



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO



DIPARTIMENTO DI
ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN

“ECOLOGIA E GESTIONE DELLE RISORSE BIOLOGICHE”
XX CICLO

*“STUDIO DELLA SIMBIOSI TRA *AEDES ALBOPICTUS* (SKUSE) E
WOLBACHIA PIPIENTIS IN RAPPORTO ALLO SVILUPPO DI TECNICHE
DI LOTTA BASATE SULLA INCOMPATIBILITA' CITOPLASMATICA”*

Settore scientifico-disciplinare
BIO/07

Coordinatore: Prof. Giuseppe Nascetti

Tutor: Prof. Sandra Urbanelli

Dottorando: Maurizio Calvitti



SCOPO DELLA RICERCA	1
INTRODUZIONE	6
1. <i>Aedes albopictus</i> (Skuse)	6
1.1 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA E IMPATTO SANITARIO	6
1.2 CENNI DI BIOLOGIA ED ECOLOGIA.....	10
1.3 IMPORTAZIONE IN ITALIA E STRUTTURA DI POPOLAZIONE.....	14
2. METODI DI LOTTA.....	15
2.1 STRATEGIE COMUNI.....	15
2.2 METODI GENETICI.....	17
2.2.1 <i>Diversi approcci alla lotta genetica</i>	18
2.2.2 <i>La tecnica dell'insetto sterile (SIT)</i>	23
3. <i>Wolbachia</i>	34
3.1 FILOGENESI DEL GENERE <i>Wolbachia</i>	35
3.2 ALTERAZIONI RIPRODUTTIVE INDOTTE DALLA SIMBIOSI	36
3.2.1 <i>L'incompatibilità citoplasmatica (IC)</i>	39
3.3 PARAMETRI DI INFEZIONE E DIFFUSIONE DI <i>Wolbachia</i>	45
3.4 <i>Wolbachia</i> E CONTROLLO DI ORGANISMI DANNOSI.....	48
3.4.1 <i>L'incompatibilità citoplasmatica e controllo autocida</i>	49
3.4.2 <i>Rischi connessi con la manipolazione delle simbiosi</i>	54
MATERIALI E METODI.....	56
4. DISTRIBUZIONE DELL'INFEZIONE DI <i>Wolbachia</i> IN <i>Ae. albopictus</i> . 56	
4.1 ORIGINE, RACCOLTA E METODI DI CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	56
4.2 ANALISI DEL DNA.....	57
5. VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI "FITNESS" IN <i>Ae. albopictus</i> IN RELAZIONE ALLA SIMBIOSI	60
5.1 ORIGINE DELLA COLONIA DI <i>Ae. albopictus</i>	60
5.2 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DELLA SIMBIOSI SULLA "FITNESS" DEGLI ADULTI.....	62
5.2.1 <i>Rimozione di Wolbachia da Ae. albopictus</i>	62

5.2.2	<i>Saggi per lo studio della longevità, fecondità e fertilità.....</i>	63
5.2.3	<i>Incroci per lo studio degli effetti della simbiosi sulla competitività sessuale dei maschi e per la stima della IC.....</i>	64
5.2.4	<i>Studio degli effetti dell'età del maschio sulla induzione della IC.....</i>	66
5.2.5	<i>Effetti della simbiosi sulla fertilità dei maschi.....</i>	67
5.3	TRASMISSIONE VERTICALE DI <i>WOLBACHIA</i>	68
6.	IL TRASFERIMENTO INTERSPECIFICO DI <i>WOLBACHIA</i>	68
6.1	CRITERI ADOTTATI PER LA SCELTA DELLE SPECIE DONATRICI	68
6.2	STUDIO DELLA SIMBIOSI IN <i>D. MELANOGASTER</i>	69
6.2.1	<i>Origine della colonia di D. melanogaster.....</i>	69
6.2.2	<i>Caratterizzazione molecolare di Wolbachia in D. melanogaster.....</i>	70
6.2.3	<i>Studio della incompatibilità citoplasmatica nella simbiosi Wolbachia-D. melanogaster.....</i>	70
6.2.4	<i>Frequenza dell'infezione nella colonia di D. melanogaster.....</i>	72
6.3	STUDIO DELLA SIMBIOSI IN <i>CX. PAPIENS</i>	73
6.3.1	<i>Origine della colonia utilizzata e metodo di allevamento.....</i>	73
6.3.2	<i>Caratterizzazione molecolare di Wolbachia in Cx. Papiens.....</i>	75
6.3.3	<i>Studio dell'incompatibilità citoplasmatica nella simbiosi Wolbachia-Cx. papiens.....</i>	75
6.3.4	<i>Frequenza dell'infezione nella colonia di Cx. papiens.....</i>	76
6.4	TEST STATISTICI ADOTTATI	76
6.5	LA TECNICA DI MICROINIEZIONE.....	78
6.5.1	<i>Localizzazione di Wolbachia negli embrioni donatori attraverso la tecnica DAPI.....</i>	79
6.5.2	<i>Preparazione degli embrioni di D. melanogaster.....</i>	80
6.5.3	<i>Prelievo degli ovari in Cx. papiens</i>	81
6.5.4	<i>Preparazione degli embrioni riceventi di Ae. albopictus</i>	82
6.5.5	<i>Apparato per la microiniezione embrionale.....</i>	84

6.5.6	<i>Trasferimento di ooplasma esogeno ad uova aposimbiontiche di Ae. albopictus</i>	85
6.5.7	<i>Raccolta dati delle microiniezioni</i>	86
6.5.8	<i>Verifica preliminare della IC indotta nella nuove simbiosi</i>	87
6.5.9	<i>Allestimento di isolinee transinfettate</i>	87
RISULTATI		88
7.	DISTRIBUZIONE DELL'INFEZIONE DI <i>WOLBACHIA</i> IN <i>AE. ALBOPICTUS</i>	88
8.	CARATTERIZZAZIONE DELLA SIMBIOSI: EFFETTI SULLA "FITNESS" E PARAMETRI D'INFEZIONE	89
8.1	EFFETTI SULLA FECONDITÀ E SULLA FERTILITÀ DELLE FEMMINE	89
8.2	EFFETTI SULLA LONGEVITÀ DI FEMMINE E MASCHI	91
8.3	EFFETTI DELLA SIMBIOSI SULLA COMPETITIVITÀ SESSUALE DEI MASCHI	92
8.4	EFFETTI DELL'ETÀ DEI MASCHI SULLA INDUZIONE DELLA IC	94
8.5	EFFETTI DELL'INFEZIONE SULLA FERTILITÀ DEI MASCHI	95
8.6	TRASMISSIONE VERTICALE	97
9.	CARATTERIZZAZIONE DELLE SIMBIOSI NELLE SPECIE DONATRICI <i>D. MELANOGASTER</i> (CEPPO CASACCIA) E <i>CX. PAPIENS</i> (CEPPO CAA)	98
9.1	CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI <i>WOLBACHIA</i> E PARAMETRI DI INFEZIONE NELLA SIMBIOSI CON <i>D. MELANOGASTER</i>	98
9.1.1	<i>Identificazione del ceppo di Wolbachia presente in D. melanogaster</i>	98
9.1.2	<i>Incompatibilità citoplasmatica in D. melanogaster</i>	99
9.1.3	<i>Frequenza dell' infezione nella colonia di D. melanogaster</i>	102
9.2	CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI <i>WOLBACHIA</i> E PARAMETRI DI INFEZIONE NELLA SIMBIOSI CON <i>CX. PAPIENS</i>	102
9.2.1	<i>Identificazione del ceppo di Wolbachia presente in Cx. pipiens</i>	102
9.2.2	<i>Incompatibilità citoplasmatica in Cx. pipiens</i>	104
9.2.3	<i>Frequenza dell'infezione nella colonia di Cx. pipiens</i>	106
10.	DATI DELLE MICROINIEZIONI	106

10.1	LOCALIZZAZIONE ADDENSAMENTI DI <i>WOLBACHIA</i> NEGLI EMBRIONI DELLE SPECIE DONATRICI	106
10.2	PARAMETRI DELLE MICROINIEZIONI wMEL- <i>AE. ALBOPICTUS</i>	107
10.3	PARAMETRI DELLE MICROINIEZIONI wPIP- <i>AE. ALBOPICTUS</i>	110
	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	114
	BIBLIOGRAFIA	122
	RINGRAZIAMENTI.....	149

SCOPO DELLA RICERCA

Milioni di persone sono colpite ogni anno da malattie quali Dengue, febbre gialla, filariarosi ed altre patologie dovute ad arbovirus (Sindbis, West Nile, Chikungunya, Rift Valley). Epidemie di dengue e DHF (dengue emorragic fever) sono in aumento negli ultimi due decenni in tutto il mondo colpendo principalmente i paesi poveri. Le zanzare sono tra i principali vettori di tali malattie, e tra queste di particolare importanza è *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) nota come zanzara tigre. Tale specie, originaria del Sud Est asiatico, ha invaso negli ultimi anni parte di quattro continenti. In Europa la specie è stata segnalata prima in Albania, alla fine degli anni '80, poi in Italia nel 1990, in Francia nel 1999, in Belgio nel 2000, nel Montenegro nel 2001, in Svizzera nel 2003, in Spagna e Croazia nel 2004, in Grecia nel 2005. Altri paesi sono già stati colonizzati o sono in fase di colonizzazione in Medio Oriente, in Africa e nelle Americhe. La rapida diffusione di *Ae. albopictus* espone quindi tutto il pianeta ad un grande problema sanitario che coinvolge anche le aree temperate quali l'Europa dove *Ae. albopictus* è, negli ambienti urbani, tra i culicidi più dannosi per la salute dell'uomo. Recentemente la specie è salita alla ribalta dell'opinione pubblica e scientifica per alcuni casi, accertati in Emilia Romagna, di Chikungunya, una forma di influenza osteo-articolare di cui l'insetto è vettore (Angelini *et al.*, 2007).

Le tecniche di lotta chimica tradizionali, utilizzate per il controllo di molte specie di zanzare, oltre ai problemi ambientali causati, non hanno riscosso grande successo per alcune di queste, come nel caso di *Ae. albopictus*, a causa dell'abbondanza e la diversità dei siti riproduttivi presenti anche in aree private non facilmente accessibili. Ciò ha portato ad un rinnovato interesse per metodi alternativi o complementari di controllo, quali ad esempio la Tecnica dell'Insetto Sterile (SIT). Questa strategia, che rientra nei metodi di lotta autocida, consiste nell'allevamento massale, sterilizzazione e lanci ripetuti di maschi sterili, ed è finalizzata alla riduzione progressiva dell'idoneità riproduttiva delle specie nocive mediante l'accoppiamento tra adulti selvatici ed insetti sterili rilasciati. Il vantaggio di tale strategia sta nell'abbattimento delle popolazioni del vettore senza alcun danno per l'ambiente.

Le caratteristiche biologiche ed ecologiche della zanzara tigre ne fanno una candidata ideale per la lotta con il SIT nel nostro paese: - ristretti siti di "breeding", - facilità di adattamento alle condizioni di allevamento,- monogamia, - bassa capacità di

dispersione attiva e limitata a poche centinaia di metri (Hawley, 1988),- distribuzione delle popolazioni, prevalentemente urbana e periurbana, - affinità genetica tra le stesse (Urbanelli *et al.*, 2000), tale da escludere la presenza di sub-popolazioni con barriere di accoppiamento. Inoltre il favorevole andamento climatico in Italia che, con l'alternanza delle stagioni determina elevate fluttuazioni di densità del culicide con minimi invernali, rende facilitato il rilascio in primavera di minori quantità di maschi sterili necessari al raggiungimento del necessario rapporto maschi sterili/maschi selvatici.

In considerazione degli aspetti elencati, nel 1999 il Centro Agricoltura Ambiente (CAA) di Crevalcore (Bo) in collaborazione con ENEA (Dipartimento di Biotecnologie, Agro-industria e Protezione della Salute) e col Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare della Sapienza di Roma, ha avviato il progetto "SIT *Aedes albopictus*", che a tutt'oggi è in pieno svolgimento (Bellini *et al.*, 2007). Tra le tecniche utilizzate per il raggiungimento della sterilità, oltre all'irraggiamento, viene presa in esame anche la possibilità di utilizzare la "Incompatibilità Citoplasmatica" (IC) per lo sviluppo di tale strategia di lotta.

La IC è una barriera riproduttiva post-copula tra individui della stessa specie infettati da differenti ceppi di *Wolbachia* (Rickettsiales), un batterio gram-negativo endosimbionte intracellulare del 15-30% delle specie del Phylum Arthropoda e di alcune specie del Phylum Nematoda. Diverse specie di culicidi sono infettate, tra queste *Ae. albopictus*, *Aedes cinereus*, *Culex torrentium*, *Culex pipiens* (Ricci *et al.*, 2002). L'incompatibilità citoplasmatica può essere unidirezionale, quando un maschio infetto si incrocia con una femmina non infetta (l'incrocio reciproco è perfettamente fertile) oppure bidirezionale quando un maschio infettato si incrocia con una femmina infettata con un ceppo differente del simbionte (l'incrocio reciproco è ugualmente sterile). In natura soltanto in alcuni casi la IC è del 100% e questo dipende proprio dal rapporto tra il batterio ed il suo ospite.

La possibilità di sfruttare questa forma di sterilità naturale, nei programmi di lotta autocida, venne sperimentata per la prima volta in India per il controllo di *Culex fatigans* sfruttando l'esistenza di popolazioni tra loro incompatibili perché infettate da diversi ceppi di *Wolbachia* (Laven, 1967; Sharma *et al.*, 1979; Arunachalam e Curtis, 1985). Successivamente esperienze analoghe furono condotte in Europa utilizzando popolazioni incompatibili di *Rhagoletis cerasi* (mosca del ciliegio). Fu allora che, accanto al SIT convenzionale, venne definita la "Incompatibile Insect Tecqnique" (IIT.) (Boller e Bush, 1976; Bourtzis e Robinson, 2006). La IIT è una tecnica analoga alla

tecnica di lotta col maschio sterile (SIT convenzionale), con la differenza che, anziché rilasciare maschi irraggiati, vengono rilasciati maschi incompatibili. A vantaggio di tale metodo c'è che l'insetto maschio incompatibile, che viene allevato e rilasciato in campo, non è soggetto ad alcun trattamento con radiazioni ionizzanti che possano ridurre la sua competitività sessuale (Andreasen e Curtis, 2005). Ciò permette di adottare sistemi di allevamento più semplici con costi inferiori. Uno dei fattori che però limita l'applicazione su più vasta scala di questo approccio è che alcune specie oggetto di tali programmi di lotta autocida, ad esempio *Ceratitis capitata*, *Aedes aegypti* ed *Anophels spp.*, non presentano popolazioni tra loro incompatibili in quanto non sono infettate da *Wolbachia*; d'altra parte altre specie, quali *Aedes albopictus*, sembrano invece presentare un pattern d'infezione omogeneo in tutto l'areale di distribuzione con popolazioni tutte tra loro compatibili (Armbruster *et al.*, 2003). Per poter sfruttare la IC è necessario che all'interno della specie "target" esistano "patterns" d'infezione tra loro differenti che inducono barriere riproduttive riconducibili alla IC.

Negli ultimi venti anni la ricerca biotecnologica, mirata alla trasformazione genetica degli insetti, ha compiuto notevoli progressi nella messa a punto di metodiche per il trasferimento del DNA attraverso la microiniezione embrionale (Morris *et al.*, 1989). La stessa tecnica può essere utilizzata per il trasferimento interspecifico di *Wolbachia* (transinfezione) da specie infettate a specie non infettate al fine di realizzare "linee di laboratorio" con uno stato infettivo non presente in natura (Boyle *et al.*, 1993; Braig *et al.*, 1994; Poinso *et al.*, 1998; Marnix *et al.*, 1999a; 1999b; Sasaki e Ishikawa, 2000; Riegler *et al.*, 2004; Xi e Dobson 2005). L'aspetto più interessante dei primi risultati di transinfezione ottenuti è che in incroci di laboratorio i maschi di queste linee sono risultati "incompatibili" con le femmine della popolazione selvatica. A tal riguardo, un progetto di ricerca che merita di essere menzionato è quello, a tutt'oggi in corso presso le Università di Eraclion e Ioannina in Grecia, in cooperazione con FAO-IAEA, che ha portato alla realizzazione di alcune linee transinfettate di *Ceratitis capitata* con *Wolbachia* prelevata da popolazioni di *Rhagoletis cerasi* (Zabalou *et al.*, 2004). I livelli di IC osservati negli incroci di laboratorio sono risultati interessanti (circa il 100% di mortalità embrionale) ed aprono prospettive assolutamente nuove per l'uso di tale barriera riproduttiva, sia da sola, che in integrazione con l'irraggiamento, nell'ambito dei progetti di lotta autocida alla mosca mediterranea della frutta.

Per quanto riguarda analoghi tentativi di transinfezione fatti su specie della famiglia Culicidae, il gruppo di ricerca guidato dal Prof. Stephen Dobson (Università

del Kentucky-USA) ha recentemente transinfettato, con *Wolbachia* prelevata da *Ae. albopictus*, embrioni di *Ae. aegypti*, culicide in natura privo di *Wolbachia* (Xi *et al.*, 2005), ottenendo una linea transinfettata che negli incroci di laboratorio è risultata incompatibile al 100% con la popolazione selvatica. Oltre che creare delle “associazioni simbiotiche” nuove in specie che in natura non sono infettate da *Wolbachia*, l’approccio biotecnologico della “transinfezione” permette anche di creare infezioni nuove, con ceppi di *Wolbachia* diversi, in specie che in natura sono già infettate. Studi recenti, come già menzionato, hanno rilevato che *Ae. albopictus* sembrerebbe presentare un’infezione omogenea in tutto l’areale di distribuzione conosciuto. A causa della mancanza in natura di popolazioni tra loro incompatibili, il processo di transinfezione potrebbe rivelarsi una potenziale soluzione per utilizzare la sterilità dei maschi indotta dall’IC nella lotta autocida contro questa specie. Sino ad oggi un solo tentativo è stato portato a termine per quanto riguarda la transinfezione di *Ae. albopictus*, microiniettando il ceppo di *Wolbachia* proveniente da *D. simulans* (Xi *et al.*, 2006). Sebbene la nuova infezione ha avuto successo nella colonia, tuttavia non sono state ottenute quelle caratteristiche della simbiosi quali, trasmissione materna del 100% ed incompatibilità anch’essa del 100%, da consentirne un immediato utilizzo nei programmi di lotta. I risultati sono stati comunque molto incoraggianti. Per realizzare, tuttavia, una linea di *Ae. albopictus* citoplasmaticamente incompatibile con le popolazioni naturali, il massimo sforzo di ricerca dovrebbe essere orientato sia verso una maggiore conoscenza di base dei sistemi batterio-ospite (specie da transinfettare e specie donatrici del batterio) su cui si intende operare che sulla messa a punto di metodologie per il trasferimento interspecifico del batterio.

Scopo di questo lavoro di ricerca è stato quello di approfondire la conoscenza della simbiosi tra il batterio *Wolbachia pipientis* ed il culicide *Ae. albopictus* in rapporto alla possibilità di utilizzare la IC nell’applicazione di strategie di lotta autocida.

La prima fase della ricerca ha riguardato lo studio della distribuzione del “pattern” d’infezione del batterio attraverso l’analisi di campioni di popolazioni di *Ae. albopictus* raccolti in diverse località geografiche. Tale informazione si è resa necessaria al fine di ottenere un quadro, quanto più completo, sullo status infettivo della specie e sulla eventuale esistenza di popolazioni tra loro incompatibili, sia nel “range” nativo che nelle aree di recente colonizzazione. Era stata riportata, infatti, l’esistenza di possibili popolazioni, nel range nativo, con differenti infezioni (O’Neill e Karr, 1990;

Kambhampati *et al.*, 1993; Sinkins *et al.*, 1995b; Otsuka e Takaoka, 1997). Successivamente le ricerche sono state finalizzate allo studio dell'infezione. In particolare le indagini hanno riguardato: a) l'influenza del batterio sulla "fitness" dell'ospite, attraverso il rilevamento di parametri quali longevità, fecondità, fertilità, valutati comparativamente in individui portatori dell'infezione ed individui artificialmente resi aposimbiontici e b) l'analisi delle caratteristiche principali dell'infezione, quali la trasmissione materna del batterio e l'induzione della IC. La finalità di tali ricerche risiede sia nell'approfondire la conoscenza legata all'interazione tra *Wolbachia* ed *Ae. albopictus* che nell'esplorare le sue potenzialità applicative nell'ambito della realizzazione di programmi di controllo autocida. Considerando l'importanza del sesso maschile in tali programmi di lotta, in questo lavoro è stato rivolto uno studio specifico alla valutazione degli effetti della simbiosi sulla competitività sessuale dei maschi.

La seconda fase della ricerca è stata finalizzata alla realizzazione di linee di *Ae. albopictus* transinfettate ed alla caratterizzazione delle nuove simbiosi. A tal riguardo abbiamo sperimentato due ceppi esogeni di *Wolbachia* prelevati da altre specie di insetti (*Drosophila melanogaster* Meigen, *Culex pipiens* Linnaeus) opportunamente selezionate. La finalità di realizzare linee transinfettate, riproduttivamente isolate dalla popolazione selvatica, non è solo di tipo applicativo, ma anche di tipo conoscitivo, permettendo di incrementare le informazioni di base sui meccanismi che legano i differenti ceppi di *Wolbachia* ai propri ospiti.

La possibilità di trasferire ceppi di *Wolbachia* in ospiti diversi da quelli naturali apre nuove possibilità applicative nel controllo genetico attraverso la IC. Ovviamente il trasferimento artificiale costituisce solo il primo passo; l'eventuale successo nella creazione di una nuova associazione simbiotica in *Ae. albopictus* e l'eventuale espressione di IC dipenderanno dalla capacità del batterio di integrarsi con le attività della cellule del nuovo ospite e da aspetti ancora poco noti legati al genoma delle due specie interagenti (McGraw *et al.*, 2001) che potrebbero venire in luce proprio attraverso la realizzazione di queste nuove simbiosi.

Il percorso di ricerca nel suo complesso si è avvalso dell'applicazione delle tecniche classiche dell'entomologia e dell'ecologia applicata (approccio numerico-quantitativo) integrate a metodologie di biologia molecolare (PCR), citogenetica (DAPI) e microiniezione embrionale.

INTRODUZIONE

1. *Aedes albopictus* (SKUSE)

Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse) (Diptera, Culicidae), nota come “zanzara tigre” è un culicide antropofilo, a diffusione urbana, vettore potenziale di molti agenti patogeni dell’uomo. Recentemente la specie è salita alla ribalta dell’informazione pubblica italiana in seguito all’accertamento, nel Nord Italia, di un focolaio epidemico della febbre chikungunya, una forma di influenza osteo-articolare virale di cui l’insetto è vettore (Angelini *et al.*, 2007).

Le tecniche tradizionali di lotta, per lo più su base chimica, utilizzate tradizionalmente per il controllo di altre specie di zanzare, non si dimostrano sufficientemente efficaci nel caso della zanzara tigre, sia per l’abbondanza e la diversità dei siti riproduttivi di questa specie che per la loro diffusione in aree private non facilmente accessibili. La ricerca entomologica è fortemente impegnata su più fronti per lo sviluppo di adeguate strategie di lotta al vettore nel rispetto dei principi ecologici e di tutela della salute umana.

Una delle soluzioni alternative alla lotta chimica, sempre di maggiore interesse, è rappresentata dalle strategie di lotta su basi genetiche, in particolare dalla tecnica del maschio sterile (SIT). Lo studio della “ incompatibilità citoplasmatica” (morte delle uova) indotta dal batterio simbionte *Wolbachia*, e delle sue potenzialità applicative, si colloca in tale ambito di ricerca.

1.1 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA E IMPATTO SANITARIO

Aedes albopictus è una specie diffusa in tutta l’Asia sud-orientale, dall’India al Giappone e nella maggior parte delle isole dell’Oceano Indiano. Il limite settentrionale del suo areale asiatico è all’incirca il 40° parallelo nord (Giappone Settentrionale) mentre il limite sud corre lungo il 10° parallelo con l’eccezione del Madagascar che si

trova entro 10° e 25° di latitudine Sud (Freng, 1938; Kamimura, 1968; Huang, 1972) (Fig. 1).

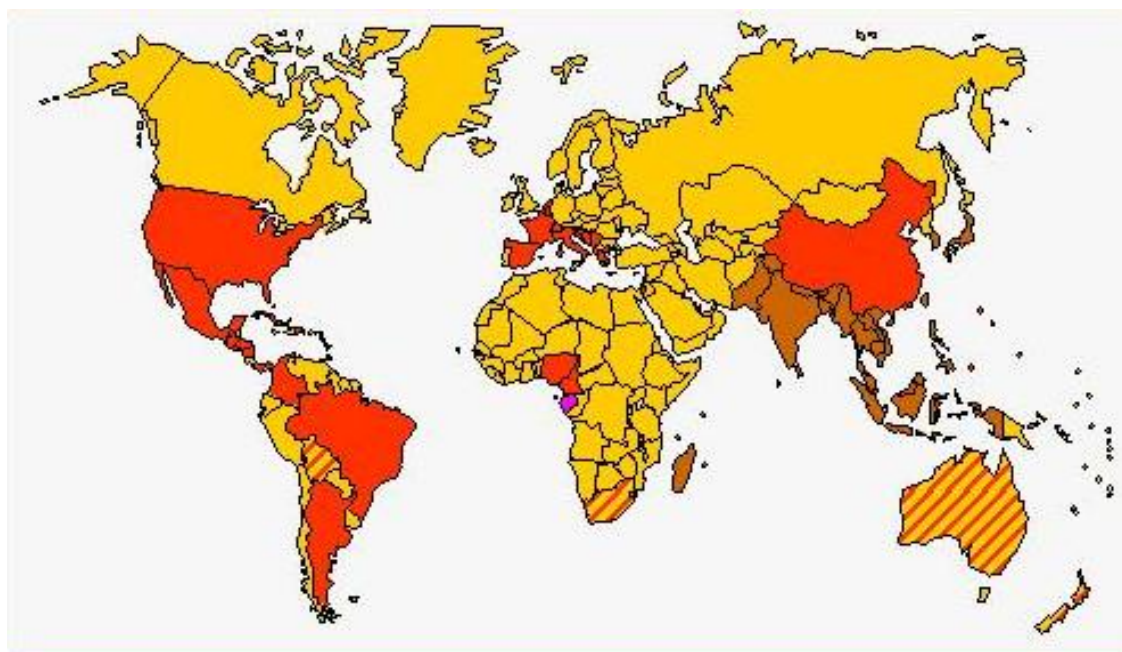


Figura 1: Range nativo (marrone) ed aree colonizzate (rosso arancio) di *Aedes albopictus* (Schaffner *et al.*, 2007)

Nell'ultimo cinquantennio l'areale di *Ae. albopictus* è andato espandendosi verso est fino alle isole Hawaii e più recentemente è stata individuata la prima colonia negli Stati Uniti, nel Texas (Sprenger e Wuithiranyagool, 1986). Successivamente al 1986 *Ae. albopictus* è stata segnalata in 4 stati del Brasile (Birungi e Munstermann, 2002). La prima segnalazione rilevazione della “zanzara tigre” in Europa è avvenuta in Albania (Adhami e Murati, 1987).

Nel settembre 1990 *Ae. albopictus* viene segnalata per la prima volta in Italia in un reperto raccolto a Genova (Sabatini *et al.*, 1990) e successivamente vengono scoperti numerosi focolai nel padovano (Dalla Pozza e Majori, 1992; Romi *et al.*, 1993). Negli anni che seguirono divenne sempre più evidente che la “zanzara tigre” fosse in grado di sopravvivere ai rigidi inverni dell'Italia Settentrionale e che il numero di popolazioni fortemente radicatesi nel nostro paese fosse assai cospicuo (Romi, 1995).

L'importazione di questa specie esotica ha destato subito una notevole preoccupazione tra gli esperti del settore, sia per il suo elevato grado di adattamento agli ambienti urbani che per la sua potenziale pericolosità legata al ruolo di vettore di arbovirus, in particolare quello della “dengue”, e di alcune filarie.

Fin dal 1991, il Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha lanciato un allarme con lo scopo di promuovere l'adozione di provvedimenti atti a frenare il processo di espansione dell'areale di distribuzione della specie, cui però non ha fatto seguito, sul piano politico, una risposta adeguata delle autorità sanitarie sia a livello centrale che locale. Il risultato è sotto gli occhi di tutti, il processo di diffusione della “zanzara tigre” sul territorio italiano è continuato negli anni e nelle aree dove oggi è presente (Fig. 2) l'insetto desta allarme e preoccupazione.

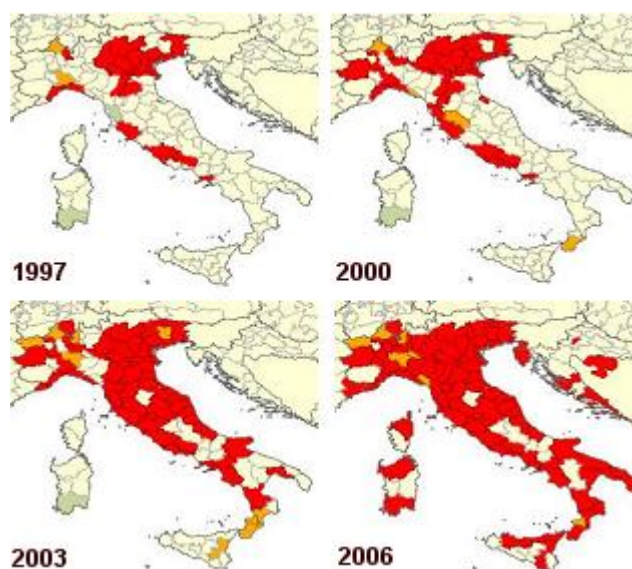


Figura 2: Espansione di *Aedes albopictus* nelle province Italiane dal 1997 al 2006 (Schaffner *et al.*, 2007)

In questi ultimi anni il ruolo di *Ae. albopictus* come vettore della febbre causata dall'arbovirus *Dengue* è in via di rivalutazione. Numerosi studi di laboratorio hanno dimostrato che questa specie di zanzara (compresi i ceppi italiani ed albanesi) è capace di trasmettere verticalmente ed orizzontalmente il virus *Dengue* tipo II (Romi, 2001) ed altri importanti arbovirus patogeni per l'uomo (Shroyer, 1986; Mitchell *et al.*, 1992; Vazeille-Falcoz *et al.*, 1999).

La “febbre dengue” è una grave arbovirosi causata dal virus *Dengue* (*Flavivirus*; fam. *Togaviridae*) endemica in tutta la fascia tropicale dell'Asia, del Sud Pacifico e del continente americano. I rari casi riscontrati in Africa sono da considerarsi eccezionali. La malattia rappresenta una delle principali cause di morbosità e mortalità infantili in tutta l'area endemica dove comunemente segue un andamento epidemico. La malattia può presentarsi clinicamente in due forme diverse: una forma ad evoluzione benigna, algo eruttiva, con sindrome febbrile acuta, ed una sindrome emorragica con shock ipovolemico, ad esito fatale, diffusa principalmente nelle aree urbane del sud-est

asiatico. La terapia è sintomatica, mediante antipiretici, analgesici, miorilassanti. Nelle zone endemiche le epidemie vengono combattute con intensa lotta anitivettoriale a base di insetticidi adulticidi irrorati spazialmente.

Per quanto riguarda la trasmissione di altri patogeni *Ae. albopictus* gioca un ruolo chiave nella trasmissione di *Dirofilaria immitis* (Chellapah e Chellapah, 1968) e di altre malattie virali quali l'encefalite giapponese (Huang, 1972) e l'influenza chikungunya (Mangiafico, 1971). A proposito di questa ultima malattia (influenza osteo-articolare) occorre menzionare la comparsa di alcuni casi in Italia, in particolare Emilia Romagna, negli anni 2006 e 2007 (Angelini *et al.*, 2007). Il virus che provoca la chikungunya appartiene alla famiglia delle togaviridae, del genere degli *Alphavirus*. Il Ministero della Sanità ha avviato recentemente un piano di sorveglianza su tutto il territorio nazionale.

A tutt'oggi non ci sono evidenze che *Ae. albopictus* sia coinvolta nella trasmissione di altri agenti patogeni responsabili di malattie nell'uomo, né in Europa né negli Stati Uniti, ma il caso chikungunya apre scenari non del tutto rassicuranti. Anche se ad oggi il rischio che la "zanzara tigre" possa trasmettere arbovirus in Italia è ancora del tutto teorico e potenziale e comunque legato all'importazione accidentale di serbatoi di infezione, non si può comunque sottovalutare che il numero di casi di "dengue" di importazione sia in costante aumento passando dai 23 casi confermati dall'ISS nel periodo 1990-94 agli 80 del quinquennio 1995-99 (Verani *et al.*, 1995; Romi, 2001).

Ma al di là delle potenzialità quale vettore di arbovirus, in Italia, dove non sono segnalati serbatoi di infezione virale, la zanzara tigre è un formidabile ectoparassita con comportamento alimentare antropofilo da parte delle femmine adulte ad alta aggressività. La reazione cutanea alle punture di alimentazione ematofila è costituita da ponfi dolorosi, sovente edematosi ed emorragici. In presenza di alte infestazioni l'elevato numero di punture che si ricevono in un breve intervallo di tempo, concentrate prevalentemente negli arti inferiori, può dare origine a risposte allergiche localizzate con effetti più rilevanti su bambini ed anziani che richiedono l'intervento medico. Questa realtà ogni estate interessa migliaia di persone.

1.2 CENNI DI BIOLOGIA ED ECOLOGIA

Un pò come gran parte delle zanzare adulte, anche *Ae. albopictus* si presenta con corpo di piccole dimensioni, addome e torace sottili, un paio di ali molto strette e tre paia di sottili zampe (Fig. 3).

Un carattere che aiuta a distinguere questa specie dalle altre zanzare è sicuramente la banda bianca che corre longitudinalmente alla parte dorsale del torace (Fig. 4) e la presenza di scaglie bianche sui tergiti addominali e sulle zampe, che danno l'effetto visivo di una vera e propria bandeggiatura, da cui il nome comune di “zanzara tigre” (Figg. 3 e 4).



Figura 3: Femmina di *Aedes albopictus* (foto R. Bellini)



Figura 4: Torace di *Ae. albopictus* (a destra) ed *Ae. aegypti* (a sinistra)

Una evidente proboscide molto allungata permette alle femmine di pungere ed alimentarsi con il sangue degli ospiti. I maschi si nutrono di solo nettare.

Il ciclo biologico di *Ae. albopictus* (Fig. 5) è simile a quello delle zanzare italiane appartenenti allo stesso genere. La fase preimmaginale avviene nell'acqua.

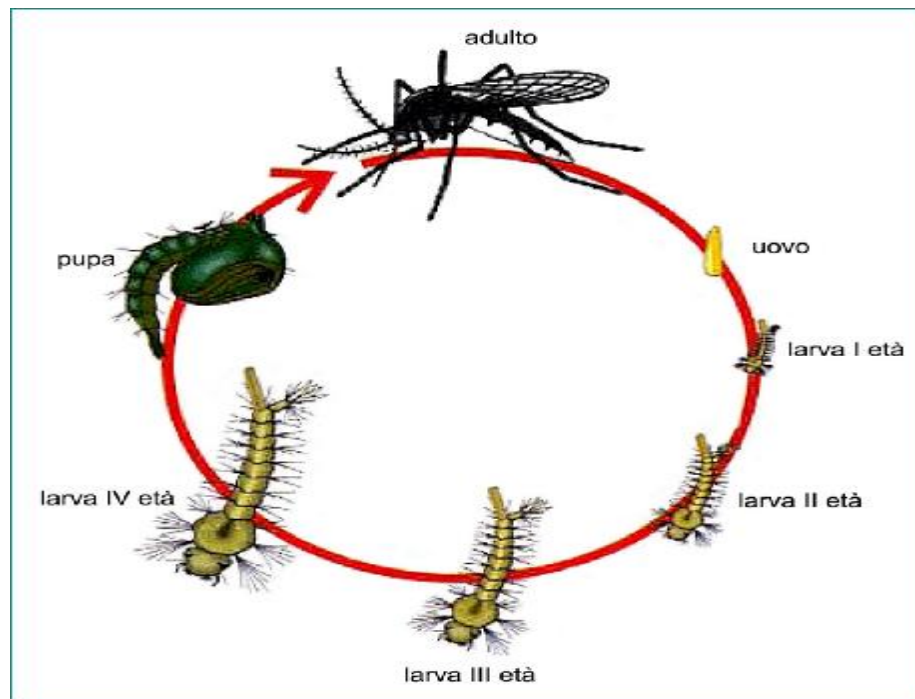


Figura 5: Ciclo biologico *Aedes* spp.

Le uova vengono deposte poco sopra la superficie del liquido e schiudono in risposta alla loro immersione. Bianche appena deposte, diventano nere con il procedere dello sviluppo embrionale (Fig.6) ed hanno una lunghezza media di 0,55 mm e una larghezza media di 0,16 mm.



Figura 6: Uova mature (corion nero) di *Ae. albopictus*

Dalle uova schiudono le larve che, attraverso 4 stadi di crescita, separati da altrettanti cambi del rivestimento cuticolare (mute), raggiungono lo stadio di pupa. La zanzara adulta sfarfallerà circa 48 ore dopo l'impupamento. L'intero ciclo dura tra 10 e 20 giorni alle nostre latitudini, a seconda della temperatura. Maschi e femmine sono già pronti per l'accoppiamento 48-72 ore dopo lo sfarfallamento. La durata del ciclo gonotrofico varia tra 3 e 5 giorni (Hien, 1976).

