

La tecnica dell'insetto sterile per il controllo integrato di insetti nocivi: evoluzione e prospettive

Le nuove biotecnologie promettono di riproporre e di rilanciare la tecnica dell'insetto sterile attraverso innovazioni in grado di rendere il processo più efficace e sostenibile

DOI 10.12910/EAI2016-037

di **Maurizio Calviti** e **Riccardo Moretti**, ENEA

A causa della loro versatilità bio-ecologica gli insetti esercitano un notevole impatto economico, sanitario e sociale, condizionando le produzioni agroalimentari e mettendo a rischio la salute umana. Numerose strategie di verifica sono state sviluppate e sperimentate per il loro controllo e tra esse la tecnica dell'insetto sterile è senz'altro premiata da un altissimo livello di specificità ed ecocompatibilità. Rispetto alle attese teoriche, l'applicazione di questo approccio di controllo ha però avuto risultati soddisfacenti solo in alcuni casi specifici. Le nuove biotecnologie promettono di rilanciare questa strategia attraverso innovazioni in

grado di renderla più efficace e sostenibile. In particolare, il batterio endosimbiote *Wolbachia* può essere sfruttato per lo sviluppo di linee di insetti in grado di produrre naturalmente maschi sterili da rilasciare in campo per abbattere la fertilità delle popolazioni selvatiche di insetti dannosi o vettori di patogeni per uomo e animali.

In un contesto di sempre maggiore consapevolezza del delicato equilibrio alla base dell'ecosistema e della limitatezza di molte di quelle che sono le sue risorse, l'uomo si trova necessariamente a confrontarsi con una serie di organismi competitori in grado, nel complesso, di mettere a repentaglio da una parte la pro-

duzione di cibo, dall'altra la stessa salute umana. Gli insetti, in particolare, hanno enorme impatto sull'attività umana, sia in quanto diretti consumatori delle risorse, sia perché vettori di microrganismi patogeni per piante, animali, uomo. Molte specie d'insetti, un tempo relegate alle aree tropicali e subtropicali, hanno oggi iniziato a invadere le aree temperate in risposta sia ai cambiamenti climatici che ad un commercio fortemente globalizzato e non sottoposto ad adeguati controlli di frontiera.

In considerazione di tutti gli effetti collaterali associati all'uso di pesticidi e all'acquisizione di resistenza evidenziata da molte specie d'inset-



ti a principi attivi efficaci solo fino a pochi anni fa, la lotta chimica sembra essere destinata nel futuro a perdere quel ruolo di componente essenziale e irrinunciabile delle strategie di lotta a fitofagi e vettori. Le crescenti restrizioni all'uso di varie molecole di sintesi, dimostrate altamente pericolose per l'ambiente e per gli organismi non target (gli impollinatori in primo luogo), stanno facendo crescere l'interesse per strategie innovative di difesa delle produzioni agroalimentari e della salute umana, basate su principi di sostenibilità economica ed ambientale. L'alta specificità d'azione accomuna due principali filoni di strategie di lotta agli insetti nocivi. Il primo è quello che vede come obiettivo primario la bio-fortificazione delle piante coltivate (miglioramento genetico e biotecnologie di nuova generazione per l'acquisizione di re-

sistenze) e di uomo e animali (vaccini). Altra strada è quella che mira a sviluppare metodologie in grado di contrastare direttamente gli insetti, sfruttando antagonisti naturali (predatori, parassitoidi, microrganismi entomopatogeni), molecole attrattive o repellenti, o applicando metodologie che ne inibiscano l'elevata prolificità riproduttiva, una delle chiavi del successo invasivo di molte specie.

