

Dagli albori della genetica degli insetti alle nuove sfide biotecnologiche per combattere quelli dannosi e invasivi, ovvero “Sex, flies and Cas9-gene drives”

INTRODUZIONE

La nascita dell'agricoltura risolse l'importante problema di conciliare la nuova vita sedentaria della nostra specie con la disponibilità di alimenti, ma apriva un nuovo fronte di lotta per la sopravvivenza: la lotta contro gli insetti che danneggiavano il raccolto. A inizio del secolo scorso, l'evoluzione della Genetica ha visto la scoperta del ruolo dei cromosomi nello sviluppo (determinazione del sesso) e la localizzazione dei geni sui medesimi grazie allo studio di insetti dannosi (*Tenebrio melitor*) o innocui (*Drosophila melanogaster*). La genetica della *Drosophila*, fondata da Thomas Hunt Morgan (1866-1945; Columbia University, USA; Nobel 1933) ha permesso successivamente e senza volerlo di porre le basi per la SIT e la biotecnologia degli insetti dannosi per sviluppare nuovi metodi di controllo.

LO SVILUPPO DELLA TECNICA DELL'INSETTO STERILE, SIT

A metà del secolo scorso, il genetista sovietico Aleksandr Sergeevich Serebrovskii (1892-1948) propose un metodo di controllo di insetti dannosi basato sul rilascio di individui sterilizzati mediante irradiazione perché portatori di nuove mutazioni cromosomiche dominanti letali nei loro gameti. L'idea era derivata anche dagli studi dell'allievo di Morgan, Hermann J. Muller (1890-1967; Nobel nel 1946), che aveva scoperto come i raggi X inducessero mutazioni letali ereditarie nella *Drosophila*. Muller era in visita scientifica in Russia

* Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II

proprio nel laboratorio di Serebrovskii. Dopo alcuni decenni l'idea fu messa in pratica negli Stati Uniti da Edward Knippling (1909-2000) che riuscì a eradicare in 4 decadi nell'intera nazione e in quelle limitrofe a sud fino all'istmo di Panama, un insetto dannoso al bestiame, lo "screwworm", o verme trapanatore, *Cochliomyia hominivorax*, le cui larve si nutrono crescendo nelle ferite degli animali. Fu possibile applicare questa tecnica genetica di controllo a questa specie, anche perché era stata sviluppata una dieta artificiale e un metodo di allevamento massivo (Klqssen and Curtis, 2005). Questa tecnica detta dell'insetto sterile, o SIT, fu esportata anche ad altre specie dannose, che sono allevabili in laboratorio e su vasta scala, ma che danneggiano l'agricoltura. Le mosche della frutta appartenenti alla famiglia delle mosche Tephritidae sono il principale bersaglio per proteggere l'agricoltura e la economia. A fine anni Ottanta, sulla base degli avvenuti grandi avanzamenti nella genetica della *Drosophila* fu proposta la nuova strada della biotecnologia per combattere in modo più efficace gli insetti dannosi e potenziare la SIT (Louis et al., 1988). In *Drosophila* erano state infatti sviluppate tecniche di mutagenesi e di isolamento molecolare di geni della determinazione del sesso corrispondenti a ceppi mutanti nel fenotipo. Inoltre era stata applicata con successo la trasformazione genetica mediante elementi trasponibili – curando mosche con occhio bianco, ripristinandone il colore rosso e la piena funzionalità visiva anche con luce intensa.

Dopo l'arrivo della mosca mediterranea *Ceratitis capitata*, detta *medfly*, in California e Florida, ci furono forti contestazioni delle popolazioni urbane contro l'uso del *malathion*, pesticida che veniva spruzzato dall'alto con aerei, anche in zone abitate. Fu quindi inizio un progetto di controllo della *medfly*, ancora oggi attivo, basato sulla SIT.