Le femmine consumano il loro primo pasto di sangue, necessario per la maturazione delle uova, generalmente dopo l'accoppiamento. Mentre il pasto di sangue provvede essenzialmente a fornire l'apporto proteico per lo sviluppo delle uova, i carboidrati assunti con il nettare floreale rappresentano il cibo vero e proprio che sostiene energeticamente maschi e femmine.

Gli adulti di zanzara tigre vivono da pochi giorni a parecchie settimane dipendentemente dalle condizioni climatiche. Condizioni di caldo torrido riducono la longevità a pochi giorni, ma in queste condizioni, tipiche dell'estate italiana, le zanzare frequentano maggiormente le nostre abitazioni, i giardini irrigati, dove trovano un ambiente molto più confortevole che assicura loro un habitat ideale per la sopravvivenza e la riproduzione (Hawley, 1988).

Come gran parte delle zanzare, anche *Ae. albopictus* è fortemente legata al mezzo acquoso per la ovideposizione. Le femmine gravide cercano piccoli contenitori di acqua nei quali ovideporre. Qualsiasi piccola raccolta di acqua, da un copertone di automobile ai sottovasi o anche in cavità di alberi, possono essere siti riproduttivi. L'ovideposizione avviene preferibilmente in aree ombreggiate e in cavità le cui pareti sono molto scure, maggiormente in acque torbide con residui organici piuttosto che in acque limpide. Le uova vengono deposte lungo le pareti delle cavità o dei contenitori poco sopra il livello variabile dell'acqua e vengono indotte alla schiusura quando il livello della stessa sale ricoprendole completamente con una temperatura non inferiore a 15°C. Se la temperatura è più bassa le uova entrano in uno stadio quiescente in attesa di condizioni termiche ottimali per la schiusura (fase di svernamento). La proporzione di uova che schiudono aumenta se le uova rimangono all'asciutto per alcuni giorni prima di essere sommerse ed iniziare lo sviluppo.

Una femmina di zanzara tigre può deporre tra 40 e 150 uova dopo aver consumato il pasto di sangue (Hawley, 1988). Il ciclo del pasto di sangue e la produzione delle uova continuerà per tutta la vita delle femmine. Generalmente si ha

una ovideposizione per settimana. Il numero medio di uova deposto da una femmina in tutto il corso della sua vita è di circa 300-400.

La zanzare tigre vive gran parte della sua esistenza riposando, volando e pungendo gli ospiti in prossimità del suolo. E' attiva di giorno (raramente la notte) particolarmente nelle prime ore del giorno e nel tardo pomeriggio. I maschi volano in veri e propri sciami a pochi cm dal terreno in luoghi ombreggiati (Bellini, comunicazione personale).

Le femmine sono fortemente attratte a pungere l'uomo, ma si alimentano anche su gatti, cani, altri mammiferi e su uccelli che vivono in prossimità del suolo. La puntura di alimentazione viene fatta in qualsiasi area epidermica accessibile, ma di preferenza, per quanto concerne l'uomo, sugli arti inferiori (le caviglie e le ginocchia in particolare). In media una zanzara ingerisce dai 2 ai 6 mg di sangue per pasto.

Indipendentemente dalla longevità, le zanzare tigre hanno una scarsa attitudine migratoria. La maggior parte degli adulti vive la propria vita entro un raggio di 200-400 m dalla raccolta di acqua nella quale sono nati (Hawley, 1988). Questo ultimo aspetto può avere conseguenze non di poco conto, come vedremo, nella scelta delle strategie di lotta.

In Italia gli adulti di zanzare tigre sono presenti nei mesi estivi ed iniziali dell'autunno. Lo svernamento avviene allo stadio di uova durevole durante i mesi più freddi. Le uova svernanti schiudono in primavera (in Italia settentrionale ad aprile-maggio) dando origine alla prima generazione larvale. La popolazione aumenta durante l'estate raggiungendo la massima densità e diffusione a settembre. Il ciclo di sviluppo stagionale si conclude in autunno (nelle regioni settentrionali ad ottobre-novembre) con la deposizione di uova in diapausa. La riduzione del numero di ore di luce e della temperatura cui sono esposte pupe e adulti nel periodo autunnale stimola la deposizione di uova in diapausa embrionale. In laboratorio il numero di ore di luce necessario per indurre la deposizione di uova diapausanti a 21°C (Fotoperiodo Critico FC) è variabile a seconda dei ceppi. In campo a Desenzano del Garda si è osservato che il FC è di 11h 58' e corrisponde al 27 settembre (Bellini *et al.*, 1996a). Complessivamente si possono avere fino a 10-12 generazioni.

Monogamia. Ciascuna femmina copula più volte e con maschi differenti nel corso della sua vita, tuttavia gli spermatozoi del primo maschio sono quelli che restano immagazzinati nella spermateca e provvedono alla fecondazione delle uova prodotte

nel corso dell'intera vita di una femmina (Jones, 1973). Il comportamento monogamico “*sensu strictu*” sembra indotto dall'azione di sostanze peptidiche tra cui una denominata “matrone” (Craig, 1967; Fuchs *et al.*, 1969) che ostacolerebbe il successivo ingresso di altri spermatozoi, come evidenziato in studi eseguiti su *Aedes aegypti*.

1.3 IMPORTAZIONE IN ITALIA E STRUTTURA DI POPOLAZIONE

La capacità di *Ae. albopictus* di adattarsi al nostro clima temperato è oramai una realtà ben assodata. Ma come è avvenuta l'importazione di questa specie nel continente Americano prima ed Europeo poi?

E' stato accertato che un ruolo fondamentale nel trasporto passivo delle uova viene svolto dai copertoni dei pneumatici delle automobili che, accatastati su vaste aree (Fig.7), formano tante piccole raccolte di acqua, siti ideali di ovideposizione per le femmine della zanzara tigre. L'esportazione dei copertoni usati in giro per il mondo ha promosso la diffusione intercontinentale della specie (Hawley, 1988; Reiter, 1998).



Figura 7: Copertoni di pneumatici, sito ottimale di ovideposizione per *Ae. albopictus*

Anche per l'Italia sembra che l'importazione di copertoni dagli Stati Uniti sia stato tra i principali fattori per l'introduzione di *Ae. albopictus* (Dalla Pozza e Majori, 1992). Ne è anche una parziale conferma l'alta affinità genetica riscontrata tra le popolazioni italiane e quelle statunitensi (Black *et al.*, 2000; Urbanelli *et. al.*, 2000;).

La colonizzazione di *Ae. albopictus* in Italia ha avuto un andamento molto simile a quello avvenuto negli Stati Uniti realizzatosi con l'ingresso di un numero massiccio di individui seguito da una rapida diffusione a livello locale nonostante le limitate capacità di dispersione descritte per questa specie. Anche la diffusione locale di *Ae. albopictus* è

sicuramente legata al trasporto passivo ed anche in questo caso il ruolo svolto dal commercio dei copertoni sembra essere molto importante. Studi eseguiti da Hawley (1988) suggeriscono che in *Ae. albopictus* 200 m sia la distanza media massima di dispersione degli adulti dal sito di nascita. Tale informazione, come vedremo, è di rilevante importanza nello sviluppo di strategie territoriali di controllo della “zanzara tigre”.

2. METODI DI LOTTA

2.1 STRATEGIE COMUNI

Accertato che i copertoni di pneumatici usati oltre ad essere un mezzo di trasporto passivo possono rappresentare una fonte di sviluppo locale, si può a ragione pensare che, la prima forma di controllo a carattere preventivo, sia quella di intervenire direttamente sui copertoni spostandoli in ambienti chiusi (tettoie e capannoni) oppure sottoponendoli a trattamenti mirati con insetticidi preferibilmente a base di piretroidi.

Il monitoraggio con trappole è un supporto fondamentale per indirizzare le attività di lotta e verificarne l'efficacia. Nei programmi di sorveglianza condotti in Italia, in Asia e in America, il monitoraggio di *Ae. albopictus* viene realizzato mediante ovitrappole (Fay e Eliason, 1966), costituite da contenitori di colore nero di circa 500 ml di volume (Fig. 8). Le ovitrappole sono riempite con circa 300 ml di acqua (priva di cloro) e sulla parete viene fissata una listella di masonite (larghezza di circa 2 cm) o un altro supporto idoneo per l'ovideposizione. Settimanalmente le listelle devono essere sostituite e quelle raccolte vengono esaminate per il conteggio delle uova. Per avere una buona stima della popolazione adulta occorre posizionare le trappole ad una distanza tra loro di 100-200 metri in aree ombreggiate (questa specie di zanzara predilige alti livelli di umidità) con uno spazio libero al di sopra della ovitrappola di almeno 30 cm.



Figura 8: ovitrappola

Per ridurre i tempi di conteggio delle uova, nel 1994 è stato messo a punto un modello di campionamento binomiale (Gerrard e Chiang, 1970) in grado di stimare la

densità media della popolazione dalla semplice frequenza delle trappole positive (Bellini *et al.*, 1996;1996b).

Oggi sono in sperimentazione anche altri efficienti sistemi di cattura per le femmine basate su trappole adesive poste in prossimità di siti di ovideposizione artificiali (piccole raccolte di acqua) che attraggono le femmine (Facchinelli *et al.*, 2007).

Disinfestazione chimica e microbiologica. I focolai di sviluppo larvale di *Ae.albopictus* più importanti in area urbana sono senza dubbio le caditoie stradali. La schiusura delle uova è legata all'innalzamento del livello dell'acqua all'interno del tombino che si realizza a seguito delle piogge, dei lavaggi stradali, dell'irrigazione di giardini, ecc. Il numero di generazioni e la popolazione che si sviluppa nei tombini presenti nelle aree private è sicuramente maggiore rispetto alle caditoie di strade pubbliche, pertanto per ottenere un efficace controllo occorre estendere le attività di lotta anche nelle aree private. La disinfestazione chimica può essere svolta con formulati fluidi a base di Temephos alla dose di 0,5 g di principio attivo per tombino. A questa dose il prodotto ha una persistenza d'azione di circa 20-25 giorni, pertanto durante la stagione estiva occorre svolgere 6-8 interventi di disinfestazione. La lotta può essere svolta con formulati granulari o liquidi a base di pyriproxyfen o diflubenzuron (Colonna *et al.*, 2004)

Il controllo di focolai larvali stabili (tombini stradali) possono essere effettuati con i più comuni larvicidi in formulazioni liquide o granulari a seconda dell'accessibilità del sito. Particolarmente indicati sono i formulati a base di *Bacillus thuringiensis*, per la loro scarsa o nulla tossicità ambientale.

Azione larvicida del rame. *Ae. albopictus* tende a svilupparsi soprattutto in piccoli contenitori tra i quali i più numerosi sono i sottovasi. Nel 1995 sono stati condotti in laboratorio, in condizioni simili a quelle di campo, prove per verificare l'effetto del rame sullo sviluppo larvale di *Ae. albopictus* nei sottovasi (Bellini *et al.*, 1998). Lo studio ha evidenziato che una dose di 8 g/l di rame metallico (filo elettrico privato della guaina di plastica) posto in sottovasi con vaso di terra cotta contenente torba, determina una mortalità larvale del 93% dopo 2 mesi, 96% dopo circa 3,5 mesi e 100% dopo 5 mesi. Il rame inoltre sembra avere un effetto negativo sullo sviluppo delle larve sopravvissute. Infatti, si è osservato il raddoppiamento dei tempi di sviluppo

larvale e una riduzione della biomassa degli adulti. Il rame quindi oltre a determinare una forte mortalità determina la riduzione del numero di generazioni durante la stagione e il calo delle capacità di spostamento e della fertilità delle femmine.

Studi sull'efficacia in campo del rame, condotti nel 1998 e 1999 su oltre 3500 sottovasi, hanno evidenziato che il rame (in media 20 grammi/sottovaso) determina una riduzione della densità delle larve mature rispetto al testimone del 94-98%. Oltre ad una riduzione della densità media larvale è stato osservato un calo evidente del numero dei sottovasi colonizzati rispetto al testimone (97,6% nel 1998 e 85,6% nel 1999). Prove condotte nel 2000 hanno evidenziato che il rame sembra incidere in modo significativo sulla ovideposizione. In ovitrappole da 500 ml sono stati introdotti 20 g di rame e si è osservata una riduzione delle uova deposte rispetto al testimone del 49,5%. Tuttavia l'uso del rame viene sconsigliato nelle grandi raccolte d'acqua e nei tombini stradali ove accanto ad una accertata scarsa efficienza si profila il rischio di impatto ambientale dovuto al rilascio del metallo pesante.

Comunque, al di là delle metodologie di controllo adottate, occorre rimarcare che, per quanto concerne il controllo degli innumerevoli microfocolai domestici (raccolte d'acqua in manufatti umani), è fondamentale lo spirito di cooperazione della popolazione opportunamente sensibilizzata da una corretta informazione.

2.2 METODI GENETICI

Una delle maggiori difficoltà nel progettare piani di controllo efficaci per la zanzara tigre, soprattutto con la lotta chimica, è proprio quello di effettuare i trattamenti su microfocolai, per lo più domestici, delle aree urbanizzate. Trattamenti estensivi e poco capillari il più delle volte non risolvono il problema, senza poi considerare il negativo impatto ambientale.

Per questo motivo negli ultimi anni entomologici e biotecnologici hanno rivalutato il ruolo delle tecniche di lotta genetica la cui applicazione è rivolta allo stadio adulto della specie bersaglio inibendone appunto la funzione riproduttiva.

L'idea di applicare la genetica al controllo degli insetti dannosi fu concepita almeno tre volte, indipendentemente tra gli anni 1930 e 1940. Serebrovsky (1940) scriveva in suo articolo sulla possibilità di sfruttare alcune anomalie cromosomiche per scopi di controllo di insetti dando il via ad una serie di ulteriori studi ed

approfondimenti nei quali assumeva un ruolo centrale l'impiego di agenti mutageni quali le radiazioni ionizzanti. Vanderplank (1947; 1948), Knippling (1955) e Curtis (1968) contribuirono successivamente a rafforzare l'idea che effettivamente l'utilizzazione di tecniche genetiche rappresentasse un approccio innovativo di lotta agli insetti, alternativo alla tradizionale lotta chimica.

Sempre in quegli anni, lo sviluppo della genetica in ambito entomologico ed in particolare nello studio dei ditteri culicidi, accrebbe l'entusiasmo dei ricercatori per lo studio di sistemi genetici di controllo per moltissime specie di zanzare; inoltre, un ulteriore impulso verso questa tematica di ricerca venne dall'accertamento, sempre più frequente, di fenomeni resistenza genetica agli insetticidi di cui si era fatto largo uso, in popolazioni di zanzare.

2.2.1 Diversi approcci alla lotta genetica

La produzione ed il rilascio di milioni di insetti sterilizzati per esposizione a prodotti chimici o radiazioni mutagene, generalmente è considerata la forma più semplice di manipolazione genetica (Smith *et al.*, 1964). Dalla registrazione di questi agenti mutageni e dalle procedure di applicazione, i ricercatori mirano a provocare danni cromosomici nei gameti maschili che interrompano lo sviluppo dell'embrione, senza la perdita per il maschio della sua capacità di accoppiamento. La Tecnica dell'Insetto Sterile (SIT) è focalizzata sull'importanza del numero dei maschi rilasciati, mentre in una popolazione il numero di femmine sterili liberate è considerato un fattore neutro in base al presupposto che ci sia potenzialmente un eccesso di accoppiamenti del maschio (Makela e Huettel, 1979).

Tuttavia, se le femmine sono liberate con i maschi è importante che siano sterili e che non procurino danni diretti o indiretti sia in ambito sanitario che agrario. Realizzare la sterilità femminile è un problema importante nelle specie dove il maschio è più suscettibile agli effetti dell'agente mutageno rispetto alla femmina (McKibben *et al.*, 2001). Semplici modelli algebrici, sviluppati da Knippling, sono stati usati per guidare lo sviluppo di programmi di controllo e/o eradicazione dell'insetto dannoso (Knippling, 1955). Secondo questo modello partendo da una popolazione autoctona di un milione di insetti femmine e vengono liberati in questa popolazione due milioni di maschi sterili per generazione, l'eradicazione totale dovrebbe essere realizzata in cinque generazioni.

Poiché l'impatto atteso da un rilascio sterile è di solito inversamente dipendente dalla densità (aumenta l'impatto mentre la densità si riduce) si ritiene che integrando i rilasci sterili con altre tecniche a effetto densità dipendente (quale l'uso di antagonisti naturali) il processo di eradicazione dovrebbe avvenire molto più rapidamente. Ad esempio molti agenti di controllo biologico specifici, come i parassitoidi, sono densità dipendente: se diminuisce la densità degli insetti target (ospiti), e quindi meno individui sono disponibili per essere catturati e/o parassitizzati, la popolazione degli agenti di controllo biologico diminuisce e diventa meno efficace. E' a questo punto, quando la densità degli insetti target è bassa, che il rilascio di insetti sterili ha la maggior efficacia.

Ibrido sterile. Il rilascio di individui di una specie che possono incrociarsi con un'altra, ma che danno una prole ibrida non vitale, può essere considerato un sottoinsieme dell'approccio del rilascio sterile. Questo approccio ha però delle proprietà specifiche quando sono rilasciati sia maschi che femmine. A seconda della specie implicata, la prole ibrida può morire come embrione, morire ad uno stadio più avanzato o essere sterili. In un rilascio sessuale doppio, sotto le condizioni più semplici, la specie con densità più alta compete sessualmente con la specie meno abbondante. Supponendo che vi siano 100 maschi e 100 femmine della specie A e vengono rilasciati 300 individui (maschi e femmine) della specie B, se l'incrocio è casuale, una femmina della specie A avrà una possibilità del 75 % di incrociarsi con un maschio della specie B, mentre una femmina della specie B avrà solo una possibilità del 25 % di incrociarsi con un maschio dell'altra specie. Questo porta ad una riduzione asimmetrica della "fitness" per le due specie che produce un aumento di diversità delle densità delle due specie. Più grande diventa la differenza tra le densità, maggiore sarà l'impatto di "fitness" negativa sulla specie meno abbondante. Infine la specie A sarà sostituita dalla specie B. Questo è esattamente quello che è avvenuto negli esperimenti di Vanderplank con le mosche tsetse (Klassen e Curtis, 2004). In quel caso, la specie B (*Glossina morsitans centralis*) ha sostituito la specie A (*G. swynnertoni*), anche se non è sopravvissuta successivamente nell'habitat della specie A durante le stagioni asciutte. Questo ha portato all'estinzione locale di entrambe le specie.

Letale condizionale. Un letale condizionale è causato da un gene che determina la mortalità solo quando l'organismo è esposto a condizioni ambientali specifiche. Non ci si aspetta che il rilascio di insetti con geni letali condizionali dominanti abbia un

effetto immediato sulla popolazione target. Gli insetti rilasciati che portano l'allele letale condizionale in forma omozigote incrociandosi con insetti nativi continuerebbero a diffondere il gene nella popolazione. La diffusione andrebbe avanti finché sotto determinate condizioni ambientali il gene non sia attivato (o represso nel caso di incapacità di diapausa).

Translocazioni. La traslocazione cromosomiale é definita come lo scambio reciproco di parti/sezioni di cromosoma tra segmenti terminali di cromosomi non omologhi (Robinson, 1976), può verificarsi naturalmente o essere indotta da mutageni (Whitten, 1985). L'uso potenziale di insetti con traslocazioni, inizialmente proposto da Serebrovsky (1940) e ampliato da Curtis (1968), ha ricevuto molta attenzione negli anni '70 e negli anni '80 come mezzo per sopprimere l'incremento demografico e/o sostituire ceppi di insetto selvatici con ceppi meno nocivi. Diversamente da quanto avviene con i rilasci di insetti sterili, ci si aspetta in linea teorica che i rilasci di insetti portatori di traslocazioni abbiano nella prima generazione un effetto più debole sulla "fitness" della popolazione, ma che l'effetto di ogni singola traslocazione continui per più generazioni (Robinson, 1976). Il meccanismo con cui la traslocazione riduce la popolazione nativa deriva dal fatto che quando un eterozigote traslocato subisce una meiosi, circa metà dei suoi gameti hanno una deficienza di un segmento cromosomico e una duplicazione di un altro. Questi gameti sono funzionali, ma quando si fondono con i gameti dell'insetto nativo, producono una prole non vitale. Quando si incrociano eterozigoti traslocati l'un con l'altro, la vitalità della prole è più alta, poiché i gameti sbilanciati si compensano. In una popolazione che si incrocia casualmente con una frequenza per singola traslocazione di 0.5, l'aspettativa teorica di prole non vitale diventa del 43,75 % invece che del 50% a causa di questa complementazione. La teoria indica che un ceppo con traslocazioni multiple avrebbe una vitalità più bassa di un ceppo con singola traslocazione e dovrebbe essere quindi più efficace nella soppressione di una popolazione "target".

Con modelli di simulazione sono stati confrontati l'efficacia di rilascio di un ceppo a doppia traslocazione con quella di rilascio di maschi sterili. Sotto condizioni specifiche, il rilascio del ceppo con doppia traslocazione causa una riduzione più sostanziale nella popolazione rispetto al rilascio di sterili. Un metodo genetico concettualmente derivato dall'uso di traslocazioni é il rilascio di ceppi con cromosomi composti. Mentre le traslocazioni sono prodotte dallo scambio di segmenti tra

cromosomi non omologhi, i cromosomi composti sono prodotti dallo scambio di braccia tra cromosomi omologhi. Questo porta a un cromosoma omologo con due braccia destre ed un secondo cromosoma omologo con due braccia sinistre unite al centromero. Il ceppo con cromosomi composti tende ad avere una ridotta fertilità quando il cromosoma è mantenuto in forma omozigote e ci si aspetta che abbiano una fertilità nulla quando sono fatti incrociare con un insetto che possiede un cromosoma normale.

Elementi trasponibili. La scoperta e la caratterizzazione di elementi trasponibili in *Drosophila* e in altri insetti hanno indotto a pensare che questi elementi potessero essere utilizzati per “guidare” determinati geni nelle popolazioni di insetti nocivi (Curtis, 1992; Kidwell e Ribeiro, 1992). Una sequenza di DNA potrebbe essere inserita all’interno di un trasposone e quindi in un cromosoma dell’organismo “target” insieme ad un appropriato gene codificante la trasposasi. Poiché sotto certe condizioni il trasposone può replicarsi e spostarsi in alte posizioni cromosomiali, come ad esempio nelle cellule germinali, tale elemento potrebbe essere ereditato da tutta la prole. Quindi, se un trasposone “caricato” con un particolare gene viene introdotto in una popolazione nativa, priva del trasposone (e quindi incapace di reprimerne il movimento), questo aumenterà di frequenza all’interno di quella popolazione (Ribeiro e Kidwell, 1994). Il trasposone potrebbe, ad esempio, contenere un gene letale recessivo. Gli insetti incrociandosi porterebbero il gene in omozigosi determinando così la morte dell’individuo.

Letalità femmina specifica. Utilizzando la stessa struttura del modello dei letali condizionali, Schliekelman e Gould hanno sviluppato un secondo modello di rilascio di un ceppo con l’inserimento di alleli letali femminili (Schliekelman & Gould, 2000). Il problema principale in questo tipo di strategia è il mantenimento di un simile ceppo prima del rilascio. Heinrich e Scott (2000), Thomas e Donnelly (2000) hanno sviluppato un metodo che offre un’alternativa pratica e ingegnosa. Essi hanno utilizzato elementi di controllo trascrizionale di *Drosophila* per guidare l’espressione della proteina di fusione tetraciclina-repressore trans-attivatore (tTa). In assenza di tetraciclina, l’elemento tTa induce l’espressione di qualsiasi gene controllato dall’elemento che risponde alla tetraciclina (tRe),⁰ ma in presenza di tetraciclina non vi è alcuna espressione.

Se un gene female-killing fosse controllato dal tRe in un insetto dannoso, allora il ceppo transgenico produrrebbe femmine finché nella dieta fosse aggiunta tetraciclina. Il ceppo progettato potrebbe essere mantenuto con una dieta contenente tetraciclina fino alla generazione precedente al rilascio, quando solo i maschi sarebbero prodotti e rilasciati. I maschi rilasciati, incrociandosi con le femmine selvatiche, determinerebbero la diffusione del gene. L'assenza di tetraciclina in campo manterrebbe il gene female-killing in uno stato attivo, determinando così la morte di tutte le femmine nella popolazione.

Sottodominanza. La tecnica della traslocazione è basata sullo scambio reciproco di parti/sezioni di cromosoma che determinano in eterozigosi una “fitness” inferiore rispetto a quella del ceppo nativo. Questa condizione dell'eterozigote è chiamata sottodominanza. Ottenere un sottodominante è molto difficile, poiché la maggior parte dei cromosomi traslocati ha una “fitness” molto bassa in condizioni di omozigosi. Davis e collaboratori hanno efficacemente sviluppato una tecnica per utilizzare al meglio le potenzialità della sottodominanza (Davis *et al.*, 2001). Il loro approccio, basato su metodi transgenici e modelli di genetica di popolazione, implica l'inserimento di due costrutti distinti in vari cromosomi. Ogni costrutto include le seguenti sequenze di DNA: un gene letale strutturale, un promotore per il gene letale, una sequenza trans-soppressore che agisce con un promotore specifico e il gene desiderato regolato indipendentemente. Il costrutto sul primo cromosoma avrebbe il promotore del gene letale che può essere soppresso solo dalla sequenza del soppressore sul secondo cromosoma, mentre il promotore sul secondo cromosoma può essere soppresso solo dalla sequenza del soppressore sul primo cromosoma. Gli stessi geni letali strutturali possono essere inseriti sul primo e sul secondo cromosoma. Un individuo che porta entrambe i costrutti non ha l'espressione del gene letale dell'uno o dell'altro costrutto perché entrambe le sequenze dei soppressori sono presenti. Il gene desiderato è espresso in questi individui perché è sotto la regolazione di un promotore indipendente. Quando un ceppo che contiene entrambe i costrutti in omozigosi è rilasciato in una popolazione nativa, la prole F1, che è in emizigosi per entrambe i costrutti, è vitale, ma qualsiasi F1 che si incrocia con un insetto nativo produrrà il 25 % di figli senza alcun costrutto, il 25 % di figli con entrambe i costrutti ed il 50 % solo con uno dei costrutti. Quest'ultimo tipo di prole non è vitale perché priva del soppressore appropriato. Lo sviluppo di costrutti con le proprietà appena descritte può essere

difficile da realizzare a causa di fattori genetici e molecolari come la perdita di promotori e l'azione incompleta dei soppressori. La sottodominanza tuttavia ha un potenziale così grande che questo così come altri approcci meritano di essere esplorati.

Incompatibilità Citoplasmatica. Nel 1971, Yen e Barr hanno dimostrato che un batterio endosimbionte del genere *Rickettsia*, *Wolbachia*, causava incompatibilità citoplasmatica in zanzare del genere *Culex* (Yen & Barr, 1971). Gli stessi tipi di batteri sono stati recentemente riconosciuti infettare un'alta percentuale di insetti, acari, isopodi e nematodi. L'incompatibilità citoplasmatica è molto diffusa negli insetti (22%) ed è stata ritrovata in diversi ordini, inclusi Coleoptera, Diptera, Homoptera, Hymenoptera, Orthoptera, e Lepidoptera (Giordano *et al.*, 1997). Recentemente, è stata descritta al di fuori degli insetti, in molte specie di acari (Arachnidae: Acari) (Breeuwer, 1997), ed in diverse specie di isopodi (Crustacea) (Rousset *et al.*, 1992; Stouthamer, 1993; Bourtzis e O'Neill, 1998). Quando maschi che portano un tipo di *Wolbachia* si incrociano con femmine non infette o infettate con un ceppo diverso (incompatibilità uni- o bidirezionale), la maggior parte o tutti gli embrioni non si sviluppano. L'incrocio reciproco è invece fertile e produce una prole infetta. Ed è in questo modo che *Wolbachia* si diffonde nella popolazione (Turelli e Hoffman, 1991). Quindi se maschi che portano un ceppo di *Wolbachia* incompatibile sono rilasciati in una popolazione, essi avranno una dinamica simile al rilascio di maschi sterili (Laven, 1967). Se invece sono rilasciati maschi e femmine di un ceppo incompatibile con quello nativo, ci si attende una dinamica molto più complessa. I risultati possono variare da una soppressione della popolazione nativa, alla sostituzione del ceppo indigeno con quello rilasciato (Turelli e Hoffman, 1999). L'incompatibilità citoplasmatica verrà trattata più approfonditamente nel capitolo 3 dedicato a *Wolbachia*.

2.2.2 La tecnica dell'insetto sterile (SIT)

La tecnica dell'insetto sterile è una tecnica di lotta autocida ad azione genetica specie-specifica. Essa si basa sull'allevamento massivo, sterilizzazione e lancio ripetuto di insetti sterili al fine di ridurre progressivamente la capacità riproduttiva della specie dannosa mediante gli accoppiamenti infecondi tra gli adulti selvatici e quelli sterili. La tecnica SIT può essere utilizzata da sola o in combinazione con altre tecniche di lotta al

fine di eradicare, sopprimere o controllare la popolazione del parassita in ambienti confinati o su ampi territori regionali.

L'idea di poter eliminare nel tempo una specie dannosa di insetto, nacque alcuni decenni fa negli U.S.A quando si ipotizzò di eradicare *Cochliomyia hominivorax* Coquerel., un dittero calliforide particolarmente dannoso agli allevamenti bradi di bestiame, con insetti radiosterilizzati liberati in territori naturalmente isolati. Essendo monogame, una volta accoppiatesi con maschi sterili, le femmine di questo dittero rimanevano anch'esse sterili per tutta la loro vita. L'idea fu in seguito sviluppata e nel 1954 l'intera isola di Curacao, circa 250 Km² di superficie, fu liberata dalla mosca del bestiame (Richardson *et al.*, 1982). Sulla base di questo successo negli anni successivi la tecnica SIT fu applicata in diversi stati meridionali degli U.S.A. ove furono liberati oltre 50 milioni di mosche sterili alla settimana su un'area di 110.000 Km² (Baumhover *et al.*, 1955).

A livello mondiale la tecnica dell'insetto sterile fu in seguito sviluppata ed utilizzata con successo per il controllo di diverse specie di insetti, quali: *Anastrepha suspensa*, *Ceratitis capitata*, *Dacus cucurbitae*, *Bactrocera dorsalis*, *Laspeyresia pomonella*.

Questa tecnica di lotta, così come venne proposta da Knipling (1955), implicava due procedure alternative di utilizzo: la prima prevedeva la sterilizzazione di una colonia della popolazione naturale mediante l'impiego di sostanze chemiosterilizzanti da utilizzare nell'ambiente; la seconda consisteva invece nell'allevamento massale, nella sterilizzazione e liberazione degli insetti nella popolazione indigena da controllare. Tuttavia solo questa ultima delle due procedure è stata sviluppata ed applicata per il controllo di diverse specie di insetti in quanto la prima, pur ricca di ricerche e sperimentazioni, presenta ancora notevoli rischi tossicologici ed ambientali per l'uso delle sostanze chimiche proposte per la chemiosterilizzazione degli insetti.

Teoricamente Knipling (1955) ipotizza che lanci ripetuti e numericamente costanti di insetti sterili, che si suppone abbiano vigore ed attività sessuale uguali agli insetti selvatici, riducano progressivamente la capacità riproduttiva della specie in proporzione al rapporto stabilito tra insetti sterili e fertili. Tuttavia, in considerazione del fatto che la densità di una popolazione naturale non è stabile, egli ipotizza che il tasso di accrescimento da generazione a generazione ed a seconda della specie varia da un minimo di 5 a un massimo di 20 volte.

Diversi requisiti tecnici e valutazioni economiche sono richieste da questa tecnica

di lotta, tra cui:

- Ü **economicità dell'allevamento massale** della specie dannosa la quale deve possedere caratteristiche di facile adattamento alle tecniche di produzione massale tali da non subire alterazioni di "fitness";
- Ü **disponibilità di tecniche per l'induzione di sterilità appropriata** per alterare la capacità di riproduzione della popolazione naturale da controllare;
- Ü **metodi biologici e test genetici per la definizione costante della qualità** dell'insetto sterile prodotto e liberato in campo;
- Ü **favorevole distribuzione spazio/temporale** degli adulti sterili basata sulla fluttuazione numerica della popolazione indigena e sulle "performances" dell'insetto sterile;
- Ü **conoscenza biologiche ed ecologiche** della popolazione dannosa nel territorio interessato al controllo, livelli di isolamento.
- Ü **innocuità della specie liberata** in campo che non deve procurare danni alle colture agrarie, alla salute dell'uomo e non deve alterare gli equilibri ecologici dell'ecosistema.
- Ü **favorevole bilancio dei costi-benefici** in rapporto ad altre tecniche di lotta.

In relazione alla situazione ecologica dell'area da controllare e degli obiettivi finali che si desidera raggiungere, questa tecnica di lotta può essere applicata da sola o integrata con altre tecniche di controllo.

In particolare essa persegue l'obiettivo dell'**eradicazione** (eliminazione completa della popolazione da un'area geografica), del **controllo** (mantenimento della densità del parassita entro soglie di densità) o della **quarantena** quando, rispettivamente, sussistono le seguenti situazioni:

- Ü *eradicazione*: presenza discontinua della specie nel territorio, livelli di densità

di popolazione bassa, recente colonizzazione di nuove aree, isolamento territoriale favorevole; indirizzo produttivo del territorio di tipo biologico;

- *controllo*: dannosità della popolazione molto elevata (specie "chiave"); difficoltà di contenimento della popolazione con altre tecniche di lotta; lunga persistenza della specie nel territorio; densità di popolazione tendenzialmente elevata; territorio non ben isolato;
- *quarantena*: possibile diffusione della specie dannosa in nuove aree; protezione preventiva di vasti tenitori.

Le informazioni di base relative all'area dove viene applicata la tecnica SIT sono indispensabili per pianificare, condurre e valutare ogni programma di controllo.

L'intensità della ricerca è in relazione all'estensione del territorio interessato in quanto è presumibile pensare che in esso vi siano diversi habitat variamente isolati, diverse condizioni microclimatiche e risorse biotiche.

Determinare il grado di isolamento del territorio di controllo è uno degli aspetti più importanti per l'applicazione del SIT; infatti l'immigrazione di femmine selvatiche già fecondate nell'area di controllo diminuisce notevolmente l'efficacia della tecnica.

La distribuzione ed abbondanza spazio/temporale degli ospiti larvali deve essere ugualmente ben conosciuta, in quanto l'alimento influenza fortemente la velocità di sviluppo, la fluttuazione e la dispersione della specie.

Un altro aspetto molto importante è il monitoraggio costante della qualità dell'insetto prodotto per i lanci in campo. Gli insetti allevati in laboratorio possono essere paragonati ad una popolazione isolata che perde ogni contatto con le altre e su cui agiscono prevalentemente, tra le forze selettive, la deriva genetica e conseguente inbreeding che nel tempo influenza negativamente la "fitness" degli insetti stessi. Dato che le tecniche di lotta genetica richiedono l'accoppiamento tra insetti rilasciati ed insetti selvatici, qualsiasi cambiamento dei campioni rilasciati, come ad esempio quello sessuale, avrà un effetto dannoso immediato sulla efficienza della tecnica (Boller, 1972).

Applicazioni del SIT nella lotta alle zanzare. Gli studi applicativi della tecnica SIT nella lotta alle zanzare in generale sono stati condotti su diverse specie e aree geografiche come schematizzato nel seguente prospetto (Tab. 1).

Tabella 1: Elenco delle specie di zanzare "target" e luogo delle applicazioni del SIT

Specie	Area	Periodo
<i>Aedes aegypti</i>	Florida	1962
	New Delhi, India	1972-'75
<i>An. albimanus</i>	El Salvador	1970-'80
<i>An. gambiae</i>	Alto Volta	1969-'70
<i>An. quadrimaculatus</i>	Florida	1959-'62
<i>Cx. p. quinquefasciatus</i>	New Delhi, India	1962-'74
	Rangoon, Burma	1966-'71
	Sea Horse Key, Florida	1970
	Montpellier, France	1972
<i>Cx. tarsalis</i>	California	1977-'83
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Labore, Pakistan	1972-'79

I risultati sono stati ampiamente variabili: accanto ad alcuni successi iniziali riferibili per lo più ad aree isolate (Patterson *et al.*, 1971; Lofgren *et al.*, 1973) si annoverano diversi insuccessi (Weidhaas *et al.*, 1962).

Negli anni 1959-62 fu condotta una delle prime esperienze applicative di SIT nei confronti di *Anopheles quadrimaculatus* in Florida (Weidhaas *et al.*, 1962; Dame *et al.*, 1964) che fornì scarsi risultati. Ricerche successive mirate a stabilire le cause di questo insuccesso supportarono l'ipotesi che i maschi sterili avessero difficoltà nella dispersione e nel contatto con le femmine vergini selvatiche, difficoltà attribuibile più alla selezione del ceppo colonizzato che non all'effetto depressivo delle radiazioni o della chemiosterilizzazione. In effetti *An. quadrimaculatus* è specie di difficile colonizzazione in quanto riluttante ad accoppiarsi in gabbia (Dame *et al.*, 1964).