Queste strategie, vaccini e varietà resistenti in particolare, hanno permesso di far fronte a diversi aspetti emergenziali di natura entomologica sia in ambito sanitario che agroalimentare, ma non sempre sono risultate attuabili. Per molti virus trasmessi all'uomo da insetti, non è stato ad esempio ancora possibile sviluppare vaccini (vedi *Dengue*, *Zika*, *Chikungunya*), così come non esistono varietà col-

turali di piante resistenti all'attacco di alcuni importanti virus trasmessi da insetti fitomizi. In questi casi non resta che un'unica via da percorrere: potenziare la ricerca per sviluppare metodi e nuove tecnologie di controllo degli insetti vettori dei patogeni. In questo lavoro parleremo delle tecniche di lotta agli insetti dannosi definite "autocide", della loro evoluzione e delle prospettive applicative future.

La tecnica di lotta col maschio sterile (SIT)

Si parla di metodo "autocida" di lotta quando il controllo numerico di una popolazione avviene attraverso l'azione di esemplari conspecifici portatori di fattori di sterilità che si esprimono in fase post copula. Di base, la strategia è altamente specifica ed ecocompatibile, perché lo stru-

mento di lotta è lo stesso insetto che si vuole combattere, e, idealmente, è volta a ridurre fortemente la capacità riproduttiva di specie d'insetti dannose fino a livelli tali da causare un collasso nella popolazione. La forma di controllo autocida più nota ed utilizzata è la tecnica di lotta con l'Insetto Sterile (SIT) [1]. Generalmente i fattori di sterilità sono l'espressione di alterazioni cromosomiche (aberrazioni, traslocazioni) indotte sottoponendo gli insetti a radiazioni ionizzanti o, più raramente, ad agenti chimici che generalmente agiscono direttamente sulle gonadi.

La SIT si basa su una filiera di operazioni che vanno dall'allevamento intensivo della specie target alla sua sterilizzazione, alla separazione dei sessi e infine al lancio ripetuto degli insetti sterilizzati (possibilmente solo maschi) in campo. L'obiettivo è quello di indurre un'alta frequenza di accoppiamenti infecundi tra le femmine selvatiche e i maschi sterili al fine di ridurre progressivamente la capacità riproduttiva della popolazione naturale dannosa. È evidente come tale metodologia di lotta sia altamente selettiva e possa essere utilizzata da sola o in combinazione con altre tecniche di controllo nell'ambito dell'*Integrated Pest Management* (IPM), al fine di eradicare, sopprimere o controllare la popolazione del parassita in ambienti confinati o su ampi territori regionali.

A livello mondiale, la tecnica dell'insetto sterile è stata sviluppata e utilizzata con successo per il controllo di diverse specie di insetti, a partire dal caso esemplare di *Cochliomyia hominivorax* (mosca del bestiame). L'uso è stato poi esteso a varie altre specie di interesse agronomico tra le quali, *Anastrepha suspensa*, *Ceratitis capitata*, *Dacus cucurbitae*, *Bactro-*

cera dorsalis, *Laspeyresia pomonella*. Negli anni 70, sotto la direzione del Prof. Gian Tommaso Scarascia Mugnozza, fu stabilita una collaborazione tra ENEA (allora CNEN) e la "Joint Division FAO-IAEA" per avviare una sperimentazione della SIT per il controllo della mosca mediterranea della frutta *C. capitata* nell'isola di Procida. Il progetto portò alla realizzazione, presso il Centro Ricerche ENEA della Casaccia, del più grande e innovativo insettario d'Europa per l'allevamento della specie, dove si producevano fino a quattordici milioni di insetti sterili la settimana. I risultati di quell'esperienza furono estremamente positivi e in seguito interessarono anche piccole aree della terraferma, dislocate in diverse regioni italiane (Calabria, Lazio, Campania, Sardegna e Sicilia). Tuttavia, dopo una preliminare fase di studi ecologici effettuati su ampi territori frutticoli di diverse regioni, l'iniziativa conobbe una fase di declino venendo a mancare il necessario supporto per la realizzazione di impianti che in qualche modo industrializzassero il processo.

