	288
G1RQ0Q004EQN2T	15	5	ata	173	43	87	215
cons1_2_A	15	5	tcg	75	424	465	498
cons23_3_A	15	5	ctt	158	197	312	354
cons30_2_A	15	5	gtc	90	0	22	89
cons35_2_A	15	5	gat	78	323	349	400
cons37_2_A	15	5	tgt	75	125	156	199
contig00100	15	5	att	75	210	242	284

<b>Codice read o contig 454</b>	<b>Lunghezza SSR (bp)</b>	<b>Numero ripetizioni</b>	<b>Motivo ripetuto</b>	<b>Lunghezza prodotto PCR (bp)</b>	<b>Posizione inizio primer L (bp)</b>	<b>Posizione inizio SSR (bp)</b>	<b>Posizione fine primer R (bp)</b>
G1RQ0Q003C1EL7	10	5	ta	82	215	246	296
G1RQ0Q003CYLAC	10	5	ac	141	89	173	229
G1RQ0Q003CYMZJ	10	5	ag	98	44	73	141
G1RQ0Q003DMCBN	10	5	tg	154	5	85	158
G1RQ0Q004D181Z	10	5	ta	94	125	182	218
G1RQ0Q004EEQSG	10	5	ta	93	271	320	363
cons9_3_A	10	5	ta	267	39	94	305

## Appendice n°6

### Caratteristiche dei *primer* dei 98 microsatelliti individuati tramite *mining* bioinformatico

Codice identificativo <i>read o contig 454</i>	Sequenza Primer Left (L)	Sequenza Primer Right (R)	Primer L (bp)	Primer R (bp)	Primer L Tm	Primer R Tm	Primer L GC %	Primer R GC %
G1RQ0Q003CX8HH	AAGGATTAACCCGCGACT	CAATCCGTCATAATGTTTATAGGGT	20	25	59.966	59.474	45.000	36.000
G1RQ0Q003C6KHH	TCCGATTCTGTTTCAGACCAA	TCCTTTATACCGCGGAAGTG	20	20	59.215	60.089	45.000	50.000
G1RQ0Q003DA9H4	TCCCATGCCATTGCTATTTT	GAAACGGGAAACGACTACCA	20	20	60.289	59.971	40.000	50.000
G1RQ0Q004D5QFR	CAGTTTGTATGGTGGCGTTG	GGTCTAGTCGATATTGGCCG	20	20	60.027	59.551	50.000	55.000
G1RQ0Q003C98CU	TGATTAACCCAAAGTTGTTTCG	TGCGGTTGTCAACAATAAGTG	21	21	57.679	59.641	38.095	42.857
G1RQ0Q003CY8XR	AACCTCCGGAATCGTACCTT	CTCATCCATCGTCCATTCG	20	19	59.827	60.015	50.000	52.632
G1RQ0Q003CZSXI	CAAGATCAAAATTAATGAATGTGTGT	GACGCGACAACATAGCTGAA	27	20	59.643	60.019	25.926	50.000
G1RQ0Q004ERLPG	CGGCCATTTGCTTCATGTTA	GTTTTAAGCTGCTGTTGATTTGAG	20	24	61.900	59.515	45.000	37.500
G1RQ0Q004EUH5H	TCAGCTGTTTCAACGTTCTCTT	GGTTTCAAAAGCCACGTTTT	22	20	59.169	59.111	40.909	40.000
cons18_3_A	TTCTTACGTCTCCTCTTGCTCC	AAGTACAGATCGTTATCGACGGA	22	23	60.019	60.035	50.000	43.478
cons22_2_A	TCGTCAGTTAGATCCCATGAT	GAAAGCTTTTAATTTATCATAACACGC	21	26	57.060	58.847	42.857	30.769
G1RQ0Q003C2F9O	ACCAGTCGTCATTTCCCTTG	TTGTATAGGTATCAGGTAAGCAATG	20	27	59.966	59.062	50.000	33.333
G1RQ0Q004D7478	CCCAACAAAATAACGCAACA	TTTCATAATTCTCCGCGGTC	21	20	60.745	60.038	38.095	45.000
contig00190	CCTGGTGAATTGACCGATTT	GGGTTTGGGTTTGGTTAGGT	20	20	59.790	59.955	45.000	50.000
G1RQ0Q003C0AQH	CTTTTGGATGGAAAAGGCAG	CGCGGAATGTATTTATTCGAT	20	21	59.679	58.973	45.000	38.095
G1RQ0Q003C4XH7	GTCTGTTTGGTGGAGCGATG	CCTGTCATTGCTTCTGCTGT	20	20	61.669	59.037	55.000	50.000
G1RQ0Q003DGCXF	CTCCAATATGCAAGTGACGC	GCGACCTGTATGGAATTCGT	20	20	59.301	59.962	50.000	50.000
G1RQ0Q003C1QSO	GTCGAGATATAGCGTCCCA	CCGTTCCGGTTTTGGTACAAT	20	20	60.059	59.724	55.000	45.000
G1RQ0Q003CXLNA	CAACGCTGCCTCTAACATCT	GGATATGTGAGCGCTAAGTTATTAT	20	25	58.132	57.262	50.000	36.000
G1RQ0Q003CZQBN	CAAACCTCCACTAGGGCAAAGA	GTCATACCAAAAGCCGGAGA	21	20	59.364	60.074	47.619	50.000

<i>read o contig 454</i>	Sequenza Primer Left (L)	Sequenza Primer Right (R)	Primer L (bp)	Primer R (bp)	Primer L Tm	Primer R Tm	Primer L GC %	Primer R GC %
G1RQ0Q003DJHC8	AATGGTACGTATAGATGCCAATAAA	GCAGGTTATTCATATCGCCC	25	20	58.101	59.397	32.000	50.000
G1RQ0Q004D5HU8	CCCGTAATTTAGCTCCTCCC	GCCAAAGATTAATTCTGTTTTAGTCA	20	26	59.924	59.215	55.000	30.769
G1RQ0Q004EIC80	TGCCCTGTTCTTCCAAGTTC	TTCTGTTGTTGGTTGATGTGC	20	21	60.232	59.606	50.000	42.857
G1RQ0Q004ER8MM	GCTGTTGATGGTCTTCCTT	CAACCGTAATAAACCCGAGG	20	20	59.141	59.334	50.000	50.000
cons16_2_A	CAGCTACAAACAGTGCCTTTATC	GCTGGAAAAGGCAAGGAAAT	23	20	58.163	60.562	43.478	45.000
cons17_3_A	ACGACGACATTCATCGAACA	CATCAGTAGGAACAAAGATGCG	20	22	60.120	59.769	45.000	45.455
G1RQ0Q003C9SKG	TGGGGTATCTTGCTCTTTGG	ACGGTCGTGTCGAAGATACC	20	20	60.066	59.997	50.000	55.000
G1RQ0Q003CVXZJ	AAACGGCTCGATATACGTGG	ACAAATGGTCGGAGAACGAC	20	20	59.982	59.973	50.000	50.000
G1RQ0Q003DCNU6	TAAGTGCTTCGTGCCAAGTG	TGCGCTGTTAACCAAGTGAG	20	20	60.050	60.050	50.000	50.000
G1RQ0Q003DD4UV	ACGTCAAATTCTCGTACGGC	GTTAGGGGTGGGCAAGAAAT	20	20	60.140	60.187	50.000	50.000
G1RQ0Q003DJU6Y	GGTGTAACATACAAGATTGCCAAC	TCCAAACCTTCACGTATCGAC	24	21	59.713	59.985	41.667	47.619
G1RQ0Q004D26HV	CGTCGGGAAAACATGAACTT	TGATTTATTTCCGACCGAGC	20	20	59.971	60.038	45.000	45.000
G1RQ0Q004D8CCZ	AAGGGCTTCGAAAGAGGAAC	CCTGCTCTAATTCCCACAGC	20	20	59.827	59.836	50.000	55.000
G1RQ0Q004D8TDH	ATCGTAGGCCAGGGACTTTT	GGCATAGAGACTGAGGTTTGG	20	21	59.962	58.803	50.000	52.381
G1RQ0Q004EMPDC	GTCAACTGGGGCGAGATTTA	TACTGTACATCAGCGGACC	20	20	60.074	59.707	50.000	55.000
G1RQ0Q004ER9VZ	AAGAAACCTGAGTGCCATTGA	GAAGAATATTCGGCCCTCCT	21	20	59.726	59.515	42.857	50.000
G1RQ0Q004ETNCN	TCACGCGTAGCACTAACGTC	TGTTTGTGTCGCGAGATTTT	20	20	60.081	59.322	55.000	40.000
cons24_4_A	CGGGTTTTAGGGTCGAGATT	TGAGACCTGAACTTAGGAAGTGG	20	23	60.312	59.797	50.000	47.826
G1RQ0Q003C1U2M	TCTCTTGTGCCTGAAATGGA	TCGTGAATTGTTGAACGAGC	20	20	59.369	59.847	45.000	45.000
G1RQ0Q003C3J3Y	GATAGAGCAAGAGCGGCAAC	TAGGGTGTGGTAAAAGCCCC	20	20	60.125	61.088	55.000	55.000
G1RQ0Q003CXIB8	TTCAATGTAGTTACGGGTTTTAAGC	CCATCCTCCCAACTGAGACT	25	20	59.865	59.101	36.000	55.000
G1RQ0Q003CY0GZ	CAACATGAAACAAAGCACCC	AACGTCGTTTTACCGTTGGT	20	20	59.024	59.401	45.000	45.000
G1RQ0Q003CZXGA	TCCGTAAATGAAGTTATCCGAGA	TTCGGTATATTTCTTCCAGCG	23	21	59.977	59.221	39.130	42.857
G1RQ0Q003DAZ1O	TGATGCACTTGTTGGGATTG	ACTTGTTTTGCAGGGGTTTG	20	20	60.517	60.008	45.000	45.000

<b>Codice identificativo read o contig 454</b>	<b>Sequenza Primer Left (L)</b>	<b>Sequenza Primer Right (R)</b>	<b>Primer L (bp)</b>	<b>Primer R (bp)</b>	<b>Primer L Tm</b>	<b>Primer R Tm</b>	<b>Primer L GC %</b>	<b>Primer R GC %</b>
G1RQ0Q003DB2UP	ATATTATGCGGCTGTCCTCG	AAGAGATATGCACGCCTTGG	20	20	60.081	60.235	50.000	50.000
G1RQ0Q003DGZ3P	GGAAAGGAACCCTCGAAATG	CCTCGTCGTGAAACCAATTT	20	20	60.797	59.971	50.000	45.000
G1RQ0Q003DJKMG	GACGTGCAAGGACTGTTTCA	CCATTTTAGCCATACAGGGAA	20	21	59.880	58.953	50.000	42.857
G1RQ0Q003DKBJQ	AAAAGCTCTATTGTGCGACCA	TCTTCAGTTTCAAATCCACTTTCA	21	24	59.897	60.142	42.857	33.333
G1RQ0Q003DM94T	CGAGACTTTTCAGCCCATGT	GTTTGTACATTTTGCCACG	20	20	60.255	60.011	50.000	45.000
G1RQ0Q003DOESY	GTTCGAACACATCCCCAGTT	GAGGCTTACCATGTGACCGT	20	20	59.827	59.997	50.000	55.000
G1RQ0Q004D380I	TTGCTGGCAGTGTTATTTGC	ACCATAATGAAAGCGATGCC	20	20	59.879	59.929	45.000	45.000
G1RQ0Q004D8CL1	GCAACCTTAATACATGCGGAA	GAGATGCCACGAAAAGCAAT	21	20	59.978	60.221	42.857	45.000
G1RQ0Q004D983G	ACAGCCAATGCACGTTATCA	TCGGAGCGGATTATTTCTTC	20	20	60.142	59.254	45.000	45.000
G1RQ0Q004EBXMH	CGAAGCAATTGCGAACTGTA	AAATTTAGATTGCCGGGCTT	20	20	60.014	59.936	45.000	40.000
G1RQ0Q004EDMY	CCTTCAGTATTCACCCGACC	AAATGTCGTCTCACCCCGTA	20	20	59.405	60.375	55.000	50.000
G1RQ0Q004EI1YR	GCAAATTGTTACGTTGTCGC	GTTTGTGTCTGTGCGCGT	20	18	59.234	59.436	45.000	55.556
G1RQ0Q004EMSQO	TCTTCACTTCTCCCAGCCAT	CGGCTCTAACAATAAAACAATTC	20	23	59.803	57.166	50.000	34.783
G1RQ0Q004ESM5V	AAAGAGCGGAGACGTGGAC	GCCCTCGTGAGAACAACCTTC	19	20	60.402	59.851	57.895	55.000
concat16_A	ACCCGTTTCGGTTATTGTGAG	TGATTGCAAAATATCAGGCG	20	20	59.853	59.662	50.000	40.000
cons26_2_A	GGTGCAACTTATTTTCCTACAGC	TGAATTTGACTTTGATATTTGCC	23	23	59.240	58.188	43.478	30.435
cons29_2_A	CAACTGTACCAAATTGGAAATCA	CACAACACCATCTGTTCTGAAA	23	22	58.909	58.675	34.783	40.909
G1RQ0Q003DLVBY	TTTAATTTGTTTCGATCATCGGTT	CAAAACAAACCAAACCAAAC	23	21	59.741	57.128	30.435	33.333
G1RQ0Q003DEJ6E	TTGTTTCAGCAAATCCTTCCC	CAAAACCAAACCAAACCAAAC	20	20	60.051	59.198	45.000	40.000
G1RQ0Q003C1FPB	GCCGTTGATGTTGATACACG	TGCAAGACTTTTGTTCGTCA	20	21	59.995	59.497	50.000	38.095
G1RQ0Q003CWOA2	TTATCTGCCTCTCGGCTCAT	CGCTTTGACGACCTCCTAAG	20	20	59.939	60.008	50.000	55.000
G1RQ0Q003CY6I6	AAGCGTTCCCGGTTTACTTT	TGATGATGCAAGTGTGAAACG	20	21	60.001	60.715	45.000	42.857
G1RQ0Q003DA04O	CATGGGGAGGCATTATTTCA	CAAAACTACAATCGTCGCCA	20	20	60.660	59.729	45.000	45.000
G1RQ0Q003DP7AQ	GCCTATGCTACACAAAATAACAGC	GGCAAACCTTATGAATGCAGGA	24	21	59.298	60.089	41.667	42.857