Nel progetto condotto negli anni '70 in El Salvador su *An. albimanus*, vettore primario di malaria, fu realizzato un impianto in grado di produrre 1 milione di maschi al giorno, chemiosterilizzati allo stadio pupale con *bisazir* (Kaiser *et al.*, 1979). Nelle fasi iniziali fu programmato il lancio degli adulti per poi passare al lancio delle pupe, più semplice ed efficiente (Bailey *et al.*, 1979; Lowe *et al.*, 1980). Nell'esperimento pilota condotto nel 1972 da Lofgren *et al.* (1974), furono lanciati complessivamente 4,3 milioni di maschi sterili (con una presenza indesiderata di femmine stimata del 14%) in una zona sul Lago Apastepeque; nell'arco di 5 mesi si indusse una sterilità del 99 %. L'unità di produzione aveva una superficie di 40 mq di cui 10 m² impegnati dalle

vaschette per l'allevamento delle larve e dalle gabbie degli adulti (Dame *et al.*, 1974). Si produsse anche un ceppo mutante con maschi resistenti al propoxur denominato MACHO.

I progetti storicamente più importanti sono soprattutto quelli mirati all'eradicazione di *Cx. pipiens quinquefasciatus* e successivamente di *Ae. aegypti* e *An. stephensi*, finanziati da WHO e USPHS (United States Public Health Service) in collaborazione con l'ICMR (Indian Council of Medical Research). L'unità operativa fu realizzata nel 1969 sulla base di un budget di 2 milioni di \$ per un periodo di 6 anni (Pal e LaChance, 1974). L'impianto di allevamento massale realizzato a New Delhi arrivò a produrre un milione di individui al giorno al costo di 40 \$. La separazione dei sessi era condotta sulle pupe per mezzo di setacci con una presenza inquinante di femmine ritenuta accettabile dello 0,6% (Sharma *et al.*, 1972). La sterilizzazione era ottenuta mediante trattamento delle pupe in acqua con *tiotepa*. Alla dose idonea al raggiungimento del 99% di sterilità nei maschi, le femmine mantenevano un buon grado di fertilità, ma ciò era considerato accettabile in considerazione del fatto che le femmine con residuo di fertilità avevano alte probabilità di accoppiarsi con i maschi sterili co-lanciati. Furono saggiati anche ceppi sterili per doppia traslocazione (Grover *et al.*, 1976). Il progetto fu chiuso a furor di popolo nel 1975 sommerso da critiche e speculazioni di natura socio-politica (Anonymous, 1975).

Ancora su *Ae. aegypti* è da ricordare il tentativo, condotto in Kenya negli anni '70, di lanciare in campo un ceppo omozigote sterile per traslocazione. Si poté stabilire che la "fitness" in campo del ceppo era deficitaria in termini di fertilità, tempo di sviluppo larvale, sopravvivenza delle larve e degli adulti e nella fase di accoppiamento rispetto alla popolazione naturale; di conseguenza il materiale genetico introdotto fu velocemente spiazzato (Lorimer *et al.*, 1976).

Nel sud della California, negli anni 1977-1983, fu condotto un nuovo studio per l'applicazione della tecnica SIT contro *Cx. tarsalis* che portò importanti contributi conoscitivi nel settore. Fu ad esempio possibile verificare che le radiazioni utili ad ottenere sterilizzazione dei maschi avevano scarsi effetti negativi sulle loro capacità di accoppiamento in gabbia con femmine selvatiche (Zalom *et al.*, 1981), mentre il peso negativo della colonizzazione appariva determinante (Reisen *et al.*, 1980; 1982). In effetti, irraggiando i maschi, raccolti come pupe in natura, con raggi gamma alla dose di 60 Gy si induceva una sterilità nella popolazione selvatica pari a quella attesa sulla base di un coefficiente di competizione di 1:1 (Reisen *et al.*, 1981). Utilizzando invece

materiale in allevamento da 9-16 generazioni la sterilità indotta nella popolazione selvatica era più bassa indicando una competitività dei maschi sterili del 29 % (Reisen *et al.*, 1982). Entrando nel merito dei motivi in grado di incidere negativamente sul comportamento dei maschi in campo Reisen *et al.* (1985) osservarono che la colonizzazione selezionava ceppi meglio adattati a formare sciami di accoppiamento e ad accoppiarsi in gabbia ma che avevano ridotte capacità di formare sciami di accoppiamento in natura rispetto ai maschi selvatici.

Nella sperimentazione relativa a *Cx. tritaeniorhynchus* in Pakistan, utilizzando un ceppo in cui i sessi venivano separati per via genetica (tsl), si poté stabilire che i maschi sterili erano altamente competitivi per l'accoppiamento con femmine allevate in laboratorio e lanciate in campo, ma non competitivi con le femmine selvatiche. Questo fenomeno fu successivamente confermato con una sperimentazione ad hoc utilizzando un altro ceppo mutante (In(3)T(2,3)1) (Reisen *et al.*, 1980). Da queste evidenze gli autori deducevano che l'allevamento selezionava un ceppo meglio adattato all'ambiente artificiale ma non più in sintonia con le femmine selvatiche (Baker *et al.*, 1979).

Recentemente si è assistito al tentativo di un concreto rilancio della SIT nella lotta contro *An. stephensi*, vettore primario della malaria, nelle zone urbane dell'India (Jayaraman, 1997). Tentativo che ha avuto il pregio e l'ambizione di partire da un'analisi critica delle ragioni dei precedenti insuccessi.

Sicuramente la storia della SIT nel controllo delle zanzare ha avuto risvolti molto controversi. Si può a ragione sostenere che molti degli insuccessi siano stati frutto soprattutto di scarsa conoscenza nei seguenti campi:

- ü ecologico: mancanza di informazioni generali sulle caratteristiche dell'ambiente; errato periodo di lancio degli insetti sterili; scarsa quantità di individui liberati; mancanza di un adeguato isolamento geografico dell'area di controllo; carenza di studi sulle "performances" degli insetti sterili;
- ü genetico: bassa variabilità genetica nella colonia fondatrice; selezione di genotipi nella popolazione massale scarsamente adattabili alle condizioni ambientali estreme; mancanza di conoscenze sulla struttura genetica della popolazione selvatica.
- ü tecnico: danni indotti dalle diverse tecniche impiegate nelle varie fasi dell'allevamento e sterilizzazione ;
- ü sterilizzazione e liberazione in campo; lancio di insetti non adeguatamente

sterilizzati;

- Ü teorico: numero degli insetti sterili liberati calcolato sulla competitività degli insetti sterili studiata in esperimenti di campo; eccessiva semplicità dei modelli matematici utilizzati.

Il SIT in Italia. Intorno agli anni '70 l'ENEA (allora CNEN), in collaborazione con la "Joint Diviosn FAO-IAEA", realizzò, presso il Centro Ricerche della Casaccia, il più grande ed innovativo insettario d'Europa per l'allevamento di *Ceratitis capitata* (Mosca Mediterranea della frutta) dove si producevano 14 milioni di insetti sterili alla settimana (Cirio e Saleme, 1975). I risultati del SIT, conseguiti da ENEA nel controllo della Mosca Mediterranea presso l'isola di Procida (Cirio, 1975), successivamente interessarono anche piccole aree della terra ferma (Cirio, 1977) dislocate in diverse regioni italiane (Calabria, Lazio, Campania, Sardegna e Sicilia). Purtroppo dopo una preliminare fase di studi ecologici effettuati su ampi territori frutticoli di diverse regioni, venne a mancare la successiva fase di industrializzazione del processo di produzione massale degli insetti sterili necessari per i programmi di controllo facendo mancare al progetto il necessario supporto per il suo sviluppo ed espansione.

***Aedes albopictus*, come specie target di un programma SIT** Molto più recentemente la tecnica SIT è stata rivalutata proprio in Italia nella lotta contro *Ae. albopictus*.

Le caratteristiche biologiche ed ecologiche di questa specie ne fanno una buona candidata per l'applicazione della tecnica dell'autocidio, all'interno di programmi di gestione integrato (Integrated Pest Management, IPM) nel nostro Paese, in considerazione di diversi aspetti così riassumibili:

- Ü l'allevamento massale delle specie di *Aedes* è relativamente facile comparato a quello di altre specie di zanzara (*Anopheles*);
- Ü la specie è monogama, mostra una bassa capacità di dispersione attiva (considerata poche centinaia di metri in ambiente urbano), una principale distribuzione urbana e periurbana, con una struttura delle popolazioni che mostra un ridotto scambio genico;
- Ü gli studi finora condotti indicano una buona somiglianza genetica tra le

popolazioni italiane di *Aedes albopictus*, tale da escludere la presenza di sub popolazioni con barriere di accoppiamento. Ma anche nel caso si rivelassero problemi di incompatibilità tra popolazioni la raccolta di materiale in natura e la colonizzazione sono operazioni facilmente eseguibili, quindi non presenterebbe grosse difficoltà dover partire dal ceppo locale;

- ù la distribuzione della specie sul territorio è centrata sulle aree urbane dove troviamo elevate densità di popolazione mentre scarsa è la presenza nelle zone agricole e naturali per la mancanza di luoghi idonei allo sviluppo. Si stima che lo spostamento da una zona all'altra avvenga in gran parte per trasporto passivo (autoveicoli, commercio copertoni) con numeri di individui tali da non invalidare l'efficacia del metodo in termini di soppressione (e non di eradicazione);
- ù nel nostro Paese c'è il vantaggio di poter sfruttare il crollo di popolazione causato dal periodo invernale (stimato in circa il 90-95 % delle uova svernanti) iniziando il rilascio di maschi sterili nella fase di ripresa primaverile quando la densità della specie è più bassa e quindi più contenute sono le dosi di maschi sterili necessarie al raggiungimento del rapporto desiderato di maschi sterili/maschi selvatici.

Le capacità di dispersione attiva della specie risultano limitate a poche centinaia di metri, anche se recenti esperienze sembrano indicare un raggio di spostamento maggiore di quello inizialmente accettato (Honòrio *et al.*, 2003; Liew e Curtis, 2004), mentre inevitabile appare il trasporto passivo legato al commercio dei copertoni usati ed in misura minore allo spostamento degli autoveicoli. Possiamo ipotizzare che il passivo possa considerarsi proporzionale alla densità di popolazione e al numero di zone infestate contraendosi fortemente al diminuire degli adulti sul territorio ed all'aumentare della distanza tra i siti considerati.

Nel 1999 il Centro Agricoltura Ambiente (CAA) di Crevalcore (Bo) in collaborazione con ENEA (Centro Ricerche Casaccia) ed il Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare dell'Università "La Sapienza" di Roma, ha avviato un programma sperimentale di radiosterilizzazione (raggi gamma) di *Ae. albopictus*, attraverso l'irraggiamento dello stadio di pupa, che portò alla definizione di dosi di sterilizzazione comprese tra 60 e 80 Gy (186 Gy/h) (Bellini *et al.*, 2005). Negli anni precedenti il CAA aveva messo a punto un sistema di allevamento massale di *Ae albopictus* basato su una

tecnica di separazione sessuale delle pupe con l'impiego di setacci metallici di precisione in grado di sfruttare la lieve differenza di dimensioni tra maschi e femmine (separazione di maschi con 2% di femmine residue) (Bellini *et al.*, 2002).

Dopo una fase di studio in laboratorio, tra il 2003 e 2004 sono stati condotti i primi test applicativi del SIT in campo nelle aree di Desenzano (Lago di Garda) e Rimini. I primi risultati, anche se preliminari, sono stati piuttosto incoraggianti ed hanno evidenziato, nelle aree di lancio dei maschi sterili, una significativa riduzione del tasso di fertilità delle uova catturate con ovitrappele intorno al 20-30% ed una diminuzione delle uova deposte nelle ovitrappele (Bellini *et al.*, 2007). Gli esiti delle osservazioni sperimentali hanno rappresentato soprattutto lo spunto per ulteriori studi ed approfondimenti necessari affinché la tecnica SIT possa accrescere il suo impatto, quale tecnica di controllo della zanzara tigre, in relazione alle esigenze delle varie comunità locali. Tra gli aspetti che meritano di essere approfonditi c'è quello di una maggiore conoscenza degli effetti che la sterilizzazione con radiazioni ionizzanti potrebbe avere sulla competitività sessuale del maschio. In tal senso si sta già lavorando per ridurre ancora la dose di sterilizzazione aumentando il livello di maturità delle pupe da trattare (Bellini *et al.*, 2007). Altri aspetti importanti sono un maggior approfondimento delle caratteristiche biologiche ed ecologiche della specie, in particolare la dispersione, e la struttura genetica analizzata a fine scala geografica.

Solamente approfondendo questi aspetti e perseguendo un approccio integrato è possibile giungere alla definizione di un programma di lotta col maschio sterile che abbia le più alte possibilità di successo.

Concludiamo questa rassegna, fino ad ora dedicata alle applicazioni della SIT convenzionale (basata sull'uso di trattamenti sterilizzanti), riportando le esperienze di lotta autocida basate sulla "incompatibilità citoplasmatica" e l'esistenza di differenti "mating types". La IC fu scoperta nella zanzara *Cx. pipiens pipiens* quando fu riscontrato che popolazioni simpatriche del culicide erano tra loro riproduttivamente isolate da meccanismi post-copula (Laven, 1951; 1953; Ghelelovitch, 1952).

Ben presto fu sviluppata una nuova strategia di lotta genetica-autocida che, sulla scia dell'allora emergente tecnica di lotta con l'insetto sterile (SIT) era incentrata sul rilascio massale di maschi appartenenti a ceppi incompatibili (Laven, 1967; Davidson, 1974). Venne proposto il termine "Incompatible Insect Technique" (IIT.) da Boller e Bush (1976). Tale termine è stato poi ripreso più recentemente da Bourtzis e Robinson

(2006). Yen e Barr (1971;1973) individuarono nel batterio endosimbionte *Wolbachia* l'agente eziologico della incompatibilità citoplasmatica.

Tra il 1979 ed il 1985 furono condotti esperimenti di campo con lo scopo di ottimizzare il controllo genetico di *Cx. pipiens* integrando radiazioni ionizzanti (a dosi substerilizzanti) e IC (Sharma *et al.*, 1979; Arunachalam e Curtis, 1985). Pur ottenendo importanti risultati le applicazioni di questa metodologia di lotta non decollarono sia per problemi politici ed amministrativi locali (Anon., 1975) sia per un'eccessiva critica della comunità scientifica concentrata sul fatto che fosse tecnicamente difficile il rilascio massale di soli maschi senza contaminazione femminile. Ma questa, d'altra parte, era una contestazione con cui dovevano confrontarsi gran parte dei progetti di lotta col maschio sterile.

3. WOLBACHIA

Wolbachia è un genere di batteri della famiglia Rickettsiacee (Ordine Rickettsiales) nel Phylum Proteobacteria. Fu scoperto da Hertig e Wolbach nel 1924 e successivamente fu descritto come microrganismo presente negli ovari di zanzare della specie *Cx. pipiens* (Hertig e Wolbach, 1924; Hertig, 1936). *Wolbachia pipientis* è attualmente l'unica specie attribuita al genere (Dumler *et al.*, 2001). Altri taxa quali *Wolbachia persica*, *Wolbachia popcorn*, *Wolbachia postica* e *Wolbachia trichogramma*, non hanno ancora avuto riconoscimento sistematico ufficiale tanto che c'è ancora molta incertezza nell'attribuire tali taxa al genere *Wolbachia*. *W. postica*, ad esempio, sembrerebbe appartenere al gruppo γ Proteobateri. Pertanto con il termine generico *Wolbachia* faremo riferimento alla specie *Wolbachia pipientis*.

L'analisi ultrastrutturale evidenzia un batterio gram-negativo (Fig. 9), endosimbionte intracellulare. Viene ereditato per via materna e, secondo alcune recenti stime, infetta naturalmente tra il 15 ed il 30% delle specie del Phylum Arthropoda ed alcune specie del Phylum Nematoda (Werren *et al.*, 1995a). Negli artropodi le specie nelle quali è stata riscontrata la presenza di *Wolbachia*, appartengono agli Ordini Isopoda (Classe *Crustacea*), Acari (Classe *Arachnida*), Coleoptera, Diptera, Rynchota, Hymenoptera, Lepidoptera e Orthoptera (Classe *Insecta*) (Bourtzis e O' Neill, 1998).

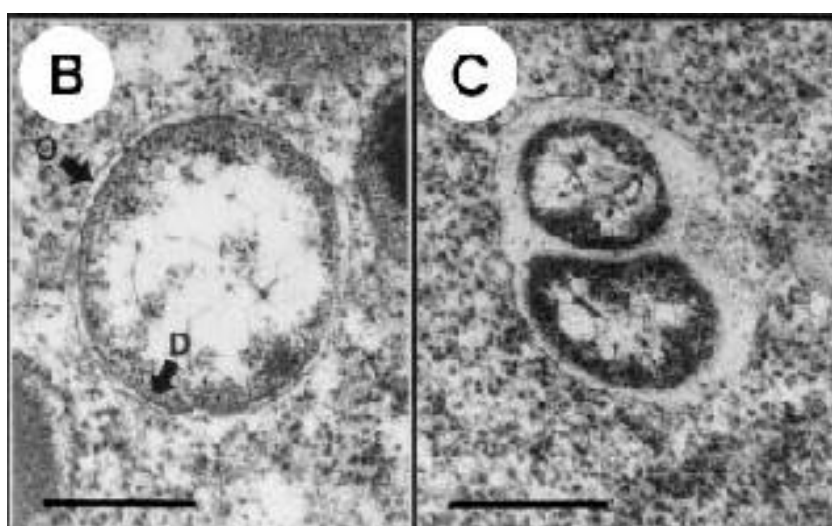


Figura 9: Ultrastruttura di *Wolbachia* con visibile la doppia membrana (Oh *et al.*, 2000)

3.1 FILOGENESI DEL GENERE *WOLBACHIA*

L'analisi ed il sequenziamento del gene che codifica per la subunità ribosomiale 16S (16S rRNA) ha permesso di attribuire *Wolbachia* alla sottodivisione alfa-2 di proteobatteri (Proteobacteria) che costituiscono un gruppo monofiletico strettamente imparentato con *Anaplasma*, *Cowdra*, *Ehrlichia* e *Rickettsia* (Breeuwer *et al.*, 1992; Drancourt e Raoult, 1994). Lo studio filogenetico integrato delle sequenze dei geni 16S rRNA e *ftsZ* (gene che regola il ciclo cellulare) ha portato alla distinzione di quattro super-gruppi (A-D). I super-gruppi A e B contengono *Wolbachia* presente in insetti, acari e crostacei, mentre quelli C e D raggruppano *Wolbachia* di nematodi (Bandi *et al.*, 1998). Tra i due super-gruppi A e B è stata riscontrata una divergenza di sequenza pari al 15 %, mentre all'interno dei super-gruppi questa era rispettivamente del 3% e del 6%. La bassa variabilità all'interno del super-gruppo A suggerisce che frequenti trasferimenti orizzontali devono essere avvenuti abbastanza recentemente (Werren *et al.*, 1995b). Più recentemente è stato identificato e sequenziato, da 28 ceppi diversi di *Wolbachia*, un nuovo gene “*wsp*” codificante per una proteina batterica (outer surface protein) (Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). L'analisi filogenetica di questo terzo gene ha confermato l'esistenza dei due supergruppi principali, A e B, ed inoltre ha consentito una conoscenza più dettagliata dei differenti ceppi di *Wolbachia* con il riconoscimento di 12 sottogruppi prima (Zhou *et al.*, 1998) e 19 successivamente (Van Meer *et al.*, 1999) (Fig. 10). Utilizzando il tasso di sostituzioni sinonime è stato possibile valutare la divergenza tra i due super-gruppi. Ochman e Wilson (1987) hanno stimato che il tasso di evoluzione delle sostituzioni sinonime in alcuni batteri appartenenti al genere *Rickettsia*, è di circa lo 0.8% per milioni di anni. La percentuale di sostituzioni calcolate per due specie appartenenti ai due super-gruppi A e B, rispettivamente *Drosophila simulans* e *Culex pipiens*, risulta essere del 46.6%. Sulla base di questi dati è stato stimato che la divergenza tra A e B è avvenuta circa 58-67 milioni di anni fa. Il profondo interesse per la filogenesi di questo batterio è dettato dalle sue inaspettate caratteristiche: la mancanza di correlazione tra la filogenesi di *Wolbachia* e quella del suo ospite ed il fatto che ceppi di *Wolbachia* filogeneticamente molto vicini possono indurre effetti piuttosto diversi nei loro ospiti

Trasmissione orizzontale. Sebbene *Wolbachia* si trasmetta normalmente per via materna (trasmissione verticale), ci sono alcune evidenze sperimentali che lasciano supporre anche casi di trasferimento tra specie diverse (trasferimento orizzontale) (Rousset *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995b; Schilthuizen e Stouthamer, 1997). Nel

trasferimento orizzontale di *Wolbachia* uno dei fattori che riveste un ruolo chiave è il rapporto intimo che si stabilisce tra organismi di diverse specie quando legati da relazioni trofiche come il parassitoidismo (Health *et al.*, 1999). Secondo gli stessi autori data la ubiquità degli insetti parassitoidi nei vari ecosistemi terrestri e le particolari caratteristiche del loro ciclo vitale, è ragionevole speculare che su tempi molto lunghi il trasferimento orizzontale di *Wolbachia* possa aver avuto un peso molto maggiore di quanto oggi evidenziabile con le analisi filogenetiche disponibili.

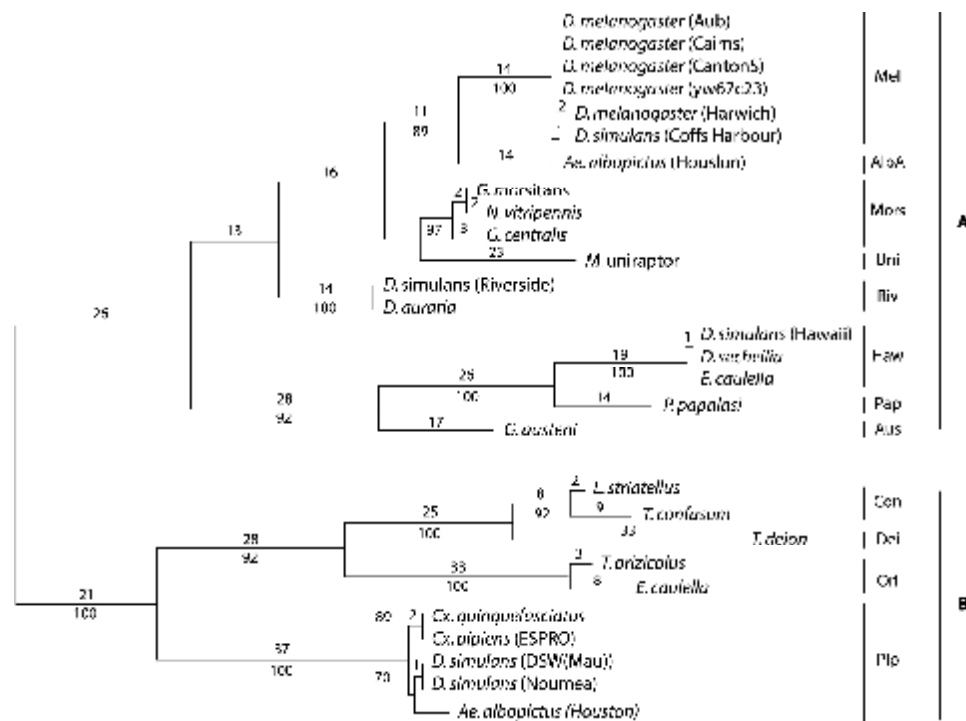


Figura 10: Ricostruzione dell'albero filogenetico di *Wolbachia* in base alle sequenze del gene *wsp*. Accanto al nome della specie di artropode ospite vengono riportati il gruppo ed il Super Gruppo di *Wolbachia*. (Van Meer *et al.*, 1999)

3.2 ALTERAZIONI RIPRODUTTIVE INDOTTE DALLA SIMBIOSI

Il batterio è localizzato principalmente nelle cellule dei tessuti riproduttivi dei suoi ospiti nei quali può determinare alcune alterazioni riproduttive riconducibili a:

- ü Induzione di partenogenesi telitoca
- ü Incompatibilità Citoplasmatica;
- ü Femminizzazione di genotipi maschili;
- ü Morte del genotipo maschile

Anche le cellule della linea somatica possono essere infettate da *Wolbachia* in specie quali *Ae. albopictus*, *Cx. pipiens*, *Drosophila spp.* (Dobson *et al.*, 1999). I tessuti maggiormente interessati alla presenza del batterio sono risultati quello cerebrale, i muscoli, le ghiandole salivari ed i tubi malpighiani.

In tabella 2 si riporta un elenco di specie di artropodi infettate da differenti ceppi di *Wolbachia* con relativa appartenenza al supegruppo A o B e l'alterazione riproduttiva indotta.

Tabella 2: Nomenclatura gruppi di *Wolbachia* e numero di accesso al GeneBank (GB No.). CI= Incompatibilità citoplasmica; F= femminizzazione; Fec=incremento fecondità; P= telitochia; NE= nessun effetto (Van Meer *et al.*, 1999)

Supergroup	Group	<i>Wolbachia</i> host species	Associated <i>Wolbachia</i> strain (reference strain in bold)	Phenotype
A	Mel	<i>D. melanogaster</i> (Aub)	wMel	CI
		<i>D. simulans</i> (Coffs harbour)	wCof	NE
		<i>A. fuscipennis</i>	wFus	T
		<i>D. melanogaster</i> (Harwich)	wMelH	NE
	AlbA	<i>A. albopictus</i> (Houston)	wAlbA	CI
		Mors	<i>G. morsitans</i>	wMors
	<i>N. vitripennis</i>		wVitA	CI
	<i>G. centralis</i>		wCen	?
	<i>C. peregrinus</i>		wPer	T
	Kue	<i>E. kuehniella</i>	wKue	?
		<i>T. kaykai</i> (LC110)	wKayA	T
		<i>T. bourarachae</i>	wBou	Fec
	Riv	<i>D. simulans</i> (Riverside)	wRi	CI
	Uni	<i>M. uniraptor</i>	wUni	T
	Ha	<i>D. sechellia</i>	wHa	CI
		<i>E. cautella</i>	wCauA	CI
	Pap	<i>P. papatasi</i>	wPap	?
	Aus	<i>G. austeni</i>	wAus	?
	Dro	<i>T. drosophilae</i>	wDro	CI
	B	Con	<i>T. confusum</i>	wCon
<i>L. striatellus</i>			wStri	CI
Dei		<i>T. bedeguaris</i>	wBed	T/?
		<i>T. deion</i> (TX)	wDei	T
Sib		<i>T. sibericum</i> (SIB)	wSib	T
Kay		<i>T. kaykai</i> (JT6-3)	wKayB	T
		<i>T. kaykai</i> (LC110)	wKayLC	T
		<i>T. deion</i> (SW 436)	wDeiSW	T
		<i>T. nubilale</i> (234)	wNub	T
Div		<i>A. diversicornis</i>	wDiv	T
For		<i>E. formosa</i>	wFor	T
Ori		<i>T. orizicolus</i>	wOri	CI
		<i>D. rosae</i>	wRos	T/?
		<i>S. fuscipes</i>	wFu	T/?
		<i>E. cautella</i>	wCauB	CI
		<i>E. stauferi</i>	wSta	T/?
		<i>L. australis</i>	wAus	T
		<i>C. pipiens</i> (ESPRO)	wPip	CI
Pip		<i>D. simulans</i> (DSW/MAU)	wMa	-
		<i>A. albopictus</i> (Houston)	wAlbB	CI
Vul	<i>A. vulgare</i>	wVul	F	

Partenogenesi telitoca. Il fenomeno della Partenogenesi indotta da *Wolbachia* rappresenta la perfetta manipolazione della riproduzione dell'ospite in favore esclusivamente del simbionte. Poiché i maschi non trasmettono il batterio, essi rappresentano uno "spreco di risorse". *Wolbachia* permette alle femmine infette di produrre solo prole femminile da uova non fertilizzate attraverso una modifica della prima divisione mitotica (Stouthamer e Kazmer, 1994). L'identificazione esatta di "Wolbachia IP" (ceppo inducente partenogenesi) quale agente responsabile di questa

alterazione riproduttiva è da attribuire a Stouthamer *et al.*, (1990) che, attraverso trattamenti con antibiotici (tetraciclina, rifampicina, ecc.) o esposizioni delle femmine di *Trichogamma* ad alte temperature ($> 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), ottenne la produzione di progenie maschile. Alcuni anni dopo Grenier *et al.*, (1998), microiniettando in uova di *T. dendrolini* (specie a riproduzione biparentale) “*Wolbachia* IP” prelevata da una linea telitoca di *T. pretiosum*, confermarono definitivamente che *Wolbachia* fosse l’agente eziologico inducente la partenogenesi telitoca. Infatti, per la prima volta, furono evidenziati alcuni casi di partenogenesi telitoca anche in *T. dendrolini*.

Analisi cromosomiche citogenetiche in uova non fecondate, prodotte da femmine infettate, indicano che il meccanismo responsabile della ricostituzione di un assetto cromosomico diploide sta nella mancata segregazione dei cromosomi omologhi con la risultante di un nucleo con due set di cromosomi identici. Questo meccanismo è stato riscontrato in *Muscidifurax uniraptor* e *Diplolepis rosae*, specie di parassitoidi entrambe infettate con *Wolbachia* (Stouthamer e Kazmer, 1994).

La femminizzazione è un fenomeno grazie al quale individui geneticamente maschi sono convertiti funzionalmente al sesso femminile dalla presenza di *Wolbachia*. Casi di femminizzazione sono stati riscontrati in isopodi terrestri (*Armadillum vulgare*) (Rigaud e Juchault, 1993) nei quali i maschi sono omogametici (ZZ) e le femmine eterogametiche (WZ). Differentemente da altre specie infettate con *Wolbachia*, in *A. vulgare* il batterio è presente nei tessuti di tutto il corpo. Il livello di eredità materna del batterio è molto alto. Si pensi che le femmine infette producono il 90% di progenie femminile che comprende anche individui geneticamente maschi. Si è anche visto che il trattamento con antibiotici o a temperature $>$ di $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ restaura una proporzione sessi più bilanciata.

Sebbene il meccanismo della femminizzazione non è ancora molto chiaro sembra che sia implicata l’inibizione di geni che controllano lo sviluppo in senso maschile (inibizione ghiandole androgeniche). Inoltre, *Wolbachia* ha una ulteriore azione femminizzatrice che si esplica quando i batteri vengono ad infettare maschi già differenziati. I maschi “infettati artificialmente” vanno incontro a femminizzazione, mostrando un fenotipo intersessuale con aperture genitali femminili nonostante il funzionamento delle ghiandole androgene e la presenza di ormoni maschili siano ancora riscontrabili (Rigaud, 1997).

“Male Killing”. La morte di progenie maschile (male killing) può avvenire o durante lo sviluppo embrionale o essere più tardiva e prende il nome di “male killing”. E’ diretta conseguenza di uno status infettivo della madre legato alla presenza di *Wolbachia* (male killing strain). Tale situazione è riscontrata maggiormente in specie di insetti dove alta è la competizione (ad esempio tra specie sorelle di Lepidotteri) (Hurst *et al.*, 1999). Il significato evolutivo di tale fenomeno si spiega col fatto che la morte di maschi aumenta la sopravvivenza delle femmine, ovvero di ospiti che possano essere infettati dal batterio e favorire la sua trasmissione verticale per via materna.

3.2.1 L’incompatibilità citoplasmatica (IC)

Il fenomeno fu originariamente descritto in zanzare del complesso *Culex pipiens* (Linnaeus) quando fu osservato che popolazioni simpatriche del culicide erano tra loro riproduttivamente isolate (Laven, 1951; 1953; Ghelelovitch, 1952). Tuttavia fu non prima del 1971 che Yen e Barr (1971) riconobbero in *Wolbachia* il fattore eziologico alla base della IC in *Cx. pipiens* ed altre specie di insetti.

La IC indotta da *Wolbachia* determina la morte embrionale in progenie nata da incroci tra individui con un differente status infettivo. Il fenomeno può essere direzionale, allorquando un maschio infetto si incrocia con una femmina non infetta (l’incrocio reciproco è perfettamente fertile) oppure bidirezionale quando un maschio infettato si incrocia con una femmina infettata con un ceppo differente del simbionte (Fig. 11).

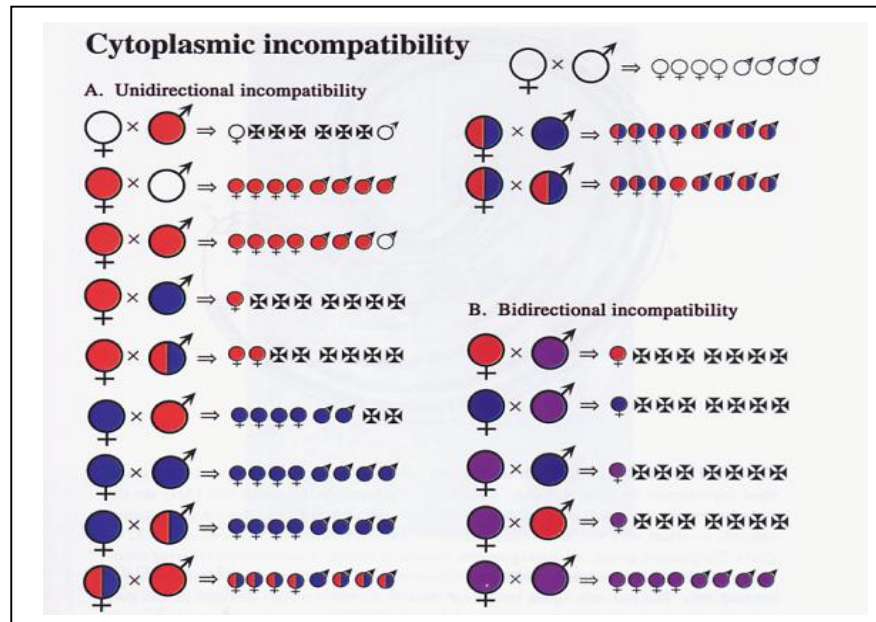


Figura 11: Tipi di incroci relativamente alle infezioni di *Wolbachia*. I colori Blue, Rosso e Violetto indicano differenti citotipi del batterio (Dobson, 2003)

Sebbene il meccanismo della IC non sia stato ancora completamente compreso a livello molecolare, moltissime evidenze genetiche e citogenetiche relative al genere *Drosophila*, suggeriscono che *Wolbachia* modifica i cromosomi paterni durante la spermatogenesi (Presgraves, 2000). Lo spermatozoo maturo poi perderà l'infezione. Le modifiche avvengono durante la fase di sviluppo degli spermatociti e riguardano i processi di divisione mitotica che portano alla perdita di una normale sincronia dei processi di divisione cellulare (Breeuwer e Werren, 1990; Reed e Werren, 1995; Lassy e Karr, 1996; Callaini *et al.*, 1997). Studi eseguiti attraverso tecniche di immunofluorescenza con un anticorpo specifico per l'istone H3 (Tram e Sullivan, 2002) hanno dimostrato in maniera inequivocabile che l'origine della IC è nella dinamica dei processi mitotici dei due pronuclei. Tale anticorpo risulta un eccellente marcatore dei cromosomi mitotici dalla profase alla anafase in embrioni di *D. melanogaster*. Infatti, la fosforilazione dell'istone H3 (PH3) richiede che sia attiva la proteina Cdk1 (cyclin-dependent kinase). L'osservazione di cromosomi marcati in embrioni di controllo, dalla profase all'anafase, ha messo in evidenza una sincronia temporale perfetta nella dinamica di marcatura nei pronuclei maschili e femminile. Di contro, in embrioni nati da incroci incompatibili, il processo di marcatura dei pronuclei si presenta asincrono. In particolare i pronuclei maschili risultano ad un livello di condensazione molto inferiore probabilmente a causa di una ritardata attivazione della Cdk1. La conseguenza di questa mancata sincronia è che durante il processo di allineamento metafasico il set cromosomico paterno, non condensato, segrega in modo

non corretto nell'anafase. Durante la telofase il genoma paterno resta ancora marcato e ciò suggerisce un ritardato inizio della condensazione rispetto al genoma femminile. Questo sembrerebbe essere il meccanismo chiave attraverso il quale si realizza la mortalità embrionale indotta dalla IC (Fig. 12). Probabilmente *Wolbachia* agisce attraverso l'attivazione di un punto di controllo del ciclo cellulare nel pronucleo maschile.

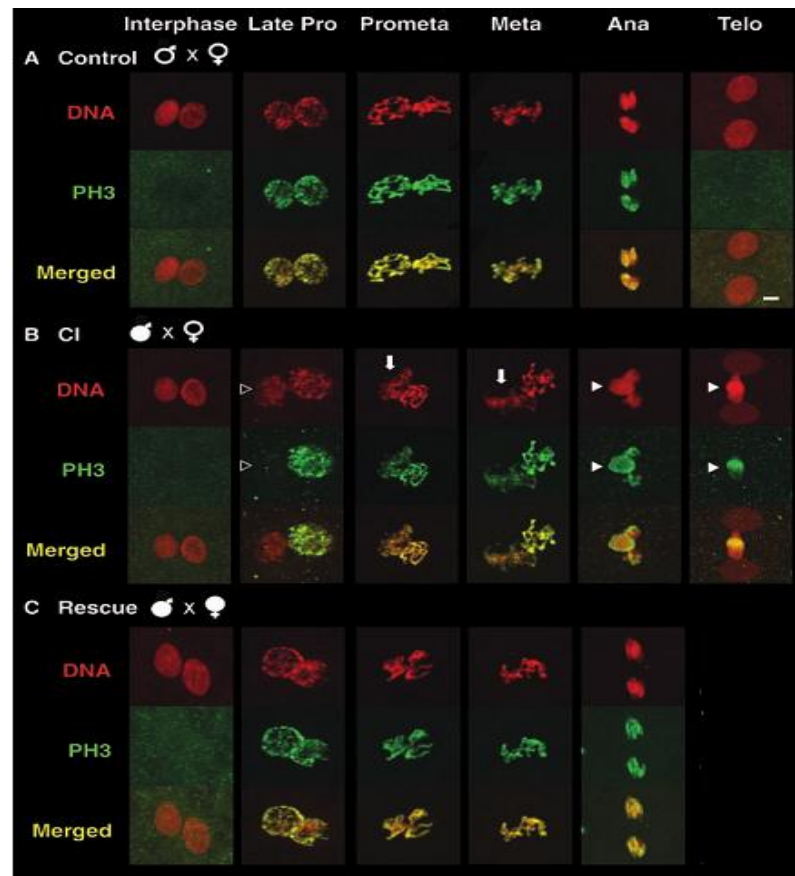


Figura 12: Microscopia confocale: dinamica temporale della fosforilazione dell'istone H3. (A, incroci di controllo; B, incroci incompatibili, C incroci con recupero fertilità. In rosso il DNA; in verde il PH3;). (Tram e Sullivan, 2002).