Certamente, l'estrema polverizzazione delle proprietà agricole e l'errata convinzione che questo metodo di lotta potesse costituire una risposta adeguata solo dove fosse possibile ottenere l'eradicazione completa degli insetti dannosi, determinarono il progressivo abbandono dell'approccio, in una realtà poco incline a veder realizzati progetti *area-wide* di grande condivisione territoriale. A partire dagli anni 80, il *mainstream* della ricerca entomologica agraria europea si orientò principalmente verso la *Lotta Biologica* con la realizzazione di diverse biofabbriche per la produzione di insetti utili. La SIT venne margina-

lizzata ad approccio specifico solo per situazioni particolari.

A essere critici, possiamo oggi dire che quel progetto ambizioso di SIT, una volta calato nel provincialismo italiano, per di più in un contesto legislativo ancora troppo permissivo per l'uso degli insetticidi, non risultò forse avere tutte le caratteristiche richieste per essere definito realmente sostenibile e competitivo e tale da prevederne una crescente diffusione. Dobbiamo altresì constatare che anche molti progetti di lotta biologica non hanno portato ai risultati auspicati (si pensi all'uso dei parassitoidi contro i ditteri tefritidi) in riferimento anche agli investimenti dedicati. Con questa premessa, riconsiderare il SIT e fare ricerca per renderlo più sostenibile è stato uno degli obiettivi della ricerca entomologica di ENEA, a cominciare dall'ottimizzazione dei metodi utilizzati per produrre la sterilità.

Criticità della SIT tradizionale

La storia della SIT si accompagna allo sviluppo e alla promozione di dispositivi di irraggiamento, in particolare di raggi gamma, sempre più sofisticati e maneggevoli. Ancora oggi, come dimostrato dai molteplici progetti e dalle relative infrastrutture dedicate, tale metodo di sterilizzazione rappresenta la soluzione più adottata nel mondo e la prima scelta per ottenere grandi numeri di maschi sterilizzati da introdurre in campo.

Tuttavia alcuni aspetti critici della strategia non possono essere più sottovalutati se mettiamo al centro di una nuova tecnologia di lotta non solo la sua efficienza ma la sua coerenza con i principi della sostenibilità, gli unici che possono garantire successo e diffusione su larga scala.

In primo luogo, l'applicazione del SIT convenzionale richiede il rispetto di un quadro normativo specifico per l'allocazione e gestione delle sorgenti radioattive di ^{60}Co o $^{137}\text{Cesio}$ o delle infrastrutture necessarie all'utilizzo di altre possibili strategie di irraggiamento (raggi x, elettroni, neutroni ecc.). Il trasporto degli insetti da irraggiare verso le suddette strutture e poi irraggiati verso le aree di rilascio richiede inoltre un livello di organizzazione elevato ed il supporto di una rete di trasporto non comune ad esempio a molti dei paesi del terzo mondo. Questi aspetti necessariamente limitano l'autonomia periferica e la penetrazione capillare di tale forma di lotta, diversamente da quanto potrebbe avvenire utilizzando la lotta

biologica o altre strategie di controllo che possano far a meno delle suddette strutture.

Non meno importante è il fatto che i ripetuti cicli di allevamento in laboratorio e, soprattutto, la radiosterilizzazione degli insetti spesso inducono effetti che riducono in modo evidente la fitness dei maschi sterili, che divengono quindi meno efficienti rispetto ai selvatici in quanto a competitività sessuale. In tali casi, diviene quindi necessario massimizzare le quantità di individui rilasciati in campo determinando costi di produzione spesso non più sostenibili rispetto alle aspettative teoriche. Per di più, nel caso di specie di zanzare appartenenti al genere *Aedes*, vettrici di virus come quelli di *Dengue* e *Zika*, ottenere la

completa sterilizzazione dei maschi è possibile solo al costo di ridurne significativamente la fitness riproduttiva. In alternativa, bisognerebbe accettare di sottoporre gli insetti a dosi di irraggiamento che trovino un compromesso accettabile tra effetti sulla fitness e mantenimento di piccole percentuali di fertilità. Questa "finestra" utile non è ovviamente disponibile per tutte le specie e la "sub-sterilità" potrebbe comunque consentire ad alcuni degli individui mutanti di riprodursi, con effetti difficili da prevedere nel lungo termine.