<b>Codice identificativo read o contig 454</b>	<b>Sequenza Primer Left (L)</b>	<b>Sequenza Primer Right (R)</b>	<b>Primer L (bp)</b>	<b>Primer R (bp)</b>	<b>Primer L Tm</b>	<b>Primer R Tm</b>	<b>Primer L GC %</b>	<b>Primer R GC %</b>
G1RQ0Q004D2MB9	TGATATTCGAAGACTGGTATAACAAA	GCGTCGTATCAACAAACCAA	26	20	58.299	59.590	30.769	45.000
G1RQ0Q004D632Y	CAACTGATGTGGCCGATAGA	GACCCTAAGCAATCAATTTTCTG	20	23	59.673	59.175	50.000	39.130
G1RQ0Q004ES0WJ	AAAATTACCAACTTCCTAAATATGGAC	AGCCTGAGCTATGGGAATCA	27	20	58.469	59.797	29.630	50.000
G1RQ0Q004ES69O	AGCGTATCTAGCGTGTGGCT	TGATGAGCTGCGTTAGGATG	20	20	60.067	59.972	55.000	50.000
G1RQ0Q003C2KK8	CTTGTGAGCAGCATTCCGGTA	TGCCTTCTGTAAATGATTCCG	20	21	60.011	60.081	50.000	42.857
G1RQ0Q003C5YNK	ACGGGGACATAACATGGAAA	ACCAGCCTGTTCTTGAGCTA	20	20	60.051	60.012	45.000	55.000
G1RQ0Q003CZXJA	ATCGTAGTGGCAAGGCTACG	GCCAAGCAAACAATTCTCC	20	20	60.292	59.691	55.000	45.000
G1RQ0Q003DLSNH	CGACGTTTCTCGTGCTGTAG	TACGTGGCCTTAAACGTTGC	20	20	59.658	61.046	55.000	50.000
G1RQ0Q003DOGPF	GGTCTATGTTTGACGCCCTC	GGTCGATTGCTAATCATGGC	20	20	59.700	60.444	55.000	50.000
G1RQ0Q003DQN9V	ACCGAAACAAAGTCGGATTG	TCTTACGGCGGACAAGAGAT	20	20	59.971	59.836	45.000	50.000
G1RQ0Q004EBS8U	CAAGCGAAGCAATGACTTGA	GCAAACGCTACACCCACTTT	20	20	60.134	60.176	45.000	50.000
G1RQ0Q004EDZ2X	TGCAGGAAGTTTCTTTCCGGT	TTCTACGCGGGATTTATTCG	20	20	59.853	60.054	45.000	45.000
G1RQ0Q004EIRDK	TCAGCTTCGGAGATTCGTT	CACGCCTTTTGACTCAGTT	20	20	59.955	60.291	45.000	50.000
G1RQ0Q004EK3YZ	GAAGAATTTGGCAGTGGCAT	AATGAAGGAGTGCTGGAGGA	20	20	60.081	59.803	45.000	50.000
G1RQ0Q004ENLHX	GGTGAAAATGTATTTCCCCTG	TACCCCAGTTGTGCCATTC	21	20	58.290	60.755	42.857	50.000
G1RQ0Q004EOIK6	TGCTTTCCTTCTTGTGCTT	TGATGACGATGACGAAGACG	20	20	59.993	60.840	45.000	50.000
G1RQ0Q004EQN2T	TGTTTCATGAAATCATATCTTAGTGTTT	TATGTGTCAGGTCGGGGAAT	27	20	57.459	60.195	25.926	50.000
cons1_2_A	CCTCGAGGTCTCCGACCA	GGGCTGACGTAGAGCAACA	18	19	62.434	60.000	66.667	57.895
cons23_3_A	AGAGGAAACAAACGCGCTAA	CGTATAAAAGTTGGAGCAGCG	20	21	60.018	59.918	45.000	47.619
cons30_2_A	CGATACCGTACGCCACTTTT	GTCGAGGAGACCAACCACC	20	19	60.018	60.520	50.000	63.158
cons35_2_A	GGCCAGCGATTGTTGTAAAG	CGTACGTCAGCACCATCATC	20	20	60.637	60.144	50.000	55.000
cons37_2_A	TCACTCAGTCCACCATCTCTGT	CAGAGACAGAGACAGAGACAACA	22	23	59.756	57.298	50.000	47.826
contig00100	AATCGCTTTATTGTAAATCATGTG	CATCGTATAACCACAAAGCAATATAA	24	25	57.414	57.404	29.167	32.000
G1RQ0Q003C1EL7	CGCCAAAGTATTTAGAGTACAAGGA	CACTTCCACTGATCTATAGGGAGA	25	24	60.083	58.804	40.000	45.833

<b>Codice identificativo read o contig 454</b>	<b>Sequenza Primer Left (L)</b>	<b>Sequenza Primer Right (R)</b>	<b>Primer L (bp)</b>	<b>Primer R (bp)</b>	<b>Primer L Tm</b>	<b>Primer R Tm</b>	<b>Primer L GC %</b>	<b>Primer R GC %</b>
G1RQ0Q003CYLAC	CCCAACCCCATACCTCTTTT	AGGAAAGGAAAGCATGCAGA	20	20	60.046	59.955	50.000	45.000
G1RQ0Q003CYMZJ	TCAGCATTACAGGGAGAAAGC	CGGCGCCAACAGATTATTT	20	19	60.483	60.976	50.000	47.368
G1RQ0Q003DMCB	TAGGCACGAAAATACCGCTT	CCCATATCCGACGTCTCTTT	20	20	59.742	59.006	45.000	50.000
G1RQ0Q004D181Z	CGGTTTCCACTGTTACCGTT	TTGAGCAATTAGCAATGAACC	20	21	59.891	57.912	50.000	38.095
G1RQ0Q004EEQSG	ACAGCCATCGTCGATCATT	AAATTTTCAGGCAAATCCTCG	20	20	59.105	59.158	45.000	40.000
cons9_3_A	GTGAGTCCACAATCTGCCCT	AGTGTCAGTGCATCCCAATG	20	20	60.120	59.551	55.000	50.000

**Tm**, temperatura di *melting*; **GC%**, contenuto percentuale di guanine e citosine nella sequenza nucleotidica



## Appendice n°7

### Genotipi dei 106 individui di *R. ferrugineus* analizzati sui 16 marcatori microsatelliti risultati polimorfici

ID individuo	RPW02	RPW03	RPW06	RPW11	RPW13	RPW16	RPW17	RPW20	RPW22	RPW24	RPW25	RPW26	RPW32	RPW36	RPW38	RPW39
GR01xxx	300 300	214 214	104 106	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 218	145 145	151 157	191 191
GR04xxx	300 300	214 214	96 106	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 99	136 136	218 238	145 145	151 151	193 205
GR09xxx	300 300	214 214	78 78	158 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	145 145	151 151	193 205
GR10xxx	300 300	214 214	96 96	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	145 145	151 151	205 205
GR11xxx	300 300	214 214	78 96	161 161	172 172	226 229	222 222	86 86	163 163	95 95	95 99	136 140	238 238	143 145	151 163	205 205
GR12xxx	300 300	214 214	94 96	158 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	145 145	151 151	205 205
GR13xxx	300 300	214 214	78 96	158 161	172 172	226 229	222 222	86 86	163 163	95 95	95 95	140 140	238 238	145 145	151 151	193 207
RP26A03	300 304	212 214	78 92	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 95	140 140	238 238	145 145	151 157	205 205
RP26A04	300 300	214 214	78 78	161 161	172 175	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	143 145	151 151	205 205
RP26A05	300 300	212 214	78 96	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	143 145	151 161	205 205
RP38A01	300 300	214 214	94 104	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	145 145	157 157	205 207
RP38A02	300 300	214 214	78 96	158 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	143 143	151 157	205 207
RP38A03	300 300	214 214	96 96	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	143 143	151 151	205 207
RP39A01	300 300	214 214	94 106	158 158	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 218	143 143	151 157	205 207
RP39A02	300 300	214 214	78 106	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 163	95 95	95 95	140 140	218 218	143 145	151 151	205 207
RP40A01	300 300	214 214	78 90	158 158	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	143 145	151 157	193 193
RP41A01	300 300	212 214	78 94	158 161	172 172	229 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	238 238	143 143	151 157	193 205
IV3.M1	300 300	214 214	78 96	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	159 163	95 95	99 99	140 140	238 238	143 145	157 163	193 205
IV4.M2	300 300	212 214	78 98	158 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 238	145 145	157 163	205 205
RP04B01	300 302	202 214	78 96	158 158	172 172	226 229	222 222	86 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	143 145	157 163	205 207
RP06A01	300 302	212 214	96 96	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	145 145	157 157	205 205
RP06A03	300 300	214 214	96 96	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	145 145	157 163	193 205

ID individuo	RPW02	RPW03	RPW06	RPW11	RPW13	RPW16	RPW17	RPW20	RPW22	RPW24	RPW25	RPW26	RPW32	RPW36	RPW38	RPW39
RP08A04	300 300	214 214	96 96	158 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	238 238	145 145	151 151	205 205
RP08A05	300 300	214 214	78 96	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 238	145 145	151 163	205 205
RP11A01	300 300	212 214	78 96	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 238	145 145	151 151	205 205
RP13A01	302 304	214 214	78 78	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	143 145	151 151	191 191
RP13A02	302 302	214 214	78 78	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	143 145	157 163	191 191
RP13A03	302 302	214 214	0 0	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	140 140	218 218	145 145	151 151	193 205
RP14A05	300 300	202 214	78 92	158 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	145 145	151 157	193 205
RP19A01	300 300	214 214	94 94	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	143 145	163 163	205 205
RP19A02	300 302	202 202	94 104	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	136 140	218 218	145 145	151 157	205 205
RP19A03	300 302	214 214	94 104	161 161	172 172	229 229	222 222	82 86	159 163	95 95	95 99	136 136	218 218	145 145	151 151	205 205
RP19A05	300 300	212 214	78 94	161 161	172 172	226 229	222 222	86 86	159 163	95 95	95 99	140 140	238 238	145 145	151 151	205 205
RP21C01	300 300	212 214	96 96	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	159 163	95 95	95 99	140 140	218 218	143 145	163 163	193 207
RP21C02	300 300	214 214	96 104	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	159 163	95 95	95 95	136 140	218 218	143 143	163 163	205 205
RP21C03	300 300	214 214	78 98	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	136 140	218 218	143 145	151 151	205 205
RP24A01	300 302	214 214	90 104	158 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 218	145 145	157 163	203 207
RP25A01	300 300	210 212	90 96	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 163	95 95	95 95	140 140	218 218	143 145	161 163	193 205
RP25A02	300 304	202 214	78 78	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 95	136 136	218 238	143 145	161 163	205 205
RP52A01	300 300	202 202	106 106	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	132 136	218 238	145 145	163 163	191 207
RP52A02	300 300	214 214	96 96	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 238	145 145	163 163	207 207
RP52A03	300 300	212 214	96 106	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 238	145 145	157 163	207 207
RP52A04	300 302	202 202	90 104	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	99 99	140 140	238 238	143 145	161 163	207 207
RP52A05	300 300	212 214	96 106	158 161	172 172	226 229	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	136 140	218 238	143 145	163 163	205 207
RP52A06	300 300	202 202	90 96	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	136 140	218 238	143 145	151 163	203 205
RP28A01	294 302	202 202	78 94	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	143 145	159 161	205 207
RP28A02	294 294	202 202	90 104	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	145 145	161 163	205 207
RP28A03	300 300	202 204	78 90	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 163	95 95	95 99	140 140	218 238	145 145	159 161	191 207

ID individuo	RPW02	RPW03	RPW06	RPW11	RPW13	RPW16	RPW17	RPW20	RPW22	RPW24	RPW25	RPW26	RPW32	RPW36	RPW38	RPW39
RP28A04	302 302	202 202	78 106	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	145 145	161 163	191 205
RP28A06	294 294	202 202	78 90	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	145 145	159 161	191 191
RP28A07	300 302	202 202	96 96	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 159	95 95	95 95	140 140	218 218	145 145	161 161	191 191
RP28A08	300 302	202 202	90 104	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 163	95 95	95 99	136 140	218 238	145 145	159 161	207 207
RP28A09	300 302	202 202	78 104	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	159 163	95 95	95 95	136 136	218 218	145 145	161 161	191 207
RP28A10	300 302	202 204	90 104	158 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 159	95 95	95 99	140 140	218 238	145 145	161 163	191 191
RP32A01	300 300	186 232	86 86	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 159	87 95	99 99	140 140	218 218	139 145	163 163	203 207
RP32A02	294 300	204 204	90 108	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	159 163	87 95	95 95	140 140	218 238	139 143	163 163	207 207
RP32A03	294 300	204 204	90 104	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	87 87	95 103	140 140	218 218	145 145	163 163	191 205
RP32A04	294 300	186 186	0 0	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	99 99	136 140	218 218	139 145	157 163	191 205
RP32A05	300 300	0 0	90 90	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 163	95 95	95 99	140 140	218 218	139 145	157 167	191 207
RP42A01	300 300	204 204	90 90	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 218	139 143	163 167	191 203
RP42A02	292 300	204 204	90 108	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	159 159	95 95	95 99	140 140	218 218	139 139	157 161	207 207
RP42A03	300 322	212 214	86 104	161 161	172 172	226 226	222 222	82 82	163 163	95 95	99 99	140 140	218 218	139 143	161 163	191 207
RP42A04	292 300	0 0	90 108	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	87 95	95 99	140 140	218 218	143 145	161 167	191 207
RP42A05	300 324	0 0	86 86	161 161	172 172	226 226	222 222	82 82	159 163	95 95	99 99	140 140	218 218	139 139	159 161	191 203
RP43A01	302 302	202 202	86 90	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 95	136 136	218 238	143 145	163 163	191 203
RP43A02	292 294	202 202	90 90	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	145 145	159 161	205 207
RP43A03	294 300	204 204	90 90	161 161	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 238	145 145	163 173	191 207
RP43A04	292 292	202 202	78 94	161 161	172 172	226 229	222 222	82 86	159 159	87 87	95 99	140 140	218 218	145 145	151 161	191 205
RP36A01	292 292	0 0	94 96	158 158	172 172	226 226	219 222	86 86	163 163	87 87	99 99	140 140	218 236	139 143	0 0	187 187
RP36A02	292 292	212 214	96 96	158 158	172 172	226 226	219 222	86 86	163 163	87 87	99 99	140 140	218 236	139 139	0 0	187 187
RP36A03	292 300	0 0	86 86	158 158	172 172	226 226	219 219	86 86	163 163	87 87	99 99	140 140	236 236	139 139	0 0	187 187
RP36A04	292 292	0 0	0 0	158 158	172 172	226 226	219 219	86 86	163 163	87 87	99 99	140 140	236 236	139 139	0 0	187 187
RP44A01	292 292	202 202	78 86	158 161	172 172	226 226	219 219	86 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 218	145 145	159 163	185 185
RP44A02	292 302	226 226	78 98	155 158	169 172	226 226	219 222	86 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 236	145 145	163 163	199 203