Nel tentativo di interpretare quanto osservato negli incroci ad elevata IC, molto valido risulta anche il modello proposto da Werren (1997) “mod/resc” che si basa su due distinte funzioni del batterio:

- una funzione modificatrice (mod+) che agisce sulla linea germinale maschile sia attraverso la secrezione di proteine che modificano i cromosomi paterni sia rimuovendo proteine dall'ospite (lo spermatozooto) che sono necessarie per la condensazione e la decondensazione del set paterno di cromosomi nella

fase di formazione dello zigote. Altre modifiche possono riguardare fattori extranucleari della cellula spermatica, quali gli elementi del centromero che sono essenziali per lo sviluppo embrionale. Infatti, in moltissimi animali gli elementi del centrosoma paterno debbono combinarsi con quelli del centrosoma materno per formare il centro di organizzazione microtubulare dello zigote e consentire un normale processo di apposizione e segregazione dei set cromosomici paterno e materno.

- Ü l'altra funzione di recupero (resc+) avviene nell'uovo infetto e probabilmente riguarda la secrezione di fattori modificatori nell'uovo che consentono la neutralizzazione delle modifiche avvenute nella linea paterna. Attualmente studi a livello molecolare sono in corso per identificare le proteine coinvolte nel processo mod/resc. (Sasaki *et al.*, 1998; Braig *et al.*, 1998; Harris e Braig, 2001).

Le funzioni “mod –resc” vengono oggi caratterizzate attraverso un certo numero di proprietà che devono spiegare qualsiasi ipotesi che le riguarda come fenomeno molecolare non ancora conosciuto. Charlat *et al.* (2001; 2002) prendono in considerazione cinque proprietà:

1. L'intensità del meccanismo mod è molto variabile ed infatti i livelli di modificazione cromosomica paterna, espressi come mortalità zigotica in incroci incompatibili, varia da 0 a 100% (Poinsot *et al.*, 1998). Evidenze sperimentali suggeriscono che sia *Wolbachia* che determinati fattori presenti nell'ospite entrano in gioco nel determinare i livelli di intensità del processo modificativo. Anche la densità di *Wolbachia* nell'ospite gioca un ruolo molto importante (Boyle *et al.*, 1993; Sinkins *et al.*, 1995b; Giordano *et al.*, 1997; Poinsot *et al.*, 1998; Poinsot e Mercot, 1999; Veneti *et al.*, 2003);
2. I fattori “mod” e “resc” interagiscono in maniera altamente specifica. Il fenomeno della IC bidirezionale conferma questa conclusione. I dati attualmente a disposizione sull'esito di incroci sperimentali indicano inequivocabilmente che qualsiasi ceppo di *Wolbachia* è pienamente compatibile solo con se stesso. Questo implica uno specifico riconoscimento tra i differenti fattori “mod” e “resc” (O' Neill e Karr, 1990; Braig *et al.*, 1994). D'altra parte in incroci che riguardano individui portatori di infezioni

multiple si possono avere livelli totali o parziali di riconoscimento dei fattori mod /resc (Merçot *et al.*, 1995; Sinkins *et al.*, 1995a; Perrot-Minnot *et al.*, 1996; Poinso *et al.*, 1998; Rousset *et al.*, 1999);

3. I fattori “mod” e “resc” sono funzioni distinte del batterio. La scoperta di un ceppo di *Wolbachia* incapace di indurre IC, ma in grado di neutralizzare la IC indotta da altri ceppi, suggerì l’ipotesi che le funzioni di modificazione e recupero fossero distinte ed indipendenti. (Bourtzis *et al.*, 1998). In conseguenza di questa scoperta si può ipotizzare l’esistenza di quattro tipi di *Wolbachia*:

a) un tipo “**mod+ resc+**” che può provocare alterazioni tali da indurre IC, ma al tempo stesso neutralizzare queste alterazioni ristabilendo condizioni di piena compatibilità. Ad esempio, in *Drosophila simulans* sono stati riportati tre differenti citotipi “mod+”, “resc+” (*w*Ri, *w*Ha, e *w*No) (Hoffman *et al.*, 1986; O’Neill e Karr, 1990; Braig *et al.*, 1994; Merçot *et al.*, 1995), mentre in *D. melanogaster* ne è stato riscontrato soltanto uno (*w*Mel) (Hoffman, 1988; Hoffman *et al.*, 1994; Bourtzis *et al.*, 1994; 1996;1998; Reynolds e Hoffman, 2002; Weeks *et al.*, 2002);

b) il tipo “**mod/ resc**” che è incapace di indurre IC e recuperare le modificazioni inducenti IC causate da altri ceppi “mod+”. Un ceppo del genere è stato ritrovato sempre in *D. simulans* (*w*Cof) (Hoffman *et al.*, 1996);

c) il tipo “**mod+/ resc**” può indurre IC, ma non è in grado di neutralizzare i suoi stessi effetti. Questo tipo risulta autodistruttivo e non è stato mai rinvenuto né in popolazioni di campo né in laboratorio. Tuttavia Charlat *et al.*, (2001) ritengono che un polimorfismo stabile (tra varianti mod e resc) potrebbe essere mantenuto in popolazioni naturali, permettendo l’esistenza a lungo termine anche di ceppi di *Wolbachia* autodistruttivi;

d) il tipo “**mod/ resc +**” di cui già abbiamo accennato in precedenza è presente nel ceppo *w*Ma di *D. simulans* e *D. mauritania* e riesce a ristabilire condizioni di compatibilità con le modificazioni indotte da *w*No (Bourtzis *et al.*, 1998; Merçot e Poinso, 1998).

4. Approfondimenti condotti sull’associazione simbiotica *Wolbachia-Drosophila spp.* e la IC osservata nelle popolazioni delle due specie sorelle *D. melanogaster* e *D. simulans* hanno evidenziato che sostanzialmente i livelli di

IC sono la risultante di tre principali fattori: un genotipo di tipo "mod+" in *Wolbachia*, alti livelli di presenza del batterio specificatamente nelle cisti spermatiche, ed un notevole livello di recettività all'infezione da parte dell'ospite (Clark *et al.*, 2003).

5. La funzione "mod" altera il comportamento mitotico dei cromosomi paterni dopo la fecondazione. Studi citologici hanno infatti dimostrato che *Wolbachia* distrugge i meccanismi cinetici di condensazione-decondensazione dei pronuclei durante la fecondazione.

Recenti sviluppi nello studio della genomica e della proteomica di *Wolbachia*, che ha portato al sequenziamento del genoma di *Wolbachia* in *D. melanogaster* (Wu *et al.*, 2004), suggeriscono che nel meccanismo della IC possano essere coinvolti anche geni batteriofagici o geni codificanti proteine contenenti domini "ankyrin repeat" (Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2005). Tali geni sono generalmente presenti ed espressi nelle cellule eucariotiche, ma da studi eseguiti su ceppi di *Wolbachia* inducenti alti livelli di IC in *Cx. pipiens*, sono stati riscontrati alti livelli di espressione di queste proteine che potrebbero svolgere la funzione di potenziali mediatori proteici dell'associazione simbiotica.

L'incompatibilità tra maschi infetti di una popolazione e femmine non infette di un'altra popolazione (incompatibilità unidirezionale) può ridurre il flusso genico in una direzione. Il batterio agisce quindi come una barriera pre-zigotica. *Wolbachia*, così facendo, incrementa la divergenza genetica e riduce il tasso di migrazione tra popolazioni. I batteri, inducendo CI, hanno così il potenziale per agire come un agente che provoca speciazione e per questo sono anche denominati agenti di "speciazione infettiva" (Charlat *et al.*, 2003). Pertanto, quando si intraprendono studi di genetica di popolazione e di genetica evolutiva particolare attenzione deve essere rivolta non solo all'effetto della selezione e ai vari processi demografici (colli di bottiglia, espansioni) che agiscono in una popolazione nel corso del tempo, ma devono essere presi in esame anche i possibili effetti che un batterio come *Wolbachia* può avere sugli ospiti ("selective sweep" e speciazione) (Werren *et al.*, 1995b).

3.3 PARAMETRI DI INFEZIONE E DIFFUSIONE DI *WOLBACHIA*

Sino ad oggi gli studi sulla diffusione di *Wolbachia* in popolazioni di insetti sono stati condotti in laboratorio, prevalentemente su specie modello quali *Drosophila simulans* (Turelli e Hoffman, 1991) ed in misura ridotta su *Laodephalx striatellus* (Hoshizaki e Shimada 1995) attraverso un approccio di tipo modellistico (Hoffman e Turelli, 1997; Dobson *et al.*, 2002a; 2002b; Telschow *et al.*, 2002). I modelli multipli che sono stati sviluppati per la simulazione della dinamica di infezione di ceppi di *Wolbachia* inducenti IC, si basano essenzialmente su tre parametri chiave dell'infezione: l'efficienza della trasmissione materna (verticale), il livello di IC, ed il costo/beneficio biologico dello stato infettivo (effetti negativi o positivi del batterio sulla "fitness" biologica dell'ospite).

Non c'è alcun dubbio però che il sistema infettivo multiplo che caratterizza il rapporto simbiotico *Wolbachia-Ae. albopictus* costituisca un sistema molto utile per lo studio della IC e della dinamica di diffusione del batterio. Dagli studi pubblicati sino ad oggi, relativi ad aree di campionamento degli USA, del Sud-America, del Giappone e del Sud Est Asiatico, risulta che questa zanzara è coinfectata da due differenti citotipi di *Wolbachia*: il tipo *wAlb A* ed il tipo *wAlb B* (Armbruster *et al.*, 2003). Tuttavia mentre ci sono segnalazioni di individui riscontrati con singola infezione di tipo *wAlb A* (O'Neill e Karr, 1990; Kambhampati *et al.*, 1993; Sinkins *et al.*, 1995b; Otsuka e Takaoka, 1997) non risultano a tutt'oggi ancora riscontrati individui con infezioni singoli *wAlb B* (Dobson *et al.*, 2001). Tuttavia il quadro del "pattern" geografico di distribuzione dell'infezione in *Ae. albopictus*, che si riesce a costruire in base ai dati disponibili, è ancora piuttosto frammentario e necessita dell'analisi di nuovi campioni di popolazioni provenienti sia dalle aree del range nativo che dalle aree di recente colonizzazione.

Secondo quanto osservato da Dobson *et al.*, (2004), in *Ae. albopictus* lo status infettivo si associa ad un significativo incremento della "fitness" delle femmine. Femmine singolarmente o superinfettate risultano infatti più longeve, hanno una maggiore fecondità cui si associa un più elevata vitalità delle uova deposte, rispetto a femmine nelle quali l'infezione è stata rimossa con trattamento antibiotico. Contrariamente a quanto avvenuto per le femmine, lo studio degli effetti dell'infezione sui parametri di "fitness" dei maschi non è stato eseguito con lo stesso approfondimento, limitando le osservazioni al solo parametro della longevità. In considerazione dell'importanza del sesso maschile nell'attuazione di programmi di lotta

autocida, non c'è dubbio che l'argomento necessiti di ulteriori approfondimenti, in particolare per gli effetti della simbiosi sulla competitività sessuale del maschio.

Studi mirati a definire un ruolo distinto dei due ceppi di *Wolbachia* (*wAlb A* e *wAlb B*) in rapporto alla determinazione dei parametri di infezione in *Ae. albopictus*, hanno messo in evidenza una minore efficienza di trasmissione verticale del ceppo *wAlb A* (Kytayapong *et al.*, 2002); inoltre, aspetto questo non secondario, gli stessi autori, disponendo di una linea singolarmente infettata con *wAlb A* hanno riscontrato un lieve effetto dell'invecchiamento maschile sulla diminuzione della IC, aspetto questo non riscontrato in linee super infettate.

Gli studi di Xi *et al.* (2005a) su linee artificiali singolarmente infettate con *wAlb B*, confermano la capacità di indurre IC da parte di questo ceppo e confermano quanto riscontrato da Dutton e Sinkins (2004), ovvero valori di densità batterica inferiori per *wAlb A* rispetto a *wAlb B* in individui di *Ae. albopictus* sviluppati da larve allevate in condizioni di stress.

L'argomento è lungi comunque dall'essere stato esaurito e sicuramente merita ulteriori studi ed approfondimenti. Resta molto interessante l'idea di un'azione sinergica dei due ceppi del batterio, quale chiave vincente del successo coevolutivo di questa simbiosi.

Dinamica dell'infezione. L'azione combinata della IC con l'incremento di "fitness" che si associa allo status infettivo può abbassare notevolmente la "soglia minima di frequenza di individui infetti" (SMF) necessaria per avviare un processo di "ricambio di popolazione (population replacement)" di popolazioni non infette da parte di quelle infette.

Tanto per rimanere nella trattazione specifica del caso *Ae. albopictus*, "alti livelli della "velocità di ricambio" sono prevedibili quando popolazioni sia singolarmente sia multi-infettate (entrambi avvantaggiate in termini di "fitness") invadono popolazioni non infette (svantaggiate); di contro, una maggiore SMF di individui infetti ed una più bassa "velocità di sostituzione" è ipotizzabile nel caso in cui una popolazione doppiamente o triplo-infettata invade rispettivamente una popolazione singolarmente o doppiamente infettata (Tab. 3). In questo caso il fattore chiave, che determina l'invasione e la sostituzione, può non essere la diversa "fitness", ma soltanto l'espressione della IC al 100%.

Tabella 3. Esempio di incroci possibili quando una popolazione triplo infettata invade una popolazione superinfettata		
♀♀	♂♂	Accoppiamento
ABC	ABC	Fertile
ABC	AB	Fertile
AB	AB	Fertile
AB	ABC	Incompatibile

La SMF necessaria affinché individui portatori di *Wolbachia* possano fissarsi nella popolazione è un aspetto rilevante per l'evoluzione dei rapporti simbiotici del batterio e per la distribuzione geografica delle infezioni.

Tra i meccanismi ipotizzati per l'introduzione di *Wolbachia* in una nuova popolazione non infettata, c'è anche il trasferimento interspecifico. Tuttavia come abbiamo già trattato (cfr. par. 3.1), sulla base di studi filogenetici compiuti su *Wolbachia* in insetti è emerso che i casi accertati di trasferimento orizzontale naturale sono estremamente rari e difficilmente prevedibili. (O' Neill *et al.*, 1992; Rousset *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995b; Zhou *et al.*, 1998; Vavre *et al.*, 1999).

In considerazione di quanto riportato si possono ipotizzare due eventi iniziali per interpretare l'attuale quadro simbiotico che lega *Wolbachia* ed *Ae. albopictus*. Un iniziale abbassamento della SMF, può essersi verificata attraverso l'incremento selettivo della "fitness" in quei pochi individui infettati accidentalmente per via orizzontale. Questo potrebbe aver facilitato l'inizio di invasione di *Wolbachia* in *Ae. albopictus*. In alternativa si può anche ipotizzare che il vantaggio riproduttivo acquisito da femmine infettate si sia evoluto successivamente al processo di infezione iniziale ed invasione.

Una SMF più alta è sicuramente necessaria per l'innesco del processo di invasione di una popolazione di *Ae. albopictus* multi-infettata ($wAlb A + wAlb B$) in una singolarmente infettata ($wAlb A$). Tale ipotesi può trovare supporto nell'attuale distribuzione geografica delle infezioni naturali di *Wolbachia* nelle popolazioni naturali della zanzara tigre.

Popolazioni super infettate sono state riscontrate in Giappone, India, America, Malaysia, Europa (Kambhampati *et al.*, 1993; Otsuka e Takaoka, 1997; Kittayapong *et al.*, 2000). Di contro popolazioni singolarmente infettate sono state riscontrate solamente in isole geograficamente separate fisicamente dalle popolazioni

superinfettate (Isole di Koh Samui e Mauritius) (Kambhampati *et al.*, 1993; Sinkins *et al.*, 1995b; Kittayapong *et al.*, 2000; Dobson *et al.*, 2001). In queste isole è probabile che i tassi di presenza di individui superinfetti siano ancora al disotto della SMF necessaria per avviare il processo di fissazione della doppia infezione. E' però facile ipotizzare che i tassi di immigrazione di individui superinfetti dalla terraferma alle isole vadano via via crescendo con il traffico legato alle attività umane e che quanto prima anche nelle isole sopra menzionate la doppia infezione sostituisca la singola.

3.4 *WOLBACHIA* E CONTROLLO DI ORGANISMI DANNOSI

Lo sviluppo di nuove strategie di lotta ad organismi di interesse agrario, medico e veterinario, basate su nuovi sistemi biologici, è oggi un tema di grande interesse ed attualità in relazione ai problemi di ordine ambientale e sanitario implicati nell'uso massiccio di pesticidi.

Relativamente alle potenzialità applicative delle strategie di lotta biologica basate sullo sfruttamento dei fenomeni indotti dal rapporto simbiotico tra *Wolbachia* ed il suo ospite, focalizzeremo la nostra attenzione essenzialmente su due fenomeni *Wolbachia*-dipendenti ritenuti i più importanti: 1. l'induzione della partenogenesi telitoca; 2. l'induzione della IC.

Nel successivo paragrafo tratteremo, con il necessario approfondimento, il secondo dei due aspetti, dal momento che il presente lavoro di tesi si occupa ampiamente dello studio della IC in rapporto allo sviluppo di strategie di lotta ad insetti nocivi. Mi preme ora accennare brevemente al primo aspetto che si può ritenere di grandi prospettive applicative nell'ambito della lotta biologica classica con il rilascio di parassitoidi.

Gran parte delle specie di parassitoidi utilizzate in lotta biologica appartengono all'ordine Hymenoptera. Tali specie si riproducono per partenogenesi arrenotoca. Lo sviluppo virginale delle uova riguarda solamente quelle non fecondate che hanno un corredo cromosomico aploide e daranno vita a maschi. Attraverso la messa a punto preliminare di tecniche di infezione artificiale (Marnix *et al.*, 1999b) si possono infettare gli embrioni di queste specie aplo-diploidi con lo scopo di indurre lo sviluppo virginale di uova diploidi e la creazione di linee partenogenetiche che avrebbero certamente costi di mantenimento inferiori rispetto alle linee biparentali. La sola presenza del sesso femminile garantirebbe maggiori tassi di accrescimento

popolazionistico in campo e quindi una maggiore efficienza nel controllo biologico. (Stouthamer, 1993) L'Imenottero afelinide *Encarsia formosa* è uno degli esempi di parassitoidi, la cui riproduzione partenogenetica uniparentale è indotta naturalmente da *Wolbachia*. E' stato evidenziato che in alcuni contesti agro-climatici particolari quali le colture protette, in cui *E. formosa* viene utilizzata per controllare *Bemisia tabaci* (Rynchota: Homoptera), le sue performances di agente biologico di controllo risultano nettamente superiori a quelli di *Eretmocerus mundus* (Hymenoptera: Apelinidae) specie arrenotoca considerata il parassitoide primario di *B. tabaci* in natura (Moretti e Calvitti, 2004)

Occorre comunque sottolineare che allo stato attuale delle ricerche c'è ancora molto da lavorare sia per quel che concerne la messa a punto di protocolli per il trasferimento artificiale di *Wolbachia* da specie infette a specie che ne sono prive in natura, sia nella scelta dei ceppi di *Wolbachia* più idonei per la induzione della partenogenesi e nella stabilizzazione delle infezioni prodotte.

3.4.1 L'incompatibilità citoplasmatica e controllo autocida

Abbiamo già accennato (cfr. par. 3.2.1) che il fenomeno della Incompatibilità Citoplasmatica (IC) fu originariamente scoperto nella zanzara *Cx. pipiens* grazie all'osservazione di popolazioni tra loro riproduttivamente isolate da meccanismi post-copula (Laven, 1951; 1953; Ghelelovitch, 1952).

La possibilità di sfruttare questa forma di sterilità naturale, nei programmi di lotta autocida (Laven, 1967; Sharma *et al.*, 1979; Arunachalam e Curtis, 1985) garantisce in linea teorica una migliore conservazione della originale competitività sessuale nei maschi incompatibili che non devono essere sottoposti ad alcuna radiazione ionizzante o comunque, se lo devono essere, a dosi più basse. Nelle zanzare è noto, infatti, che il trattamento radiosterilizzante, anche se effettuato sullo stadio di pupa matura può causare significative riduzioni della competitività sessuale nei maschi che sfarfalleranno. Questo fu dimostrato da Smittle *et al.* (1968) su *Culex spp.* e successivamente anche su *Anopheles spp.* (Andreasen e Curtis, 2005). D'altra parte irraggiare direttamente di milioni di adulti sembra piuttosto complicato sia in termini tecnici che economici.

Il meccanismo di azione della Incompatible Insect Technique (IIT.) (Bourtzis e Robinson, 2006) si basa sugli stessi principi applicativi del SIT convenzionale (cfr. par. 2.2.2) con la differenza, molto importante, che il rilascio accidentale di femmine infette deve essere evitato soprattutto quando la popolazione target è costituita da individui non infetti. Le femmine infette lanciate sarebbero infatti compatibili con i maschi non infetti della popolazione target, e sarebbero pertanto in grado di generare nuove colonie di infetti che possono sostituire le popolazioni native (Bourtzis e Robinson, 2006).

Incompatibilità Citoplasmatica nella lotta contro *Ae. albopictus*. Le prove di campo condotte nel Burma (India) con il supporto dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità, che l'applicazione della IC dimostrarono che attraverso il rilascio di "mating types" incompatibili poteva rappresentare una utile strategia per l'eradicazione di zanzare del genere *Culex* da alcuni villaggi indiani (Fig. 13).

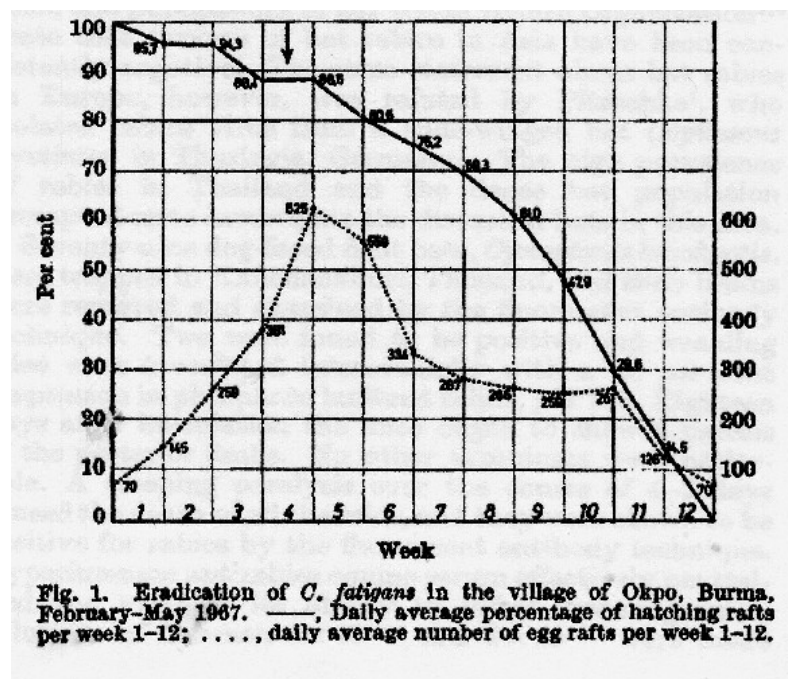


Figura 13: Dati originali sull'eradicazione di *Cx. pipiens fatigans* (Laven, 1967)

Sebbene le prove ebbero successo nelle specifiche condizioni sperimentali delle aree trattate, gli elevati livelli di densità delle popolazioni di zanzara, i tassi riproduttivi molto alti e soprattutto il fatto che le popolazioni fossero estese su vastissime aree, ben presto convinsero l'opinione scientifica che l'approccio di lotta autocida su limitate aree locali fosse inefficiente nel medio termine. D'altro canto l'organizzazione di

programmi di lotta autocida su vaste aree poteva risultare estremamente dispendiosa in termini economici.

Le caratteristiche biologiche ed ecologiche delle specie “target” rappresentano un fattore chiave nel successo della lotta genetica. Alti tassi riproduttivi sicuramente giocano un ruolo sfavorevole così come la vasta estensione delle popolazioni, l’elevata capacità dispersiva di maschi e femmine adulte. Se elevati tassi riproduttivi sono una caratteristica che accomuna gran parte delle zanzare, per quanto riguarda la struttura delle popolazioni, la capacità dispersiva degli adulti, ci sono importanti differenze che possono giocare un ruolo fondamentale nella scelta delle strategie di controllo. Nel precedente paragrafo abbiamo visto come una bassa capacità dispersiva, distribuzione delle popolazioni in isolati urbani, una struttura genetica omogenea, sono aspetti che per la zanzara *Ae albopictus* risultano favorevoli ad un approccio autocida di lotta.

Oggi sappiamo che l’agente responsabile della IC in *Cx. pipiens*, *Ae. albopictus* ed altre specie di insetti è il batterio *W. pipientis*. Negli ultimi venti anni l’interesse di biologi verso lo studio di questo batterio simbiote è aumentato considerevolmente, come evidenziato nel grafico di figura 14, grazie anche al contributo delle sempre più avanzate tecniche di biologia molecolare ed alle prospettive di impiego nel controllo biologico.

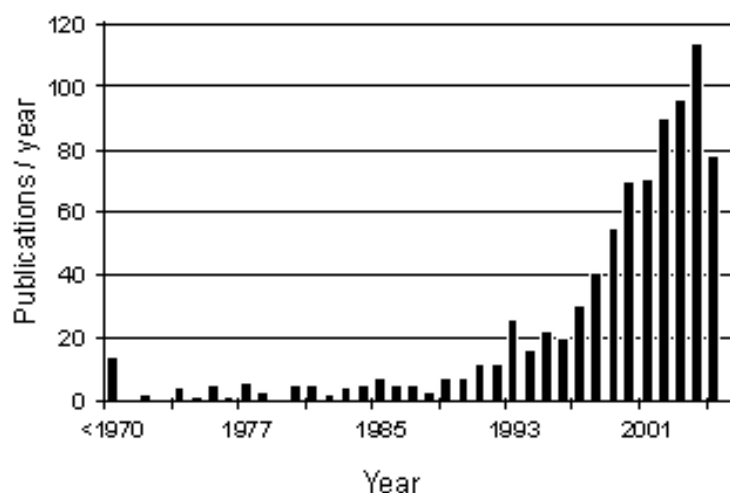


Figura 14. Numero annuale di pubblicazioni originali “peer reviewed” inerenti *Wolbachia* (Floate *et al.*, 2006)

Gli studi di laboratorio e le modellizzazioni teoriche sulla dinamica di invasione e “ricambio di popolazione” da parte di popolazioni infette (cfr. par. 3.3) hanno messo in evidenza che *Wolbachia* potrebbe anche rappresentare un vettore ideale di geni utili per

il controllo di organismi indesiderati (geni soppressori della virulenza). Ciò ha da una parte promosso le ricerche nel campo della biologia molecolare del batterio finalizzate alla sua trasformazione genetica (fino ad oggi senza successo) dall'altra ha anche promosso lo studio e la messa a punto di tecniche per il trasferimento artificiale di *Wolbachia* in specie che in natura ne sono prive oppure di ceppi diversi di quelli che infettano naturalmente la popolazione. Le tecniche si basano generalmente sull'impiego di micromanpolatori e microniettori (Santamaria, 1987).

Con la messa a punto dei protocolli di "transinfezione" è stato possibile produrre in laboratorio popolazioni di insetti con uno stato infettivo non osservato in natura (Boyle *et al.*, 1993; Braig *et al.*, 1994; Marnix *et al.*, 1999a; Marnix *et al.*, 1999b; Poinot *et al.*, 1998; Sasaki e Ishikawa, 2000; Riegler *et al.*, 2004; Xi e Dobson 2005).

Un progetto di ricerca che merita particolare attenzione è quello che è in corso di svolgimento presso le Università di Eraclion e Ioannina in Grecia, in cooperazione con FAO-IAEA. Sono state prodotte alcune linee trans-infettate di *Ceratitis capitata* con *Wolbachia* prelevata da popolazioni di *Rhagoletis cerasi* (Zabalou *et al.*, 2004). I livelli di IC riscontrati in incroci di laboratorio sono estremamente interessanti ed aprono prospettive assolutamente nuove per l'uso della IC, sia da sola, che in integrazione con l'irraggiamento, nell'ambito dei progetti su larga scala di lotta autocida alla mosca mediterranea della frutta.

Ancora più recentemente il gruppo americano di ricerca guidato dal Prof. S. Dobson (Università del Kentucky-USA) ha transinfettato, con *Wolbachia* prelevata da *Ae. albopictus*, embrioni di *Ae. aegypti*, culicide in natura privo di *Wolbachia* (Xi *et al.*, 2005b).

Inoltre sempre lo stesso gruppo ha già esplorato con successo la possibilità di creare, in *Ae. albopictus*, infezioni singole con *Wolbachia* proveniente da *D. simulans* (Xi *et al.*, 2006), non ottenendo tuttavia parametri di infezione utilizzabili ai fini applicativi.

Ma quali sono i vantaggi che ci aspettiamo da un approccio di lotta basato sulla IC?

Innanzitutto c'è da considerare, a vantaggio della strategia IIT, che l'insetto che deve essere liberato è sterile per proprietà naturali, e non deve essere oggetto di alcun trattamento con radiazioni ionizzanti. Questo aspetto, oltre a significare una riduzione dell'impatto negativo delle varie fasi del processo irradiativo (continue manipolazioni) sulla qualità dell'insetto, abbassa i costi di gestione soprattutto per programmi di lotta

autocida su vastissima scala: un conto è allevare insetti, doverli sterilizzare e poi lanciarli, un conto è allevarli e poterli lanciare direttamente.

Ma allo stato attuale delle conoscenze, c'è ancora molto da approfondire soprattutto per quel che concerne la stabilità delle nuove associazioni simbiotiche e gli effetti che queste possono avere sulle caratteristiche biologiche e comportamentali dei maschi nati da embrioni trans-infettati. Inoltre bisogna ricordare che uno dei punti fondamentali dell'applicazione della IC (soprattutto quando la popolazione da controllare è aposimbiontica) è che siano rilasciati solamente maschi. Purtroppo non sempre sono disponibili adeguati sistemi di separazione dei sessi. In tali casi comunque è ipotizzabile un irraggiamento a dosi sterilizzanti per le femmine e substerilizzanti per i maschi. E' stato dimostrato che irraggiamenti a bassi dosaggi (40-50 Gy) possono rendere completamente sterili le femmine e mantenere i maschi incompatibili perfettamente competitivi (Sharma *et al.*, 1979; Arunachalam e Curtis, 1985; Shahid e Curtis, 1987)

Comunque la reale possibilità di creare in laboratorio popolazioni di insetti portatori di ceppi di *Wolbachia* incompatibili con quelli della popolazione selvatica, riapre prepotentemente le possibilità applicative della IIT. Ovviamente il massimo sforzo di ricerca deve essere orientato verso la conoscenza della distribuzione di *Wolbachia* e delle sue varianti citotipiche, nonché alla messa a punto di protocolli che consentano il trasferimento di *Wolbachia*, la stabilità delle nuove linee simbiotiche ed adeguati livelli di espressione della IC unidirezionale (nel caso di popolazioni da controllare non infettate) o bidirezionale (nel caso di popolazioni da controllare infettate naturalmente).

Altre strategie di sfruttamento della IC: “il ricambio di popolazione”. In considerazione sia del forte scetticismo che parte della comunità scientifica ha sempre espresso nei confronti della lotta genetica basata sulla SIT in generale, che del recente sviluppo della biologia molecolare, l'interesse sull'uso applicato della IC si è andato spostando da originari obiettivi di eradicazione, o controllo, ad obiettivi di “sostituzione di popolazione”. Abbiamo già discusso (cfr. pag. 3.3) su quali sono i meccanismi che possono portare ad un vero e proprio ricambio popolazionistico (“guida” citoplasmatica). Una importante ricaduta di questa strategia potrebbe essere quella di utilizzare *Wolbachia* quale vettore di nuovi geni all'interno della popolazione bersaglio. (Curtis 1992; Turelli e Hoffmann 1999; Sinkins e O' Neill, 2000) . Piuttosto che

allevare massalmente e rilasciare in campo insetti transgenici che possano sostituire le popolazioni native, attraverso semplice diluizione, con il la “sostituzione di popolazione” indotta da *Wolbachia* è possibile diffondere e fissare nella popolazione selvatica geni desiderati (ad esempio geni che conferiscono refrattarietà alla trasmissione di patogeni) semplicemente sfruttando il fenomeno del “cytoplasmic drive”.

C'è ancora molto da studiare sulla dinamica del “cytoplasmic drive” e l'approccio che si sta seguendo è soprattutto quello matematico-modellistico.

Comunque ad oggi non si è ancora riusciti a trasformare geneticamente *Wolbachia* e pertanto anche se sono stati messi a punto con successo vari metodi per il trasferimento artificiale di *Wolbachia* da specie a specie, questa strategia non è stata ancora applicata.

3.4.2 Rischi connessi con la manipolazione delle simbiosi

Una trattazione a parte meritano alcune riflessioni sui rischi biologici ed ambientali legati al trasferimento orizzontale-artificiale di *Wolbachia* ed il rilascio nell'ambiente di nuove popolazioni portatrici dell'infezione. Senza alcun dubbio, fin tanto che *Wolbachia* non sarà geneticamente modificata (paratransgenesi), i rischi sono essenzialmente limitati alla diffusione di ceppi del batterio in aree geografiche diverse da quelle di origine con possibili effetti su specie non bersaglio.

Premesso che sarebbe opportuno transinfettare una popolazione ospite con *Wolbachia* presente nella stessa area geografica, bisogna considerare che maggiore è la presenza nell'ambiente di popolazioni infettate (sia naturalmente che artificialmente) maggiori sono le probabilità che il passaggio di *Wolbachia* in specie non bersaglio possa avvenire.

Ad oggi un solo caso di accertato trasferimento orizzontale è stato riportato in letteratura (Huigens *et al.*, 2004) e riguarda un caso di endo-parassitoidismo da parte del genere *Trichogramma* ooparassitoide di Lepidotteri. In genere le barriere che si oppongono al trasferimento orizzontale sono molto efficaci. *Wolbachia*, infatti, si trova relegata all'interno di vacuoli intracellulari e l'infezione si propaga citoplasmaticamente dalla madre alla progenie. Casi di trasferimento orizzontale sono rari e possibili soltanto quando la *Wolbachia* presente nelle cellule dell'ospite viene in

contatto, è incorporata e riesce a sopravvivere nell'ambiente endocellulare del nuovo ospite. Ma non basta, l'infezione persiste se il nuovo individuo infettato è una femmina e se l'infezione riguarda la linea germinale ad una densità batterica tale da consentire la trasmissione verticale. Tali condizioni sono più realizzabili nei rapporti intimi che si creano, ad esempio, nel parassitismo protelico tra una specie infetta ed una non infetta.

Per quanto attiene la specie *Ae. albopictus*, essendo superinfettata e presentando le femmine infette evidenti vantaggi in termini di "fitness", è assai probabile che femmine appartenenti a ceppi mono-infettati artificialmente con un ceppo esogeno di *Wolbachia*, accidentalmente rilasciati nell'ambiente, abbiano una bassissima probabilità di successo nei confronti delle femmine selvatiche infettate con *wAlbA* e *wAlb B*.

MATERIALI E METODI

4. DISTRIBUZIONE DELL'INFEZIONE DI *WOLBACHIA* IN *AE. ALBOPICTUS*

Al fine di integrare con nuove osservazioni il quadro conoscitivo del “pattern” di distribuzione dell'infezione di *Wolbachia* in *Ae. albopictus*, sono stati reperiti diversi campioni di popolazioni, da tutti i continenti (Fig. 15) per le analisi dello status infettivo.