Un terzo aspetto chiave nel determinare l'efficienza dei programmi SIT è la disponibilità di sistemi avanzati ed efficienti di separazione dei sessi. La presenza di femmine insieme ai



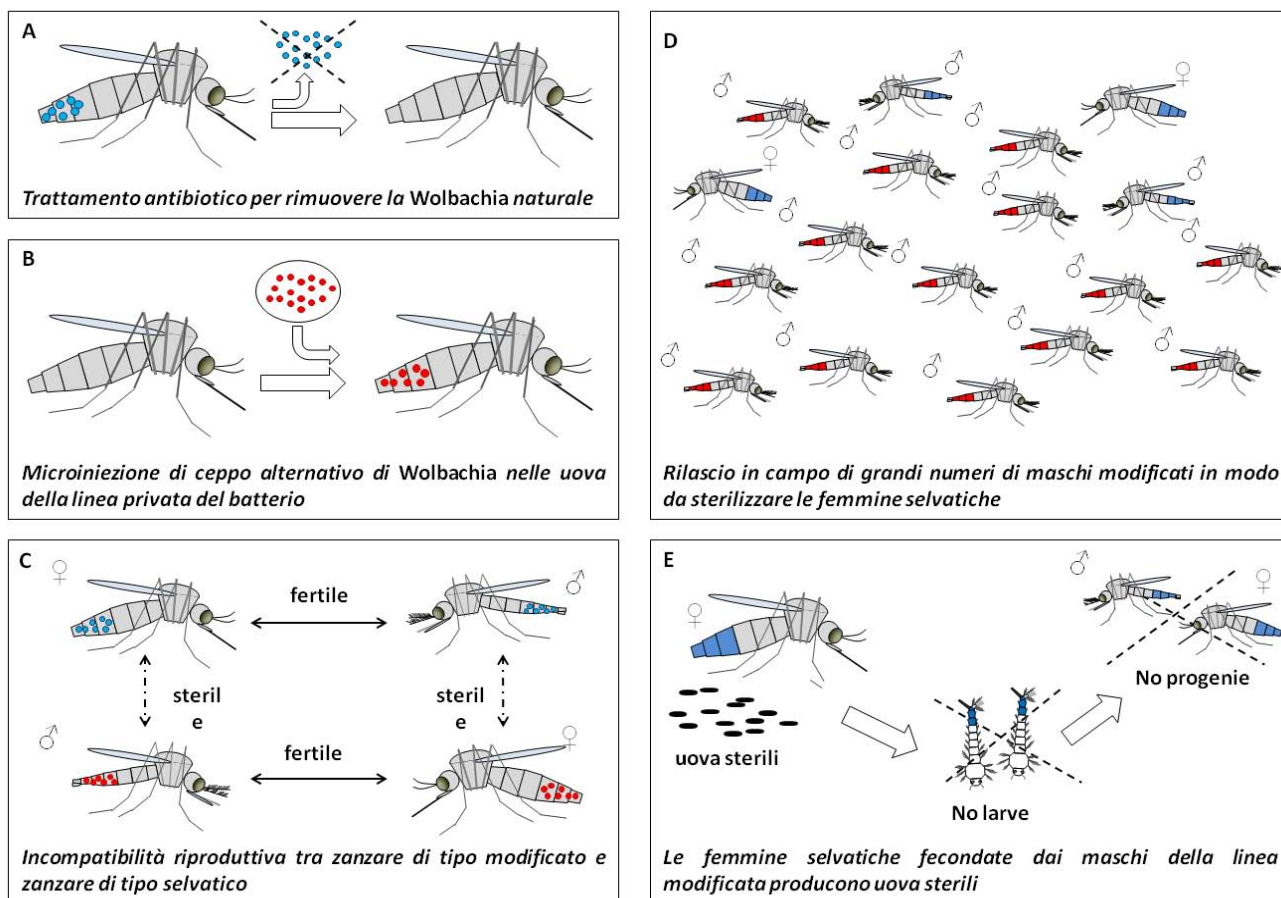


Fig 1 Una strategia di lotta alla zanzara tigre basata sul rilascio di maschi resi sterili da *Wolbachia*