ID individuo	RPW02	RPW03	RPW06	RPW11	RPW13	RPW16	RPW17	RPW20	RPW22	RPW24	RPW25	RPW26	RPW32	RPW36	RPW38	RPW39
RP44A03	0 0	214 214	82 82	158 164	169 172	226 226	222 222	82 82	163 163	95 95	99 99	140 140	218 218	139 145	159 163	179 185
RP44A04	302 304	202 202	78 78	158 158	172 172	226 226	219 222	86 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 236	145 145	0 0	179 181
RP44A05	302 302	220 222	86 86	158 167	172 172	226 226	219 222	86 86	163 163	87 87	99 99	140 140	218 218	147 147	151 151	185 197
RP44B01	312 314	186 202	86 86	158 158	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	139 139	151 151	181 197
RP44B02	292 292	214 216	86 108	155 158	172 172	226 226	219 222	82 82	163 163	95 95	95 95	136 140	218 218	145 145	159 163	199 203
RP44B03	292 302	202 214	90 90	161 167	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 218	143 145	169 171	187 187
RP44B04	292 318	214 220	78 98	158 167	172 172	226 226	219 222	82 86	163 163	87 95	99 99	140 140	218 236	143 145	163 163	185 197
RP44B05	302 302	212 214	78 92	158 167	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	87 95	99 99	140 140	218 236	139 139	0 0	181 181
IV3.M2	292 312	214 214	90 100	158 164	172 172	226 226	219 222	86 86	159 159	95 95	99 99	132 140	218 236	139 145	157 157	185 185
IV4.M1	304 312	212 214	98 98	158 158	172 172	226 226	219 222	86 86	159 163	95 95	99 99	140 140	218 236	143 145	163 165	185 185
RP53A01	312 312	210 210	80 80	158 158	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	87 95	99 99	136 140	218 218	143 145	165 167	183 183
RP53A02	0 0	186 202	78 78	158 167	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	87 95	99 99	140 140	218 218	139 139	157 159	183 189
RP53A03	312 312	202 202	92 92	158 158	172 172	226 226	222 222	82 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 218	139 143	151 151	185 185
RP53A04	314 314	210 210	78 88	158 158	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	99 99	136 140	218 218	139 139	161 167	185 185
RP53A05	300 300	202 202	0 0	158 158	172 175	226 226	222 222	86 86	163 163	91 91	99 99	140 140	218 218	143 143	159 159	181 185
RP46A01	302 302	0 0	86 100	158 161	172 172	226 226	219 222	86 86	159 163	95 95	95 99	140 140	218 238	139 143	149 151	187 187
RP46A02	300 302	186 186	86 90	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 99	140 140	236 238	143 143	151 165	205 205
RP46A03	300 302	186 186	90 100	158 161	172 172	226 226	219 222	86 86	163 163	95 95	99 99	140 140	236 238	139 143	151 151	181 181
RP46A04	292 302	186 186	86 86	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 99	140 140	218 236	139 139	149 149	189 205
RP46A05	300 322	0 0	86 86	161 161	172 172	226 226	219 222	86 86	159 159	95 95	99 99	140 140	236 236	139 145	163 165	187 205
RP46A06	300 322	186 186	86 106	158 161	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	99 99	140 140	236 238	139 145	149 149	187 187
RP46A07	300 318	186 186	0 0	158 161	172 172	226 226	222 222	86 86	159 163	87 95	95 99	140 140	218 218	139 139	149 151	187 187
RP46A08	300 300	0 0	104 104	158 161	172 172	226 226	219 222	86 86	159 163	95 95	95 95	140 140	218 218	139 139	151 151	187 187
RP46A09	302 302	204 204	102 104	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	159 163	95 95	99 99	140 140	236 238	139 143	151 151	187 191
RP46A10	300 302	186 186	102 102	158 167	172 172	226 226	219 222	86 86	159 159	95 95	99 99	140 140	236 236	139 145	163 165	205 205
RP46A11	300 300	212 214	86 86	161 167	172 172	226 226	222 222	86 86	163 163	95 95	95 99	140 140	236 238	143 143	151 151	189 205

<b>ID individuo</b>	<b>RPW02</b>	<b>RPW03</b>	<b>RPW06</b>	<b>RPW11</b>	<b>RPW13</b>	<b>RPW16</b>	<b>RPW17</b>	<b>RPW20</b>	<b>RPW22</b>	<b>RPW24</b>	<b>RPW25</b>	<b>RPW26</b>	<b>RPW32</b>	<b>RPW36</b>	<b>RPW38</b>	<b>RPW39</b>
RP46A12	300 300	0 0	86 100	158 161	172 172	226 226	219 222	86 86	159 163	95 95	99 99	140 140	236 238	139 143	151 151	187 205
RP46A13	312 312	0 0	86 86	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	159 163	95 95	99 99	140 140	236 238	139 139	151 151	187 191
RP46A14	300 300	0 0	104 106	161 161	172 172	226 226	219 222	86 86	159 159	95 95	99 99	140 140	218 236	139 139	151 151	189 205
RP46A15	292 292	0 0	86 86	158 161	172 172	226 226	219 219	86 86	159 163	95 95	95 99	140 140	236 238	143 143	151 151	187 205
RP46A16	300 322	0 0	100 102	161 161	172 172	226 226	222 222	86 86	159 159	95 95	95 99	140 140	236 238	139 145	149 165	205 205
RP46A17	322 322	0 0	104 106	161 167	172 172	226 226	219 219	86 86	163 163	95 95	99 99	140 140	218 218	139 139	149 151	185 205

## Appendice n°8

### Sequenze nucleotidiche dei 14 marcatori microsatelliti polimorfici selezionati, dimensioni del frammento amplificato e codici di accesso GenBank

Locus	Dimensioni (bp)	Sequenza nucleotidica	n°accesso GenBank
RPW02	300 bp	TCCGATTCTGTTTCAGACCAAATAACTGGGCAAAGAACTTTAAATGAACTATTAG ATTTACTGACATTAATTTGACAATATAAACGGCATTAACACCCATATCAATAAATTT ACGACCAATGGATGACACTAATAGAAATTAATTCGTTATATATATATATATATATATT GTTACAATGTTGCCAAATTGTACCGTAAATTACTATCTTTCACGTAAACCGTCAAGA TAAGCGTTACCTCTATACTTTAAGGAAACGAATTTAATTAATTTATTAGCACTTCCGC GGTATAAAGGA	LK392620
RPW03	212 bp	TCCCATGCCATTGCTATTTTGAATTGCTATATATATATATATATATATATTGATGACGTAC ATTGATTGTTTTATTGGAAGTGCATATGAACGTAGATTTTGTGCTATGGATAAATT AGTTGAATGAAGAGGTTTCAGAAGACATGGACATGATTTTCTTTGAAGCCTTTAAG ATCAATTTCAAATATTTTGGTAGTCGTTTCCCGTTTC	LK392621
RPW06	80 bp	AACCTCCGGAATCGTACCTTGATGGTTCTATATATATATATATAAATATTGTTTCGAC CCGAATGGACGATGGATGAG	LK392622
RPW11	159 bp	TCGTCAGTTAGATCCCATGATATTTTNGAAACGATATTATTGGTTATAGAATGAGAAT TATTATTATTATTATTATTATAAACGCTATTAAGGTTACTAACTACTGGTGAATTTTA TTATTGTGATTTTAGCGTGATGATAAATTAAGCTTTC	LK392623
RPW13	170 bp	GTCTGTTTGGTGGAGCGATGGGCCGGGGTTGGTCCGATGGTCCGATAGTGGTGGTG GTGGTGGTGGTGGAGATGGTGGCGGGAGGAAAAGGCGACGGGGCGGCCAAGGGC GGTCGCTCTACTGACGGCCCGCAACAGCTGGTACTGAAACAGCAGAAGCAATG ACAGG	LK392624
RPW16	228 bp	AAGGGCTTCGAAAGAGGAACTTTACTTTGGCGTCGGAAGTTTTCGTGTCTCTGGCG CGGATTAATACGAAAGTTCTATCAGGCAGGCGGGCGGGCGGGCGGCGGTGGCGGA TGGGTAAGCCTGTAGTTTGTGTTGGAGATTATTGGGGAATACGGATTGTTAAAG TCAAATATTAACCGAGGGAGGCGCAAAGGAATGGAATGGCGCTGTGGGAATTAG AGCAGG	LK392625
RPW17	222 bp	AAACGGCTCGATATACGTGGAGGATTTATTATAACCAATAAGTAACATTTCAATCTT TACGGGCCGTTGTTGTTGTTGTTCCCGGTTAGAAACCAGAAAATCCTGGTCTGA TCCCTGTTCCAGAAATAGGCTGACTAGCGTGAGGATACTGATTGAGAAGCACAGCA CGGCGCAGGAGTTGAGCAGGGGCGTACAGGTAGTCGTTCTCCGACCATTGT	LK392626
RPW20	90 bp	GCCGTTGATGTTGATACACGACGGAGTGTATCAGATAGATAGATAGATAGATCTCCA GTATTTAGATATGACGAAACAAAAGTCTTGCA	LK392627
RPW22	163 bp	AAGCGTTCGCGTTTACTTTGGCGTTTCGGAAGCCGGAAGGCAAATGTTTGCCCGG ATAAAGTTGTCCGATGCGGCGACTTATCCCTGGGCGTTGTTCGGTTCCGCTCGCTA CTTGTTTATTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTCAACACTTGCATCATCA	LK392628
RPW24	99 bp	GCCTATGCTACACAAAATAACAGCTTTTCTAATACTAATACTAATACTTTGTAAC TTACTAGCTAAATAACATTTCTGCATTCATAAGTTTGCC	LK392629
RPW25	98 bp	TGATATTCGAAGACTGGTATAACAAAGTTATACTGAATGAATGAATGAATGAATAAG TGAATGAATTACCAATTGCTGTTGGTTTGTGATACGACGC	LK392630
RPW26	141 bp	CAACTGATGTGGCCGATAGAAGAATCTGTGATGTTAAAAGTCATATCCCAGACGTA GCACAAGGCATTTGTAAGGTTGGGTTTTGAAGGATTCATTCATTCATTCATAAT ATACAGAAAATTGATTGCTTAGGGTC	LK392631
RPW32	239 bp	ACGACGACATTCATCGAACAGAAGTCGCAATCATAATGATTTGATTTCAGCAATCAT AATATAATCATATATATATATATATAATAAGATCTTCAATTTCTTATAACGTTAGC ACAGAAAATGAGAAGTACACATTTTCACCAAGTACAACAAAACAGTTTCAGTACC CATGACTTATTACTATTACTGCAACAAAACCAAAGTACTTCATACGCATCTTTGTTT CTACTGATG	LK392632
RPW36	146 bp	CAGCTACAAACAGTGCCTTTATCTAAGTGTATAAGATATTAATAAGTTATATCTATTT TNNATATATATATATANAANNAAGAGCATGTAAAGCAACGATAACAATAACAT TATTGAAATTTTCTTGCCTTTTCCAGC	LK392633

**Appendice n°9**  
**Genotipi delle 24 larve campionate dalla progenie dei due incroci**  
**dell'esperimento zero**

<b>ID larva</b>	<b>RPW16</b>	<b>RPW06</b>	<b>RPW26</b>	<b>RPW36</b>
IV1.L01	226 226	96 96	140 140	145 145
IV1.L04	226 226	96 98	140 140	145 145
IV1.L09	226 226	96 98	140 140	145 145
IV1.L11	226 226	96 96	140 140	145 145
IV1.L12	226 226	78 0	140 140	145 145
IV1.L13	226 226	96 98	140 140	145 147
IV1.L14	226 226	78 98	140 140	145 145
IV1.L15	226 226	78 0	140 140	145 147
IV1.L17	226 226	78 98	140 140	145 145
IV1.L18	226 226	78 98	140 140	145 147
IV1.L19	226 226	78 0	140 140	145 147
IV1.L20	226 226	96 98	140 140	145 145
IV2.L01	226 229	96 102	140 140	145 153
IV2.L03	226 229	88 96	140 140	145 145
IV2.L04	226 229	96 102	136 140	143 153
IV2.L06	226 229	88 96	136 136	143 153
IV2.L11	226 229	96 102	136 140	145 153
IV2.L12	226 229	88 96	140 140	145 145
IV2.L13	226 229	88 96	136 140	143 145
IV2.L15	226 229	88 96	136 140	143 153
IV2.L17	226 229	88 96	140 140	145 153
IV2.L19	226 229	96 102	140 140	143 153
IV2.L20	226 229	96 102	136 136	143 145