LO SVILUPPO DI CEPPI MUTANTI DI «CERATITIS» PER SELEZIONARE I SOLI MASCHI

Tre decenni fa, studi di mutagenesi di indotte con radiazioni (presso il laboratorio FAO-IAEA a Seibersdorf, Austria) hanno portato a isolare varie mutazioni geniche. Tra esse, due sono risultate molto utili per separare i maschi dalle femmine in modo semplice e a stadi di sviluppo precoci: 1) un ceppo con mutazione temperatura-sensibile letale embrionale e recessiva (*ts^l/ts^l*) e 2) un ceppo con pupe color bianco (*wp/wp*) invece che marrone. Anche con un pizzico di fortuna (la cosiddetta "serendipity"), è stato selezionato un ceppo eterozigote, con ulteriori riarrangiamenti e che porta una traslocazione, sul

cromosoma Y, di un segmento autosomico contenente i due geni selvatici *tsl*⁺ e *wp*⁺ e sull'autosoma integro, gli alleli recessivi mutanti *tsl* e *wp*. In questo ceppo, è possibile uccidere a stadi embrionali i soli individui XX; *tsl/tsl*, *wp/wp* future femmine, dopo shock a calore per alcune ore a 42°C. È quindi possibile portare avanti nello sviluppo i soli futuri maschi X/Y-*tsl*⁺*wp*⁺ che potranno sopravvivere allo shock e anche mostrare il colore marrone della pupa invece che bianco (come secondo sistema di separazione dei sessi e *check point* della qualità del *sexing*). È importante evitare il rilascio di femmine insieme ai maschi, sebbene entrambi sterilizzati, perché le femmine comunque danneggiano la frutta con l'ovopositore. Sono stati condotti senza successo tentativi di replicare questo metodo di "sexing" dei maschi in altre specie di Tephritidae per le quali è auspicabile applicare la SIT. La biotecnologia potrebbe risolvere questo problema (Saccone, 2018).

I GENI DELLA DETERMINAZIONE DEL SESSO DELLE MOSCHE TEPHRITIDAE

Negli ultimi due decenni in *Ceratitis* è stato sviluppato un armamentario genetico per strategie e per ingegneria genetica che ha permesso di isolare e manipolare geni della determinazione del sesso, di definire l'intero genoma, di sviluppare ceppi transgenici che esprimono nelle sole femmine proteine letali condizionali (Fu et al., 2008), di indurre trasformazione sessuale delle femmine in maschi XX fertili (Saccone, 2018), e di recente anche di trasformare i maschi in femmine XY fertili (Meccariello et al., 2019).

In *Ceratitis* è stato scoperto un gene master per la determinazione del sesso femminile che ha funzioni aggiuntive epigenetiche rispetto al gene ortologo di *Drosophila* (da cui si è partiti per isolarlo), il gene *Cctransformer* (*Cctra*) (Saccone, 2018). *Cctra* è utile anche come risorsa di sequenze regolative, per esprimere con transgeni, nelle sole femmine, proteine letali condizionali (Fu et al., 2007). È utile anche per trasformare le femmine in maschi XX, quando *Cctra* viene spento per alcune ore durante l'embriogenesi con iniezioni di RNA a doppio filamento, e produrre progenie di soli maschi. Ortologhi di *Cctra* sono stati isolati in tante altre specie di Tephritidae dei generi *Bactrocera* e *Anastrepha*, confermandone il ruolo chiave e la utilità in campo biotecnologico (Saccone, 2018). Di recente è stato identificato in *Ceratitis*, anche il gene master della determinazione del sesso maschile, il gene *MoY* (*Maleness-on-the-Y*) (Meccariello et al., 2019). *MoY* è in grado di reprimere il master della determinazione del sesso femminile *Cctra* negli embrioni XY, e indurre lo sviluppo maschile. È stato sorprendente e interessante scoprire che *MoY* è fun-

zionalmente conservato nella mosca dell'olivo *Bactrocera oleae* e nella mosca orientale *Bactrocera dorsalis*, una specie invasiva che è stata di recente rilevata per la prima volta in Italia e in Europa (Meccariello et al., 2019). Ortologi di *MoY* sono presenti sul cromosoma Y di altre 5 specie del genere *Bactrocera*, suggerendo una sua vasta conservazione evolutiva, e quindi un suo possibile uso per produrre progenie di solo sesso maschile mediante transgenesi.