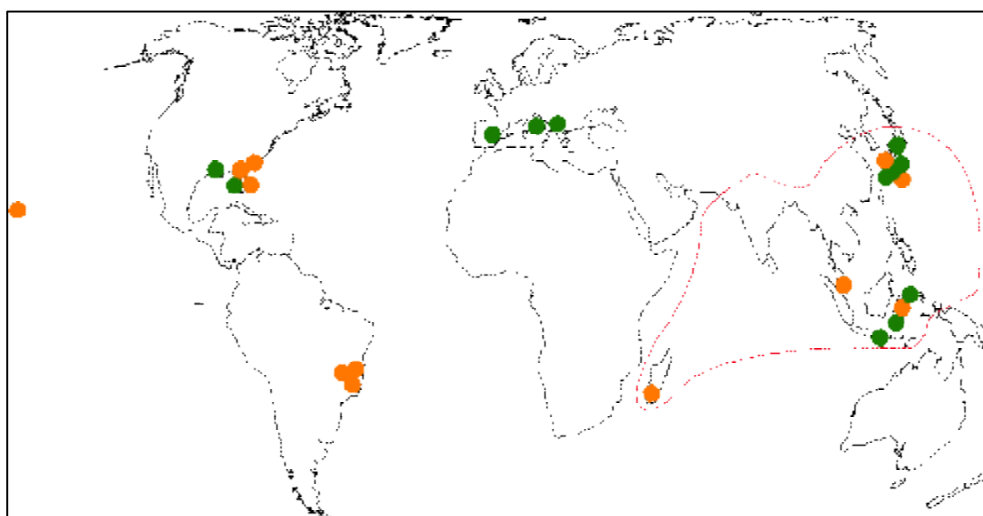


Figura 15. Distribuzione dei siti di raccolta dei campioni di *Ae. albopictus* analizzati (all'interno dell'area delimitata, i campioni del range nativo- In arancio i campioni già analizzati (Armbruster *et al.*, 2003)

4.1 ORIGINE, RACCOLTA E METODI DI CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

L'analisi del pattern di infezione di *Wolbachia* è stata condotta complessivamente su 200 adulti di *Ae. albopictus* provenienti da sei località del sud-est asiatico appartenenti al range nativo, due località della Spagna, una del Nord-America, una del Montenegro e dodici località italiane (Tab. 4). I campioni provenienti dal range nativo della specie sono stati forniti dal Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare dell'Università “La Sapienza” di Roma.

Data la scarsità di dati relativi al continente Europeo e segnatamente l'Italia, numerosi campioni italiani sono stati studiati, molti dei quali forniti dal Centro Agricoltura Ambiente di Crevalcore (BO). Nel Lazio il reperimento dei campioni è stato eseguito da tecnici del gruppo di lavoro del laboratorio di Lotta Biologica e Biotecnologie entomologiche dell'ENEA.

Una volta raccolte le larve con piccoli retini filtranti sono state fatte sviluppare e gli adulti conservati in etanolo al 95%.

Tabella 4: Elenco delle località in cui sono stati effettuati i campionamenti di *Aedes albopictus* e campioni utilizzati (+) per l'analisi del pattern d'infezione

Nazione	Provenienza geografica campione	Analisi del pattern d'infezione <i>Wolbachia</i>	N	
Italia	Rovigo	+	A	
	Anguillara (RM)	+	B	
	Roma Tuscolano	+	C	
	CAA colonia allevamento	+	D	
	ENEA CR Casaccia (Roma Nord)	+	E	
	Asti	+	F	
	Calderara (Bo)	+	G	
	Castel Maggiore (TO)	+	H	
	Torino	+	I	
	Rimini	+	L	
	Desenzano (BS)	+	M	
	Garda (BS)	+	N	
	Spagna	Barcellona	+	O
		Alicante	+	P
Montenegro	Podgorica	+	Q	
USA	Lake Charles	+	R	
Indonesia	Summarang	+	S	
	Toili	+	T	
	Ujung Pandang	+	U	
Giappone	Okinawa	+	V	
Giappone	Tane-gashima	+	W	
Giappone	Choralcuji	+	Z	

4.2 ANALISI DEL DNA

L'analisi del "pattern" di infezione è stata eseguita amplificando e sequenziando il gene *wsp* un utile marcatore per differenziare diversi ceppi di *Wolbachia* (Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). Grazie all'impiego di coppie di primers specificatamente disegnati (328F - 691R; 183F - 691R) è possibile riconoscere i ceppi di *Wolbachia* specifici di *Ae. albopictus* quali *wAlb A* e *wAlb B*. Di conseguenza abbiamo potuto

analizzare non soltanto la presenza o meno del batterio (popolazioni infettate o non infettate) ma anche determinare il tipo di ceppo (walb A o walb B) presente nei campioni.

Estrazione del DNA. Una volta dissezionati i singoli individui sono stati prelevati, a seconda del sesso, i testicoli o gli ovari lavorando in soluzione fisiologica. Quindi si è proceduto alle seguenti fasi:

- ü Omogeneizzazione degli organi in una eppendorf contenente 100 µl di STE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) e Proteinasi K ad una concentrazione finale di 400 µg/ml (Dobson *et al.*, 2001).
- ü Incubazione dell'estratto a 56 °C per 1 ora al fine di attivare la digestione da parte della proteinasi K e quindi a 95 °C per almeno 15 min per inattivarla.

Purificazione del DNA. Dopo aver centrifugato l'estratto a 14000 rpm per 20 minuti, il supernatante è stato trasferito in una nuova eppendorf aggiungendo 100 µl di isopropanolo. Il campione viene mantenuto a -20°C per 10-60 min e poi centrifugato nuovamente a 14000 rpm per 15 minuti. Questa operazione permette la precipitazione del DNA e l'adesione del pellet sul fondo delle provette che quindi vengono private del supernatante e lasciate asciugare per 5 min. A questo punto vengono aggiunti 100 µl di etanolo alla concentrazione del 70% per lavare il pellet depositato nelle eppendorf, centrifugate a 14000 rpm per 10 min, svuotate dall'etanolo e lasciate asciugare. Il pellet viene quindi fatto risospendere in 25-50 µl di acqua bidistillata.

Reazione di Polimerase Chain Reaction (PCR). La reaction mix, da 25 µl, è costituita da 2 µl del DNA estratto, 2.5 µl di tampone 10X, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM di ognuno dei dNTPs, 1 mM di ogni coppia di primers (328F - 691R; 183F - 691R) (Zhou *et al.*, 1998), 1 unità di DNA Taq polymerase, il tutto in acqua bidistillata.

Le condizioni impostate sono state: 94 °C per 3 min (1 ciclo); 94 °C per 45 secondi, 55 °C per 45 sec; 72 °C per 45 sec (35 cicli); 72 °C per 10 min (1 ciclo); holding a 12°C.

Sequenziamento dei prodotti di PCR. Al fine di evidenziare eventuali polimorfismi nelle sequenze dei geni wAlb A e wAlb B è stato eseguito il

sequenziamento nucleotidico della regione *wsp* a partire dal prodotto di PCR di singoli individui fatti correre su gel di agarosio in TAE e quindi recuperati e purificati utilizzando il QIAquick Extraction Kit (QIAGEN, 2002). Per poter identificare un possibile ceppo di *Wolbachia* non ancora caratterizzato e rilevare variazioni all'interno delle sequenze amplificate i frammenti del gene *wAlb A* e quelli del gene *wAlb B* sono stati purificati e sequenziati mediante un sequenziatore automatico (ABI Prism automated sequencer, Perkin Elmer presso la MacroGen Inc.). Tutte le sequenze del gene *wAlb A* ottenute dalle popolazioni testate, come pure tutte quelle del gene *wAlb B* ottenute dalle medesime popolazioni, sono state allineate ed analizzate attraverso i programmi *Clustal-x* e *Chromas*.

5. VALUTAZIONE DEI PARAMETRI DI “FITNESS” IN *Ae. ALBOPICTUS* IN RELAZIONE ALLA SIMBIOSI

Il sistema *Ae. albopictus-Wolbachia* è senza dubbio una fonte preziosissima per lo studio della IC e delle sue possibili applicazioni. Lo studio degli effetti della simbiosi sulla biologia del culicide, in particolare per le femmine, è stato già affrontato preliminarmente da Dobson *et al.*, (2004). Tuttavia in questa sede si intende fornire un contributo ulteriore concentrando l'attenzione anche sugli effetti della simbiosi sulla “fitness” dei maschi (longevità e competitività sessuale).

A tal proposito si è reso necessario produrre una linea di *Ae. albopictus* aposimbiontica

5.1 ORIGINE DELLA COLONIA DI *Ae. ALBOPICTUS*

La colonia di zanzara tigre che abbiamo utilizzato per il nostro progetto di ricerca ha avuto origine da alcune larve prelevate con un retino filtrante da raccolte di acqua all'interno di piccole cisterne nel Centro ENEA della Casaccia (RM).

Gli adulti sfarfallati sono stati caratterizzati morfologicamente ed attribuiti alla specie *Aedes albopictus*. Un carattere che aiuta a distinguere questa specie dalle altre zanzare è sicuramente la banda bianca che corre longitudinalmente lungo tutto il torace e la presenza di scaglie bianche sui tergiti addominali e sulle zampe che danno l'effetto visivo di una vera e propria bandeggiatura, da cui il nome comune “zanzara tigre” (Fig. 4).

Gli adulti sono stati mantenuti in cella climatizzata (+27 C°- 75% Ur.) all'interno di gabbie di plexiglas (40x40x40cm) ed alimentati con tamponi di carta assorbente imbevuti con soluzione zuccherina al 10% posizionati all'interno delle gabbie. Periodicamente alle femmine è stata data la possibilità di consumare il pasto di sangue tramite un apparecchio che permette di mantenere il sangue (proveniente da animali da macello) a temperatura simile a quella degli animali ospiti.

Il sangue prelevato al momento della macellazione viene immediatamente defibrinato attraverso l'agitazione dello stesso in un matraccio contenente biglie di

vetro corrugate. Il sangue, allontanato dalla sostanza fibrosa, può essere conservato a 4-5 °C per alcuni giorni in attesa di essere offerto alle femmine per il pasto.

Per realizzare una normale attività alimentare ematofaga è stato fornito alle femmine sangue ad una temperatura compresa tra 35 e 37 °C all'interno di contenitori dotati di membrana artificiale o naturale o più semplicemente in sacche di membrana (Rutledge *et al.*, 1964). Il sangue viene riscaldato attraverso l'impiego di un apparecchio a coppa termostata prodotto artigianalmente (Long Life Project Srl - Bologna) (Fig. 16) al quale le femmine possono accedere perforando una membrana costituita da budello intestinale ovino posizionato a guisa di tappo sull'apparecchio.



Figura 16. Dispositivo termostato per il pasto di sangue

All'incirca 3-4 giorni dopo il pasto di sangue le femmine hanno iniziato ad ovideporre su strisce di carta corrugata bianca che riveste le pareti dei piccoli contenitori cilindrici neri con acqua al loro interno.

Le larve sono allevate in vaschette di plastica utilizzando acqua piovana raccolta in contenitori durante le piogge. L'alimento standard è costituito da biscotti per gatti FRISKIES ADULT® finemente sminuzzato con dose fissa pari a 4 mg/larva di cui il 10% viene fornito al 1 giorno di età, il 45% a 2 giorni e il restante 45% a 5 giorni di età.

5.2 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DELLA SIMBIOSI SULLA “FITNESS” DEGLI ADULTI

In una prima serie di esperimenti sono state studiate, attraverso osservazioni comparative tra individui di *Ae. albopictus* infetti ed aposimbiontici, i seguenti parametri di “fitness”:

• **la longevità** (maschi e femmine);

• **la fecondità e la fertilità** delle femmine;

Nella seconda serie di prove abbiamo studiato ed analizzato comparativamente:

• **la competitività sessuale e la fertilità (capacità spermatica)** dei maschi infetti ed aposimbiontici,

• **i livelli di induzione della IC** in funzione della età del maschio.

5.2.1 Rimozione di *Wolbachia* da *Ae. albopictus*

Per la rimozione del simbionte e la produzione di linee di zanzara aposimbiontiche è stato applicato il metodo di Dobson e Rattanadechakul (2001), in cui sono state apportate alcune modifiche.

Il trattamento con antibiotici è stato infatti somministrato direttamente agli adulti attraverso una soluzione zuccherina al 10% (pH=7) con 1-5 mg/ml di tetraciclina.

Il tamponamento della soluzione di tetraciclina è stato ottenuto usando una soluzione 1M non tamponata di Tris.

Maschi e femmine sono stati alimentati con questa soluzione per almeno 1 settimana. Quindi le singole femmine sono state accoppiate con maschi trattati per la costituzione di differenti linee.

Dopo il pasto di sangue e la successiva ovideposizione di queste linee si è proceduto alla verifica, tramite PCR, dell'avvenuta rimozione del simbionte dalle femmine. Sono state quindi portate avanti solo le progenie di femmine risultate negative che sono state poi nuovamente sottoposte al ciclo di somministrazione dell'antibiotico. I trattamenti sono stati continuati fin quando tutta la progenie delle madri, risultata negativa ai test di PCR, è risultata anch'essa negativa. Una volta ottenute le linee aposimbiontiche, gli individui sono stati impiegati negli esperimenti non prima della terza generazione dopo il trattamento. Questo per scongiurare il rischio che le

prove potessero essere invalidate da possibili effetti indesiderati derivabili dalla somministrazione di antibiotici.

5.2.2 Saggi per lo studio della longevità, fecondità e fertilità

Per lo studio dei parametri biologici è stato allestito un unico esperimento composto da due sistemi. Le prove sono state condotte ponendo gli adulti di zanzara tigre, 48 ore dopo lo sfarfallamento, all'interno di gabbie trasparenti (40 x 40 x 40 cm) in cella climatizzata a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e 80% U.R. I maschi e le femmine utilizzati nell'esperimento sono stati separati prima dello sfarfallamento per impedirne l'accoppiamento e poterli pertanto utilizzare vergini.

Due sistemi sono stati messi a confronto:

ü sistema A: 10 femmine vergini prive di *Wolbachia* ($\text{♀}w^-$) + 10 maschi privi di *Wolbachia* ($\text{♂}w^-$).

ü sistema B: 10 femmine vergini normali ($\text{♀}w^+$) + 10 maschi normali ($\text{♂}w^+$).

Ciascuno dei due sistemi sperimentali è stato replicato 4 volte con un impiego totale di 80 zanzare aposimbiontiche e 80 normali.

In ognuno dei due sistemi le femmine sono state alimentate introducendo all'interno delle gabbie il dispositivo per la somministrazione del sangue bovino, descritto precedentemente (cfr. par. 5.1), per circa 60 minuti. Nell'eventualità che qualche femmine non si fosse alimentata, una seconda somministrazione di sangue è stata ripetuta 6 ore dopo. Il pasto di sangue è stato fornito con cadenza settimanale a partire dal giorno di immissione nella gabbia (T_0) fino alla morte dell'ultima femmina (T_{fin}). Durante ogni pasto di sangue si è sempre proceduto al conteggio delle femmine che lo hanno effettivamente consumato. Una striscia di carta bianca ruvida, immersa in un piccolo contenitore contenete acqua, è stata utilizzata come dispositivo per la raccolta delle uova deposte all'incirca 3-4 giorni dopo i pasti di sangue.

I campioni di uova raccolte nelle diverse fasi temporali dello studio della fecondità sono state utilizzate, oltre che per un'analisi prettamente quantitativa, anche per lo studio della fertilità in relazione all'età (in settimane) delle femmine e e del periodo di tempo successivo alla inseminazione. Dopo un periodo di 5 giorni in cui le

cartine con le uova venivano mantenute in contenitori chiusi ad elevata umidità (per favorire lo sviluppo embrionale) le stesse venivano immerse in acqua deossigenata per favorirne la schiusura.

Raccolta ed analisi dei dati. Per l'analisi della longevità si è valutato il tempo di sopravvivenza dei maschi e delle femmine controllando giornalmente il numero di morti in ciascuna gabbia sino all'ultimo sopravvissuto.

L'analisi statistica della sopravvivenza è stata eseguita attraverso due metodi. Le curve di sopravvivenza sono state analizzate con il metodo Kaplan-Meier e comparate con il test Log-rank. In questo caso le femmine ed i maschi in osservazione sono stati considerati una unica coorte da 40 individui benché fossero suddivisi in 4 gabbie ognuna con 10 individui.

Nel secondo metodo la sopravvivenza è stata analizzata considerando le gabbie come unità sperimentali separate (4 repliche). I dati relativi alla sopravvivenza a diversi intervalli di tempo sono stati confrontati mediante il valore di χ^2 .

I dati sul tasso riproduttivo delle femmine, valutato come il numero totale di uova deposte all'interno di ciascuna delle gabbie ad ogni pasto, diviso il numero di femmine viventi che hanno consumato il pasto di sangue, e la fertilità (frazione di uova deposte che sono schiuse) sono stati analizzati mediante ANOVA ad una via.

5.2.3 Incroci per lo studio degli effetti della simbiosi sulla competitività sessuale dei maschi e per la stima della IC

Prove di laboratorio. L'impiego di femmine aposimbiontiche è stato molto utile al nostro scopo in quanto grazie alla IC, che si verifica soltanto negli accoppiamenti tra femmine aposimbiontiche e maschi infettati, è stato possibile discriminare se una femmina fosse stata inseminata da un maschio anch'esso aposimbiontico (incrocio fertile) o da un maschio infettato (incrocio sterile).

Per le prove di competitività è stato studiato quindi il seguente incrocio (C= competitività): 20 femmine vergini aposimbiontiche ($\text{♀}w^-$), 20 maschi aposimbiontici ($\text{♂}w^-$) e 20 maschi normali ($\text{♂}w^+$) sono stati immessi in gabbia (40 x 40 x 40 cm) e lasciati accoppiare per 48 ore in cella climatizzata a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e U.r. = 80%. Contemporaneamente sono stati allestiti anche l'incrocio A (controllo fertilità normale) (20 femmine aposimbiontiche $\text{♀}w^-$ e 40 maschi aposimbiontici $\text{♂}w^-$) e l'incrocio B

(controllo IC) (20 femmine aposimbiontiche ♀ w^- e 40 maschi normali ♂ w^+). Tutti gli insetti sono stati utilizzati a partire dalle 48 ore dopo lo sfarfallamento per avere la certezza che avessero raggiunto la maturità sessuale.

Dopo il periodo di accoppiamento (48 ore) tutti i maschi sono stati rimossi dalle gabbie ed alle femmine è stato somministrato un pasto di sangue; quindi le femmine, una volta consumato il pasto di sangue, sono state prelevate dalle gabbie e poste ad ovideporre singolarmente in piccole gabbiette di plastica trasparente (13 x 7 x 5 cm) (Fig. 17) contenenti strisce di carta filtro posizionate all'interno di barattolini di plastica riempiti di acqua dechlorata per $\frac{1}{4}$ della loro capienza. Una volta completata la fase di ovideposizione (5 giorni dal pasto), le femmine che non hanno prodotto uova sono state dissezionate in soluzione fisiologica per verificare che fossero state realmente inseminate.



Figura 17: Unità ovidepositive di *Ae. albopictus* per lo studio degli effetti della simbiosi sulla competitività sessuale dei maschi e la induzione della IC

Le uova deposte sono state lasciate in umido per circa 5 giorni e poi messe a schiudere per analizzare la fertilità (% di sviluppo embrionale).

Riassumendo sono stati analizzati tre incroci riportati nella seguente tabella :

Tabella 5: Incroci analizzati per lo studio della competitività del maschio e per la stima della IC (w^+ = individuo infettato con *Wolbachia*; w^- = individuo aposimbiontico)

Incroci	♀♀ vergini	♂♂ vergini
A (Controllo fert.)	20 w^-	20 w^-
B (Controllo IC)	20 w^-	20 w^+
C (Competitività)	20 w^-	20 w^- + 20 w^+

I tre tipi di incroci sono stati replicati 4 volte. per un totale di 12 gabbie.

Prove di campo. Parallelamente alle prove eseguite su scala di laboratorio sono state condotte altre prove con lo scopo di valutare la competitività sessuale dei maschi naturalmente infettati e maschi aposimbiontici all'interno di serre-tunnel di 5 x 8 m, protette da reti anti-insetto. Questo al fine di riprodurre condizioni di studio più simili a quelle naturali. Le prove sono state condotte in collaborazione con il CAA di Crevalcore (BO) che ha messo a disposizione 2 tunnels localizzati in un boschetto comunale della zona e sono state svolte durante l'estate 2007. In ciascun tunnel sono state allocate piante tropicali in vaso al fine di ricreare un ambiente forestale. All'interno del tunnel A sono stati introdotti, allo stadio di pupa matura, 100 maschi normali w^+ e 100 maschi aposimbiontici w^- . Prima di introdurre le 100 femmine aposimbiontiche (sempre come pupe) sono trascorse 48 ore in modo da consentire la maturazione sessuale dei maschi. Nel tunnel B sono stati introdotti, con la stessa modalità, 200 maschi aposimbiontici w^- e 100 femmine aposimbiontiche w^- .

Successivamente all'introduzione delle femmine (circa 3-4 giorni dopo) è stato somministrato il pasto di sangue attraverso l'ingresso nei tunnel di persone volontarie. Una volta terminate le ovideposizioni in apposite ovitrappole distribuite nelle serre, le femmine sono state recuperate con aspiratore e quindi dissezionate in laboratorio per l'analisi delle spermatozoi e la verifica dell'avvenuta inseminazione.

Per ogni tunnel si è poi proceduto al conteggio delle uova deposte e al calcolo della percentuale di schiusura.

5.2.4 Studio degli effetti dell'età del maschio sulla induzione della IC

Per completare le nostre osservazioni sulla IC in *Ae. albopictus*, è stata studiata anche l'eventuale influenza dell'età del maschio. Gli incroci A, e B, di cui al precedente paragrafo, sono stati ripetuti con maschi di circa 35 giorni dallo sfarfallamento. Per il calcolo della IC reale è stato applicato l'ICcorr (Bourtzis *et al.*, 1998) come segue:

$$IC_{corr} (\%) = [(CI_{obs} - CCM) / (100 - CCM)] \times 100$$

dove

CI_{obs} = percentuale di uova non schiuse nell'incrocio incompatibile ($\text{♀} w^- - * \text{♂} w^+$);

CCM = percentuale di mortalità negli incroci compatibili.

5.2.5 Effetti della simbiosi sulla fertilità dei maschi

Per analizzare la capacità d'inseminazione dei maschi di *Ae. albopictus*, sia in relazione al loro status infettivo che alla loro età, 10 maschi infetti e 10 aposimbiontici, per ciascuna delle 3 differenti età (1, 2 e 4 settimane) considerate, sono stati posti singolarmente all'interno di 5 gabbie in perspex trasparenti (30x30x30 cm) insieme a 10 femmine vergini infette (ma l'infezione delle femmine non era un fattore importante in questo esperimento) di 48 ore. Femmine e maschi sono stati tenuti insieme per 24 ore.

Per i maschi utilizzati a 2 e 4 settimane dallo sfarfallamento, la fase d'invecchiamento è avvenuta mantenendo i maschi in presenza costante di femmine. Tutte le femmine utilizzate per essere inseminate, una volta rimosse dalla gabbia con i maschi, sono state dissezionate per l'analisi del contenuto delle spermatozoi al microscopio ottico (100 x).

Raccolta e analisi dei dati. La valutazione del grado di competitività dei maschi è stata eseguita mediante il confronto delle percentuali medie (\pm D. S.) di schiusura (n° di larve prodotte/ n° di uova deposte) delle uova deposte nell'incrocio A (fertilità normale di controllo), nell'incrocio B (incompatibile) e nell'incrocio C (gabbie miste con maschi normali e maschi aposimbiontici). L'incrocio di controllo A ci doveva fornire i dati relativi alla mortalità naturale presente nel sistema sperimentale non imputabile alla IC, mentre l'incrocio B ci ha dato una misura del livello di espressione della IC unidirezionale. Essendo la specie monogamica, è stato possibile mettere in correlazione i livelli di fertilità osservati nell'incrocio C, sia con la frequenza degli accoppiamenti tra femmine e maschi aposimbiontici che con quella degli accoppiamenti tra femmine e maschi infetti. Le femmine di tutte le 12 gabbie sono state lasciate, infatti, ad ovideporre singolarmente, per poterne valutare, caso per caso, il rispettivo livello di fertilità (% schiusura uova deposte) da mettere in relazione diretta al tipo di maschio con cui si fossero accoppiate. La percentuale di schiusura delle uova è stata poi calcolata, complessivamente per ogni replica (gabbia), come rapporto tra la somma del numero di uova schiuse e del numero di uova deposte da tutte le 20 femmine.

I dati delle prove di fertilità dei maschi normali ed aposimbiontici, a differenti età, sono stati analizzati mediante ANOVA univariata e bivariata.

5.3 TRASMISSIONE VERTICALE DI *WOLBACHIA*

Per determinare l'efficienza di trasmissione materna dell'infezione in *Ae. albopictus* è stata analizzata la frequenza di infezione di una colonia di *Ae. albopictus* nel corso di 4 generazioni consecutive. Al fine di evitare la sovrapposizione delle generazioni, le uova deposte da ogni generazione sono state rimosse dai siti di raccolta della gabbia di origine e spostate in una nuova. Per ognuna delle 4 generazioni è stato analizzato il DNA di 50 maschi e 50 femmine appena sfarfallati. L'analisi dell'infezione è stata eseguita amplificando e sequenziando il gene *wsp* (Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998).

6. IL TRASFERIMENTO INTERSPECIFICO DI *WOLBACHIA*

Lo studio del trasferimento artificiale di *Wolbachia* tra specie ospiti differenti è un aspetto che, oltre a suscitare sempre maggiore interesse per i suoi risvolti applicativi, può contribuire a fornire informazioni utili alla comprensione dei meccanismi che legano intimamente le varianti genetiche del batterio ai rispettivi ospiti naturali. Per studiare gli effetti del trasferimento di *Wolbachia* esogena (prelevata da altre specie ospiti) ad *Ae. albopictus*, abbiamo usato la tecnica della microiniezione embrionale. Il nuovo processo infettivo si chiama "transinfezione".

Il primo aspetto che abbiamo affrontato è la scelta delle specie da quali prelevare *Wolbachia* per il trasferimento.

6.1 CRITERI ADOTTATI PER LA SCELTA DELLE SPECIE DONATRICI

In base agli esiti delle prime esperienze di transinfezione riportate in letteratura, si è visto come in generale maggiori possibilità di successo si abbiano quanto più le specie ricevente e donatrice sono affini filogeneticamente. Inoltre studi eseguiti su colture cellulari di *A. albopictus* hanno evidenziato che è possibile coltivare in vitro *Wolbachia* prelevata da *Drosophila simulans* (wRiv) e da *Cx. pipiens* (wPip) (Dobson *et al.*, 2002c). E' stato ritenuto opportuno, pertanto, saggiare *D. melanogaster*,

(donatrice di *Wolbachia* del gruppo *wMel* (Supergruppo A) e *Cx. pipiens*, donatrice di *Wolbachia* del gruppo *wPip* (Supergruppo B) (cfr. par. 3.1). Si tratta di specie di insetti ospiti facilmente reperibili ed allevabili in laboratorio. La scelta di tali specie donatrici è anche motivata dalla loro presenza in natura nel nostro ambiente.

Ma questi non sono stati i soli criteri adottati nella scelta. Nel caso di *D. melanogaster* si è anche tenuta in considerazione la profonda conoscenza disponibile in letteratura sul rapporto simbiotico tra *D. melanogaster* ed il batterio e l'esistenza di esperienze preliminari di trasferimento orizzontale in *Ae. albopictus* di *Wolbachia* da *D. simulans* (specie affine a *D. melanogaster*).

Nel caso del complesso *Cx. pipiens* ha prevalso soprattutto il criterio di affinità filogenetica tra il ceppo di *Wolbachia wAlbB* presente in *Ae. albopictus* e *wPip* presente in *Cx. pipiens*, entrambi appartenenti al Gruppo Pip ed entrambi caratterizzati da un fenotipo fortemente “mod⁺-resc⁺”.

6.2 STUDIO DELLA SIMBIOSI IN *D. MELANOGASTER*

Dai dati di letteratura emerge che in *D. melanogaster* la simbiosi con *Wolbachia* assume caratteristiche piuttosto variabili per quel che riguarda i parametri d'infezione. I livelli di IC, gli effetti sulla “fitness” degli adulti, la trasmissione verticale del batterio sono grandezze che variano tra le diverse popolazioni studiate (Hoffman *et al.*, 1998; Hoffmann, 1998; Olsen *et al.*, 2001; Reynolds e Hoffmann, 2002; Fry *et al.*, 2004; Champion De Crespigny *et al.*, 2006; Champion De Crespigny e Wedell, 2006).

Prima di procedere al trasferimento di *Wolbachia* da *D. melanogaster* ad *Ae. albopictus*, abbiamo cercato di caratterizzare alcuni aspetti dell'interazione simbiotica tra *Wolbachia* e la nostra colonia di *D. melanogaster*, suo ospite naturale. Inoltre, abbiamo caratterizzato molecularmente il ceppo di *Wolbachia* presente nella colonia di drosofile.

6.2.1 Origine della colonia di *D. melanogaster*

La colonia di drosofile sulla quale abbiamo condotto le nostre osservazioni inerenti la simbiosi e che successivamente utilizzato per prelevare dalle uova ooplasma

infetto per la transinfezione di *Ae. albopictus*, ha avuto origine da alcuni individui adulti sfarfallati da pupe all'interno di olive marcescenti raccolte in un oliveto del centro ENEA della Casaccia (RM). Gli individui, all'incirca 5 coppie, sono stati fatti riprodurre e successivamente sono stati spediti al Dr. Gerhard Baechli dello "Zoological Museum" di Zurigo che li ha determinati come appartenenti alla specie *D. melanogaster*. Chiameremo il nostro campione "ceppo Casaccia".

Gli adulti sono stati allevati in gabbie cubiche di plastica dalle dimensioni di 30x30x30 cm, alimentati con saccarosio e idrolizzato di lievito in rapporto (p/p= 3:). Quale substrato per la ovideposizione ed allevamento larvale è stata utilizzata una dieta artificiale a base di farina di carote (per 2 kg= lt 1,7 di acqua. gr 320 di farina di carote. gr 64 di lievito deamarizzato. ml 80 di HCl 2N. gr 1,5 di Benzoato di Sodio. Gli allevamenti sono stati mantenuti in una cella climatizzata +25 C°, 65% di UR.

6.2.2 Caratterizzazione molecolare di *Wolbachia* in *D. melanogaster*

Al fine di caratterizzare il ceppo di *Wolbachia* presente nel "ceppo Casaccia", una volta estratto il DNA da alcuni individui (cfr. par. 4.2), abbiamo eseguito reazioni di PCR per l'amplificazione del gene *wsp* (cfr. par. 4.2) utilizzando una coppia di primers (308 F e 691R) disegnati specificatamente per *wMel* (GB N. AF020072) (Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). Il prodotto di PCR è stato sequenziato utilizzando il servizio offerto dal C.R.I.B.I dell'Università di Padova. L'elaborazione delle sequenze è stata effettuata con il software MacVector (7.0).

6.2.3 Studio della incompatibilità citoplasmatica nella simbiosi *Wolbachia-D. melanogaster*

I dati riportati in letteratura, inerenti l'osservazione della IC in *D. melanogaster*, evidenziano generalmente una riduzione parziale della percentuale di schiusa delle uova quando una femmina non infetta si accoppia con un maschio infetto (Hoffmann, 1998). Per poter eseguire analoghi esperimenti sulla nostra colonia di *D. melanogaster*, è stato necessario disporre di una linea aposimbiotica a partire dalla originale popolazione infetta. E' molto importante, ai fini di una corretta interpretazione dei dati, che popolazione infetta ed aposimbiontica abbiano lo stesso "background genetico",

questo al fine di evitare di attribuire alla IC mortalità embrionali dovute ad altri fattori genetici nucleari (Weeks *et al.*, 2002).

Un ciclo di trattamenti con tetraciclina, come descritto in Hoffmann (1998), è stato eseguito su un centinaio di individui della colonia infetta. Le linee aposimbiontiche sono state utilizzate negli esperimenti non prima di 3 generazioni dal trattamento antibiotico.

Gli esperimenti sono stati condotti partendo dalle progenie di una femmina infetta ed una non infetta, che sono state fatte ovideporre. Da ciascuna progenie (linea infetta e non infetta), singole pupe sono state separate in piccole provette per evitare l'accoppiamento degli adulti una volta sfarfallati, onde preservarne la verginità. All'interno di gabbiette di plastica trasparente (13x 7x 5 cm) (Fig. 18) sono stati fatti accoppiare singoli maschi con singole femmine vergini per 24 ore ($T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$).



Figura 18: Unità sperimentali per lo studio della IC in *D.melanogaster*

Sono stati studiati i seguenti quattro tipi di incroci ognuno replicato 5 volte:

ü ♀ w^+ * ♂ w^+ , per il calcolo della mortalità naturale.

ü ♀ w^- * ♂ w^- , per valutare eventuali influenze sulla schiusura delle uova dovute al trattamento con tetraciclina.

ü ♀ w^+ * ♂ w^- , per il calcolo della mortalità naturale.

ü ♀ w^- * ♂ w^+ , per il calcolo della eventuale IC.

Dopo l'accoppiamento il maschio è stato rimosso e la femmina è stata lasciata deporre per 48 ore su un substrato ovidepositivo a base di omogenato di mela per facilitare il conteggio delle uova. Trascorso il tempo di ovideposizione, anche le femmine sono state rimosse e le uova, una volta contate, sono state mantenute ad una temperatura di 25 ± 1 °C.

Dopo 2 giorni dalla deposizione è stata calcolata la percentuale di schiusura come rapporto fra le uova deposte da ogni femmina e il numero di uova schiuse.

Il valore della IC è stato calcolato utilizzando un inde corretto dell'incompatibilità citoplasmatica, l'ICcorr (Bourtzis *et al.*, 1998) (cfr. par. 5.2.4), al fine di minimizzare l'influenza della mortalità naturale del sistema

I dati di mortalità embrionale riscontrate nei vari tipi di incrocio saggi sono state analizzati mediante il test Kruskal-Wallis ed ANOVA univariata e bivariata (effetto combinato tipo di incrocio-età maschio). Per il confronto delle medie è stato applicato il test Student-Newman-Keuls. (Software statistico MedCalc vers. 9.3.2)

6.2.4 Frequenza dell'infezione nella colonia di *D. melanogaster*

Al fine di valutare la conservazione dello status infettivo della colonia, nelle condizioni di allevamento in cui è stata mantenuta *D. melanogaster*, la frequenza di infezione (espressa come percentuale di femmine infette su un campione analizzato) è stata analizzata in 4 generazioni successive a quella parentale (una coppia di individui infetti).

Per ogni generazione 20 femmine sono state prelevate dalla colonia, messe in etanolo alla concentrazione del 95% e tenute a -20 °C prima di essere analizzate mediante PCR.

La presenza di *Wolbachia* è stata determinata con i primers specifici per il gene 16S (O'Neill *et al.*, 1992).

6.3 STUDIO DELLA SIMBIOSI IN *Cx. pipiens*

Analogamente a quanto eseguito su *D. melanogaster*, anche su *Cx. pipiens* l'altra specie donatrice di *Wolbachia* per le transinfezioni di *Ae. albopictus*, è stato ritenuto opportuno verificare sperimentalmente alcuni parametri dell'infezione, quali la IC e la trasmissione verticale del batterio, e caratterizzare molecolarmente il ceppo di *Wolbachia* presente nella nostra colonia di *Cx. pipiens*.

6.3.1 Origine della colonia utilizzata e metodo di allevamento

La colonia di *Cx. pipiens* allevata nel nostro laboratorio ha avuto origine da un campione fornito dal Centro Agricoltura ed Ambiente di Crevalcore (Bo). Pertanto chiameremo la nostra popolazione "ceppo CAA".

Si tratta di una linea selezionata per autogenia. Gli adulti sono stati mantenuti in cella climatizzata (D:L = 8:16) all'interno di gabbie di plexiglas (40x40x40cm) (Fig. 19) ed alimentati con tamponi di carta assorbente imbevuti con soluzione zuccherina al 10% posizionati all'interno delle gabbie. In considerazione della tendenza naturale ad ovideporre nelle ore crepuscolari e notturne di questa specie, al fine di promuovere le ovideposizioni in corrispondenza delle ore lavorative, il fotoperiodo è stato completamente invertito rispetto a quello naturale. In questo modo molto spesso sono state ottenute ovideposizioni in corrispondenza delle ore centrali della giornata.



Figura19: gabbia di mantenimento degli adulti di *Cx. pipiens*

Poiché il ceppo è autogenico, per il mantenimento dell'allevamento vengono utilizzate le uova della prima ovideposizione. Tuttavia, occasionalmente, per aumentare la frequenza delle ovideposizioni è stato fornito un pasto di sangue con modalità analoghe a quelle utilizzate per *Ae. albopictus*, ma con risultati decisamente inferiori per le maggiori difficoltà che *Cx. pipiens* ha incontrato nell'alimentarsi su dispositivi artificiali.

Le uova, che appaiono aggregate in zattere, vengono sistemate in contenitori di plastica con acqua nella quale vengono aggiunte alcune gocce di un prodotto della Askoll contenente sodio tiosolfato (decolorante) e acido etilendiaminotetracetico (EDTA) chelante dei metalli pesanti (piombo, cromo e rame) (Fig. 20).



Figura 20: Larve di *Cx. pipiens* in vassoi di allevamento

L'alimento standard per il mantenimento delle larve è costituito da biscotti per gatti FRISKIES ADULT® finemente sminuzzato con dose fissa pari a 4 mg/larva di cui il 10% viene fornito al 1 giorno di età, il 45% a 2 giorni e il restante 45% a 5 giorni di età.

6.3.2 Caratterizzazione molecolare di *Wolbachia* in *Cx. pipiens*

Come già trattato nel paragrafo 4.2 il gene “*wsp*” è un utile marcatore per differenziare differenti ceppi di *Wolbachia* (Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). Grazie all’impiego di coppie di primers specificatamente disegnati (328F; 691R- 183F; 691R) è possibile riconoscere ceppi di *Wolbachia* specifici di *Ae. albopictus* quali *wAlb A* e *wAlb B*. La coppia di primer 183F-691R consente l’amplificazione del gene *wPip* (AF301010) di *Cx. pipiens* molto affine a *wAlb B* (gen bank AF020059), ma non è possibile ottenere un profilo diagnostico dei prodotti di PCR che consenta di distinguere i due ceppi di *Wolbachia*. Pertanto ai fini del nostro lavoro, tra le cui finalità c’è quella di studiare la trasferibilità orizzontale di *Wolbachia* da *Cx. pipiens* ad *Ae. albopictus*, si è reso necessario conoscere la sequenza del gene *wsp* negli individui della nostra colonia di *Cx. pipiens* e confrontarla con quella di *wAlb B*. Il sequenziamento è stato effettuato utilizzando il servizio offerto dal C.R.I.B.I dell’Università di Padova. L’elaborazione delle sequenze è stata effettuata con il software MacVector (7.0).