maschi sterili da rilasciare può, infatti, ridurre l'efficacia del programma di controllo e, nel caso di insetti ematofagi come le zanzare, può aumentare il numero di femmine in grado di pungere e/o trasmettere patogeni.

Questi fattori limitanti sono spesso risultati critici nel determinare le possibilità di successo di un programma basato sul SIT. C'è inoltre da considerare che la strategia è applicabile solamente alle specie d'insetti che abbiano questi requisiti:

- possibilità di essere allevate in condizioni artificiali e per più cicli annuali in modo massale (e

possibilmente automatizzato) e a basso costo;

- riproduzione sessuale (che non contempli cioè partenogenesi);
- stadio adulto riproduttore (il maschio in particolare) che non abbia alcun ruolo dannoso;
- limitata tendenza alla dispersione e distribuzione spaziale che tenda ad essere localizzata.

Nuove biotecnologie per un SIT più sostenibile

Alcune delle criticità della tecnica dell'insetto sterile basata su irraggiamento sono state affrontate da varie altre strategie alternative e comun-

que volte alla produzione di maschi sterili. Obiettivi perseguiti singolarmente o nel complesso da queste strategie sono: il miglioramento dell'efficienza dell'allevamento, in termini di maschi sterili prodotti per uova di partenza; la messa a punto di metodi ideali e pratici per la separazione dei sessi; la ricerca di metodi di sterilizzazione a basso o nullo impatto sulla fitness dei maschi (sopravvivenza e competitività sessuale).

A livello generale, le piattaforme omiche e la caratterizzazione del microbioma associato agli insetti stanno fornendo nuovi strumenti per una caratterizzazione a livello molecolare di molti processi biolo-

gici fino ad ora di difficile investigazione. Questa rivoluzione strumentale e metodologica ha consentito di descrivere e comprendere nei minimi termini alcuni fenomeni che possono essere sfruttati per progettare strategie di controllo innovative e altamente specifiche.

Modificazione genetica

L'individuazione e la caratterizzazione di diversi geni associati alla determinazione del sesso stanno consentendo di progettare nuovi metodi per la separazione dei maschi basati sull'utilizzo di marcatori precoci della sessualità (ad esempio il colore dei pupari in alcuni ditteri teritidi o la fluorescenza in alcune specie di zanzara), geni che conferiscano sensibilità differenziale a shock termici o a insetticidi specifici.

L'individuazione di mutazioni ad effetto letale dominante è stata invece già utilizzata per la produzione di ceppi di zanzare in grado di trasmettere alla progenie geni letali e "disattivabili" solo tramite somministrazione dell'appropriato "antidoto", cioè uno specifico reagente chimico. Questa peculiarità permette l'allevamento massivo di questi ceppi consentendo poi il rilascio in campo di individui maschi in grado di trasmettere questi fattori di mortalità alle femmine selvatiche fecondate (RIDL = *Release of Insects carrying a Dominant Lethal*).

L'applicazione e la diffusione di strategie basate sulle modificazioni genetiche fin qui descritte sono ovviamente subordinate a contesti etici e legislativi specifici che tuttora ne limitano l'uso solo in alcuni paesi.

Le nuove frontiere del "genome editing" promettono di consentire livelli di specificità estrema nella modificazione genetica, eliminando inoltre la necessità di ricorrere a geni ottenuti da altri organismi e, almeno in teoria, riducendo notevolmente il rischio di effetti collaterali (*out of tar-*

get) associati alla modificazione stessa. Sono ad esempio già state testate in laboratorio su *Anopheles gambiae* (la zanzara vettrice della malaria) alcune modificazioni ottenute tramite *genome editing*, in grado di indurre sterilità femminile o incapacità di trasmettere la malaria stessa.