## Appendice n°10

### Risultati dell'analisi di paternità condotta con il *software* Cervus v.3.0.6 sulla progenie dell'esperimento zero

\*\*\*\* Summary statistics \*\*\*\*

#### Mother alone (all offspring):

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95	0.68	18	18	75%	75%
Relaxed	80	0.00	24	22	100%	93%
Unassigned			0	2	0%	7%
Total			24	24	100%	100%

#### Father alone (all offspring):

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95	0.68	20	18	83%	75%
Relaxed	80	0.00	24	22	100%	93%
Unassigned			0	2	0%	7%
Total			24	24	100%	100%

#### Parent pair (sexes known):

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95	0.68	24	20	100%	82%
Relaxed	80	0.00	24	23	100%	95%
Unassigned			0	1	0%	5%
Total			24	24	100%	100%



**\*\*\*\* Number of individuals tested \*\*\*\***

Offspring (total):	24
Tested (typed at 3 or more loci):	24
Not tested (typed at fewer than 3 loci):	0
Candidate fathers (total):	2
Tested (typed at 3 or more loci):	2
Not tested (typed at fewer than 3 loci):	0
Average number of candidate fathers per offspring:	2
Average proportion of sampled candidate fathers:	1
Candidate mothers (total):	2
Tested (typed at 3 or more loci):	2
Not tested (typed at fewer than 3 loci):	0
Average number of candidate fathers per offspring:	2
Average proportion of sampled candidate mothers:	1
Average candidate parent pairs per offspring	4

**\*\*\*\* Loci \*\*\*\***

- 1 RPW16
- 2 RPW26
- 3 RPW06
- 4 RPW36

**\*\*\*\* Simulation parameters \*\*\*\***

**Input**

Number of offspring:	10000.00
Number of candidate mothers:	2.00
Proportion of candidate mothers sampled:	1.00
Number of candidate fathers:	2.00
Proportion of candidate fathers sampled:	1.00
Number of parent pairs:	4.00
Proportion of loci typed:	1.00
Proportion of loci mistyped:	0.01
Error rate in likelihood calculations:	0.01
Minimum number of typed loci:	3.00

## Appendice n°11a

### Risultati del *software* CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni madre-figlio dell'esperimento zero

ID larva	ID madre	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score	Delta	Livello di confidenza
IV1.L01	F1	4	4	0	1.75414422964818E+0000	1.75414422964818E+0000	*
IV1.L04	F1	4	4	0	1.06979346349682E+0000	1.06979346349682E+0000	*
IV1.L09	F1	4	4	0	1.06979346349682E+0000	1.06979346349682E+0000	*
IV1.L11	F1	4	4	0	1.75414422964818E+0000	1.75414422964818E+0000	*
IV1.L13	F1	4	4	0	3.88701302597677E-0001	3.88701302597677E-0001	+
IV1.L14	F1	4	4	0	7.87932972141689E-0001	7.87932972141689E-0001	*
IV1.L15	F1	4	3	0	2.61077953140879E-0001	2.61077953140879E-0001	+
IV1.L16	F1	4	4	0	1.06840811242550E-0001	1.06840811242550E-0001	+
IV1.L17	F1	4	4	0	7.87932972141689E-0001	7.87932972141689E-0001	*
IV1.L18	F1	4	4	0	1.06840811242550E-0001	1.06840811242550E-0001	+
IV1.L19	F1	4	3	0	2.61077953140879E-0001	2.61077953140879E-0001	+
IV1.L20	F1	4	4	0	1.06979346349682E+0000	1.06979346349682E+0000	*
IV2.L01	F2	4	4	0	4.25699432030290E-0001	4.25699432030290E-0001	+
IV2.L03	F2	4	4	0	1.09516397519351E+0000	7.02615471473433E-0001	*
IV2.L04	F2	4	4	0	2.34798300032931E+0000	2.34798300032931E+0000	*
IV2.L05	F2	4	4	0	1.37133399931992E+0000	1.37133399931992E+0000	*
IV2.L06	F2	4	4	0	2.82518999431115E+0000	2.82518999431115E+0000	*
IV2.L11	F2	4	4	0	1.37133399931992E+0000	1.37133399931992E+0000	*
IV2.L12	F2	4	4	0	1.09516397519351E+0000	7.02615471473433E-0001	*
IV2.L13	F2	4	4	0	2.65469095831139E+0000	2.65469095831139E+0000	*
IV2.L15	F2	4	4	0	2.34798300032931E+0000	2.34798300032931E+0000	*
IV2.L16	F2	4	4	0	2.04079854248314E+0000	2.04079854248314E+0000	*
IV2.L19	F2	4	4	0	1.40234843303968E+0000	1.40234843303968E+0000	*
IV2.L20	F2	4	4	0	3.13189795229323E+0000	3.13189795229323E+0000	*

F1, femmina n°1; F2, femmina n°2; \*, livello di confidenza statistica elevato; +, livello di confidenza statistica medio.

## Appendice n°11b

### Risultati del *software* CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni padre-figlio dell'esperimento zero

ID larva	ID padre	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score	Delta	Livello di confidenza
IV1.L01	M1	4	4	0	3.95582052211384E-0001	3.95582052211384E-0001	+
IV1.L04	M1	4	4	0	9.71505476231146E-0001	9.71505476231146E-0001	*
IV1.L09	M1	4	4	0	9.71505476231146E-0001	9.71505476231146E-0001	*
IV1.L11	M1	4	4	0	3.95582052211384E-0001	3.95582052211384E-0001	+
IV1.L13	M1	4	4	0	3.16549706264855E+0000	3.16549706264855E+0000	*
IV1.L14	M1	4	4	0	6.44931169076429E-0001	6.44931169076429E-0001	+
IV1.L15	M1	4	3	0	1.77759952302063E+0000	1.77759952302063E+0000	*
IV1.L16	M1	4	4	0	2.83892275549383E+0000	2.83892275549383E+0000	*
IV1.L17	M1	4	4	0	6.44931169076429E-0001	6.44931169076429E-0001	+
IV1.L18	M1	4	4	0	2.83892275549383E+0000	2.83892275549383E+0000	*
IV1.L19	M1	4	3	0	1.77759952302063E+0000	1.77759952302063E+0000	*
IV1.L20	M1	4	4	0	9.71505476231146E-0001	9.71505476231146E-0001	*
IV2.L01	M2	4	4	0	5.16149086475843E+0000	5.16149086475843E+0000	*
IV2.L03	M2	4	4	0	1.21551893432834E+0000	1.21551893432834E+0000	*
IV2.L04	M2	4	4	0	6.08809503881026E+0000	6.08809503881026E+0000	*
IV2.L05	M2	4	4	0	5.41496722378308E+0000	5.41496722378308E+0000	*
IV2.L06	M2	4	4	0	5.87314382452711E+0000	5.87314382452711E+0000	*
IV2.L11	M2	4	4	0	6.10712543204806E+0000	6.10712543204806E+0000	*
IV2.L12	M2	4	4	0	1.21551893432834E+0000	1.21551893432834E+0000	*
IV2.L13	M2	4	4	0	1.49168895845475E+0000	1.49168895845475E+0000	*
IV2.L15	M2	4	4	0	5.39593683054527E+0000	5.39593683054527E+0000	*
IV2.L16	M2	4	4	0	2.16115350161797E+0000	2.16115350161797E+0000	*
IV2.L19	M2	4	4	0	5.14246047152062E+0000	5.14246047152062E+0000	*
IV2.L20	M2	4	4	0	2.66105416070157E+0000	2.66105416070157E+0000	*

**M1**, maschio n°1; **M2**, maschio n°2; \*, livello di confidenza statistica elevato; +, livello di confidenza statistica medio.

## Appendice n°12

### Output dell'analisi di paternità eseguita con il *software* Patri sulle 24 larve campionate dalla progenie dei due incroci dell'esperimento zero

Number of breeding males = 2

expected numbers of sampled offspring from sampled fathers: 24

non-zero probabilities of paternity for each mother-offspring pair:

labels:	group:	P(father)	labels:	group:	P(father)
calf: IV1.L01			calf: IV1.L15		
mother: IV1.F1			mother: IV1.F1		
male: IV1.M1	0	1.000000E+00	male: IV1.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV1.L04			calf: IV1.L16		
mother: IV1.F1			mother: IV1.F1		
male: IV1.M1	0	1.000000E+00	male: IV1.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV1.L09			calf: IV1.L17		
mother: IV1.F1			mother: IV1.F1		
male: IV1.M1	0	1.000000E+00	male: IV1.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV1.L11			calf: IV1.L18		
mother: IV1.F1			mother: IV1.F1		
male: IV1.M1	0	1.000000E+00	male: IV1.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV1.L13			calf: IV1.L19		
mother: IV1.F1			mother: IV1.F1		
male: IV1.M1	0	1.000000E+00	male: IV1.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV1.L14			calf: IV1.L20		
mother: IV1.F1			mother: IV1.F1		
male: IV1.M1	0	1.000000E+00	male: IV1.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

labels:	group:	P(father)	labels:	group:	P(father)
calf: IV2.L01			calf: IV2.L12		
mother: IV2.F1			mother: IV2.F1		
male: IV2.M1	0	1.000000E+00	male: IV2.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV2.L03			calf: IV2.L13		
mother: IV2.F1			mother: IV2.F1		
male: IV2.M1	0	1.000000E+00	male: IV2.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV2.L04			calf: IV2.L15		
mother: IV2.F1			mother: IV2.F1		
male: IV2.M1	0	1.000000E+00	male: IV2.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV2.L05			calf: IV2.L16		
mother: IV2.F1			mother: IV2.F1		
male: IV2.M1	0	1.000000E+00	male: IV2.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV2.L06			calf: IV2.L19		
mother: IV2.F1			mother: IV2.F1		
male: IV2.M1	0	1.000000E+00	male: IV2.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV2.L11			calf: IV2.L20		
mother: IV2.F1			mother: IV2.F1		
male: IV2.M1	0	1.000000E+00	male: IV2.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

**Legenda:**

<identificativo larva>

<identificativo madre>

<identificativo maschio x> <gruppo del maschio x>  
 <gruppo y>  
 all

<Probabilità che il maschio x sia il padre>  
 <Probabilità che il maschio x appartenga al gruppo y>  
 <Probabilità che il padre sia stato campionato>

## Appendice n°13

### Genotipi della progenie dell'esperimento n°1 in ordine di ovideposizione

Ovatura	ID larva	RPW06	RPW32	RPW11
I	IV3.L01	90 96	218 218	158 164
I	IV3.L02	90 94	218 218	161 164
I	IV3.L03	96 100	218 218	158 158
II	IV3.L04	94 100	218 236	158 158
II	IV3.L05	94 100	218 218	161 164
II	IV3.L06	90 94	218 218	158 158
II	IV3.L07	94 100	218 218	158 161
III	IV3.L08	90 96	218 236	158 161
III	IV3.L09	94 100	218 236	158 161
III	IV3.L10	94 100	218 236	158 161
III	IV3.L11	90 96	218 218	158 158
III	IV3.L12	90 96	218 218	158 161
III	IV3.L13	94 100	218 218	158 161
IV	IV3.L14	90 94	218 236	158 161
IV	IV3.L15	96 100	218 236	158 158
IV	IV3.L16	96 100	218 218	158 164
IV	IV3.L17	94 100	218 218	158 164
V	IV3.L18	90 94	218 236	158 158
V	IV3.L19	90 96	218 218	161 164
V	IV3.L20	90 96	218 236	158 158
V	IV3.L21	90 94	218 236	158 158
V	IV3.L22	94 100	218 218	158 158
V	IV3.L23	96 100	218 236	158 158
V	IV3.L24	90 96	218 236	158 161
V	IV3.L25	90 96	218 236	161 164
V	IV3.L26	90 94	218 236	158 164
V	IV3.L27	90 96	218 218	161 164
V	IV3.L28	96 100	218 218	158 164
V	IV3.L29	96 100	218 236	158 164
V	IV3.L30	94 100	218 236	158 158
V	IV3.L31	94 100	218 218	158 161
V	IV3.L32	94 100	218 236	158 158
V	IV3.L33	94 100	218 236	158 161
V	IV3.L34	90 96	218 218	158 161
V	IV3.L35	90 94	218 218	158 158
V	IV3.L36	96 100	218 218	158 164
V	IV3.L37	96 100	218 236	161 164
V	IV3.L38	90 96	218 218	158 161
VI	IV3.L39	90 94	218 236	158 164

<b>Ovatura</b>	<b>ID larva</b>	<b>RPW06</b>	<b>RPW32</b>	<b>RPW11</b>
VI	IV3.L40	90 94	218 218	158 164
VI	IV3.L41	94 100	218 218	161 164
VI	IV3.L42	96 100	218 218	158 161
VI	IV3.L43	94 100	218 236	158 164
VI	IV3.L44	96 100	218 218	158 158
VII	IV3.L45	90 96	218 218	158 164
VII	IV3.L46	96 100	218 218	158 158
VII	IV3.L47	96 100	218 236	158 158
VIII	IV3.L48	90 94	218 218	158 161
VIII	IV3.L49	90 96	218 218	161 164
VIII	IV3.L50	94 100	218 218	158 161
VIII	IV3.L51	90 96	218 218	158 161
IX	IV3.L52	90 94	218 236	158 161
IX	IV3.L53	96 100	218 218	158 158
X	IV3.L54	90 94	218 236	158 164
X	IV3.L55	90 94	218 236	158 164
XI	IV3.L56	90 94	218 218	158 161
XI	IV3.L57	96 100	218 236	158 158
XI	IV3.L58	96 100	218 236	161 164
XI	IV3.L59	90 94	218 218	161 164
XI	IV3.L60	94 100	218 218	158 158
XI	IV3.L61	90 94	218 218	158 164
XI	IV3.L62	90 96	218 218	161 164
XI	IV3.L63	96 100	218 236	158 164
XI	IV3.L64	94 100	218 236	158 161
XII	IV3.L65	90 96	218 218	158 161
XII	IV3.L66	90 96	218 218	158 161
XII	IV3.L67	90 96	218 218	158 161
XII	IV3.L68	90 94	218 218	158 158
XII	IV3.L69	90 96	218 236	158 158
XII	IV3.L70	94 100	218 218	158 164
XII	IV3.L71	90 94	218 236	158 158
XII	IV3.L72	90 94	218 218	158 158
XII	IV3.L73	90 96	218 236	158 161
XIII	IV3.L74	90 96	218 236	161 164
XIII	IV3.L75	94 100	218 218	158 164
XIV	IV3.L76	90 94	218 218	158 161
XIV	IV3.L77	90 94	218 218	158 161
XIV	IV3.L78	94 100	218 218	161 164
XIV	IV3.L79	96 100	218 236	158 161
XIV	IV3.L80	90 96	218 236	158 161
XIV	IV3.L81	94 100	218 218	158 164