6.3.3 Studio dell’incompatibilità citoplasmatica nella simbiosi *Wolbachia-Cx. pipiens*

Lo studio, finalizzato a caratterizzare la IC indotta da *Wolbachia* in *Cx pipiens*, ha reso necessario disporre di una linea aposimbiontica di questa zanzara. La linea è stata ottenuta applicando il protocollo di trattamento con tetraciclina descritto in Portarro e Barr (1975).

Una volta ottenuta ed allevata la linea aposimbiontica, dalla terza generazione dopo l’ultimo trattamento antibiotico, sono stati analizzati quattro diversi incroci analogamente a quanto eseguito nello studio della IC in *D. melanogaster* (cfr. par. 6.2.3). L’effetto dell’età dei maschi sulla IC è stato valutato utilizzando maschi di età 3, 15 e 25 giorni.

Ogni incrocio è stato replicato 5 volte. Anziché separare fin dall’inizio le singole coppie utilizzando gabbiette di piccole dimensioni, adatte per le drosofile, si è ritenuto opportuno far avvenire gli accoppiamenti simultaneamente in gabbie 30x30x30 cm e solo successivamente isolare le femmine in gabbie 20 x 20 x 20 cm per la deposizione delle zattere in appositi contenitori contenenti acqua piovana.

Una volta deposte, le zattere sono state raccolte e poste in contenitori con acqua per analizzare la percentuale di schiusura delle uova.

Ogni femmina che ha prodotto uova è stata dissezionata al fine di verificare nelle spermateche l'avvenuta inseminazione. Le femmine non risultate inseminate sono state scartate e sostituite da femmine di coppie di riserva.

Il valore dell'IC è stato calcolato utilizzando l'indice corretto dell'incompatibilità citoplasmatica, l'ICcorr (Bourtzis *et al.*, 1998) (cfr. par. 5.2.4).

I dati di mortalità embrionale riscontrate nei vari tipi di incrocio sono stati analizzati mediante il test Kruskal-Wallis ed ANOVA univariata e bivariata (effetto combinato tipo di incrocio-età maschio). Per il confronto delle medie è stato applicato il test Student-Newman-Keuls. (Software statistico MedCalc vers. 9.3.2).

6.3.4 Frequenza dell'infezione nella colonia di *Cx. pipiens*

Analogamente a quanto eseguito sulla colonia di drosofile, anche per la colonia di *Cx. pipiens* abbiamo monitorato per 5 generazioni continuative la frequenza di femmine infettate.

6.4 TEST STATISTICI ADOTTATI

Analisi della varianza. Il metodo ANOVA (ANalysis Of VAriance) (Box *et al.*, 1978) è stato utilizzato per valutare l'effetto della variazione dei fattori considerati (presenza *Wolbachia*, età degli adulti) sulla variabilità dei risultati sperimentali del sistema sotto osservazione (longevità, fertilità, IC) determinando se la variazione fosse imputabile ai fattori stessi o ad effetti casuali. Abbiamo utilizzato sia "ANOVA ad un criterio di classificazione" (one-way ANOVA) che ha permesso di studiare l'effetto di un singolo fattore (stato infettivo, età) che ANOVA Bivariata (Two-ways ANOVA) per lo studio multifattoriale (effetto combinato dell'infezione e dell'età dei maschi sulla competitività sessuale, capacità spermatica). Con ANOVA è stato possibile capire se, ad esempio, la differenze osservate nella "fitness" delle femmine fossero dovute effettivamente alla presenza del simbionte oppure alla variabilità intrinseca di ogni misurazione. La distribuzione utilizzata è quella della variabile casuale F di Snedecor.

Kruskal-Wallis. Il test proposto nel 1952 da Kruskal e Wallis (Kruskal-Wallis One-Way ANOVA by Ranks o più semplicemente the Kruskal-Wallis test), è l'equivalente non parametrico dell'analisi della varianza ad un criterio di classificazione.

E' stato utilizzato in questa ricerca per verificare se "k gruppi indipendenti (ad esempio le medie delle fertilità osservata in 4 diversi tipi di incroci) provengano dalla stessa popolazione e/o da popolazioni che abbiano la medesima mediana. A differenza dell'analisi della varianza, il test di Kruskal-Wallis può essere utilizzato anche quando un gruppo ha una sola osservazione (Kruskal, 1952; Kruskal e Wallis, 1952).

La metodologia del test Kruskal-Wallis è molto semplice e si basa sulla verifica dell'ipotesi che tutti i campioni (ad esempio, le diverse fertilità osservate nelle diverse categorie di incroci) hanno la stessa mediana, con ipotesi alternativa che almeno una mediana è differente dalle altre.

Student-Newman-Keuls. Il test di Student-Newman-Keuls o test SNK, citato anche come test q studentizzato come il test di Tukey, è stato proposto da D. Newman (Newman, 1939) nel 1939 e completato da M. Keuls nel 1952 (Keuls, 1952). Il test è stato impiegato in questa ricerca per il confronto di gruppi di medie (valori di fertilità) relative a k trattamenti (tipi di incroci tra zanzare simbiotiche ed aposimbiotiche). Con la metodologia SNK, il numero di medie a confronto varia in funzione del rango occupato dalle due medie a confronto. Si introduce il concetto di passi avanti, che corrisponde al numero di medie implicate effettivamente in un confronto specifico.

Il test è stato impiegato per indagare l'ipotesi nulla parziale, ovvero l'ipotesi che tutti i k trattamenti meno un certo numero g, provenissero dalla stessa popolazione. Inizialmente il test confronta tutte le combinazioni di k-1 medie, quindi k-2, fino a che confronta due sole medie. Man mano che si prosegue nel test, i set di dati diventano sempre più piccoli, non appena ci si trova nella condizione che la media più grande e la media più piccola non appartengono alla stessa popolazione, il test si ferma.

Il metodo Kaplan-Meier. Anche conosciuto come "Product Limit Estimator", tale metodo analitico è stato adottato in questo lavoro per lo studio della longevità degli adulti di *Ae. albopictus* infetti e non infetti. Il test consente, Infatti, di stimare la funzione di sopravvivenza dai dati delle tavole di sopravvivenza. Un importante vantaggio della curva di Kaplan-Meier è che può stimare anche i dati "censored"

(campioni persi) prima che sia stato osservato il risultato finale (per esempio se una zanzara è volata via dalla gabbia prima della morte).

Log-Rank. Il log-rank (a volte chiamato test di Mantel-Haenszel o test di Mantel-Cox) è stato utilizzato per confrontare le distribuzioni di sopravvivenza di due campioni. È un test non parametrico e si può usare quando i dati sono censiti correttamente.

Il test altro non è che un confronto tra le probabilità attese dell'evento con il numero di eventi osservato (Martin Bland e Altman, 2004).

Il test del Chi-quadro. Il test, di tipo associativo, è stato utilizzato per confrontare i dati osservati con i valori di aspettazione. Maggiore è il valore χ^2 , maggiore è stata la discrepanza del valore osservato con il valore atteso. Il test è stato applicato per il confronto della distribuzione delle sopravvivenze di *Ae. albopictus* in relazione allo stato infettivo (Box *et al.*, 1978).

Levene Test. Il test di Levene è stato applicato per individuare l'omogeneità delle varianze dei campioni. In caso di significatività i dati sono stati trasformati nel rispettivo logaritmo.

Tutti i test statistici sono stati adottati con i software MedCal 9.4 e SPSS 10 (SPSS, Inc., 2003).

6.5 LA TECNICA DI MICROINIEZIONE

In questo paragrafo viene illustrata la metodologia adottata per il trasferimento di *Wolbachia* da *D. melanogaster* e *Cx. pipiens* ad *Ae. albopictus*.

Le fasi principali che verranno descritte sono:

- ü raccolta uova delle specie donatrici
- ü localizzazione del batterio nell'embrione dei donatori
- ü predisposizione degli embrioni del donatore e del ricevente
- ü preparazione dei vetrini ed allineamento uova
- ü microiniezione

6.5.1 Localizzazione di *Wolbachia* negli embrioni donatori attraverso la tecnica DAPI

Conoscere in quali aree embrionali si concentra il batterio nelle prime fasi dello sviluppo, consente di non aspirare e trasferire porzioni di ooplasma nelle quali il batterio è assente o presente a bassissima densità.

A tal proposito abbiamo utilizzato la tecnica DAPI. Attraverso la tecnica di marcatura del DNA con 4', 6-diamidino-2-phenylindole-2-HCl (DAPI) (Hoffman *et al.*, 1994) è possibile visualizzare in epifluorescenza la presenza di *Wolbachia* sia in embrioni infetti che nelle cellule riproduttive maschili.

Gli embrioni (sia di *D.melanogaster* che *Cx. pipiens*), entro tre ore dalla ovideposizione, sono stati posti all'interno di tubetti da scintillazione da 20 ml, contenenti 5 ml di tampone di fissazione composto da 182 mM di KCl, 46 mM di NaCl, 10mM Tris, formaldeide al 3,7%, pH 7.2 e 5 ml di n-eptano. I tubetti sono stati incubati a temperatura ambiente (+20 °C) con una leggera agitazione meccanica per 15 min. Lo strato acquoso è stato poi rimosso e sostituito con 10 ml di metanolo 100%; una nuova incubazione a + 20 °C è stata eseguita con lieve agitazione meccanica per altri 10 min. Lo strato di eptano è stato rimosso e successivamente sono stati aggiunti altri 10 ml di metanolo 100%. I tubetti sono stati quindi agitati in maniera lieve meccanicamente per 15 sec. Gli embrioni fissati sono stati fatti depositare sul fondo dei tubetti e quindi recuperati utilizzando una pipetta con punta a foro largo, risciacquati in metanolo 100% e conservati in metanolo 100% a -20 °C.

Prima di procedere all'osservazione al microscopio, gli embrioni sono stati lavati due volte in PBST (1 X PBS, 0.1% Triton X-100), due volte in PBS e marcati con una soluzione di 1 µg /ml di DAPI in PBS per 15 min, tenuti a temperatura ambiente (+20 °C) con leggera agitazione meccanica.

Gli embrioni marcati sono stati poi sciacquati una volta in PBS e montati in PBS 80%, glicerolo 20%, ed osservati a 100 ingrandimenti attraverso un microscopio ad epifluorescenza.

6.5.2 Preparazione degli embrioni di *D. melanogaster*

La preparazione degli embrioni delle specie donatrici, per il prelievo di ooplasma, consta delle seguenti fasi:

- raccolta delle uova;
- decorionizzazione;
- preparazione dei vetrini ed allineamento.

La raccolta delle uova è avvenuta per circa un'ora e viene effettuata su piastre (10 cm di diametro) composte da agar al 3%, con l'aggiunta di 2g di lievito idrolizzato, 1ml di acido acetico, 0,1g di Benzoato di Sodio in 200 ml di succo di frutta (preferenzialmente mela o albicocca). Prima dell'immissione del substrato di ovideposizione nella gabbia delle drosofile, la superficie del gel è stata inumidita e ricoperta da un sottile strato di comune lievito per pane. Il recupero delle uova è stato eseguito tramite il risciacquo della superficie del gel e la raccolta dell'acqua di lavaggio in una provetta Falcon 50 ml modificata con la base permeabile costituita da un filtro a maglia sottile.

Per la decorionizzazione, il filtro con le uova raccolte è stato immerso in NaClO 3% per tre minuti e quindi risciacquato accuratamente in soluzione di Ringer (182 mM KCl; 46 mM NaCl; 3mM CaCl₂ 10 mM Tris-HCl, pH 7.2).

A questo punto sono stati preparati i vetrini coprioggetto (anche una metà è sufficiente) sui quali è stata applicata una striscia di nastro biadesivo (circa 4 mm di spessore) (Fig. 21, A-B).

Una volta decorionizzate le uova sono state spostate con un pennello sul vetrino coprioggetto, ma non ancora sul nastro adesivo (Fig. 21, C). L'acqua in eccesso è stata eliminata, con l'ausilio di carta assorbente, in modo da permettere l'adesione delle uova al nastro. A questo punto, le uova sono state prelevate singolarmente e trasferite sul nastro biadesivo avendo cura di disporle con un orientamento perpendicolare al lato del vetrino coperto dal nastro e con il polo posteriore (estremità più arrotondata) esposto verso l'esterno del vetrino stesso (Fig. 21, D). Con un pennello a setole morbide è stata operata una pressione per favorire l'incollaggio.

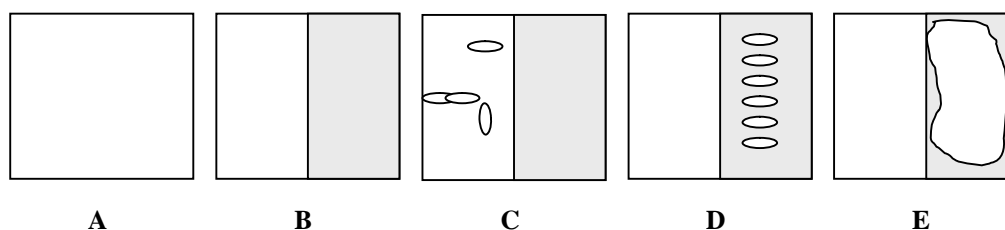


Figura 21. Preparazione uova di *D. melanogaster* per la transfezione: in grigio l'area del vetrino ricoperta da nastro biadesivo

Le uova sono state poi coperte da una goccia di "halocarbon oil 700" (Sigma Aldrich Co.) saturo di acqua con l'ausilio di uno spillo (Fig. 21E). Il vetrino coprioggetto così preparato viene poggato su un vetrino portaoggetti e fatto aderire su di esso grazie all'interposizione di una gocciolina d'acqua.

6.5.3 Prelievo degli ovari in *Cx. pipiens*

La preparazione delle uova di *Cx. pipiens* per il prelievo di ooplasma è una operazione più complessa rispetto a *D. melanogaster* soprattutto per il fatto che la produzione di zattere difficilmente avviene con la continuità necessaria nelle ore diurne in cui si eseguono le microiniezioni.

Per ovviare a questo inconveniente si è optato per il prelievo delle uova direttamente dagli ovari (Fig. 22) dalle femmine gravide.



Figura 22. Ovari di *Cx. pipiens*

Attraverso l'uso di una pinzetta entomologica, facendo pressione e tirando l'ultimo segmento addominale, le uova estratte, ancora raggruppate negli ovari e mantenute in soluzione fisiologica, sono state immediatamente utilizzate per il prelievo di citoplasma.

6.5.4 Preparazione degli embrioni riceventi di *Ae. albopictus*

Il protocollo che abbiamo applicato per la transfezione delle uova di *Ae. albopictus* è sostanzialmente quello messo a punto da Xi *et al.* (2005) con alcune modifiche. Si parte ovviamente da unità di allevamento (linea aposimbiontica) cui è stato somministrato il pasto di sangue.

La raccolta delle uova di *Ae. albopictus* (cfr. 5.1) ha avuto la durata massima di 90 minuti. Ad intervalli di 30 minuti è stato necessario verificare che le zanzare avessero iniziato ad ovideporre per stabilire l'effettivo tempo di inizio di ovideposizione.

Su un vetrino coprioggetto (anche mezzo vetrino può essere sufficiente) va posta e fatta aderire accuratamente una strisciolina di nastro biadesivo trasparente di almeno 6 mm, in modo che ne copra un lato; viene quindi posta sul vetrino una seconda strisciolina del medesimo nastro adesivo in modo da incollarsi sulla prima lasciandone scoperto il settore vicino al bordo del vetrino per circa 4mm (Fig. 23).

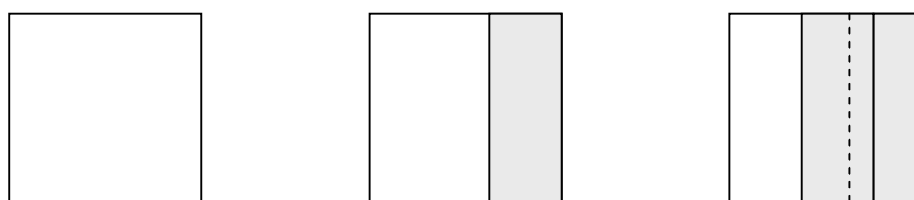


Figura. 23. Preparazione vetrino per fissaggio uova *Ae. albopictus*

Trascorsa l'ora e mezza di raccolta delle uova di *Ae. albopictus*, l'unità di ovideposizione è stata recuperata dalla gabbia delle zanzare e sostituita da un'altra in caso si voglia subito riprendere la raccolta delle uova.

Sulla carta di raccolta abbiamo trovato, a questo punto, uova nere, già con corion formato, che corrispondono a quelle ovideposte all'inizio del periodo di raccolta, ed una popolazione di uova che gradualmente variano da bianco quasi trasparente (uova appena ovideposte) a varie gradazioni di grigio. Ai fini della transfezione le uova grigio scuro (fase embriologica precedente a quello blastoderma (Fig. 24) garantiscono le migliori rese in sopravvivenza e possibilità di successo nella microiniezione (Xi *et al.*, 2005).

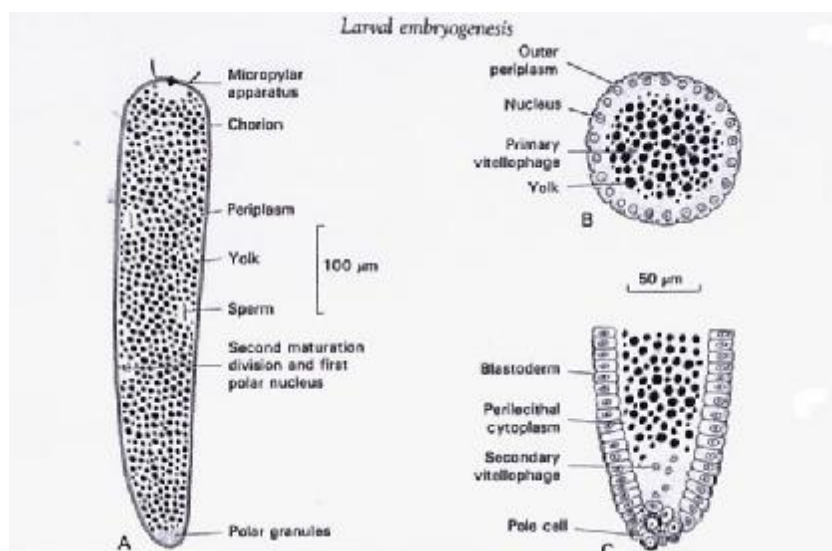


Figura 24: Uovo di Culicidae poche ore dopo la deposizione: fase di divisione mitotica e formazione del blastoderma. (da Davis, 1967)

Le uova nere non possono essere microiniettate, mentre si deve attendere che le bianche inizino a scuirsi prima di poter essere utilizzate. Le uova grigie possono essere raccolte con un pennello e radunate in un punto di raccolta della carta di ovideposizione.

Una ad una le uova grigie sono state prelevate con un pennello dalla carta nera e poste sul nastro biadesivo in posizione perpendicolare rispetto al bordo del vetrino ove è presente il nastro e poggiando con il polo anteriore (estremità più arrotondata) al bordo della seconda strisciolina di nastro (Fig. 25).

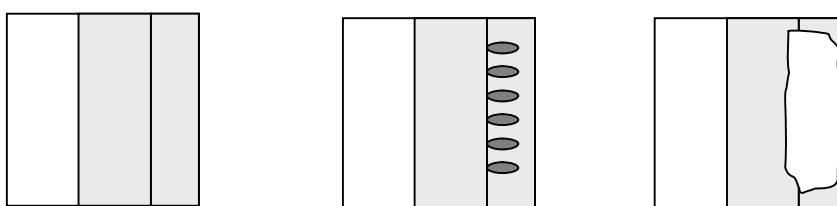


Fig. 25. Fissaggio delle uova di *Ae. albopictus*

Prima del trasferimento, le uova di *Ae. albopictus* sono lasciate leggermente disidratarsi. A questo punto va aggiunta una goccia di olio minerale a coprire completamente le uova, tramite uno spillo già preparato in precedenza (mantenuto immerso in una eppendorf contenente olio saturato con acqua). L'olio va steso uniformemente sulle uova.

6.5.5 Apparato per la microiniezione embrionale

Le microiniezioni sono state eseguite con un Microiniettore IM 300 della Narishighe. Trattasi di un sistema complesso con sistema idraulico ad Azoto gassoso, costituito da micromanipolatore più microiniettore semiautomatizzato per quel che concerne il settaggio dei volumi di inspirazione ed espirazione (Fig. 26)



Figura 26. Micromanipolatore-microiniettore IM300

Generalmente è stato iniettato un volume pari ad $1/5$ del volume dell'uovo. Dopo una fase di messa a punto, l'ago ottimale, preparato con Puller PC-10 (Narishighe) (Fig. 27) a partire da capillari lunghi 9 cm e con diametro esterno 0,9 mm, è risultato quello ottenuto stirando il capillare verticalmente a pieno peso, in un solo step, alla temperatura di $+55\text{ C}^\circ$. L'ago così prodotto garantisce penetrabilità nell'uovo e fluidità citoplasmatica.



Figura 27: Puller per la preparazione degli aghi

6.5.6 Trasferimento di ooplasma esogeno ad uova aposimbiontiche di *Ae. albopictus*

Gli embrioni vengono iniettati sulla superficie ventrale, vicino il polo posteriore (Fig.28).

L'angolo orizzontale del capillare varia, ma deve essere approssimativamente di 30° sul piano dello stativo. Il vetrino con le uova iniettate è stato successivamente recuperato e trasferito in una camera umida (capsula Petri quadrata con spugnetta saturata di soluzione di Ringer) dove le uova sono mantenute, sempre ricoperte da halocarbon oil, per circa 40 minuti dopo la microiniezione. Dopo questo intervallo di tempo le uova microiniettate sono state recuperate dal vetrino con l'ausilio di uno spillo entomologico modificato in modo tale da avere l'estremità a forma di anello. Per distaccare le uova dal nastro adesivo va operata una pressione molto leggera e graduale con l'anello dello spillo (o con un pennello a setole morbide). Le uova sono state quindi trasferite su apposita carta bianca increspata anch'essa saturata con soluzione di Ringer. Si è reso necessario rimuovere per quanto possibile l'olio rimasto sulle uova per favorire la respirazione attraverso il corion. Parallelamente è stato effettuato un analogo trattamento di controllo su uova non iniettate per ottenere un confronto su percentuale e tempi di schiusa delle uova.

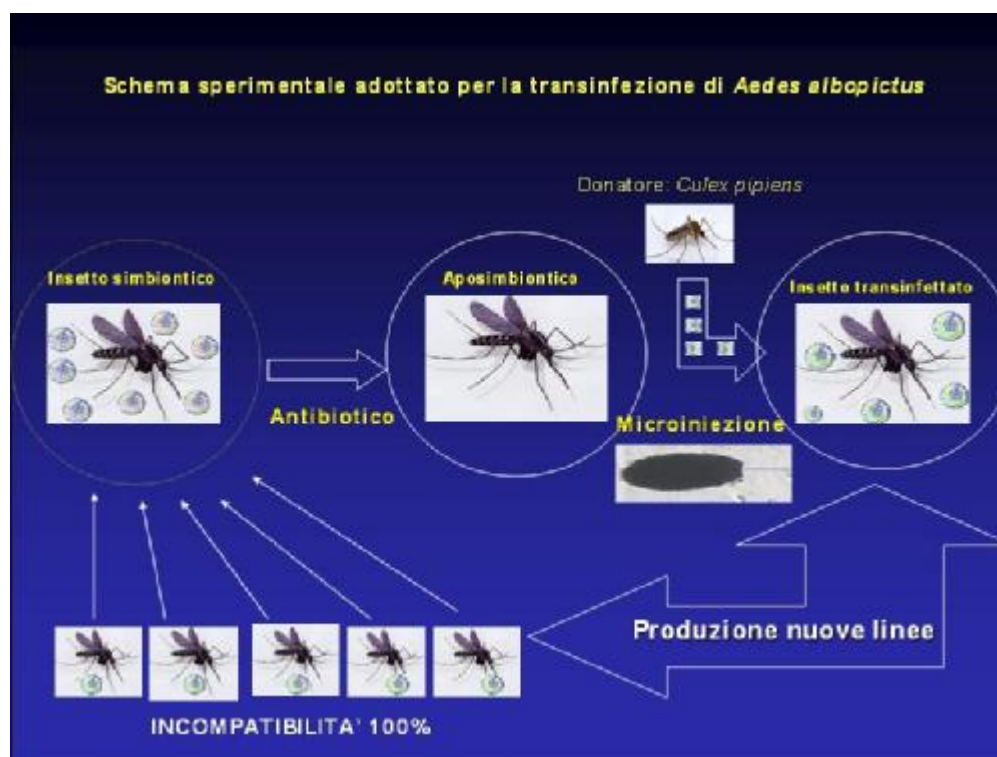


Figura 28: Procedura sperimentale di microiniezione embrionale di *Ae. albopictus*

6.5.7 Raccolta dati delle microiniezioni

Per ogni lotto di uova microiniettate sono stati analizzati i seguenti parametri:

- ü percentuale di schiusa delle uova;
- ü percentuale di uova microiniettate che ha raggiunto lo stato di pupa;
- ü percentuale di uova microiniettate che ha raggiunto lo stadio adulto;
- ü percentuale di adulti sfarfallati risultati transinfettati.

Al fine di verificare l'esito del processo di microiniezione in termini di accertamento di un nuovo stato infettivo è stato necessario eseguire reazioni di PCR attraverso l'uso di primer specifici per l'amplificazione della regione *wsp* delle specie donatrici (cfr. par. 4.2).

Il DNA è stato estratto da adulti nati da embrioni sopravvissuti alla microiniezione.

6.5.8 Verifica preliminare della IC indotta nella nuove simbiosi

Tutti i maschi ottenuti dalle microiniezioni (maschi G₀) sono stati accoppiati con femmine vergini aposimbiontiche. Successivamente le femmine sono state alimentate su uomo e lasciate ovideporre.

Al termine della ovideposizione le uova sono state messe a sviluppare e dopo 5 giorni di fase umida a + 27 C° sono state sommerse in acqua per permettere lo sviluppo larvale. Contemporaneamente sono stati allestiti 10 incroci di controllo tra maschi e femmine aposimbiontici al fine di avere un valore di riferimento della mortalità media embrionale in incroci compatibili. Una volta aver ovideposto la femmina è stata dissezionata e le spermatozoi sono state analizzate per verificare l'avvenuta inseminazione da parte dei maschi. Questi ultimi sono stati predisposti per l'analisi tramite PCR del loro stato infettivo.

6.5.9 Allestimento di isolinee transinfettate

Tutte le femmine nate dai processi microiniettivi sono state fatte accoppiare con maschi aposimbiontici, fatte alimentare su uomo e poi lasciate ovideporre.

Le ovideposizioni di femmine eventualmente risultate positive ai test molecolari (PCR), e quindi transinfettate, sono state utilizzate per dare origine a nuove isolinee.

RISULTATI

7. DISTRIBUZIONE DELL'INFEZIONE DI *WOLBACHIA* IN *AE. ALBOPICTUS*

L'analisi del "pattern" di distribuzione dell' infezione di *Wolbachia* è stata condotta complessivamente su 200 adulti di *Ae. albopictus* provenienti da sei località del sud-est asiatico appartenenti al range nativo, due località della Spagna, una del Nord-America, una del Montenegro e dodici località italiane (Tab. 4). Il monitoraggio dell'infezione del batterio *Wolbachia* è stato condotto utilizzando il test basato sulla PCR descritto da Zhou *et al.*(1998). I primers specifici utilizzati, che amplificano due sequenze ben conservate di un gene codificante per la proteina di membrane *wsp* rispettivamente per il ceppo A (*wAlbA*) e per il ceppo B (*wAlbB*), sono stati ricavati in letteratura (Zhou, 1999 e van Meer,1999). L'analisi dei prodotti di PCR (Fig. 29) ha messo in evidenza che tutti gli individui analizzati, sono risultati superinfettati sia con il ceppo *wAlb A* che con quello *wAlb B*. Il risultato assume particolare rilevanza per le popolazioni europee sul cui stato infettivo non esistono dati di letteratura.

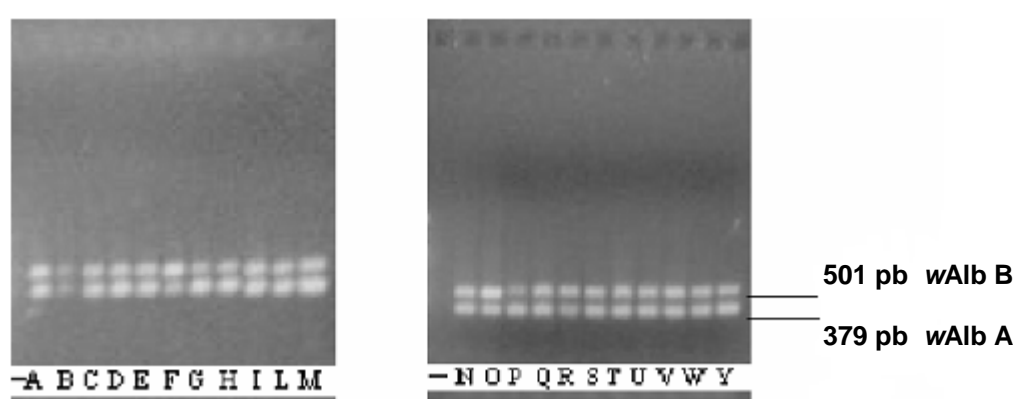


Figura 29: Profilo diagnostico dei prodotti di amplificazione risultanti da primer specifici per i ceppi di *Wolbachia wAlb A* e *wAlb B*; controlli negativi (Linee --)

Al fine di identificare un possibile ceppo di *Wolbachia* non ancora caratterizzato e rilevare variazioni all'interno delle sequenze amplificate, i frammenti del gene *wAlbA* e quelli del gene *wAlbB* sono stati purificati e sequenziati. Tutte le sequenze del gene *wAlbA* ottenute dai 22 campioni testati, come pure tutte quelle del gene *wAlbB*

ottenute dai medesimi campioni, allineate ed analizzate, sono risultate praticamente identiche.

8. CARATTERIZZAZIONE DELLA SIMBIOSI: EFFETTI SULLA “FITNESS” E PARAMETRI D’INFEZIONE

Per migliorare la comprensione dell’interazione tra *Wolbachia* ed *Ae. albopictus* abbiamo studiato gli effetti dell’infezione su alcuni parametri di “fitness” di questa specie.

8.1 EFFETTI SULLA FECONDITÀ E SULLA FERTILITÀ DELLE FEMMINE

Il confronto tra la fecondità media settimanale di femmine naturalmente infettate e femmine aposimbiontiche (prive dell’infezione) ha evidenziato nel complesso una maggiore produzione di uova nelle prime rispetto alle seconde (Fig. 30).

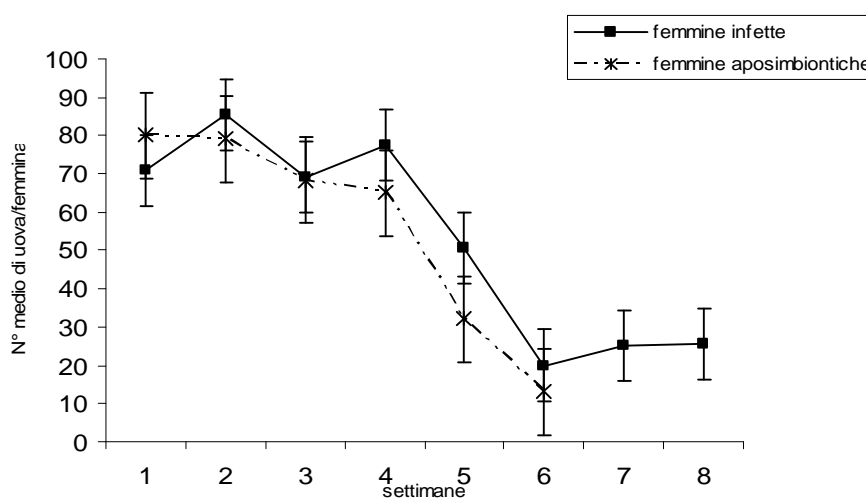


Figura 30: Confronto della fecondità in femmine infette ed aposimbiontiche. Il numero di settimane esprime l’età delle femmine analizzate (eseguiti 4 pasti di sangue umano).

Le differenze osservate sono risultate più evidenti col procedere dell’invecchiamento delle femmine saggiate (in particolare dopo la quarta settimana).

Tuttavia l'elaborazione statistica dei dati limitata al periodo nel quale entrambe le categorie di femmine sono sopravvissute, non ha evidenziato differenze statisticamente significative ($F=0,660$; g.l.= 54; $p>0,05$ -Anova univariata-SPSS Inc. 2003). Inoltre, è apparso evidente che l'invecchiamento delle femmine oltre la sesta settimana non ha influenzato il tasso di ovideposizione mantenutosi mediamente tra 20 e 24 uova per pasto di sangue fino alla loro morte. Complessivamente il numero medio di uova totali deposte da femmine infettate da *Wolbachia* è stato di $422,3\pm 24,9$ mentre le femmine aposimbiontiche nel corso della loro vita hanno mediamente deposto 337 ± 45 uova.

Lo studio della fertilità (percentuale di schiusura) delle uova deposte dalle femmine saggiate nelle differenti settimane ha evidenziato valori lievemente maggiori nelle uova deposte da femmine simbiotiche (Fig. 31). Calcolando la fertilità media delle uova deposte in tutto il periodo ovidepositivo abbiamo un valore di 38,65% di schiusura nelle uova deposte da femmine simbiotiche ed un 35,7% in quelle deposte da femmine prive del batterio.

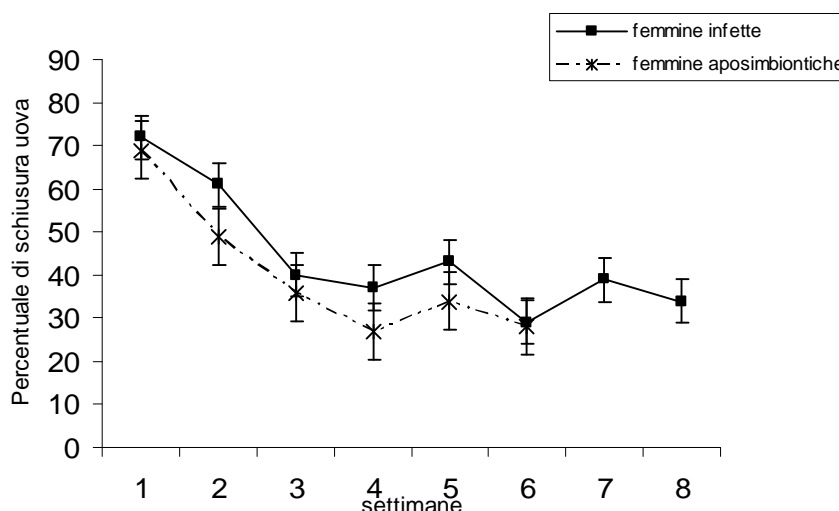


Figura 31: Confronto della fertilità media nelle ovideposizioni di femmine infette ed aposimbiontiche (unità sperimentale)

L'elaborazione statistica dei dati tuttavia non ha evidenziato differenze statisticamente significative ($F= 0,4$; g.l.= 54; $p>0,05$ -Anova univariata-SPSS Inc. 2003), probabilmente perché, come per la fecondità, anche per la fertilità le maggiori differenze tra la fertilità delle femmine infette e quelle aposimbiontiche si concentrano a partire dalla quarta settimana di ovideposizione, ovvero soltanto un paio di settimane prima della morte di tutte le femmine non infettate.

Per quanto concerne l'andamento della fertilità nel tempo, le femmine, sia infette che aposimbiontiche, hanno evidenziato i più alti livelli di fertilità (60-70%) nelle

prime ovideposizioni della loro vita. A partire dalla terza settimana abbiamo riscontrato un sensibile calo della fertilità con valori medi tra il 30 ed il 40%, rimasti invariati fino alla ultima settimana di ovideposizione. La diversa fertilità tra femmine che hanno una differente età può contribuire a spiegare la estrema variabilità che si riscontra nella schiusura delle uova prelevate dagli allevamenti massali di *Ae. albopictus* in cui le femmine sono di diverse età.

8.2 EFFETTI SULLA LONGEVITÀ DI FEMMINE E MASCHI

Differenze significative sono state riscontrate tra la longevità di femmine infette e quella di femmine senza *Wolbachia* (Log-Rank Test $p < 0,001$).

Come evidenziato nel grafico di figura 32 le femmine infette risultano significativamente più longeve. Dall'analisi comparativa eseguita con il metodo Kaplan-Meier (95%) ed applicando il test Log-Rank si riscontra una longevità media di 45 gg nelle femmine infette contro i 30 gg delle femmine aposimbiontiche ($\chi^2 = 18,01$; g.l.= 1; $p < 0,0001$).