Lo sfruttamento dei simbionti naturali: *Wolbachia* ed il caso *Aedes albopictus*

Varie specie di batteri sono note per le loro proprietà di influenzare in modo significativo la biologia riproduttiva e/o il funzionamento del sistema immunitario degli insetti di cui sono simbionti. Per il batterio *Wolbachia* sono già noti vari rilevanti esempi di applicazione pratica in campo per sfruttare i fenomeni di sterilità (incompatibilità citoplasmatica) o di inibizione della capacità vettoriale di virus patogeni, indotti dalla sua presenza [2]. Questo batterio, trasmesso verticalmente attraverso le uova, ha mostrato di poter anche essere trasferito artificialmente da specie a specie, consentendo spesso di preservare, nel nuovo ospite, gli effetti osservati nella specie originaria.

L'ENEA ha iniziato ad occuparsi di *Wolbachia* a metà anni 2000, coinvolta in un programma nazionale di lotta ad *Aedes albopictus* (zanzara tigre) col maschio sterile in collaborazione con il Centro Agricoltura Ambiente (CAA) di Crevalcore (Bologna). Tale progetto nacque per sviluppare un metodo di lotta innovativo che, mirando a inibire la riproduzione degli adulti, fosse integrabile con i protocolli di trattamento larvicida. Sappiamo che questa zanzara si insedia in modo discontinuo in aree urbane e periurbane dove, per la ovideposizione, sfrutta piccole raccolte di acqua non sempre facilmente raggiungibili dai trattamenti larvicidi. L'aspetto più rilevante, in chiave SIT, è che gli

adulti di questa specie si spostano, attivamente, solo per poche centinaia di metri. Con tali presupposti, gli approcci SIT che conosciamo, pensati per essere applicati uniformemente su vaste aree (area wide SIT), risultano poco appropriati per la zanzara tigre, in quanto il rilascio dei maschi sterili dovrebbe essere mirato e limitato ad aree riconosciute come potenziali siti riproduttivi, richiedendo un alto livello di coinvolgimento della cittadinanza per la gestione delle aree residenziali e private.

La zanzara tigre, come circa il 40-60% di tutti gli insetti, è naturalmente infettata da *Wolbachia*. Trattando una linea di zanzara locale (R = Roma) con un antibiotico specifico è stata ottenuta una popolazione aposimbiontica, cioè priva del batterio (AR). Su centinaia di embrioni di questa linea, in modo analogo a quanto si fa per una fecondazione artificiale, è stata operata una microiniezione di ooplasma prelevato dalle uova della zanzara comune, *Culex pipiens*, ed infettato da un altro ceppo di *Wolbachia*, il ceppo wPip. Le poche uova sopravvissute a questo trattamento sono state fatte schiudere per allevarne le larve fino allo stadio adulto. Dopo la produzione di progenie (nuove uova), sono state selezionate le linee sviluppatesi da femmine risultate positive a saggi diagnostici (PCR) per la presenza del ceppo di *Wolbachia* wPip, portando alla produzione di una nuova linea di zanzara tigre (ARwP) [3]. Questa linea, pur senza nessuna modificazione genetica e pur ospitando un batterio comunemente diffuso in natura, presenta delle caratteristiche, dal punto di vista applicativo, eccezionali [4]. I maschi, perfettamente fertili rispetto alle femmine ARwP, inducono invece completa sterilità nelle uova prodotte da accoppiamenti con femmine selvatiche di zanzara tigre (Figura 1). In confronti 1:1 con i maschi selvatici, i maschi ARwP hanno evi-

denziato la capacità di ridurre di più del 50% la fertilità attesa delle femmine selvatiche, sia confrontandosi con genotipi italiani che con genotipi tropicali [5][6]; si sviluppano inoltre più velocemente rispetto ai maschi selvatici e consentono una più efficiente separazione sessuale tramite mezzi meccanici (99,78% di purezza). I maschi ARwP appaiono quindi dei candidati ottimali per rinnovare e rilanciare la tecnica dell'insetto sterile contro la zanzara tigre, ovviando a molte delle criticità associate alle tecniche di sterilizzazione basate su irraggiamento e rendendo più flessibile e penetrabile sul territorio il processo di rilascio di maschi sterili o di fattori di sterilità.