L'EDITING GENOMICO IN «CERATITIS» E NELLE ALTRE «TEPHRITIDAE»: STATO DELL'ARTE E POTENZIALI APPLICAZIONI NEL LORO CONTROLLO

Da quando la CRISPR/Cas9 è stata applicata anche in *Drosophila* per mutagenizzare geni, per modificarli o inserire sequenze di DNA esogeno, si sono susseguiti a ritmo incalzante studi simili in altre specie di insetti appartenenti non solo ai Ditteri, ma anche Imenotteri, Lepidotteri e Coleotteri. Abbiamo messo a punto un metodo di applicazione della CRISPR/Cas9 in *Ceratitis capitata*, in *Bactrocera oleae* (Meccariello, A., Tsoumani, K. T., al., dati non pubblicati) e *Musca domestica*, basato sull'uso di proteina Cas9 purificata in laboratorio – per renderla più economica – sulla produzione *in vitro* di sgRNA (che permettono il riconoscimento specifico del gene da colpire, sull'assemblaggio del complesso proteina-RNA (Cas9+gRNA) *in vitro* e della iniezione in embrioni di insetto, appena dopo la ovodeposizione (Saccone, 2018). Simili approcci sono stati sviluppati in varie altre specie delle Tephritidae (*Bactrocera dorsalis*, *Anastrepha*; Saccone, 2018). È possibile indurre in via transiente con alta efficienza mutazioni anche bialleliche (2 alleli su i 2 cromosomi omologhi, in ciascuna cellula) nelle cellule somatiche e germinali degli embrioni, dai quali si sviluppa una progenie parzialmente mutante (mosaico) che quando incrociata, da origine a una successiva progenie che mostra parte degli individui pienamente mutanti (omozigoti). Un'alternativa disponibile già in *Drosophila*, nel baco da seta *Bombyx mori*, e in varie specie di zanzare (*Anopheles* e *Aedes*) è la produzione di ceppi transgenici che esprimono in modo endogeno la proteina Cas9 e il gRNA gene-specifico, necessari per l'evento di gene editing. In questi ceppi transgenici è possibile anche indurre mediante eventi di ricombinazione omologa, una duplicazione della singola copia del transgene presente su un solo cromosoma, sul sito corrispondente del cromosoma omologo. Un insetto che riceve una sola copia del costrutto transgenico, durante il suo sviluppo e nelle sue cellule germinali, lo duplica, divenendo in pratica un omozigote. Si assiste così a una cosiddetta ereditarietà super-mendeliana anche detta *gene drive*, che permette di

trasmettere il costrutto genico artificiale e aumentarne la sua frequenza in poche generazioni in popolazioni che simulano quelle selvatiche. Se il costrutto transgenico *gene drive* viene progettato così da avere anche la caratteristiche di indurre una sterilità femminile o una trasformazione delle femmine in maschi (ad esempio, usando un gene mascolinizzante), dopo poche generazioni si assiste al collasso delle popolazioni bersaglio.