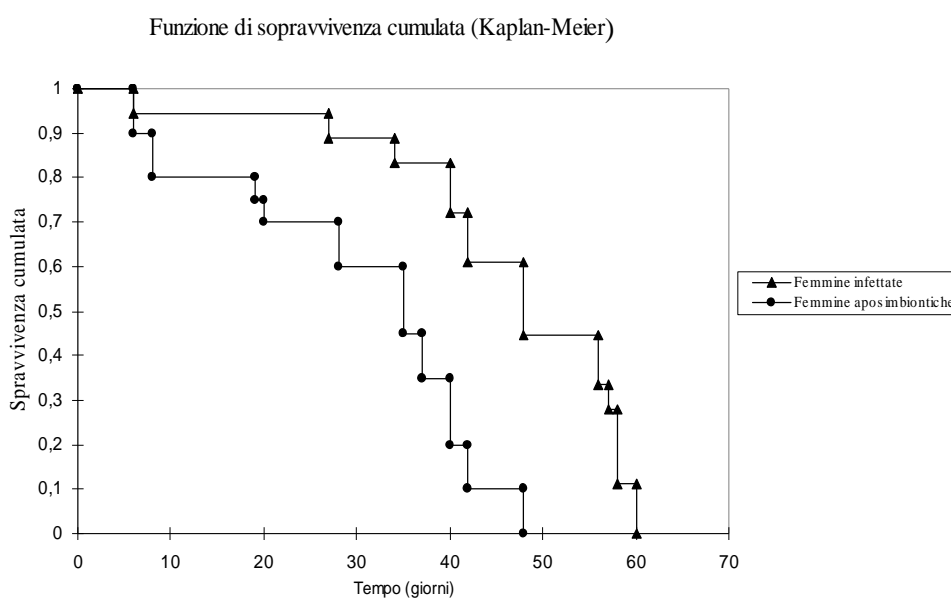


Figura 32: Andamento della sopravvivenza in femmine infette ed aposimbiontiche.

Di contro i dati di longevità relativi ai maschi infetti ed aposimbiontici non hanno evidenziato tra questi differenze significative (Test Log-Rank $p=0,6 > 0,05$) ($\chi^2 = 0,27$; g.l.= 1; $p > 0,05$).

La sopravvivenza media dei maschi infetti è risultata di 39 gg contro i 40,5 gg dei maschi aposimbiontici (metodo Kaplan-Meier) (Fig. 33).

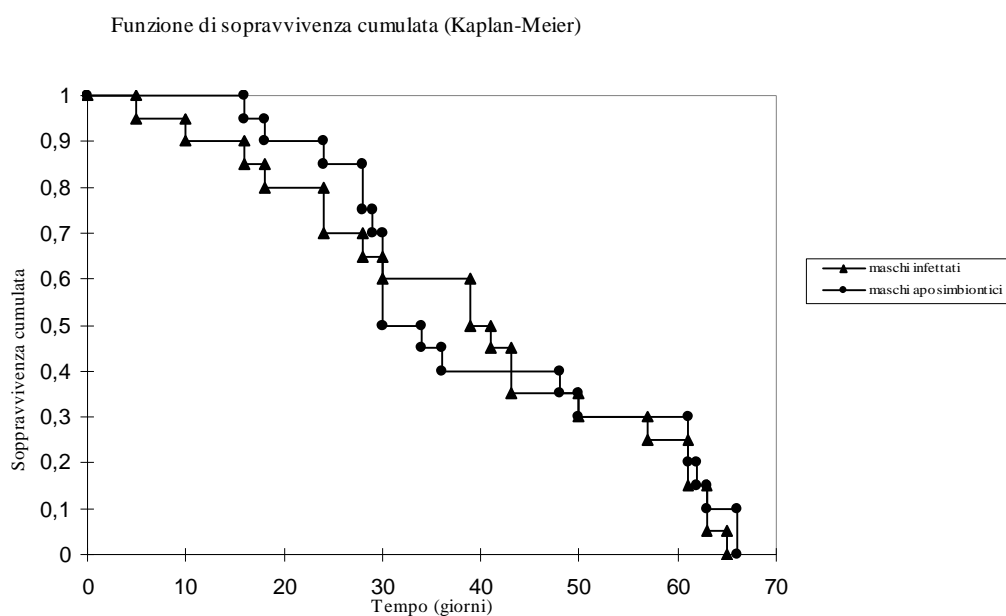


Figura 33: Andamento della sopravvivenza in maschi infetti ed aposimbiontici.

8.3 EFFETTI DELLA SIMBIOSI SULLA COMPETITIVITÀ SESSUALE DEI MASCHI

Prove di laboratorio. La lettura integrata dei dati sulla percentuale di schiusura delle uova deposte nei tre differenti incroci analizzati (Tab. 6) ha consentito di ottenere indirettamente una stima del livello di competitività tra i maschi infetti ed aposimbiontici, in relazione alla capacità di accoppiarsi ed inseminare per primi le femmine vergini disponibili.

Tabella 6- Tipologie di incroci analizzati e fertilità media riscontrata ($M \pm D.S.$) (lettere diverse a,b,c lungo la riga indicano significatività all'analisi della varianza)

A	B	C
♀♀ $w^- \times$ ♂♂ w^-	♀♀ $w^- \times$ ♂♂ w^+	♀♀ $w^- \times$ ♂♂ $w^- +$ ♂♂ w^+
65,6±6,6%^a	0%^b	34,4±6,3%^c

Dai dati di fertilità media degli incroci di controllo (A= maschi e femmine aposimbiontici) è stato possibile ottenere un valore di riferimento della fertilità delle femmine di *Ae. albopictus* nel nostro sistema sperimentale ($65,6\pm 6\%$). Molto utile, ai fini dello studio della competitività dei maschi infetti e non, è stata l'evidenza che tutti gli accoppiamenti tra femmine aposimbiontiche e maschi infetti (incrocio B) si sono risolti nella completa sterilità dovuta ad espressione della IC del 100%.

Pertanto, nell'incrocio C, nel quale maschi infetti e maschi non infetti compatibili, sono stati immessi contemporaneamente con femmine aposimbiontiche, è stato possibile mettere in correlazione la frequenza degli accoppiamenti incompatibili tra femmine w^- e maschi w^+ con la diminuzione della fertilità rispetto agli incroci di controllo.

Nell'incrocio C la fertilità media è risultata pari a $34,4\pm 6,3\%$, poco più della metà di quella riscontrata nell'incrocio compatibile A ($65,6\%$). Dall'analisi statistica dei dati (ANOVA- Newman-Keuls) è risultato che le differenze di fertilità media ($65,6 - 0 - 34,4$) osservate nei 3 incroci analizzati sono statisticamente significative. ($F= 153,3$; g.l =9; $p<0,01$). Poiché in tutte le 4 repliche dell'incrocio C, la fertilità delle femmine è stata studiata singolarmente, è stato possibile verificare che alcune femmine hanno deposto uova completamente sterili, essendosi accoppiate maschi infetti, mentre le altre hanno evidenziato livelli normali di fertilità. Il non aver osservato livelli intermedi di fertilità nelle ovideposizioni delle singole femmine ci conferma indirettamente il comportamento monogamico della specie anche in presenza di accoppiamenti multipli.

Nella tabella 7 viene presentato il quadro riassuntivo relativo al numero femmine inseminate da maschi normali incompatibili (produzione uova sterili) e da maschi aposimbiontici compatibili (accoppiamenti fertili). Le differenze in questa distribuzione degli accoppiamenti non sono risultate significative ($F = 0,13$; g.l =6; $p>0,05$) (Anova univariata- Med Calc) e ciò conferma che la rimozione di *Wolbachia* non ha determinato alterazioni nella competitività sessuale del maschio in condizioni di laboratorio.

Tabella 7. Distribuzione percentuale delle femmine accoppiatesi con maschi infetti e maschi privi di *Wolbachia* in condizioni di scelta. *3 femmine sono risultate non inseminate e perciò non considerate

Repliche	Numero ♀♀ che ha prodotto uova sterili*	Numero ♀♀ che ha prodotto uova fertili
R1= 20♀♀w ⁻	8 (42%)	11 (58%)
R2= 20♀♀w ⁻	13 (68,5%)	6 (31,5%)
R3= 20♀♀w ⁻	12 (60%)	8 (40%)
R4= 20♀♀w ⁻	7 (37,9%)	12 (63,1%)

Prove di campo. Analogamente a quanto evidenziato nei test di laboratorio, anche nei tunnels, si è potuto constatare che quando maschi infetti e maschi aposimbiontici competono in ugual numero per le femmine, il livello di fertilità si riduce circa del 50% (circa il 47%) rispetto al testimone nel quale tutti gli incroci sono compatibili. I livelli di inseminazione delle femmine recuperate, analizzati attraverso l'osservazione delle spermatozoi, sono risultati simili (89% nel tunnel A, 95% nel tunnel B) (Tab. 8).

Anche se tali risultati rivestono carattere preliminare, il dato ci sembra suggerire che, anche in condizioni molto più simili a quelle naturali, il livello di competitività del maschio aposimbiontico non risulta assolutamente inferiore a quello del maschio simbiotico.

Tabella 8: Livelli di fertilità riscontrati nei tunnels A e B

	Uova totali	Uova/♀ pasto	Larve	%Schiusura	♀♀ inseminate/recuperate
TUNNEL A Competizione	2567	44,3	1267	49,4	17/19
TUNNEL B Controllo	2366	37,6	2221	93,9	21/22

8.4 EFFETTI DELL'ETÀ DEI MASCHI SULLA INDUZIONE DELLA IC

Come abbiamo visto nel precedente paragrafo, la induzione di IC in *Ae. albopictus* è del 100%. Il risultato non cambia con l'invecchiamento dei maschi.

Nella tabella 9 vengono riportati i valori medi di mortalità embrionale riscontrati negli incroci A (maschi e femmine aposimbiontiche) e B (femmine aposimbiontiche per

maschi normali). Anche se con la procedura sperimentale utilizzata non è possibile distinguere la mortalità causata da IC da quella fisiologica, applicando l'ICcorr ($CI_{corr} (\%) = [(100 - 28)/(100 - 28)] \times 100 = 100\%$ e $CI_{corr} (\%) = [(100 - 31)/(100 - 31)] \times 100 = 100\%$) ai valori di mortalità osservati sia con maschi di 20 che di 35 giorni otteniamo che, indipendentemente dalle due età del maschio saggiate, la IC si realizza sempre al 100%:

Tabella 9- Mortalità embrionale media riscontrata in incroci compatibili (A) ed incompatibili (B) a due differenti età dei maschi

Tipo di incrocio	Età maschio 20 gg	Maschio 35 gg
A= compatibile	28±3%	31±3,7%
B= incompatibile	100%	100%

8.5 EFFETTI DELL'INFEZIONE SULLA FERTILITÀ DEI MASCHI

Il conteggio delle spermatozoi in seminate (Fig. 34) negli incroci con maschi normali e con maschi aposimbiontici, saggiati a tre differenti età, ha evidenziato innanzitutto un naturale decremento del numero di spermatozoi riempite, età dipendente, a prescindere dalla presenza o meno di *Wolbachia* (Fig. 35) ($F = 11,25$; g.l =57 ; $p < 0,01$ -Anova univariata- Med Calc).

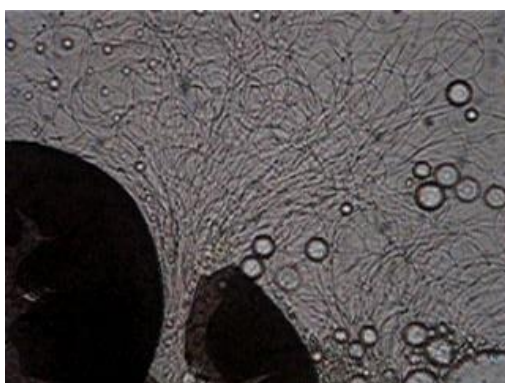


Figura 34: spermatozoi dissezionata con spermatozoi filamentosi

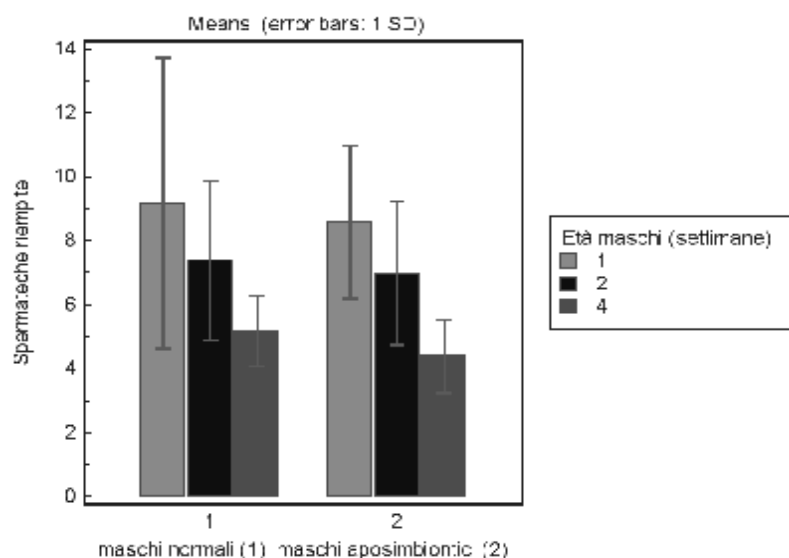


Figura 35: Andamento del numero di spermatozoi riempiti in funzione dell'infezione e dell'età

Le differenze riscontrate, che evidenziano nel complesso una maggiore capacità inseminativa media dei maschi infettati (7,2 spermatozoi riempiti contro le 6,6 dei maschi aposimbionici), indipendentemente dalle età saggiate, non sono statisticamente significative ($F = 0,63$; $g.l = 58$ $p > 0,05$ -Anova univariata- Med Calc). Lo studio dell'interazione dei due fattori combinati “presenza-assenza *Wolbachia* –età del maschio” non ha prodotto differenze significative nel tasso di riempimento delle spermatozoi ($F = 0,037$; $g.l = 2$; $p > 0,05$ -Anova bivariata- Med Calc). Questo dato indica che il naturale decadimento dell'attività inseminativa del maschio dovuto all'età avviene egualmente nei maschi infetti e non.

La procedura sperimentale adottata per lo studio della capacità di riempimento delle spermatozoi ha permesso anche di valutare la percentuale di femmine corteggiate con successo (femmine con almeno una spermatozoi riempita) in rapporto a quelle disponibili (10 per gabbia).

Come si può evidenziare dal grafico di figura 36 tale percentuale varia tra il 40 ed il 50%. Differentemente da quanto riscontrato per la produzione quantitativa di spermatozoi, il successo del corteggiamento non sembra risentire dell'età dei maschi, anche se dobbiamo riscontrare un calo più vistoso nei maschi aposimbionici. Tale decremento non è però risultato statisticamente significativo. ($F = 2,5$; $g.l = 27$; $p > 0,05$ -Anova univariata- Med Calc).

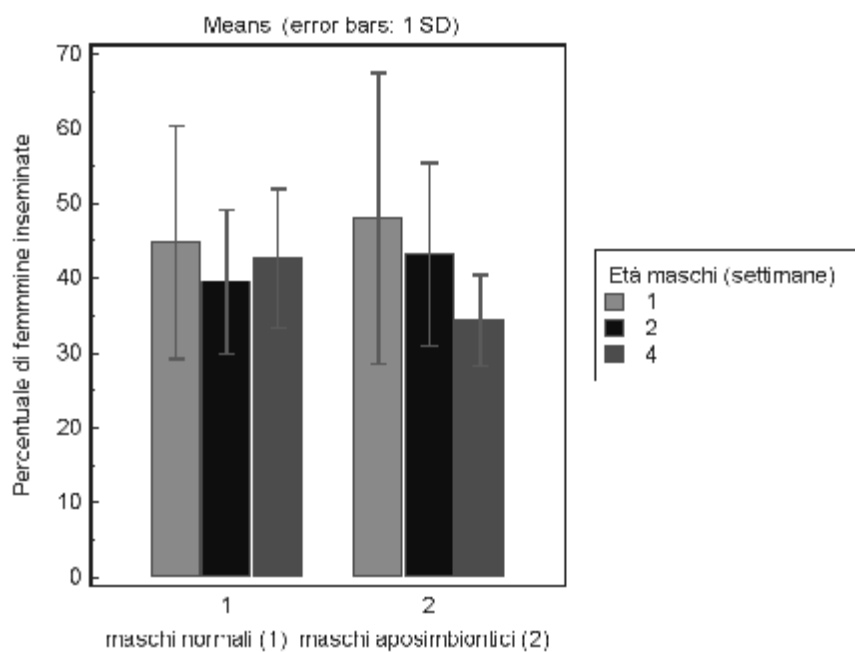


Figura 36: Andamento della fertilità del maschio in funzione dello stato simbiotico e dell'età

Anche per questo esperimento si conferma pertanto, come per lo studio della longevità, una ridotta o assente influenza della simbiosi sulla “fitness” riproduttiva del maschio, in condizioni di laboratorio.

8.6 TRASMISSIONE VERTICALE

L'analisi del DNA eseguita su 100 individui (50 maschi e 50 femmine) per ognuna delle 4 generazioni consecutive della colonia di *Ae. albopictus*, ha evidenziato il 100% di infezione in tutti i campioni analizzati (Tab. 10).

Generazioni	Individui osservati	Frequenza d'infezione (%)
P1	100	100
F1	100	100
F2	100	100
F3	100	100

9. CARATTERIZZAZIONE DELLE SIMBIOSI NELLE SPECIE DONATRICI *D. MELANOGASTER* (CEPPO CASACCIA) E *CX. PIFIENS* (CEPPO CAA)

Come trattato nel paragrafo 6.1 la scelta delle specie simbiotiche quali donatrici di ooplasma per le microiniezioni di *Ae. albopictus* è ricaduta su *D. melanogaster* e *Cx. pipiens*. Tuttavia prima di procedere alle microiniezioni abbiamo caratterizzato molecularmente il ceppo di *Wolbachia* presente nelle due specie ed abbiamo analizzato alcuni aspetti essenziali (parametri d'infezione) delle due simbiosi.

9.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI *WOLBACHIA* E PARAMETRI DI INFEZIONE NELLA SIMBIOSI CON *D. MELANOGASTER*

9.1.1 Identificazione del ceppo di *Wolbachia* presente in *D. melanogaster*

Il sequenziamento nucleotidico del prodotto di amplificazione del gene “*wsp*” (Van Meer *et al.*, 1999) di *Wolbachia* che infetta la nostra colonia di *D. melanogaster* ha evidenziato la completa identità di sequenza con il ceppo *wMel* (GB N. AF020072) (Fig. 37).

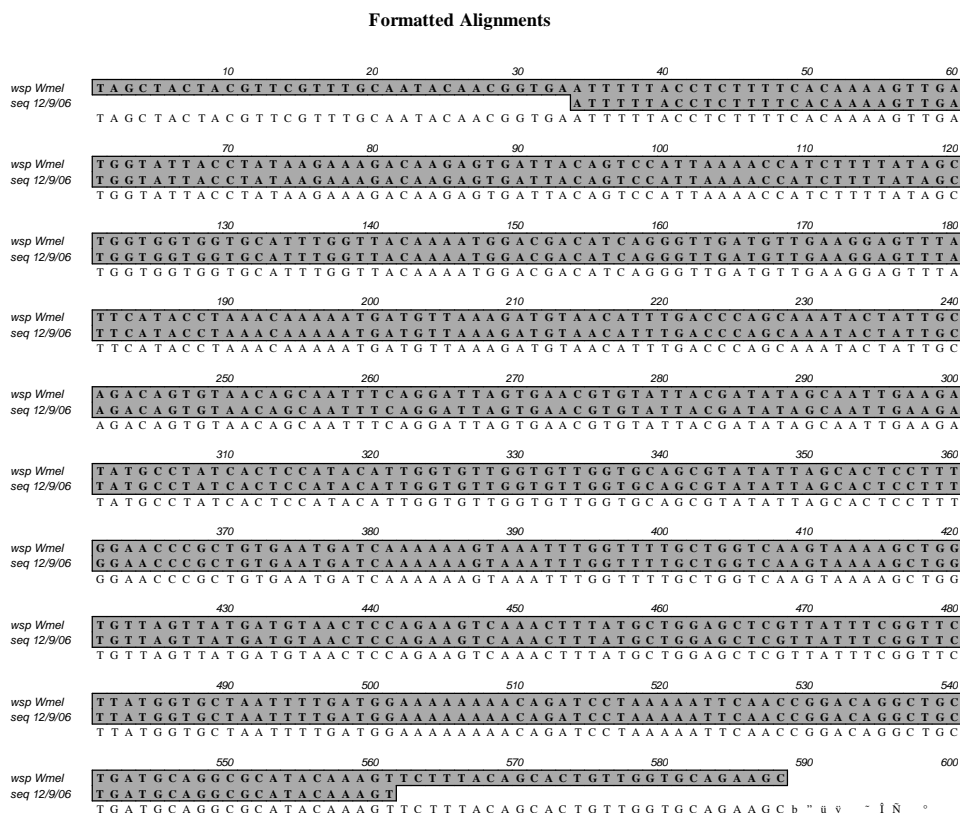


Figura 37: Allineamento della sequenza del prodotto di amplificazione del gene *wsp* di *Wolbachia* in *D. melanogaster* “ceppo Casaccia” e la sequenza *wMel* (GB N. AF020072)

In considerazione del fatto che la colonia è partita da individui selvatici raccolti in campo, tale informazione genetica conferma ulteriormente che in *D. melanogaster*, la regione ipervariabile del gene “*wsp*” si è mantenuta costante, diversamente da quanto osservato in *D. simulans* (Zhou *et al.*, 1998).

9.1.2 Incompatibilità citoplasmatica in *D. melanogaster*

I valori di IC sono stati calcolati utilizzando un indice corretto dell’incompatibilità citoplasmatica (Bourtzis *et al.*, 1998) (cfr. par. 5.2.4) al fine di minimizzare l’influenza della mortalità media naturale del sistema (Tab. 11)

Tabella 11: Valori medi (\pm DS) di mortalità embrionale e IC dedotti dai valori di fertilità delle uova deposte nei 4 differenti incroci analizzati utilizzando femmine vergini di 24 ore e maschi di 3 differenti età (1, 7 e 15 gg)- *=differenze significative

Età del maschio (gg)	1 \pm 0,5	7 \pm 0,5	15 \pm 0,5
Tipo di incrocio	Mortalità delle uova (%)		
A: ♀W ⁺ x ♂W ⁺	14,2 \pm 4	13,6 \pm 3,2	13,4 \pm 7,9
B: ♀W ⁻ x ♂W ⁻	14,4 \pm 4,8	21,6 \pm 7,3	19 \pm 6,9
C: ♀W ⁺ x ♂W ⁻	13 \pm 5,6	24,2 \pm 4,2	17,4 \pm 7,7
D: ♀W ⁻ x ♂W ⁺	75\pm5,4*	77\pm 5,6*	20,1 \pm 5,4
Stima ICcorr	71%	71,3%	4%

L'analisi dei dati della mortalità embrionale (uova non schiuse) osservati negli incroci A,B,C e D conferma che i valori di mortalità relativi all'incrocio D sono significativamente maggiori di quelli osservati nei 3 incroci compatibili (A, B e C) (Kruskal-Wallis; g.l.= 3; $p < 0,0001$). L'analisi comparativa delle medie attraverso il test Student-Newman-Keuls, indica che non ci sono invece differenze significative tra i valori di mortalità riscontrati nei 3 incroci compatibili A, B e C. Negli esperimenti finalizzati alla valutazione dell'influenza dell'età del maschio sulla mortalità embrionale, non si evidenziano differenze significative negli incroci compatibili (Kruskal-Wallis; g.l.= 23; $p = 0,37$).

Se attraverso il test Student-Newman-Keuls analizziamo i valori medi di mortalità embrionale relativi a tutti gli incroci in cui sono stati utilizzati maschi della terza classe di età (15 gg), osserviamo che i valori di mortalità dell'incrocio incompatibile D non sono più significativamente maggiori di quelli riscontrati negli incroci compatibili (Fig. 38). L'età del maschio è pertanto un fattore che pur non avendo di per sé significativi effetti sulla percentuale di mortalità embrionale, ha invece un significativo impatto sulla induzione della IC.

Pertanto, differentemente da quanto riscontrato in *Ae. albopictus*, l'IC unidirezionale si realizza solo parzialmente (circa il 71% di sterilità indotta) ed è fortemente legata alla età del maschio (1-7 gg). Infatti, già a 15 giorni di vita dei maschi, l'induzione di questo fenomeno è estremamente bassa (non più del 4%) (Tab. 11 e Figg. 38 e 39).

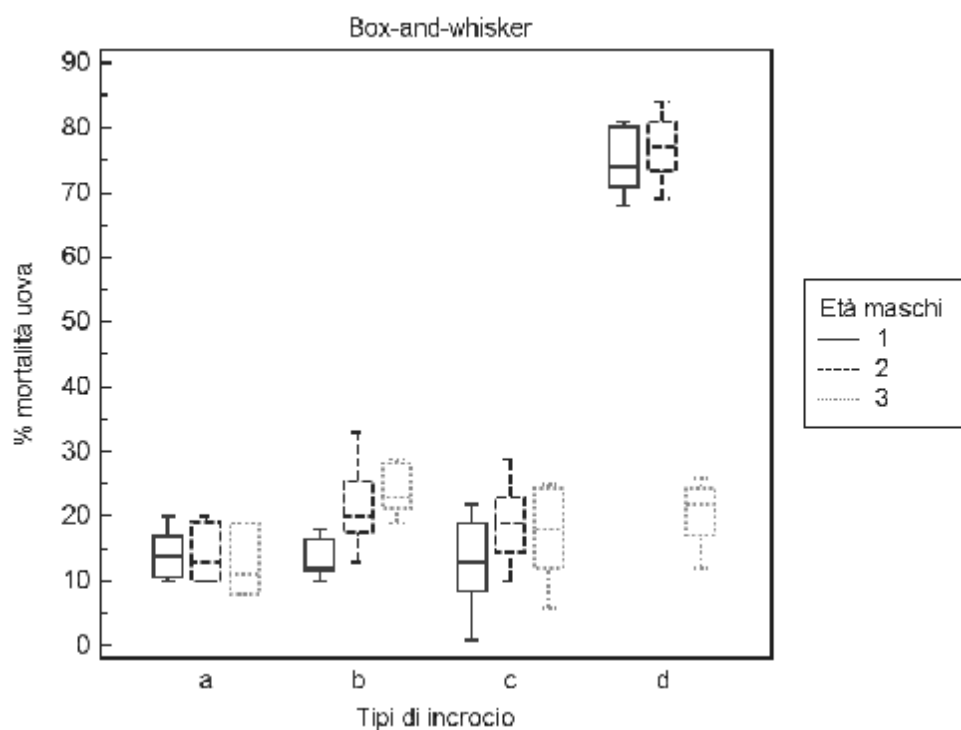


Figura 38: Percentuale di mortalità delle uova deposte nei 4 differenti incroci analizzati utilizzando femmine vergini di 24 ore e maschi di 3 differenti età (1, 7 e 15 gg)

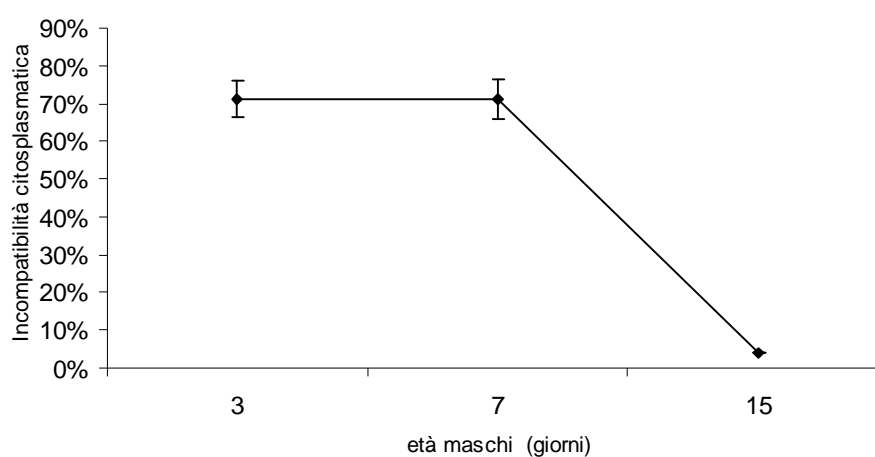


Figura 39 – Andamento della IC indotta a differenti età del maschio di *D. melanogaster*.

Ciò che interessa sottolineare nel presente contesto è che siamo in presenza di un ceppo di *Wolbachia* (*wMel*) caratterizzabile come moderatamente “mod+”, “resc+” (cfr. par. 3.2.1) e che pertanto in linea teorica non sembrerebbe un candidato ideale per transinfettare *Ae. albopictus* ed ottenere linee di popolazioni nelle quali la IC bidirezionale si realizzi nella piena totalità.

Tuttavia occorre ricordare che la IC non è una proprietà intrinseca del batterio bensì il frutto della interazione dello stesso con l’ospite.

9.1.3 Frequenza dell' infezione nella colonia di *D. melanogaster*

I dati relativi alla frequenza di individui infetti nella nostra colonia a partire dalle generazioni parentali e nelle successive (Fig. 40) confermano una elevata efficienza della trasmissione verticale del batterio di poco inferiore al 100%. La percentuale di individui risultati non infetti al test PCR è stata molto bassa tra il 6 e l'8%.

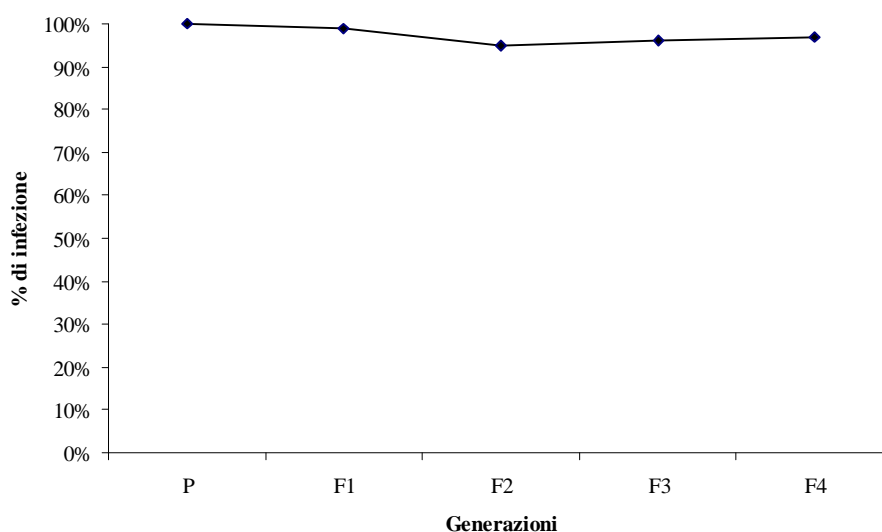


Figura 40: Frequenza di infezione nel corso delle generazioni

9.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI *WOLBACHIA* E PARAMETRI DI INFEZIONE NELLA SIMBIOSI CON *Cx. pipiens*

9.2.1 Identificazione del ceppo di *Wolbachia* presente in *Cx. pipiens*

La sequenza del gene *wsp* analizzata in campioni di *Culex pipiens* prelevati dalla nostra colonia è risultata perfettamente sovrapponibile con la sequenza AF301010 del ceppo *wPip* riscontrato in *Cx. pipiens pipiens* (100% di identità di sequenza) (Fig. 41).

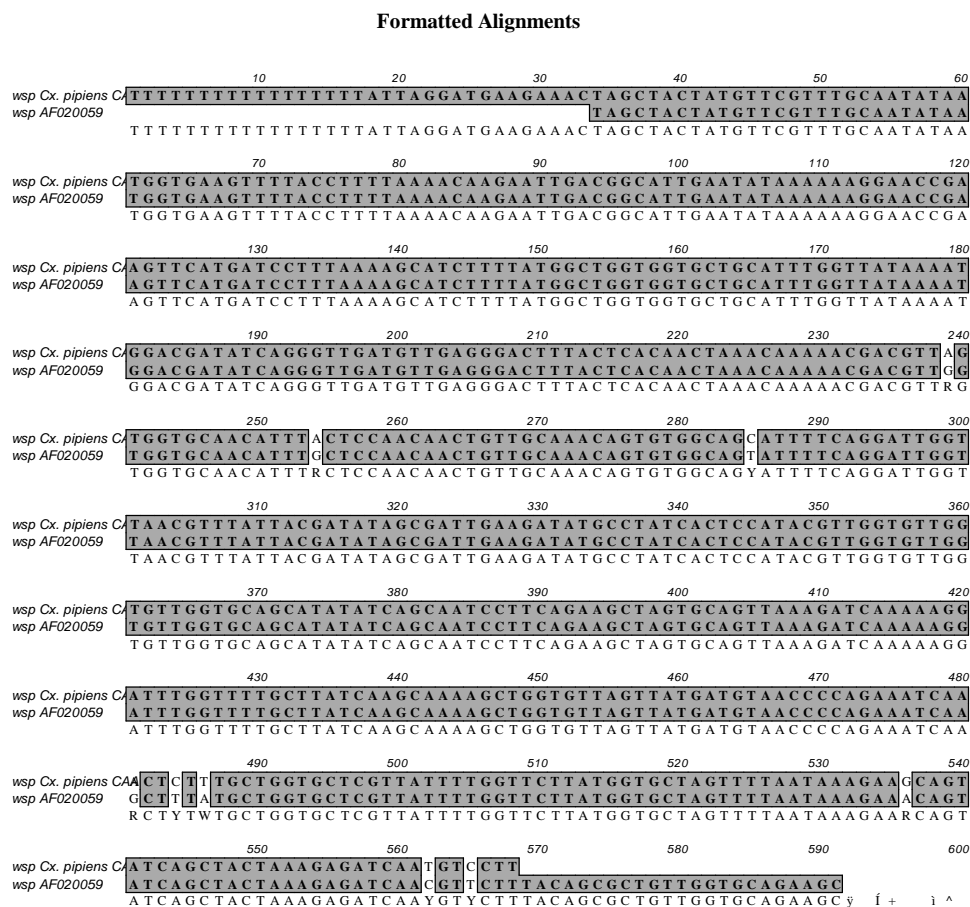


Figura 42: Matrici di allineamento tra la sequenza ottenuta dai campioni di *Cx. pipiens* CAA e le sequenza AF020059 (wAlb B)

Le 8 mutazioni puntiformi rilevate consentono la distinzione del ceppo wAlb B da quello wPip attraverso il sequenziamento dei prodotti di PCR.

9.2.2 Incompatibilità citoplasmatica in *Cx. pipiens*

Il test Kruskal-Wallis (g.l.= 3; $P < 0,0001$), per l'analisi dei dati sulla mortalità embrionale, ha confermato che esiste almeno una categoria di incroci i cui valori medi si discostano significativamente dagli altri. Il test Student-Newman-Keuls, per il confronto a delle medie a coppie, ci dice che questo incrocio è quello D (incrocio incompatibile) ($p < 0,05$; g.l = 56; $F = 631,45$) e che inoltre non ci sono differenze significative tra i tassi di mortalità embrionali negli incroci compatibili (A, B, C).

I valori di IC (Tab. 12) sono stati calcolati utilizzando l'indice di correzione "ICcorr" (cfr. par. 5.2.1) che permette di sottrarre alla mortalità dovuta ad IC quella di controllo nel sistema sperimentale.

Come già discusso nel paragrafo dedicato allo studio della IC in *D. melanogaster*, anche in *Cx. pipiens* l'effetto dell'età maschio si traduce in un lieve ma significativo ($p < 0,05$) ripristino della fertilità (dal 100% di mortalità embrionale al 93,7%). Il risultato conferma dunque quanto riscontrato da Rasgon e Scott (2003) in studi sulla IC compiuti su campioni popolazioni californiane del complesso *Cx. pipiens*.

Tabella 12: Valori medi (\pm DS) di mortalità embrionale e IC dedotti dai valori di mortalità delle uova deposte nei 4 differenti incroci analizzati (A,B,C, e D)

Età del maschio (gg)	3 \pm 0,5	15 \pm 0,5	25 \pm 0,5
Tipo di incrocio	Mortalità delle uova (%)		
A: ♀w ⁺ x ♂w ⁺	4 \pm 4,4	2,97 \pm 3,4	19,7 \pm 8,4
B: ♀w ⁻ x ♂w ⁻	7,9 \pm 8,9	10,7 \pm 9,2	8,3 \pm 8,9
C: ♀w ⁺ x ♂w ⁻	2,2 \pm 4,3	3,2 \pm 3,9	13,9 \pm 7,2
D: ♀w ⁻ x ♂w ⁺	100*	100*	93,7\pm6,6
Stima ICcorr	100%	100%	80%

Alcune foto scattate sugli embrioni analizzati (Fig. 43A e 43B) evidenziano le differenze tra l'aspetto morfologico di un uovo prodotto da femmine non inseminate, da quelle prodotte in incroci incompatibili. Come descritto da Duron e Weill (2006), la presenza di macchie nella porzione mediana-posteriore dell'embrione corrisponde ad un arresto precoce del processo di differenziazione.



Figura 43. Uova di *Cx. pipiens*: A: uovo non fertilizzato; B: uovo da incrocio incompatibile con tipiche macchie embrionali; C: analisi embrionale morfologica comparativa tra embrioni di differenti classi di sviluppo e provenienti da incroci compatibili e incompatibili (Duron e Weill, 2006)

9.2.3 Frequenza dell'infezione nella colonia di *Cx. pipiens*

I dati relativi alla frequenza di individui infetti nella nostra colonia di *Cx pipiens* a partire dalle generazioni parentali (individui fondatori) e nelle successive (Fig. 44) confermano un'elevata efficienza della trasmissione verticale del batterio prossima a 100%.