L'utilizzo di *Wolbachia* non subisce inoltre le restrizioni a cui sono assoggettati gli organismi modificati geneticamente. Sono comunque in corso esperimenti di verifica supportati da specifici modelli di dinamica di popolazione, atti a valutare una serie di criteri di sicurezza per consentire

la messa a punto di nuove strategie applicative di ARwP ottimizzate e sostenibili nelle realtà urbane e periurbane sia di paesi come il nostro che di quelli in via di sviluppo.

Conclusioni

L'esplorazione del ruolo funzionale dei batteri endosimbionti di insetti e delle potenzialità applicative che ne scaturiscono sta rappresentando una diramazione importante lungo il percorso di sviluppo delle biotecnologie entomologiche, che, ai fini di sviluppare strategie di controllo degli insetti nocivi, avevano finora puntato preferenzialmente sulle tecniche del DNA ricombinante. Questo campo d'indagine ed applicazione sta acquisendo sempre maggiore rilevanza, tanto da rappresentare oggi una soluzione di eccellenza nel quadro di iniziative attive su campo. Un esempio emblematico è rappresentato dal progetto di lotta alla Dengue¹, malattia infettiva pandemica nelle

zone tropicali e subtropicali causata da un virus trasmesso da insetti vettori, che sfrutta l'effetto inibitorio di *Wolbachia* nei confronti del virus per promuoverne l'eradicazione.

Pur se attualmente gli esempi applicativi più importanti riguardano il mondo dei vettori, in prospettiva la stessa biotecnologia potrà essere utilizzata per combattere anche molte specie di insetti dannosi in agricoltura, grazie alla crescente conoscenza dell'associazione simbiotica e ad una sapiente gestione di rapporti insetto-batterio naturali o artificialmente indotti. La simbiosi tra batteri e insetti può essere considerata a tutti gli effetti una risorsa naturale, ancora in gran parte da esplorare, che può essere opportunamente sfruttata per creare strategie di lotta sempre più efficaci e con costi di sviluppo ed applicazioni sempre più sostenibili.

*Per saperne di più:
maurizio.calvitti@enea.it*

¹ www.eliminatedengue.com

BIBLIOGRAFIA

1. Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, et al. (2010). “Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis”. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 10: 295–311. doi:10.1089/vbz.2009.0014
2. Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z, Rasgon JL, Calvitti M, Moreira LA, et al. (2014). “Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control”. *Acta Tropica*, 132 Suppl: S150–63. doi:10.1016/j.actatropica.2013.11.004
3. Calvitti M, Moretti R, Lampazzi E, Bellini R, Dobson SL. (2010). “Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)”. *Journal of Medical Entomology*, 47: 179–187. doi:10.1603/Me09140
4. Calvitti M, Moretti R, Skidmore AR, Dobson SL. (2012). *Wolbachia* strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a *Wolbachia*-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors*. *Parasites & Vectors*, 5: 254. doi:10.1186/1756-3305-5-254
5. Moretti R, Calvitti M. (2013). “Male mating performance and cytoplasmic incompatibility in a wPip *Wolbachia* trans-infected line of *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*)”. *Medical and Veterinary Entomology*, 27: 377–386. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01061.x
6. Atyame CM, Labbé P, Lebon C, Weill M, Moretti R, Marini F, et al. (2016). “Comparison of irradiation and *Wolbachia* based approaches for sterile-male strategies targeting *Aedes albopictus*”. *PLoS One*, 11: e0146834. doi:10.1371/journal.pone.0146834