## Appendice n°14

### Risultati dell'analisi di paternità condotta con il *software* Cervus v.3.0.6 sulla progenie dell'esperimento n°1

#### \*\*\*\* Summary statistics \*\*\*\*

##### Father alone (all offspring):

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95	0.68	70	60	86%	74%
Relaxed	80	0.00	81	76	100%	93%
Unassigned			0	5	0%	7%
Total			81	81	100%	100%

##### Father given known mother:

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95	0.00	81	77	100%	94%
Relaxed	80	0.00	81	78	100%	96%
Unassigned			0	3	0%	4%
Total			81	81	100%	100%

#### \*\*\*\* Number of individuals tested \*\*\*\*

Offspring (total):	81
Tested (typed at 2 or more loci):	81
Known mother typed at 2 or more loci:	81
Known mother typed at fewer than 2 loci:	0
Not tested (typed at fewer than 2 loci):	0
Candidate fathers (total):	2
Tested (typed at 2 or more loci):	2
Not tested (typed at fewer than 2 loci):	0
Average number of candidate fathers per offspring:	2
Average proportion of sampled candidate fathers:	1

#### \*\*\*\* Loci \*\*\*\*

- 1 RPW06
- 2 RPW11
- 3 RPW32



\*\*\*\* Simulation parameters \*\*\*\*

**Input**

Number of offspring:	10000.00
Number of candidate fathers:	2.00
Proportion of candidate fathers sampled:	1.00
Proportion of loci typed:	1.00
Proportion of loci mistyped:	0.01
Error rate in likelihood calculations:	0.01
Minimum number of typed loci:	2.00

\*\*\*\* Known parent-offspring mismatches \*\*\*\*

TOTAL: 0

\*\*\*\* Error rate analysis \*\*\*\*

<b>Locus name</b>	<b>N compared</b>	<b>N mismatching</b>	<b>N null</b>	<b>Detection prob.</b>	<b>Est. error rate</b>
RPW06	81	0	0	0.52763723	0.00000000
RPW11	81	0	0	0.18403755	0.00000000
RPW32	81	0	0	0.07471528	0.00000000

Mean observed error rate across loci: 0.000E+0000  
(assumes all known parent-offspring pairs are equally independent)

## Appendice n°15a

### Risultati del software CERVUS v.3.0.6 riguardanti le coppie madre-figlio dell'esperimento n°1

ID larva	<i>non-exclusion probability</i>	ID madre	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score
IV3.L01	2.76020775623269E-0001	F1	3	3	0	1.03041536981238E-0001
IV3.L02	1.99179213078464E-0001	F1	3	3	0	7.08225392363291E-0001
IV3.L03	2.16621418369114E-0001	F1	3	3	0	7.81300476352875E-0001
IV3.L04	1.04256050342337E-0001	F1	3	3	0	1.01006372342229E+0000
IV3.L05	1.30346164587132E-0001	F1	3	3	0	7.08225392363291E-0001
IV3.L06	1.54402490758500E-0001	F1	3	3	0	1.68808014791284E+0000
IV3.L07	1.63716440871812E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L08	4.39362413232016E-0001	F1	3	3	0	-3.84341291330400E-0002
IV3.L09	1.68921533875188E-0001	F1	3	3	0	8.68345542426925E-0001
IV3.L10	1.68921533875188E-0001	F1	3	3	0	8.68345542426925E-0001
IV3.L11	2.62812750227233E-0001	F1	3	3	0	7.81300476352875E-0001
IV3.L12	4.25824043252792E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L13	1.63716440871812E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L14	2.58125417773809E-0001	F1	3	3	0	8.68345542426925E-0001
IV3.L15	2.23508537482687E-0001	F1	3	3	0	1.03284051862325E-0001
IV3.L16	2.27508033240997E-0001	F1	3	3	0	1.03041536981238E-0001
IV3.L17	1.06121623961218E-0001	F1	3	3	0	1.00982120854120E+0000
IV3.L18	1.59311462148735E-0001	F1	3	3	0	1.01006372342229E+0000
IV3.L19	3.39028447793131E-0001	F1	3	3	0	-1.98554279196675E-0001
IV3.L20	2.71168446210613E-0001	F1	3	3	0	1.03284051862325E-0001
IV3.L21	1.59311462148735E-0001	F1	3	3	0	1.01006372342229E+0000
IV3.L22	1.01043538439637E-0001	F1	3	3	0	1.68808014791284E+0000
IV3.L23	2.23508537482687E-0001	F1	3	3	0	1.03284051862325E-0001
IV3.L24	4.39362413232016E-0001	F1	3	3	0	-3.84341291330400E-0002
IV3.L25	3.49807295611691E-0001	F1	3	3	0	-8.76570703687224E-0001
IV3.L26	1.67317884349030E-0001	F1	3	3	0	3.31804784050654E-0001
IV3.L27	3.39028447793131E-0001	F1	3	3	0	-1.98554279196675E-0001
IV3.L28	2.27508033240997E-0001	F1	3	3	0	1.03041536981238E-0001
IV3.L29	2.34741274238227E-0001	F1	3	3	0	-5.74974887509311E-0001
IV3.L30	1.04256050342337E-0001	F1	3	3	0	1.01006372342229E+0000
IV3.L31	1.63716440871812E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L32	1.04256050342337E-0001	F1	3	3	0	1.01006372342229E+0000
IV3.L33	1.68921533875188E-0001	F1	3	3	0	8.68345542426925E-0001
IV3.L34	4.25824043252792E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L35	1.54402490758500E-0001	F1	3	3	0	1.68808014791284E+0000
IV3.L36	2.27508033240997E-0001	F1	3	3	0	1.03041536981238E-0001
IV3.L37	2.88326013352666E-0001	F1	3	3	0	-8.76570703687224E-0001
IV3.L38	4.25824043252792E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L39	1.67317884349030E-0001	F1	3	3	0	3.31804784050654E-0001

<b>ID larva</b>	<b><i>non-exclusion probability</i></b>	<b>ID madre</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con mismatch</b>	<b>LOD score</b>
IV3.L40	1.62162205678670E-0001	F1	3	3	0	1.00982120854120E+0000
IV3.L41	1.30346164587132E-0001	F1	3	3	0	7.08225392363291E-0001
IV3.L42	3.50982241711392E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L43	1.09495585180055E-0001	F1	3	3	0	3.31804784050654E-0001
IV3.L44	2.16621418369114E-0001	F1	3	3	0	7.81300476352875E-0001
IV3.L45	2.76020775623269E-0001	F1	3	3	0	1.03041536981238E-0001
IV3.L46	2.16621418369114E-0001	F1	3	3	0	7.81300476352875E-0001
IV3.L47	2.23508537482687E-0001	F1	3	3	0	1.03284051862325E-0001
IV3.L48	2.50171625411015E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L49	3.39028447793131E-0001	F1	3	3	0	-1.98554279196675E-0001
IV3.L50	1.63716440871812E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L51	4.25824043252792E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L52	2.58125417773809E-0001	F1	3	3	0	8.68345542426925E-0001
IV3.L53	2.16621418369114E-0001	F1	3	3	0	7.81300476352875E-0001
IV3.L54	1.67317884349030E-0001	F1	3	3	0	3.31804784050654E-0001
IV3.L55	1.67317884349030E-0001	F1	3	3	0	3.31804784050654E-0001
IV3.L56	2.50171625411015E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L57	2.23508537482687E-0001	F1	3	3	0	1.03284051862325E-0001
IV3.L58	2.88326013352666E-0001	F1	3	3	0	-8.76570703687224E-0001
IV3.L59	1.99179213078464E-0001	F1	3	3	0	7.08225392363291E-0001
IV3.L60	1.01043538439637E-0001	F1	3	3	0	1.68808014791284E+0000
IV3.L61	1.62162205678670E-0001	F1	3	3	0	1.00982120854120E+0000
IV3.L62	3.39028447793131E-0001	F1	3	3	0	-1.98554279196675E-0001
IV3.L63	2.34741274238227E-0001	F1	3	3	0	-5.74974887509311E-0001
IV3.L64	1.68921533875188E-0001	F1	3	3	0	8.68345542426925E-0001
IV3.L65	4.25824043252792E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L66	4.25824043252792E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L67	4.25824043252792E-0001	F1	3	3	0	6.39582295357510E-0001
IV3.L68	1.54402490758500E-0001	F1	3	3	0	1.68808014791284E+0000
IV3.L69	2.71168446210613E-0001	F1	3	3	0	1.03284051862325E-0001
IV3.L70	1.06121623961218E-0001	F1	3	3	0	1.00982120854120E+0000
IV3.L71	1.59311462148735E-0001	F1	3	3	0	1.01006372342229E+0000
IV3.L72	1.54402490758500E-0001	F1	3	3	0	1.68808014791284E+0000
IV3.L73	4.39362413232016E-0001	F1	3	3	0	-3.84341291330400E-0002
IV3.L74	3.49807295611691E-0001	F1	3	3	0	-8.76570703687224E-0001
IV3.L75	1.06121623961218E-0001	F1	3	3	0	1.00982120854120E+0000
IV3.L76	2.50171625411015E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L77	2.50171625411015E-0001	F1	3	3	0	1.54636196691748E+0000
IV3.L78	1.30346164587132E-0001	F1	3	3	0	7.08225392363291E-0001
IV3.L79	3.62141140603359E-0001	F1	3	3	0	-3.84341291330400E-0002
IV3.L80	4.39362413232016E-0001	F1	3	3	0	-3.84341291330400E-0002
IV3.L81	1.06121623961218E-0001	F1	3	3	0	1.00982120854120E+0000

## Appendice n°15b

### Risultati del *software* CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni padre-figlio dell'esperimento n°1

ID larva	<i>Non-exclusion probability</i>	ID padre candidato	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score	Delta	Livello di confidenza
IV3.L01	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.25755287191788E+0000	3.25755287191788E+0000	*
IV3.L02	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.19314100197958E+0000	3.19314100197958E+0000	*
IV3.L03	1.50320929107243E-0002	M2	3	3	0	2.79649991903404E+0000	2.79649991903404E+0000	*
IV3.L04	2.29999235792504E-0003	M2	3	3	0	4.49132232716101E+0000	4.49132232716101E+0000	*
IV3.L05	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.79831803095461E+0000	4.79831803095461E+0000	*
IV3.L06	7.31694588700820E-0002	M2	3	3	0	1.19132289005901E+0000	1.19132289005901E+0000	*
IV3.L07	2.43558448981711E-0002	M2	3	3	0	2.11824097966240E+0000	2.11824097966240E+0000	*
IV3.L08	1.81393004018514E-0002	M2	3	3	0	2.20788635881435E+0000	2.20788635881435E+0000	*
IV3.L09	3.72657736146880E-0003	M2	3	3	0	3.81306338778937E+0000	3.81306338778937E+0000	*
IV3.L10	3.72657736146880E-0003	M2	3	3	0	3.81306338778937E+0000	3.81306338778937E+0000	*
IV3.L11	7.31694588700820E-0002	M2	3	3	0	1.19132289005901E+0000	1.19132289005901E+0000	*
IV3.L12	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L13	2.43558448981711E-0002	M2	3	3	0	2.11824097966240E+0000	2.11824097966240E+0000	*
IV3.L14	1.81393004018514E-0002	M2	3	3	0	2.20788635881435E+0000	2.20788635881435E+0000	*
IV3.L15	2.29999235792504E-0003	M2	3	3	0	4.49132232716101E+0000	4.49132232716101E+0000	*
IV3.L16	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.86272990089291E+0000	4.86272990089291E+0000	*
IV3.L17	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.86272990089291E+0000	4.86272990089291E+0000	*
IV3.L18	1.11953270402311E-0002	M2	3	3	0	2.88614529818598E+0000	2.88614529818598E+0000	*
IV3.L19	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.19314100197958E+0000	3.19314100197958E+0000	*
IV3.L20	1.11953270402311E-0002	M2	3	3	0	2.88614529818598E+0000	2.88614529818598E+0000	*
IV3.L21	1.11953270402311E-0002	M2	3	3	0	2.88614529818598E+0000	2.88614529818598E+0000	*