Attualmente la sperimentazione del *gene drive* avviene solo in laboratori che rispettano livelli di sicurezza elevata per evitare la diffusione nell'ambiente di insetti transgenici, ancora prima di capire se e quando si fermerà nell'avanzare in ogni generazioni nelle popolazioni selvatiche e se vi siano rischi ecologici. Queste sperimentazione mirano anche a superare problemi di resistenza al *gene drive* che si presenta dopo poche generazioni e che ne limiterebbe l'efficacia. Combattere specie aliene di insetti dannosi con questo sistema, una volta assenti in specifiche regioni geografiche, potrebbe essere più accettabile per la società in un prossimo futuro, anche dopo che la sperimentazione avrà fornito dati rassicuranti su eventuali rischi. Intanto, sono già anni che in Brasile vengono rilasciate zanzare *Aedes aegypti* transgeniche ma sterili, per combattere la diffusione del virus zika. Il ceppo transgenico permette di separare facilmente i maschi dall'allevamento in biofattoria, risolvendo il problema delle femmine che, seppure sterili comunque farebbero il pasto di sangue, e quindi potenzialmente veicolando il patogeno. Questa sperimentazione in campo in Brasile potrà essere la base per spiegare alla società i benefici dell'uso di insetti OGM e possibilmente far accettare in futuro nuove soluzioni ancora più efficaci come quelle promesse dal *gene drive*.

Una maggiore conoscenza scientifica, una evoluzione nella politica e nella legislazione e attente valutazioni rischi-benefici saranno elementi vitali per rendere possibile una discussione costruttiva verso questa direzione.

RIASSUNTO

Molte specie di insetti sono dannose alla produzione agricola o alla salute umana e il cambiamento climatico amplifica il problema permettendo a quelle invasive di spostarsi e colonizzare nuovi territori. Un metodo di controllo alternativo all'uso dei pesticidi chimici, basato sulla genetica e specie-specifico è la tecnica dell'insetto sterile (SIT), che consiste nel continuo rilascio di maschi sterili nelle zone infestate. In questo contributo verranno descritte le tappe storiche della genetica di insetti dannosi, l'identificazione di loro geni della determinazione del sesso e verranno analizzate le potenzialità del loro utilizzo biotecnologico a fini del loro controllo, combinate con la tecnica CRISPR-Cas9.

ABSTRACT

Many insect species are harmful to agriculture or human health and the climate change empowers the problem, allowing those invasive ones to migrate and colonize new geographic areas. A control method, alternative to chemical pesticides, based on genetics and species-specific is the sterile insect technique (SIT), which consists in a continuous release of sterile males in the infested regions. In this essay, we will describe historical steps that led to the genetics of pest insects and to the identification of their sex determining genes. Furthermore, we will analyze the possibilities of their biotechnological use to their control, in the frame of CRISPR-Cas9.

REFERENZE

- FU G., CONDON K.C., EPTON M.J., GONG P., JIN L., CONDON G.C., MORRISON N.I., DAFALLA T.H., ALPHEY L. (2007): *Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing*, «Nat Biotechnol.», Mar, 25 (3), pp. 353-357. Epub Feb 18.
- KLASSEN W. AND CURTIS C.F. (2005): *History 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. (Eds.), Springer, pp. 3-36, ISBN 978-1-4020-4051-1.
- LOUIS C., SAVAKIS C., KAFATOS F.C. (1988): *Possibilities for genetic engineering in insects of economic interest*, in *Modern Insect Control: Nuclear Techniques and Biotechnology*, International Atomic Energy Agency, ISBN 92-0-010388-X.
- MECCARIELLO A., SALVEMINI M., PRIMO P., HALL B., KOSKINIOTI P., DALÍKOVÁ M., GRAVINA A., GUCCIARDINO M.A., FORLENZA F., GREGORIOU M.E., IPPOLITO D., MONTI S.M., PETRELLA V., PERROTTA M.M., SCHMEING S., RUGGIERO A., SCOLARI F., GIORDANO E., TSOUMANI K.T., MAREC F., WINDBICHLER N., NAGARAJU J., ARUNKUMAR K., BOURTZIS K., MATHIOPOULOS K.D., RAGOISSIS J., VITAGLIANO L., TU Z., PAPATHANOS P.A., ROBINSON M.D. AND SACCONI G. (2019): *Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests*, bioRxiv 533646; doi: <https://doi.org/10.1101/533646>
- SACCONI G. (2018): *Sex Determination and Gene Editing in Tephritids: Converging on Innovative Biocontrol Strategie*, «Atti Accademia Nazionale. Italiana di Entomologia», LXVI.