<b>ID larva</b>	<b><i>Non-exclusion probability</i></b>	<b>ID padre candidato</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con mismatch</b>	<b>LOD score</b>	<b>Delta</b>	<b>Livello di confidenza</b>
IV3.L22	1.50320929107243E-0002	M2	3	3	0	2.79649991903404E+0000	2.79649991903404E+0000	*
IV3.L23	2.29999235792504E-0003	M2	3	3	0	4.49132232716101E+0000	4.49132232716101E+0000	*
IV3.L24	1.81393004018514E-0002	M2	3	3	0	2.20788635881435E+0000	2.20788635881435E+0000	*
IV3.L25	9.07108549926421E-0004	M2	3	3	0	4.88796341010655E+0000	4.88796341010655E+0000	*
IV3.L26	9.07108549926421E-0004	M2	3	3	0	4.95237528004485E+0000	4.95237528004485E+0000	*
IV3.L27	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.19314100197958E+0000	3.19314100197958E+0000	*
IV3.L28	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.86272990089291E+0000	4.86272990089291E+0000	*
IV3.L29	1.86358355154952E-0004	M2	3	3	0	6.55755230901988E+0000	6.55755230901988E+0000	*
IV3.L30	2.29999235792504E-0003	M2	3	3	0	4.49132232716101E+0000	4.49132232716101E+0000	*
IV3.L31	2.43558448981711E-0002	M2	3	3	0	2.11824097966240E+0000	2.11824097966240E+0000	*
IV3.L32	2.29999235792504E-0003	M2	3	3	0	4.49132232716101E+0000	4.49132232716101E+0000	*
IV3.L33	3.72657736146880E-0003	M2	3	3	0	3.81306338778937E+0000	3.81306338778937E+0000	*
IV3.L34	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L35	7.31694588700820E-0002	M2	3	3	0	1.19132289005901E+0000	1.19132289005901E+0000	*
IV3.L36	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.86272990089291E+0000	4.86272990089291E+0000	*
IV3.L37	1.86358355154952E-0004	M2	3	3	0	6.49314043908158E+0000	6.49314043908158E+0000	*
IV3.L38	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L39	9.07108549926421E-0004	M2	3	3	0	4.95237528004485E+0000	4.95237528004485E+0000	*
IV3.L40	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.25755287191788E+0000	3.25755287191788E+0000	*
IV3.L41	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.79831803095461E+0000	4.79831803095461E+0000	*
IV3.L42	2.43558448981711E-0002	M2	3	3	0	2.11824097966240E+0000	2.11824097966240E+0000	*
IV3.L43	1.86358355154952E-0004	M2	3	3	0	6.55755230901988E+0000	6.55755230901988E+0000	*
IV3.L44	1.50320929107243E-0002	M2	3	3	0	2.79649991903404E+0000	2.79649991903404E+0000	*
IV3.L45	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.25755287191788E+0000	3.25755287191788E+0000	*

<b>ID larva</b>	<b>Non-exclusion probability</b>	<b>ID padre candidato</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con mismatch</b>	<b>LOD score</b>	<b>Delta</b>	<b>Livello di confidenza</b>
IV3.L46	1.50320929107243E-0002	M2	3	3	0	2.79649991903404E+0000	2.79649991903404E+0000	*
IV3.L47	2.29999235792504E-0003	M2	3	3	0	4.49132232716101E+0000	4.49132232716101E+0000	*
IV3.L48	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L49	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.19314100197958E+0000	3.19314100197958E+0000	*
IV3.L50	2.43558448981711E-0002	M2	3	3	0	2.11824097966240E+0000	2.11824097966240E+0000	*
IV3.L51	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L52	1.81393004018514E-0002	M2	3	3	0	2.20788635881435E+0000	2.20788635881435E+0000	*
IV3.L53	1.50320929107243E-0002	M2	3	3	0	2.79649991903404E+0000	2.79649991903404E+0000	*
IV3.L54	9.07108549926421E-0004	M2	3	3	0	4.95237528004485E+0000	4.95237528004485E+0000	*
IV3.L55	9.07108549926421E-0004	M2	3	3	0	4.95237528004485E+0000	4.95237528004485E+0000	*
IV3.L56	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L57	2.29999235792504E-0003	M2	3	3	0	4.49132232716101E+0000	4.49132232716101E+0000	*
IV3.L58	1.86358355154952E-0004	M2	3	3	0	6.49314043908158E+0000	6.49314043908158E+0000	*
IV3.L59	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.19314100197958E+0000	3.19314100197958E+0000	*
IV3.L60	1.50320929107243E-0002	M2	3	3	0	2.79649991903404E+0000	2.79649991903404E+0000	*
IV3.L61	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.25755287191788E+0000	3.25755287191788E+0000	*
IV3.L62	5.92860230844768E-0003	M2	3	3	0	3.19314100197958E+0000	3.19314100197958E+0000	*
IV3.L63	1.86358355154952E-0004	M2	3	3	0	6.55755230901988E+0000	6.55755230901988E+0000	*
IV3.L64	3.72657736146880E-0003	M2	3	3	0	3.81306338778937E+0000	3.81306338778937E+0000	*
IV3.L65	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L66	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L67	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L68	7.31694588700820E-0002	M2	3	3	0	1.19132289005901E+0000	1.19132289005901E+0000	*
IV3.L69	1.11953270402311E-0002	M2	3	3	0	2.88614529818598E+0000	2.88614529818598E+0000	*

<b>ID larva</b>	<b><i>Non-exclusion probability</i></b>	<b>ID padre candidato</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con mismatch</b>	<b>LOD score</b>	<b>Delta</b>	<b>Livello di confidenza</b>
IV3.L70	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.86272990089291E+0000	4.86272990089291E+0000	*
IV3.L71	1.11953270402311E-0002	M2	3	3	0	2.88614529818598E+0000	2.88614529818598E+0000	*
IV3.L72	7.31694588700820E-0002	M2	3	3	0	1.19132289005901E+0000	1.19132289005901E+0000	*
IV3.L73	1.81393004018514E-0002	M2	3	3	0	2.20788635881435E+0000	2.20788635881435E+0000	*
IV3.L74	9.07108549926421E-0004	M2	3	3	0	4.88796341010655E+0000	4.88796341010655E+0000	*
IV3.L75	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.86272990089291E+0000	4.86272990089291E+0000	*
IV3.L76	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L77	1.18553284769243E-0001	M2	3	3	0	5.13063950687375E-0001	5.13063950687375E-0001	+
IV3.L78	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.79831803095461E+0000	4.79831803095461E+0000	*
IV3.L79	3.72657736146880E-0003	M2	3	3	0	3.81306338778938E+0000	3.81306338778938E+0000	*
IV3.L80	1.81393004018514E-0002	M2	3	3	0	2.20788635881435E+0000	2.20788635881435E+0000	*
IV3.L81	1.21798496404843E-0003	M2	3	3	0	4.86272990089291E+0000	4.86272990089291E+0000	*

## Appendice n°16

### Output dell'analisi di paternità eseguita con il *software* Patri sulla progenie dell'esperimento n°1

Number of breeding males = 2

expected numbers of sampled offspring from sampled fathers: 81

non-zero probabilities of paternity for each mother-offspring pair:

labels:	group:	P(father)	labels:	group:	P(father)
calf: IV3.L01			calf: IV3.L08		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L02			calf: IV3.L09		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L03			calf: IV3.L10		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L04			calf: IV3.L11		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L05			calf: IV3.L12		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L06			calf: IV3.L13		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L07			calf: IV3.L14		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00



<b>labels:</b>	<b>group: P(father)</b>	
calf: IV3.L15		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L16		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L17		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L18		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L19		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L20		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L21		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L22		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L23		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L24		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00

<b>labels:</b>	<b>group: P(father)</b>	
calf: IV3.L25		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L26		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L27		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L28		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L29		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L30		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L31		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L32		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L33		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L34		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00

<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>	<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>
calf: IV3.L35			calf: IV3.L45		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L36			calf: IV3.L46		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L37			calf: IV3.L47		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L38			calf: IV3.L48		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L39			calf: IV3.L49		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L40			calf: IV3.L50		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L41			calf: IV3.L51		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L42			calf: IV3.L52		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L43			calf: IV3.L53		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L44			calf: IV3.L54		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>	<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>
calf: IV3.L55			calf: IV3.L65		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L56			calf: IV3.L66		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L57			calf: IV3.L67		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L58			calf: IV3.L68		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L59			calf: IV3.L69		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L60			calf: IV3.L70		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L61			calf: IV3.L71		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L62			calf: IV3.L72		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L63			calf: IV3.L73		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV3.L64			calf: IV3.L74		
mother: IV3.F1			mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00	male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

labels:	group: P(father)	
calf: IV3.L75		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L76		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L77		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L78		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L79		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L80		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00
calf: IV3.L81		
mother: IV3.F1		
male: IV3.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00

**Legenda:**

<identificativo larva>

<identificativo madre>

<identificativo maschio x> <gruppo del maschio x>

<gruppo y>

all

<Probabilità che il maschio x sia il padre>

<Probabilità che il maschio x appartenga al gruppo y>

<Probabilità che il padre sia stato campionato>

## Appendice n°17

### Genotipi della progenie dell'esperimento n°2 in ordine di ovideposizione

Ovatura	ID larva	RPW02	RPW39	RPW06	RPW32	RPW38
I	IV4.L01	300 300	193 205	78 98	218 238	157 163
I	IV4.L02	300 300	203 205	78 98	238 238	157 163
I	IV4.L03	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
I	IV4.L04	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
I	IV4.L05	300 300	203 205	78 78	238 238	157 163
I	IV4.L06	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
I	IV4.L07	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
I	IV4.L08	300 300	193 205	78 98	218 238	163 163
II	IV4.L09	300 300	193 205	98 98	238 238	163 163
II	IV4.L10	300 300	203 205	78 98	238 238	157 163
II	IV4.L11	300 300	193 205	98 98	238 238	163 163
II	IV4.L12	300 300	203 205	78 78	238 238	157 163
II	IV4.L13	300 300	203 205	98 98	218 218	157 163
II	IV4.L14	300 300	193 205	78 98	218 238	157 163
II	IV4.L15	300 300	203 205	98 98	238 238	157 163
II	IV4.L16	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
II	IV4.L17	300 300	193 205	78 98	218 218	157 163
II	IV4.L18	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
II	IV4.L19	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
II	IV4.L20	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
II	IV4.L21	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
II	IV4.L22	300 300	193 205	78 98	218 238	157 163
II	IV4.L23	300 300	203 205	78 78	238 238	163 163
II	IV4.L24	300 300	203 205	78 98	218 218	157 163
II	IV4.L25	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
II	IV4.L26	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
II	IV4.L27	300 300	203 205	98 98	238 238	163 163
II	IV4.L28	300 300	193 205	78 78	218 218	157 163
II	IV4.L29	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
II	IV4.L30	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
II	IV4.L31	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
II	IV4.L32	300 300	203 205	78 78	218 238	157 163
II	IV4.L33	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
II	IV4.L34	300 300	203 205	78 98	218 218	163 163
II	IV4.L35	300 300	193 205	78 78	218 238	157 163
II	IV4.L36	300 300	203 205	98 98	238 238	163 163
II	IV4.L37	300 300	203 205	98 98	218 218	157 163
II	IV4.L38	300 300	203 205	78 98	218 218	157 163
III	IV4.L39	300 304	185 193	78 98	236 238	163 163
III	IV4.L40	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163

<b>Ovatura</b>	<b>ID larva</b>	<b>RPW02</b>	<b>RPW39</b>	<b>RPW06</b>	<b>RPW32</b>	<b>RPW38</b>
III	IV4.L41	300 300	193 205	78 78	218 238	157 163
III	IV4.L42	300 300	193 205	78 78	218 218	157 163
III	IV4.L43	300 300	193 205	98 98	218 218	163 163
III	IV4.L44	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
III	IV4.L45	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
III	IV4.L46	300 300	193 205	78 78	238 238	163 163
III	IV4.L47	300 300	203 205	78 98	238 238	163 163
IV	IV4.L48	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
IV	IV4.L49	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
IV	IV4.L50	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
IV	IV4.L51	300 300	193 205	78 78	238 238	163 163
IV	IV4.L52	300 300	193 205	98 98	218 218	163 163
IV	IV4.L53	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
V	IV4.L54	300 300	193 205	98 98	218 238	163 163
V	IV4.L55	300 300	203 205	78 98	218 218	163 163
V	IV4.L56	300 300	203 205	78 98	238 238	163 163
V	IV4.L57	300 300	193 205	78 98	218 218	157 163
VI	IV4.L58	300 300	193 205	78 98	218 238	157 163
VII	IV4.L59	300 300	193 205	78 78	238 238	163 163
VII	IV4.L60	300 300	203 205	98 98	238 238	163 163
VII	IV4.L61	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
VII	IV4.L62	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
VII	IV4.L63	300 300	203 205	78 98	238 238	163 163
VII	IV4.L64	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
VII	IV4.L65	300 300	193 205	98 98	238 238	157 163
VII	IV4.L66	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
VII	IV4.L67	300 300	203 205	98 98	218 218	157 163
VII	IV4.L68	300 300	193 205	98 98	218 238	163 163
VII	IV4.L69	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
VII	IV4.L70	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
VII	IV4.L71	300 300	193 205	78 98	218 218	157 163
VIII	IV4.L72	300 300	193 205	78 98	218 238	157 163
VIII	IV4.L73	300 300	193 205	98 98	218 218	157 163
VIII	IV4.L74	300 300	203 205	98 98	218 238	157 163
VIII	IV4.L75	300 300	193 205	78 78	218 218	163 163
VIII	IV4.L76	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
VIII	IV4.L77	300 300	203 205	98 98	218 238	163 163
VIII	IV4.L78	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
X	IV4.L79	300 300	203 205	78 98	238 238	157 163
X	IV4.L80	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
X	IV4.L81	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
XI	IV4.L82	300 300	193 205	78 98	218 238	163 163
XI	IV4.L83	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
XII	IV4.L84	300 300	193 205	78 78	238 238	163 163

<b>Ovatura</b>	<b>ID larva</b>	<b>RPW02</b>	<b>RPW39</b>	<b>RPW06</b>	<b>RPW32</b>	<b>RPW38</b>
XII	IV4.L85	300 312	185 203	78 98	218 218	163 165
XII	IV4.L86	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
XII	IV4.L87	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
XII	IV4.L88	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
XII	IV4.L89	300 300	193 205	78 98	218 218	157 163
XII	IV4.L90	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
XII	IV4.L91	300 300	193 205	78 78	218 218	163 163
XII	IV4.L92	300 300	203 205	78 98	238 238	163 163
XII	IV4.L93	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
XII	IV4.L94	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
XII	IV4.L95	300 300	193 205	78 78	238 238	157 163
XII	IV4.L96	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
XII	IV4.L97	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
XII	IV4.L98	300 300	193 205	78 98	218 238	163 163
XII	IV4.L99	300 300	193 205	78 78	238 238	163 163
XII	IV4.L100	300 300	193 205	78 98	238 238	163 163
XII	IV4.L101	300 300	203 205	78 78	238 238	163 163
XII	IV4.L102	300 300	203 205	78 98	218 238	163 163
XIII	IV4.L103	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163
XIII	IV4.L104	300 300	203 205	78 78	218 218	163 163
XIII	IV4.L105	300 300	193 205	78 98	238 238	157 163
XIII	IV4.L106	300 300	193 205	78 98	238 238	163 163
XIV	IV4.L107	300 300	203 205	78 98	238 238	163 163
XIV	IV4.L108	300 300	193 205	78 78	218 218	157 163
XV	IV4.L109	300 300	193 205	78 98	238 238	163 163
XV	IV4.L110	300 300	193 205	78 98	218 218	157 163
XV	IV4.L111	300 300	193 205	78 78	218 238	163 163
XV	IV4.L112	300 300	193 205	78 98	218 218	157 163
XV	IV4.L113	300 300	193 205	78 98	238 238	163 163
XV	IV4.L114	300 300	203 205	78 98	218 218	157 163
XV	IV4.L115	300 300	203 205	98 98	238 238	163 163
XV	IV4.L116	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
XV	IV4.L117	0 0	203 205	78 98	218 218	163 163
XV	IV4.L118	300 300	193 205	78 98	218 218	163 163
XVI	IV4.L119	300 300	193 205	98 98	218 238	157 163
XVI	IV4.L120	300 300	203 205	78 98	218 238	157 163
XVI	IV4.L121	300 300	193 205	78 78	218 238	163 163
XVI	IV4.L122	300 300	193 205	78 78	238 238	157 163
XVI	IV4.L123	300 300	193 205	78 78	218 218	157 163
XVII	IV4.L124	300 300	193 205	98 98	218 238	157 163
XVIII	IV4.L125	300 300	203 205	78 78	218 238	163 163

## Appendice n°18

### Risultati dell'analisi di paternità condotta con il *software* Cervus v.3.0.6 sulla progenie dell'esperimento n°2

\*\*\*\* Summary statistics \*\*\*\*

**Father alone (all offspring):**

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95	0.00	125	120	100%	96%
Relaxed	80	0.00	125	120	100%	96%
Unassigned			0	5	0%	4%
Total			125	125	100%	100%

**Father given known mother:**

Level	Confidence (%)	Critical Delta	Assignments		Assignment Rate	
			Observed	Expected	Observed	Expected
Strict	95	0.00	125	122	100%	98%
Relaxed	80	0.00	125	122	100%	98%
Unassigned			0	3	0%	2%
Total			125	125	100%	100%

\*\*\*\* Number of individuals tested \*\*\*\*

Offspring (total):	125
Tested (typed at 4 or more loci):	125
Known mother typed at 4 or more loci:	125
Known mother typed at fewer than 4 loci:	0
Not tested (typed at fewer than 4 loci):	0
 Candidate fathers (total):	 2
Tested (typed at 4 or more loci):	2
Not tested (typed at fewer than 4 loci):	0
Average number of candidate fathers per offspring:	2
Average proportion of sampled candidate fathers:	1

\*\*\*\* Loci \*\*\*\*

- 1 RPW02
- 2 RPW39
- 3 RPW06
- 4 RPW32
- 5 RPW38



\*\*\*\* Simulation parameters \*\*\*\*

**Input**

Number of offspring: 10000.00  
Number of candidate fathers: 2.00  
Proportion of candidate fathers sampled: 1.00  
  
Proportion of loci typed: 1.00  
Proportion of loci mistyped: 0.01  
Error rate in likelihood calculations: 0.01  
Minimum number of typed loci: 2.00

\*\*\*\* Known parent-offspring mismatches \*\*\*\*

TOTAL: 0

\*\*\*\* Error rate analysis \*\*\*\*

<b>Locus name</b>	<b>N compared</b>	<b>N mismatching</b>	<b>N null</b>	<b>Detection prob.</b>	<b>Est. error rate</b>
RPW02	124	0	0	0.30364266	0.00000000
RPW39	125	0	0	0.47450952	0.00000000
RPW06	125	0	0	0.52210665	0.00000000
RPW32	125	0	0	0.08050078	0.00000000
RPW38	125	0	0	0.37219748	0.00000000

Mean observed error rate across loci: 0.000E+0000  
(assumes all known parent-offspring pairs are equally independent)

## Appendice n°19a

### Risultati del software CERVUS v.3.0.6 riguardanti le coppie madre-figlio dell'esperimento n°2

ID larva	<i>non-exclusion probability</i>	ID madre	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score
IV4.L01	2.48995504929100E-0001	F1	5	5	0	3.98325634692521E+0000
IV4.L02	7.52809089322909E-0002	F1	5	5	0	5.01889334572258E+0000
IV4.L03	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L04	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L05	6.16536796161018E-0002	F1	5	5	0	4.23093095250516E+0000
IV4.L06	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L07	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L08	1.82493242878553E-0001	F1	5	5	0	4.66979078849996E+0000
IV4.L09	1.58604858637495E-0002	F1	5	5	0	5.58401314424427E+0000
IV4.L10	7.52809089322909E-0002	F1	5	5	0	5.01889334572258E+0000
IV4.L11	1.58604858637495E-0002	F1	5	5	0	5.58401314424427E+0000
IV4.L12	6.16536796161018E-0002	F1	5	5	0	4.23093095250516E+0000
IV4.L13	5.97962833391398E-0002	F1	5	5	0	4.02169876942854E+0000
IV4.L14	2.48995504929100E-0001	F1	5	5	0	3.98325634692521E+0000
IV4.L15	2.03706005242003E-0002	F1	5	5	0	5.45406579177073E+0000
IV4.L16	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L17	2.34753775860246E-0001	F1	5	5	0	3.02993923427918E+0000
IV4.L18	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L19	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L20	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L21	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L22	2.48995504929100E-0001	F1	5	5	0	3.98325634692521E+0000
IV4.L23	4.51870805127246E-0002	F1	5	5	0	4.91746539407991E+0000
IV4.L24	2.20981141679915E-0001	F1	5	5	0	3.58652632338038E+0000
IV4.L25	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L26	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L27	1.49299761459685E-0002	F1	5	5	0	6.14060023334547E+0000
IV4.L28	1.92259024111617E-0001	F1	5	5	0	2.24197684106177E+0000
IV4.L29	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L30	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L31	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L32	1.91958912464223E-0001	F1	5	5	0	3.75188104280901E+0000
IV4.L33	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L34	1.61961016812957E-0001	F1	5	5	0	4.27306076495513E+0000
IV4.L35	2.03922738241055E-0001	F1	5	5	0	3.19529395370780E+0000
IV4.L36	1.49299761459685E-0002	F1	5	5	0	6.14060023334547E+0000
IV4.L37	5.97962833391398E-0002	F1	5	5	0	4.02169876942854E+0000
IV4.L38	2.20981141679915E-0001	F1	5	5	0	3.58652632338038E+0000

<b>ID larva</b>	<b><i>non-exclusion probability</i></b>	<b>ID madre</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con mismatch</b>	<b>LOD score</b>
IV4.L39	5.52483652875090E-0002	F1	5	5	0	3.77905883293028E+0000
IV4.L40	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L41	2.03922738241055E-0001	F1	5	5	0	3.19529395370780E+0000
IV4.L42	1.92259024111617E-0001	F1	5	5	0	2.24197684106177E+0000
IV4.L43	4.65571992086581E-0002	F1	5	5	0	4.15164612190208E+0000
IV4.L44	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L45	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L46	4.80033621413188E-0002	F1	5	5	0	4.36087830497870E+0000
IV4.L47	5.51747197276140E-0002	F1	5	5	0	5.70542778729732E+0000
IV4.L48	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L49	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L50	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L51	4.80033621413188E-0002	F1	5	5	0	4.36087830497870E+0000
IV4.L52	4.65571992086581E-0002	F1	5	5	0	4.15164612190208E+0000
IV4.L53	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L54	4.93816692939834E-0002	F1	5	5	0	5.10496323454811E+0000
IV4.L55	1.61961016812957E-0001	F1	5	5	0	4.27306076495513E+0000
IV4.L56	5.51747197276140E-0002	F1	5	5	0	5.70542778729732E+0000
IV4.L57	2.34753775860246E-0001	F1	5	5	0	3.02993923427918E+0000
IV4.L58	2.48995504929100E-0001	F1	5	5	0	3.98325634692521E+0000
IV4.L59	4.80033621413188E-0002	F1	5	5	0	4.36087830497870E+0000
IV4.L60	1.49299761459685E-0002	F1	5	5	0	6.14060023334547E+0000
IV4.L61	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L62	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L63	5.51747197276140E-0002	F1	5	5	0	5.70542778729732E+0000
IV4.L64	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L65	2.16401967753584E-0002	F1	5	5	0	4.89747870266952E+0000
IV4.L66	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L67	5.97962833391398E-0002	F1	5	5	0	4.02169876942854E+0000
IV4.L68	4.93816692939834E-0002	F1	5	5	0	5.10496323454811E+0000
IV4.L69	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L70	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L71	2.34753775860246E-0001	F1	5	5	0	3.02993923427918E+0000
IV4.L72	2.48995504929100E-0001	F1	5	5	0	3.98325634692521E+0000
IV4.L73	6.35230825108369E-0002	F1	5	5	0	3.46511168032733E+0000
IV4.L74	6.34239245283809E-0002	F1	5	5	0	4.97501588207457E+0000
IV4.L75	1.40910064994087E-0001	F1	5	5	0	2.92851128263651E+0000
IV4.L76	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L77	4.64845245562349E-0002	F1	5	5	0	5.66155032364931E+0000
IV4.L78	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L79	7.52809089322909E-0002	F1	5	5	0	5.01889334572258E+0000
IV4.L80	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L81	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000

<b>ID larva</b>	<b><i>non-exclusion probability</i></b>	<b>ID madre</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con mismatch</b>	<b>LOD score</b>
IV4.L82	1.82493242878553E-0001	F1	5	5	0	4.66979078849996E+0000
IV4.L83	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L84	4.80033621413188E-0002	F1	5	5	0	4.36087830497870E+0000
IV4.L85	1.15288607344710E-0001	F1	5	5	0	2.90286014478159E+0000
IV4.L86	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L87	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L88	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L89	2.34753775860246E-0001	F1	5	5	0	3.02993923427918E+0000
IV4.L90	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L91	1.40910064994087E-0001	F1	5	5	0	2.92851128263651E+0000
IV4.L92	5.51747197276140E-0002	F1	5	5	0	5.70542778729732E+0000
IV4.L93	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L94	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L95	6.54962408806908E-0002	F1	5	5	0	3.67434386340396E+0000
IV4.L96	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L97	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L98	1.82493242878553E-0001	F1	5	5	0	4.66979078849996E+0000
IV4.L99	4.80033621413188E-0002	F1	5	5	0	4.36087830497870E+0000
IV4.L100	5.86134802708616E-0002	F1	5	5	0	5.14884069819612E+0000
IV4.L101	4.51870805127246E-0002	F1	5	5	0	4.91746539407991E+0000
IV4.L102	1.71786651832943E-0001	F1	5	5	0	5.22637787760116E+0000
IV4.L103	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000
IV4.L104	1.32643093481579E-0001	F1	5	5	0	3.48509837173772E+0000
IV4.L105	7.99727863097236E-0002	F1	5	5	0	4.46230625662137E+0000
IV4.L106	5.86134802708616E-0002	F1	5	5	0	5.14884069819612E+0000
IV4.L107	5.51747197276140E-0002	F1	5	5	0	5.70542778729732E+0000
IV4.L108	1.92259024111617E-0001	F1	5	5	0	2.24197684106177E+0000
IV4.L109	5.86134802708616E-0002	F1	5	5	0	5.14884069819612E+0000
IV4.L110	2.34753775860246E-0001	F1	5	5	0	3.02993923427918E+0000
IV4.L111	1.49458608937061E-0001	F1	5	5	0	3.88182839528255E+0000
IV4.L112	2.34753775860246E-0001	F1	5	5	0	3.02993923427918E+0000
IV4.L113	5.86134802708616E-0002	F1	5	5	0	5.14884069819612E+0000
IV4.L114	2.20981141679915E-0001	F1	5	5	0	3.58652632338038E+0000
IV4.L115	1.49299761459685E-0002	F1	5	5	0	6.14060023334547E+0000
IV4.L116	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L117	2.24015046243209E-0001	F1	5	4	0	3.53637528238070E+0000
IV4.L118	1.72055225844017E-0001	F1	5	5	0	3.71647367585392E+0000
IV4.L119	6.73768161831610E-0002	F1	5	5	0	4.41842879297337E+0000
IV4.L120	2.34387330941830E-0001	F1	5	5	0	4.53984343602642E+0000
IV4.L121	1.49458608937061E-0001	F1	5	5	0	3.88182839528255E+0000
IV4.L122	6.54962408806908E-0002	F1	5	5	0	3.67434386340396E+0000
IV4.L123	1.92259024111617E-0001	F1	5	5	0	2.24197684106177E+0000
IV4.L124	6.73768161831610E-0002	F1	5	5	0	4.41842879297337E+0000

<b>ID larva</b>	<b><i>non-exclusion probability</i></b>	<b>ID madre</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con <i>mismatch</i></b>	<b>LOD score</b>
IV4.L125	1.40690107819462E-0001	F1	5	5	0	4.43841548438375E+0000

## Appendice n°19b

### Risultati del *software* CERVUS v.3.0.6 riguardanti le attribuzioni padre-figlio dell'esperimento n°2

ID larva	<i>non-exclusion probability</i>	ID padre candidato	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score	Delta	Livello di confidenza
IV4.L01	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L02	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L03	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L04	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L05	2.34122876182627E-0002	M2	5	5	0	3.29555402585955E+0000	3.29555402585955E+0000	*
IV4.L06	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L07	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L08	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L09	1.35917149788229E-0002	M2	5	5	0	4.14337061969897E+0000	4.14337061969897E+0000	*
IV4.L10	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L11	1.35917149788229E-0002	M2	5	5	0	4.14337061969897E+0000	4.14337061969897E+0000	*
IV4.L12	2.34122876182627E-0002	M2	5	5	0	3.29555402585955E+0000	3.29555402585955E+0000	*
IV4.L13	2.27069623866124E-0002	M2	5	5	0	3.08632184278293E+0000	3.08632184278293E+0000	*
IV4.L14	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L15	7.73550518637262E-0003	M2	5	5	0	4.51868886512512E+0000	4.51868886512512E+0000	*
IV4.L16	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L17	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L18	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L19	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L20	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L21	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L22	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*

ID larva	<i>non-exclusion probability</i>	ID padre candidato	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score	Delta	Livello di confidenza
IV4.L23	4.11366979457577E-0002	M2	5	5	0	2.92023578043341E+0000	2.92023578043341E+0000	*
IV4.L24	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L25	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L26	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L27	1.35917149788229E-0002	M2	5	5	0	4.14337061969897E+0000	4.14337061969897E+0000	*
IV4.L28	6.87249147307126E-0002	M2	5	5	0	1.86318700351736E+0000	1.86318700351736E+0000	*
IV4.L29	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L30	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L31	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L32	7.28942262243758E-0002	M2	5	5	0	2.81650411616340E+0000	2.81650411616340E+0000	*
IV4.L33	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L34	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L35	7.28942262243758E-0002	M2	5	5	0	2.81650411616340E+0000	2.81650411616340E+0000	*
IV4.L36	1.35917149788229E-0002	M2	5	5	0	4.14337061969897E+0000	4.14337061969897E+0000	*
IV4.L37	2.27069623866124E-0002	M2	5	5	0	3.08632184278293E+0000	3.08632184278293E+0000	*
IV4.L38	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L39	1.68703410180594E-0003	M1	5	5	0	5.85624472595253E+0000	5.85624472595253E+0000	*
IV4.L40	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L41	7.28942262243758E-0002	M2	5	5	0	2.81650411616340E+0000	2.81650411616340E+0000	*
IV4.L42	6.87249147307126E-0002	M2	5	5	0	1.86318700351736E+0000	1.86318700351736E+0000	*
IV4.L43	3.98974020904783E-0002	M2	5	5	0	2.71100359735678E+0000	2.71100359735678E+0000	*
IV4.L44	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L45	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L46	4.11366979457577E-0002	M2	5	5	0	2.92023578043341E+0000	2.92023578043341E+0000	*
IV4.L47	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L48	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*

ID larva	<i>non-exclusion probability</i>	ID padre candidato	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score	Delta	Livello di confidenza
IV4.L49	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L50	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L51	4.11366979457577E-0002	M2	5	5	0	2.92023578043341E+0000	2.92023578043341E+0000	*
IV4.L52	3.98974020904783E-0002	M2	5	5	0	2.71100359735678E+0000	2.71100359735678E+0000	*
IV4.L53	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L54	4.23178444839673E-0002	M2	5	5	0	3.66432071000281E+0000	3.66432071000281E+0000	*
IV4.L55	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L56	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L57	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L58	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L59	4.11366979457577E-0002	M2	5	5	0	2.92023578043341E+0000	2.92023578043341E+0000	*
IV4.L60	1.35917149788229E-0002	M2	5	5	0	4.14337061969897E+0000	4.14337061969897E+0000	*
IV4.L61	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L62	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L63	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L64	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L65	7.73550518637262E-0003	M2	5	5	0	4.51868886512512E+0000	4.51868886512512E+0000	*
IV4.L66	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L67	2.27069623866124E-0002	M2	5	5	0	3.08632184278293E+0000	3.08632184278293E+0000	*
IV4.L68	4.23178444839673E-0002	M2	5	5	0	3.66432071000281E+0000	3.66432071000281E+0000	*
IV4.L69	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L70	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L71	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L72	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L73	2.27069623866124E-0002	M2	5	5	0	3.08632184278293E+0000	3.08632184278293E+0000	*
IV4.L74	2.40845181047335E-0002	M2	5	5	0	4.03963895542896E+0000	4.03963895542896E+0000	*



ID larva	<i>non-exclusion probability</i>	ID padre candidato	Loci tipizzati	Loci comparati	Loci con mismatch	LOD score	Delta	Livello di confidenza
IV4.L75	1.20753516474827E-0001	M2	5	5	0	1.48786875809122E+0000	1.48786875809122E+0000	*
IV4.L76	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L77	4.23178444839673E-0002	M2	5	5	0	3.66432071000281E+0000	3.66432071000281E+0000	*
IV4.L78	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L79	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L80	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L81	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L82	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L83	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L84	4.11366979457577E-0002	M2	5	5	0	2.92023578043341E+0000	2.92023578043341E+0000	*
IV4.L85	1.77470021253454E-0003	M1	5	5	0	5.61255696021487E+0000	5.61255696021487E+0000	*
IV4.L86	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L87	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L88	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L89	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L90	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L91	1.20753516474827E-0001	M2	5	5	0	1.48786875809122E+0000	1.48786875809122E+0000	*
IV4.L92	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L93	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L94	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L95	2.34122876182627E-0002	M2	5	5	0	3.29555402585955E+0000	3.29555402585955E+0000	*
IV4.L96	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L97	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L98	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L99	4.11366979457577E-0002	M2	5	5	0	2.92023578043341E+0000	2.92023578043341E+0000	*
IV4.L100	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*

<b>ID larva</b>	<b><i>non-exclusion probability</i></b>	<b>ID padre candidato</b>	<b>Loci tipizzati</b>	<b>Loci comparati</b>	<b>Loci con mismatch</b>	<b>LOD score</b>	<b>Delta</b>	<b>Livello di confidenza</b>
IV4.L101	4.11366979457577E-0002	M2	5	5	0	2.92023578043341E+0000	2.92023578043341E+0000	*
IV4.L102	1.56388408531391E-0001	M2	5	5	0	3.22914826395466E+0000	3.22914826395466E+0000	*
IV4.L103	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L104	1.20753516474827E-0001	M2	5	5	0	1.48786875809122E+0000	1.48786875809122E+0000	*
IV4.L105	2.85870738463879E-0002	M2	5	5	0	4.08351641907696E+0000	4.08351641907696E+0000	*
IV4.L106	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L107	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L108	6.87249147307126E-0002	M2	5	5	0	1.86318700351736E+0000	1.86318700351736E+0000	*
IV4.L109	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L110	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L111	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L112	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L113	5.02290865867634E-0002	M2	5	5	0	3.70819817365082E+0000	3.70819817365082E+0000	*
IV4.L114	8.39150895686533E-0002	M2	5	5	0	2.65114939673477E+0000	2.65114939673477E+0000	*
IV4.L115	1.35917149788229E-0002	M2	5	5	0	4.14337061969897E+0000	4.14337061969897E+0000	*
IV4.L116	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L117	2.03935266187795E-0001	M2	5	4	0	1.53914566873420E+0000	1.53914566873420E+0000	*
IV4.L118	1.47443502700871E-0001	M2	5	5	0	2.27583115130863E+0000	2.27583115130863E+0000	*
IV4.L119	2.40845181047335E-0002	M2	5	5	0	4.03963895542896E+0000	4.03963895542896E+0000	*
IV4.L120	8.90059383358182E-0002	M2	5	5	0	3.60446650938081E+0000	3.60446650938081E+0000	*
IV4.L121	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*
IV4.L122	2.34122876182627E-0002	M2	5	5	0	3.29555402585955E+0000	3.29555402585955E+0000	*
IV4.L123	6.87249147307126E-0002	M2	5	5	0	1.86318700351736E+0000	1.86318700351736E+0000	*
IV4.L124	2.40845181047335E-0002	M2	5	5	0	4.03963895542896E+0000	4.03963895542896E+0000	*
IV4.L125	1.28079229807633E-0001	M2	5	5	0	2.44118587073725E+0000	2.44118587073725E+0000	*

## Appendice n°20

### Output dell'analisi di paternità eseguita con il *software* Patri sulla progenie dell'esperimento n°2

Number of breeding males = 2

expected numbers of sampled offspring from sampled fathers: 125

non-zero probabilities of paternity for each mother-offspring pair:

labels:	group:	P(father)	labels:	group:	P(father)
calf: IV4.L01			calf: IV4.L09		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L02			calf: IV4.L10		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L03			calf: IV4.L11		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L04			calf: IV4.L12		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L05			calf: IV4.L13		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L06			calf: IV4.L14		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L07			calf: IV4.L15		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L08			calf: IV4.L16		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>	<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>
calf: IV4.L17			calf: IV4.L27		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L18			calf: IV4.L28		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L19			calf: IV4.L29		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L20			calf: IV4.L30		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L21			calf: IV4.L31		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L22			calf: IV4.L32		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L23			calf: IV4.L33		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L24			calf: IV4.L34		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L25			calf: IV4.L35		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L26			calf: IV4.L36		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>	<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>
calf: IV4.L37			calf: IV4.L47		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L38			calf: IV4.L48		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L39			calf: IV4.L49		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M1	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L40			calf: IV4.L50		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L41			calf: IV4.L51		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L42			calf: IV4.L52		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L43			calf: IV4.L53		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L44			calf: IV4.L54		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L45			calf: IV4.L55		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L46			calf: IV4.L56		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>	<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>
calf: IV4.L57			calf: IV4.L67		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L58			calf: IV4.L68		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L59			calf: IV4.L69		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L60			calf: IV4.L70		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L61			calf: IV4.L71		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L62			calf: IV4.L72		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L63			calf: IV4.L73		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L64			calf: IV4.L74		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L65			calf: IV4.L75		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L66			calf: IV4.L76		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00

<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>	<b>labels:</b>	<b>group:</b>	<b>P(father)</b>
calf: IV4.L77			calf: IV4.L87		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L78			calf: IV4.L88		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L79			calf: IV4.L89		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L80			calf: IV4.L90		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L81			calf: IV4.L91		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L82			calf: IV4.L92		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L83			calf: IV4.L93		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L84			calf: IV4.L94		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L85			calf: IV4.L95		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M1	0	1.000000E+00	male: IV4.M1	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00
calf: IV4.L86			calf: IV4.L96		
mother: IV4.F1			mother: IV4.F1		
male: IV4.M2	0	1.000000E+00	male: IV4.M2	0	1.000000E+00
	0	1.000000E+00		0	1.000000E+00
	all	1.000000E+00		all	1.000000E+00





labels:	group:	P(father)	labels:	group:	P(father)
calf: IV4.L117					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L118					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L119					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L120					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L121					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L122					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L123					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L124					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M2	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			
calf: IV4.L125					
mother: IV4.F1					
male: IV4.M1	0	1.000000E+00			
	0	1.000000E+00			
	all	1.000000E+00			

**Legenda:**

<identificativo larva>

<identificativo madre>

<identificativo maschio x> <gruppo del maschio x>

<gruppo y>

all

<Probabilità che il maschio x sia il padre>

<Probabilità che il maschio x appartenga al gruppo y>

<Probabilità che il padre sia stato campionato>

## Ringraziamenti

Grazie al mio docente guida, il dr. Alessio De Biase, per un'infinità di motivi che vanno ben oltre il rapporto professionale che abbiamo avuto in questi anni. Egli è stato indubbiamente un punto di riferimento ed un modello per apprendere questo affascinante mestiere del “fare ricerca”, ed in generale un esempio di dedizione, serietà e amore per il proprio lavoro che porterò con me qualunque strada prenderò.

Grazie alla relatrice esterna di questa tesi, la prof.ssa Rita Cervo, per la disponibilità e gli utili consigli e osservazioni che mi hanno consentito di migliorare questo elaborato.

Un ringraziamento speciale va anche al gruppo BBKA Onlus che lavora presso il C.R. ENEA La Casaccia (UTAGRI-ECO) ed in particolar modo a Silvia Arnone, Massimo Cristofaro, Sergio Musmeci e Raffale Sasso, per aver offerto il proprio lavoro, il supporto tecnico e la propria esperienza nell'allevamento degli individui di Punteruolo rosso e nell'esecuzione degli esperimenti di incrocio.

Grazie infinite anche a Giuseppe Mazza (CRA, Firenze), Matteo Montagna (Università di Milano), LienVan Vu (Vietnam National Museum of Nature, Hanoi, Vietnam), J. Ng (Kota Baru, Malaysia), L. Ren (Chinese Academy of Sciences, China) per il prezioso contributo alla raccolta dei campioni analizzati in questo lavoro.

Grazie a tutti i docenti ed il personale del dip.to di Biologia e Biotecnologie C. Darwin che hanno offerto disponibilità, aiuto e consigli durante questa esperienza di dottorato: Andrea Setini, Marco Oliverio, Fiorenza Accordi. Antonia Bracci, Beniamino Trombetta, Fulvio Cruciani e Giancarlo Poiana. Grazie a Margherita Eufemi del dip.to di Scienze Biochimiche di questa università.

Grazie ai colleghi, ai dottorandi e tesisti con cui ho condiviso il lavoro in laboratorio ed i momenti di svago: Alessandra La Marca, Gabriele Senia, Giulia Fassio, Maria Vittoria Modica, Lucilla Ronci, Giovanna Di Donato, Dario D'eustacchio.

Grazie a Fabio di Vincenzo, per quanto non sia possibile spiegare il perché in due righe.

Grazie alla mia famiglia, al mio compagno e agli amici, che mi hanno aiutato e sostenuto, moralmente ma anche molto in modo pratico, permettendomi di conciliare la mia vita personale con la passione per il mio lavoro.

Questo lavoro è stato condotto grazie al supporto finanziario dell'Università degli Studi di Roma La Sapienza nell'ambito del progetto FARI 2010 (prot. C26I10SBMC) "Bioinformatica, ecologia molecolare e specie invasive: *in silico mining* di librerie genomiche da pirosequenziamento 454 per l'individuazione di loci microsatelliti". Esso fa parte inoltre di un finanziamento quadriennale FAO/IAEA (Technical Contract No: 15804) per il progetto "Laboratory and Confined-Field Assessment for the Feasibility of an Integrated SIT Project for the Control of the Red Palm Weevil in Italy", ottenuto in collaborazione con il gruppo Onlus BBKA che lavora presso il C.R. ENEA La Casaccia UTAGRI-ECO (S. Maria di Galeria, RM), e del progetto MiPAAF (Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali) PROPALMA.