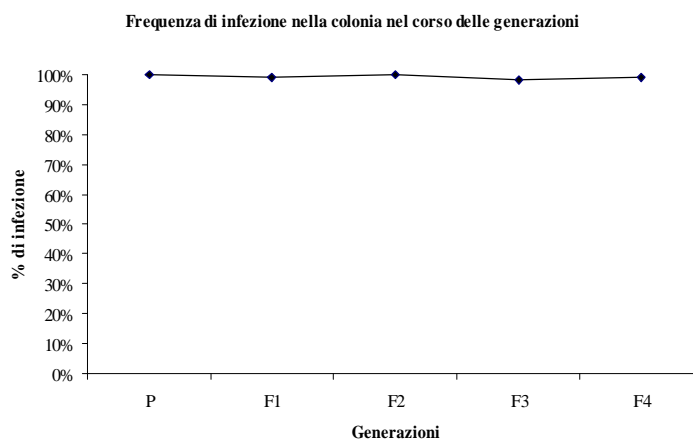


Figura 44: Frequenza di infezione nel corso delle generazioni nella colonia di *Cx. pipiens* (CAA).

10. DATI DELLE MICROINIEZIONI

10.1 LOCALIZZAZIONE ADDENSAMENTI DI *WOLBACHIA* NEGLI EMBRIONI DELLE SPECIE DONATRICI

La marcatura (DAPI) degli embrioni di entrambe le specie donatrici di ooplasma infetto, e la successiva visualizzazione attraverso epifluorescenza, ha messo in evidenza concentrazioni di fluorescenza ai due poli cellulari, indice di una maggiore concentrazione di *Wolbachia* (Fig. 45). L'osservazione conferma quanto precedentemente evidenziato in *Cx. pipiens* (Rasgon e Scott, 2003). Sulla base di tale riscontro, il prelievo di ooplasma per il trasferimento è stato eseguito in prossimità dei poli cellulari.



Figura 45: Embrione di *Cx. pipiens* marcato con “DAPI” e visualizzato attraverso epifluorescenza. Nel cerchio un’area di addensamento della fluorescenza nel polo anteriore.

10.2 PARAMETRI DELLE MICROINIEZIONI wMEL-*AE. ALBOPICTUS*

Complessivamente sono state microiniettate 2000 uova di *Ae. albopictus* con ooplasma prelevato da embrioni di *D. melanogaster*. Delle 2000 uova microiniettate soltanto 1520 (76%) hanno evidenziato, entro 40 minuti dal trattamento, un normale imbrunimento del corion; le restanti 480 (24%) hanno arrestato il loro sviluppo, come dimostrato da una anomala colorazione del corion che anziché diventare nero è rimasto bianco, grigio o marrone.

In tabella 13 sono riportati i risultati delle microiniezioni di wMel in *Ae. albopictus*. Come si può evidenziare, delle 1520 uova che hanno evidenziato completa corionizzazione, solamente 38 (2,5%) hanno sviluppato il primo stadio larvale. Delle 38 larve solamente 30 hanno raggiunto lo stato di pupa (78%) e dalle 30 pupe sono sfarfallati 29 adulti suddivisi in 17 maschi e 12 femmine (generazione G₀).

Tabella 13. Dati delle microiniezioni di uova di *Ae. albopictus* con ooplasma da embrioni di *D. melanogaster*

N. esperm.	N. uova iniettate	Uova schiuse (%)	Pupe recuperate (%)	N. adulti sfarfallati (%)	Rapporto sessi (M:F)	♂♂ G ₀ (wMel PCR+)	♀♀ G ₀ (wMel PCR+)
1	500	20 (4%)	14 (2,8%)	12 (2%)	8:4	1	2
2	600	18 (3%)	14 (2,3%)	10 (1,6%)	7:3	3	2
3	420	10 (2,3%)	9 (2,1%)	7 (1,6%)	5:2	1	1
TOTALI	1520	38 (2,5%)	30 (1,9%)	29 (1,9%)	17:12	5	5

Tutti gli adulti della generazione G₀ sono stati accoppiati con individui della linea aposimbiontica (priva di *Wolbachia*) e solo successivamente sono stati analizzati tramite PCR per verificare la presenza di *Wolbachia* ceppo wMel (Fig. 46).

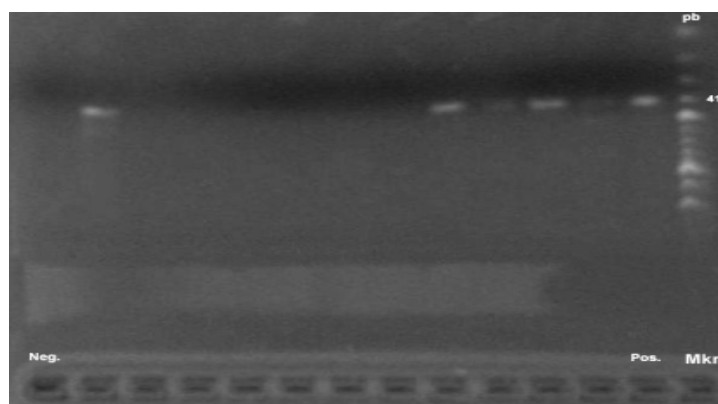


Figura 46: Amplificazione della sequenza specifica wMel in DNA estratto da femmine adulte di *Ae. albopictus* recuperate dal processo microiniettivo (bande a 405 bp)

Come riportato in tabella 13, dei 29 adulti sfarfallati, 10 (34%) sono risultati positivi alla reazione di amplificazione con i primers specifici per il gene wMel confermando l'avvenuto trasferimento di questo ceppo di *Wolbachia* da *D. melanogaster*. In questi esperimenti è risultata maggiore la percentuale di femmine transinfette (42%) rispetto ai maschi (29%).

Nella tabella 14 sono riportate le percentuali di schiusura delle uova da accoppiamenti tra gli individui G₀ (maschi e femmine rispettivamente) ed i rispettivi partners della linea aposimbiontica. Dalla prima tabella, che riguarda gli accoppiamenti tra i maschi G₀ e le femmine aposimbiontiche, si può osservare che la fertilità degli incroci non sembra essere influenzata dall'avvenuto processo transinfettivo. In sostanza non si riscontra alcun aumento di mortalità embrionale attribuibile ai maschi risultati wMel positivi.

Tabella 14: A) Incroci tra individui maschi G₀ e femmine aposimbionti e relativi valori di fertilità.

(+= spermateca piena; 0= spermateca vuota)

Incroci Maschi adulti recuperati	Accoppiamento (verifica spermateche)	Fertilità (% di schiusura) (N. uova)	Esito PCR
♂ n. 3 x ♀ Apo	+	87 (29)	Negativo
♂ n. 4 x ♀ Apo	000	0 (12)	Negativo
♂ n. 5 x ♀ Apo	+	66 (34)	wMel +
♂ n. 6 x ♀ Apo	000	0 (0)	Negativo
♂ n. 7 x ♀ Apo	+	63 (43)	wMel +
♂ n. 8 x ♀ Apo	+	66,5 (54)	Negativo
♂ n. 9 x ♀ Apo	++	77,4 (56)	Negativo
♂ n. 10 x ♀ Apo	+	67 (32)	Negativo
♂ n. 11 x ♀ Apo	+	54 (27)	wMel +
♂ n. 12 x ♀ Apo	+	65,4 (21)	Negativo
♂ n. 13 x ♀ Apo	++	75 (33)	Negativo
♂ n. 14 x ♀ Apo	+++	75,7 (36)	Negativo
♂ n. 15 x ♀ Apo	000	0 (8)	Negativo
♂ n. 16 x ♀ Apo	000	0 (0)	wMel +
♂ n. 17 x ♀ Apo	000	0 (2)	wMel +

Nella tabella 15 si può osservare che delle 5 femmine risultate positive al processo transinfettivo, 4 sono morte molto precocemente (entro 24 ore dallo sfarfallamento) e non hanno potuto accoppiarsi, mentre la quinta femmina ha vissuto regolarmente ma senza essere fecondata. Sei delle 7 femmine risultate non transinfettate, sono state in grado di accoppiarsi e produrre uova con livelli di fertilità nella norma.

Tabella 15 Incroci tra femmine G₀ e maschi aposimbionti. (valori di fertilità, esito PCR, annotazioni sull'accoppiamento e sulla vitalità degli adulti) (+= spermateca piena; 0= spermateca vuota)

Incroci Femmine adulte recuperate	Accoppiamento (verifica spermateche)	Fertilità (% di schiusura) (N. uova)	Esito PCR	Annotazioni sulle femmine
♀ n. 1 x ♂ Apo	+	69 (33)	Negativo	Normale
♀ n. 2 x ♂ Apo	000	0 (0)	wMel +	MORTE entro 24 o.
♀ n. 3 x ♂ Apo	000	0 (0)	Negativo	MORTE entro 24 o.
♀ n. 4 x ♂ Apo	+	78 (54)	Negativo	Normale
♀ n. 5 x ♂ Apo	000	0 (0)	wMel +	MORTE entro 24 o.
♀ n. 6 x ♂ Apo	+	66 (21)	Negativo	Normale
♀ n. 7 x ♂ Apo	000	0 (0)	wMel +	MORTE entro 24 o.
♀ n. 8 x ♂ Apo	000	0 (0)	wMel +	MORTE entro 24 o.
♀ n. 9 x ♂ Apo	000	0 (0)	wMel +	MORTE entro 24 o.
♀ n. 10 x ♂ Apo	++	89 (32)	Negativo	Normale
♀ n. 11 x ♂ Apo	+	76 (21)	Negativo	Normale
♀ n. 12 x ♂ Apo	++	69 (29)	Negativo	Normale

10.3 PARAMETRI DELLE MICROINIEZIONI wPIP-AE. ALBOPICTUS

Complessivamente sono state iniettate 1500 uova di *Ae. albopictus* con ooplasma prelevato da embrioni di *Cx. pipiens*. Il numero di uova trattate è stato inferiore a quello utilizzato per le microiniezioni con ooplasma di *D. melanogaster*. Tale differenza è imputabile alla maggiore difficoltà di reperimento delle zattere di ovideposizione del culicide rispetto alla illimitata disponibilità di uova della drosofila.

Delle 1500 uova iniettate ben l'82% (1240) ha portato a termine il processo di corionizzazione ed è stato sottoposto al trattamento di immersione in acqua per lo sviluppo larvale. Dalle 1240 uova corionizzate sono schiuse complessivamente 70 larve (pari al 5,6%), percentuale di schiusura superiore a quella ottenuta iniettando ooplasma di *D. melanogaster* (2,5%). La resa in pupe e lo sfarfallamento degli adulti sono stati rispettivamente del 4,5% e del 3,7%, rispetto al totale delle uova corionizzate. Anche in questo caso valori superiori a quelli riscontrati nelle prove con *D. melanogaster* (Tab. 16)

Tabella 16. Dati delle microiniezioni uova di *Ae. albopictus* con ooplasma da embrioni di *Cx. pipiens*

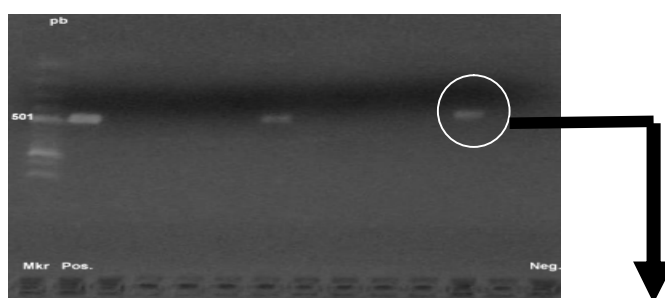
N. esperm.	N. uova iniettate	Uova schiuse (%)	Pupe recuperate (%)	N. adulti sfarfallati (%)	Rapporto sessi (♂:♀)	♂♂ G ₀ (wPip PCR+)	♀♀ G ₀ (wPip PCR+)
1	500	18 (3,6%)	11 (2,2%)	10 (2%)	4:6	1	0
2	600	42 (7%)	38 (6,3%)	30 (5%)	19:11	4	1
3	140	10 (7%)	8 (5,7%)	7 (5%)	5:5	2	1
TOTALI	1240	70 (5,6%)	57(4,5%)	47 (3,7%)	28:22	7	2

Per quanto riguarda il processo transinfettivo con wPip si evidenzia un successo più alto nel sesso maschile (7 transinfetti su 28, pari al 25%) rispetto a quello femminile (due femmine transinfettate su 22 microiniettate pari allo 0,9%). Complessivamente la percentuale di adulti che ha acquisito la nuova infezione è stata del 16%, poco meno della metà di quanto riscontrato iniettando ooplasma di *D. melanogaster* (34% di adulti transinfettati)

In figura 47 è possibile osservare la matrice di allineamento tra la sequenza AF301010 (gene *wsp* in *Cx. Pipiens* = wPip) e la sequenza del prodotto di amplificazione del gene *wsp* di uno dei maschi risultati positivi alla reazione di amplificazione del gene *wsp*. Il sequenziamento è stato necessario perché per l'amplificazione di wAlb B di *Ae. albopictus* e wPip di *Cx. pipiens* è stata usata la

stessa coppia di primers. Come abbiamo visto nel paragrafo dedicato alla caratterizzazione molecolare di *wPip* (par. 9.2.1), la presenza di 8 mutazioni puntiformi consente di discernere i due ceppi di *Wolbachia*.

L'aver riscontrato il 100% di similarità tra la sequenza del gene *wsp* degli individui microiniettati risultati positivi alla reazione di PCR e quella di *wPip*, conferma l'avvenuto trasferimento di questo ceppo di *Wolbachia* e l'avvenuta rimozione del ceppo *wAlb B*.



Formatted Alignments

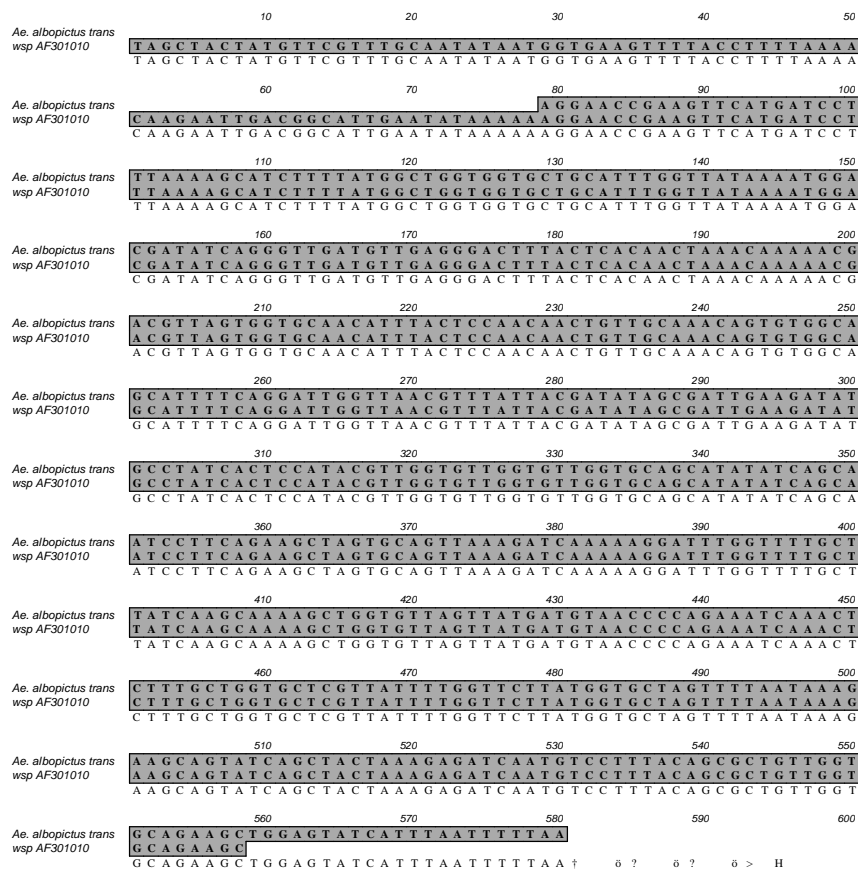


Figura 47: Matrici di allineamento tra la sequenza *wsp* ottenuta dai campioni di *Cx. pipiens* AAA (*wsp* AF301010) e le sequenza riscontrata amplificando il gene *wsp* in *Ae. albopictus* transinfettato.

Nella tabella 17 vengono riportati i valori di fertilità degli incroci tra maschi della generazione G₀ e femmine della linea aposimbiontica. Si può osservare come i livelli di fertilità siano molto bassi (valori compresi tra 0,5 e 11%) negli incroci con maschi risultati transinfettati. Tale risultato non era stato riscontrato nei maschi transinfettati con wMel (Tab. 13).

Tabella 17: Incroci tra individui maschi G₀ e femmine aposimbiontici e relativi valori di fertilità.

(+= spermateca piena;0= spermateca vuota)

Incroci Maschi adulti recuperati	Accoppiamento (verifica spermateche)	Fertilità (% di schiusura) (n. uova)	Esito PCR
♂ n. 1 x ♀ Apo	+++	77 (45)	Negativo
♂ n. 2 x ♀ Apo	++	94 (32)	Negativo
♂ n. 3 x ♀ Apo	000	0 (46)	Negativo
♂ n. 4 x ♀ Apo	++	88 (35)	Negativo
♂ n. 5 x ♀ Apo	+	4 (45)	wPip +
♂ n. 6 x ♀ Apo	000	0 (3)	Negativo
♂ n. 7 x ♀ Apo	+++	1 (64)	wPip +
♂ n. 8 x ♀ Apo	+	79 (33)	Negativo
♂ n. 9 x ♀ Apo	+++	96 (77)	Negativo
♂ n. 10 x ♀ Apo	+	89 (44)	Negativo
♂ n. 11 x ♀ Apo	+	0,5 (44)	wPip +
♂ n. 12 x ♀ Apo	+	55 (23)	Negativo
♂ n. 13 x ♀ Apo	+++	100 (55)	Negativo
♂ n. 14 x ♀ Apo	+	75,7 (32)	Negativo
♂ n. 15 x ♀ Apo	000	0 (0)	Negativo
♂ n. 16 x ♀ Apo	000	0 (0)	wPip +
♂ n. 17 x ♀ Apo	000	0 (0)	wPip +
♂ n. 18 x ♀ Apo	+	87 (51)	Negativo
♂ n. 19 x ♀ Apo	000	0 (8)	Negativo
♂ n. 20x ♀ Apo	+++	2 (16)	wPip +
♂ n. 21 x ♀ Apo	000	0 (21)	Negativo
♂ n. 22 x ♀ Apo	+	11 (21)	wPip +
♂ n. 23 x ♀ Apo	+	55 (34)	Negativo
♂ n. 24 x ♀ Apo	++	77,4 (38)	Negativo
♂ n. 25 x ♀ Apo	++	67 (24)	Negativo
♂ n. 26 x ♀ Apo	+	68 (56)	Negativo
♂ n. 27 x ♀ Apo	+	55,4 (34)	Negativo
♂ n. 28 x ♀ Apo	+	89 (56)	Negativo

Per quanto riguarda le femmine G₀ (Tab. 18) non è stato possibile ottenere ovideposizioni da parte delle uniche 2 femmine risultate transinfettate, che hanno evidenziato scarsa vitalità (bassa propensione al volo, all'alimentazione ed all'accoppiamento) ed una longevità rispettivamente di 4 e 7 gg.

Tabella 18. Incroci tra femmine G₀ e maschi aposimbionici. (valori di fertilità, esito PCR, annotazioni sull'accoppiamento e sulla vitalità degli adulti) (+= spermateca piena;0= spermateca vuota)

Incroci femmine adulte recuperate	Accoppiamento (verifica spermateche)	Fertilità (% di schiusura)	Esito PCR	Annotazioni sulle femmine
♀ n. 1 x ♂ Apo	+	77 (26)	Negativo	Normale
♀ n. 2 x ♂ Apo	000	0 (0)	wPip +	NO COPULA
♀ n. 3 x ♂ Apo	000	0 (8)	Negativo	Normale
♀ n. 4 x ♂ Apo	+	78 (36)	Negativo	Negativo
♀ n. 5 x ♂ Apo	000	0 (0)	wPip +	NO COPULA
♀ n. 6 x ♂ Apo	+	86 (47)	Negativo	Normale
♀ n. 7 x ♂ Apo	++	66 (45)	Negativo	Normale
♀ n. 8 x ♂ Apo	+++	99 (55)	Negativo	Normale
♀ n. 9 x ♂ Apo	++	79 (25)	Negativo	Normale
♀ n. 10 x ♂ Apo	+	87 (29)	Negativo	Normale
♀ n. 11 x ♂ Apo	+	61 (44)	Negativo	Normale
♀ n. 12 x ♂ Apo	+++	88 (37)	Negativo	Normale

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Obiettivo di questo lavoro di ricerca è stato indagare alcuni aspetti della simbiosi tra *Aedes albopictus* ed il batterio *Wolbachia* in rapporto alla possibilità di utilizzare la Incompatibilità Citoplasmatica (IC) quale risorsa biologica per lo sviluppo di strategie di lotta genetica al culicide.

L'utilizzo di questa forma naturale di sterilità lascia intravedere diversi vantaggi applicativi rispetto alla tecnica di sterilizzazione degli insetti ottenuta con radiazioni ionizzanti quale soprattutto una maggiore conservazione delle qualità competitive del maschio. I maschi incompatibili, infatti, prima di essere rilasciati in campo, non sono sottoposti ad alcun trattamento di sterilizzazione che comporta, oltre allo stress dell'agente sterilizzante stesso, continue manipolazioni. Inoltre, poiché il maschio incompatibile viene allevato e lanciato in campo senza alcun passaggio intermedio, è possibile adottare di sistemi di allevamento più semplici non funzionali ad una successiva fase di irraggiamento. Tutto ciò si traduce in una riduzione dei costi della tecnica che, prescindendo dall'impiego di una sorgente di radiazioni ionizzanti, diviene economicamente più competitiva.

Lo studio svolto in questo lavoro di tesi è stato articolato in due fasi principali. Nella prima fase è stato necessario acquisire una più profonda conoscenza delle caratteristiche della simbiosi *Wolbachia-Ae. albopictus* (-pattern di distribuzione dell'infezione, -parametri dell'infezione, -effetti sui parametri di fitness dell'ospite) per definire le potenzialità applicative della IC e proporre strategie applicative per la lotta alla zanzara tigre. La seconda fase della ricerca ha riguardato lo sviluppo di metodiche per realizzare linee di laboratorio incompatibili con le popolazioni naturali ed utilizzare la IC quale sorgente di sterilità nella lotta genetica contro *Ae. albopictus*.

I risultati relativi alla distribuzione di *Wolbachia*, hanno evidenziato un "pattern" omogeneo di infezione in tutto l'areale di *Ae. albopictus*. In tutti i campioni saggiati provenienti sia da località del range nativo (Indonesia e Giappone), sia dalle aree di recente colonizzazione (Europa e America), coesistono due ceppi del batterio: wAlbA e wAlbB (Fig. 29). Tale risultato completa il quadro relativo al "pattern" d'infezione di *Wolbachia* in *Ae. albopictus* aggiungendo ai precedenti monitoraggi (Kittayapong *et al.*, 2000; 2002a; Armbruster *et al.*, 2003) sia nuovi campioni di popolazioni dal range nativo sia quelli europei di nuova colonizzazione. Viene confermata la peculiarità di

tale specie per la quale in natura non sono state osservate né popolazioni non infette né con diversa infezione, al contrario di tutte le altre specie studiate infettate da *Wolbachia*, quali ad esempio *Drosophila melanogaster* e *Culex pipiens* (Sinkins, 1995; Turelli e Hoffmann, 1995). Inoltre, come evidenziato dal sequenziamento del gene *wsp* per il ceppo *wAlbA* e *wAlbB*, i singoli ceppi sono anche risultati identici in tutti gli individui analizzati. E' possibile supporre pertanto che attualmente non esistano tra loro popolazioni di *Ae. albopictus* isolate riproduttivamente da meccanismi post-copula riconducibili alla IC. Sicuramente tale premessa rende impossibile l'applicazione di strategie di lotta basate sulla IC sfruttando l'esistenza in natura di popolazioni diversamente infettate, tuttavia non preclude la possibilità di utilizzare la IC attraverso la realizzazione di campioni infettati con un ceppi batterici diversi da quelli presenti nelle popolazioni naturali.

Le ricerche relative caratteristiche dell'infezione hanno riguardato lo studio: 1) dei parametri di "fitness" dell'ospite, (longevità, fecondità, fertilità); 2) della competitività sessuale del maschio; 3) dell'efficienza della trasmissione verticale dell'infezione e 4) dell'incompatibilità citoplasmatica.

Gli esperimenti finalizzati allo studio dei parametri di "fitness" delle femmine portatrici di questa doppia infezione ci hanno permesso di confermare dati in letteratura ed aggiungere nuove informazioni riguardanti gli effetti dell'infezione sulla fertilità (livelli di schiusura delle uova). Abbiamo, infatti, osservato che le femmine infettate godono di un maggiore successo riproduttivo rilevato dai valori più elevati di longevità (45 gg) osservati rispetto alle femmine private del simbionte (30 gg). La maggiore durata del periodo ovidepositivo medio nelle femmine infettate determina infatti una più elevata fecondità totale media (uova deposte nel corso dell'intera vita) ($422,3 \pm 24,95$ uova) rispetto alle femmine non infette ($337,1 \pm 45,01$ uova). Tale risultato porta a conclusioni che si discostano da quanto riportato da altri autori (Dobson *et al.*, 2004), secondo i quali le femmine infette evidenziano una maggiore fecondità media fin dalle prime settimane di vita. Dai nostri risultati è emerso invece che è soprattutto nella fase finale della vita ovidepositiva delle femmine aposimbiontiche che si verifica un forte decremento della loro fecondità legato ad una loro minore capacità di sopravvivenza. Per quanto riguarda lo studio della fertilità (calcolata come percentuale di schiusura delle uova) abbiamo osservato che le femmine, sia infette che aposimbiontiche, depongono uova con alti livelli di fertilità (60-70%) nelle prime ovideposizioni della loro vita. A partire dalla terza settimana abbiamo riscontrato un sensibile calo della

fertilità, abbastanza evidente nelle femmine aposimbiontiche, con valori medi che si abbassano fino al 30-40% di schiusura. Tali valori rimangono invariati fino all'ultima settimana di vita che per le femmine infette corrisponde mediamente all'ottava settimana.

Le differenze osservate, nei parametri fecondità e fertilità, seppur presenti, non sono risultate significative e pertanto ci inducono ad attribuire alla simbiosi un'influenza su questi parametri di "fitness" minore di quanto riportato in letteratura. Ovviamente poiché le differenze osservate sulla longevità sono piuttosto rilevanti (le femmine infette vivono mediamente due settimane più di quelle aposimbiontiche) e poiché le femmine ovidepongono per tutto il corso della loro vita, ne consegue che il potenziale riproduttivo di una femmina infetta risulta decisamente maggiore di quello di una femmina aposimbiontica.

Nessuna influenza dell'infezione è stata, invece, osservata nei maschi né in relazione ai parametri di "fitness" né di competitività sessuale (in termini di accoppiamento e capacità spermatica). In particolare la sopravvivenza è risultata simile nei maschi infettati ed aposimbiontici (rispettivamente 39 e 40,5 giorni) come anche non sono state rilevate differenze nella competitività sessuale. Infatti, è stato osservato che femmine vergini (aposimbiontiche), poste contemporaneamente in presenza sia di maschi infetti (che inducono IC) che aposimbiontici (che non inducono IC), presentano una fertilità ridotta del 50% circa di quella osservata in femmine poste in presenza di soli maschi aposimbiontici. Poiché le femmine di *Ae. albopictus* sono monogame il dato indica che gli accoppiamenti sono avvenuti con la stessa frequenza con le due categorie di maschi. Anche la capacità di inseminazione (numero medio di spermatozoi riempite da un maschio in 24 ore in presenza di 10 femmine vergini) non è risultata influenzata dalla presenza di *Wolbachia* (7,2 spermatozoi riempite dai maschi infettati e 6,6 dai maschi non infetti). Gli esiti delle prove di competizione di laboratorio sono stati confermati anche da esperimenti condotti in serre-tunnel al fine di riprodurre condizioni sperimentali più simili a quelle naturali. I risultati ottenuti nello studio dei maschi non contraddicono l'ipotesi coevolutiva avanzata per l'associazione simbiotica tra *Ae. albopictus* e *Wolbachia*. I maschi, infatti, non sono il bersaglio dell'agente selettivo *Wolbachia* poiché la loro capacità di riprodursi non è legata all'infezione (un maschio aposimbiontico è potenzialmente fertile sia con femmine infette che non). Non sorprende pertanto che la loro "fitness" sia neutrale in relazione alla presenza o meno del simbionte e che siano competitivi come quelli naturali. Questo risultato assume un

aspetto rilevante ai fini dell'applicazione della IC nel controllo autocida di *Ae. albopictus*. Infatti, rimuovere l'infezione naturale senza alterare i parametri di fitness dei maschi rende più fattibile l'ipotesi di utilizzare linee infettate diversamente da quelle naturali per consentire il lancio in natura di maschi che inducano l'IC.

Per quanto riguarda la trasmissione verticale (la capacità delle femmine di trasmettere il batterio alla propria progenie) è stato rilevato che la percentuale di infezione della colonia, analizzata per 4 generazioni successive su campioni di 100 individui (50 maschi e 50 femmine), è del 100%. Il dato evidenzia l'elevata efficienza della trasmissione del batterio in *Ae. albopictus*, confermando quanto osservato da Kytayapong *et al.* (2002) su campioni di popolazioni della Thailandia. Tale caratteristica dell'infezione è importante per la diffusione e fissazione dell'infezione nella specie e, come dimostrato in diversi studi, è fortemente correlata con la densità batterica (Mercot *et al.*, 1995; Sinkins *et al.*, 1995b). Poiché è stato osservato che diversi fattori ambientali possono influenzare il tasso di trasmissione di *Wolbachia*, tra i quali la temperatura (Mounton e Henry, 2006), la qualità del cibo, la densità larvale (Sinkins *et al.*, 1995b), l'aver rilevato che nella nostra colonia la frequenza di infezione si mantiene al 100% nel corso delle generazioni, indica indirettamente che le condizioni ambientali di allevamento della colonia adottate sono idonee.

I risultati ottenuti sulla Incompatibilità Citoplasmatica (IC) confermano quelli ottenuti da altri ricercatori (Kittayapong *et al.*, 2002b), rilevando che in *Ae. albopictus* i livelli di mortalità embrionale sono del 100% negli incroci tra maschi infettati e femmine aposimbiontiche di laboratorio. Tali livelli di mortalità non risultano, inoltre, influenzati dall'età del maschio (maschi di 35 giorni inducono IC del 100%), cosa che invece abbiamo osservato in altre specie simbiotiche quali *Drosophila melanogaster* e *Culex pipiens*. In *D. melanogaster* la IC non raggiunge mai valori superiori al 70% e con l'invecchiamento dei maschi (già dalla terza settimana di vita) subisce una drastica riduzione (fino al 4%). In *Cx. pipiens* valori di IC del 100% sono stati ottenuti solo con maschi di età inferiore ai 15 giorni, confermando quanto osservato da Rasgon e Scott (2003).

Nel rapporto con *Ae. albopictus* (efficienza della IC, alti livelli di trasmissione del batterio e influenza positiva dell'infezione sulla "fitness" dell'ospite) *Wolbachia* promuove e mantiene se stessa nella popolazione, concorrendo alla eliminazione selettiva di eventuali genotipi non adatti alla simbiosi. Dall'analisi di questa interazione si può evincere che il ruolo di agente selettivo esercitato da *Wolbachia* è il risultato di

un lungo processo co-evolutivo grazie al quale il batterio è riuscito a superare la resistenza sia di natura immunologica che metabolica dell'ospite (Charlat *et al.*, 2003). Da questo punto di vista la simbiosi tra *Wolbachia* ed *Ae. albopictus* presenta caratteristiche non osservate nella maggior parte delle altre simbiosi (*Wolbachia-D. melanogaster*, *Wolbachia-D. simulans*, *Wolbachia-Cx. pipiens*), nelle quali il batterio conserva ancora caratteristiche di semplice “parassita” che manipola il sistema riproduttivo dei suoi ospiti con meccanismi (efficienza trasmissione verticale, livelli di IC) non sempre efficienti.

Il doppio sistema infettivo che caratterizza il rapporto simbiotico *Wolbachia-Ae. albopictus* costituisce pertanto un sistema modello per lo studio della IC e delle sue possibili applicazioni nel controllo genetico degli insetti vettori. Grazie allo sviluppo delle biotecnologie entomologiche, ed in particolare delle tecniche di microiniezione embrionale utilizzate per la trasformazione genetica degli insetti, negli ultimi anni è stata sperimentata la possibilità di realizzare in laboratorio linee di insetti con uno stato infettivo non osservato in natura (Boyle *et al.*, 1993; Braig *et al.*, 1994; Poinot *et al.*, 1998; Marnix *et al.*, 1999a; Marnix *et al.*, 1999b; Sasaki e Ishikawa, 2000; Riegler *et al.*, 2004; Xi e Dobson, 2005). In tal modo si è cercato di aumentare le possibilità applicative della IC creando infezioni nuove in quelle specie che già sono oggetto di programmi di lotta con il maschio sterile (SIT) ma non sono infettate da *Wolbachia*. Per quanto riguarda la Famiglia Culicidae, ad esempio, è stata realizzata in laboratorio una linea simbiotica di *Aedes aegypti* (specie non infettata in natura) con *Wolbachia* prelevata da *Ae. albopictus* ottenendo maschi perfettamente incompatibili con le femmine selvatiche (Xi *et al.*, 2005b; Xi e Dobson, 2005). Tentativi di infettare artificialmente anche *Ae. albopictus*, sono stati realizzati trasferendo il ceppo wRi proveniente da *Drosophila simulans* (Xi *et al.*, 2005a). I risultati fino ad ora ottenuti, non del tutto soddisfacenti, (parametri di infezione non idonei), dimostrano tuttavia che *Ae. albopictus* può essere infettato con *Wolbachia* proveniente da altre specie ospiti, ed aprono la strada a nuovi tentativi di transinfezione.

La seconda fase del presente lavoro si è inserita proprio in quest'ultima linea di ricerca, nel tentativo di fornire un contributo alla realizzazione di nuove infezioni in *Ae. albopictus* caratterizzate da livelli di trasmissione verticale e di IC idonei dal punto di vista applicativo. A tal fine abbiamo sperimentato nuove transinfezioni con due diversi ceppi di *Wolbachia*: wMel, presente in *D. melanogaster* e wPip che infetta *Cx. pipiens*. I due batteri appartengono rispettivamente ai Supergruppi A e B, cui appartengono

anche i ceppi *wAlbA* e *wAlbB*, che infettano *Ae. albopictus* in natura. Per quanto riguarda “*wMel*”, la profonda conoscenza delle caratteristiche della simbiosi con *D. melanogaster* è stata ritenuta un elemento chiave nella scelta di questo ceppo. Nel caso della scelta di *wPip* ha prevalso soprattutto il criterio di affinità filogenetica tra il ceppo di *Wolbachia wAlb B* presente in *Ae. albopictus* e *wPip* presente in *Cx. pipiens*, entrambi facenti parte del gruppo Pip ed entrambi caratterizzati da fenotipo fortemente “*mod⁺-resc⁺*” (cfr. par. 3.2.1).

Il trasferimento artificiale del batterio è tuttavia solo il primo passo verso l'eventuale realizzazione di una nuova simbiosi stabile e funzionale. Il nuovo ospite (*Ae. albopictus*) infatti deve poter sopportare la nuova infezione senza che questa provochi effetti deleteri alla propria “fitness”. Tra batterio e cellule dell'ospite deve infatti realizzarsi un alto grado di integrazione funzionale, regolato da fattori, ancora poco noti, legati al genoma delle due specie interagenti (Mc Graw *et al.*, 2001).

Il trasferimento di *wMel* in *Ae. albopictus* ha avuto successo nel 34% degli adulti nati da embrioni microiniettati (10 adulti transinfettati su 29 nati). I maschi risultati infetti (5) hanno evidenziato una normale attività riproduttiva, senza indurre IC negli incroci con femmine non infettate. Delle 5 femmine transinfettate ben 4 sono morte precocemente. Non è stato così possibile caratterizzare i parametri di infezione della nuova simbiosi per l'insuccesso nella costituzione di isolinee di femmine transinfette. Il dato, seppure preliminare, lascia supporre che la transinfezione di *Ae. albopictus* con *wMel* si traduca in una significativa riduzione di “fitness” delle femmine del culicide che difficilmente arrivano alla riproduzione. La maggiore sensibilità della femmina al processo infettivo artificiale è in accordo con il ruolo di agente selettivo attribuito a *Wolbachia* che vede nelle femmine il principale bersaglio. I maschi, invece, sopportano la nuova infezione senza influenze negative sulla propria “fitness”, ma incrociati con femmine aposimbiontiche non sembrano indurre IC unidirezionale. Non avendo ottenuto isolinee transinfettate, non è stato possibile ottenere informazioni sulla induzione di IC da parte di *wMel* in *Ae. albopictus*. Tuttavia l'aver rilevato in via preliminare l'assenza di IC negli incroci tra maschi transinfettati *wMel* e femmine aposimbiontiche, potrebbe essere una prova che lo stesso ceppo di *Wolbachia* che induce livelli di IC del 70% nel suo ospite naturale non sia in grado di fare altrettanto nel nuovo ospite. Ciò confermerebbe l'ipotesi generale che la IC non è una proprietà intrinseca del batterio ma frutto dell'interazione simbiotica tra batterio ed ospite (Poinsot *et al.*, 1998).

Nel trasferimento di *wPip*, affine a quello (*wAlb B*) presente nelle popolazioni naturali di *Ae. albopictus*, da *Cx. pipiens* si è osservata una percentuale del 16% di adulti transinfettati, ed anche in questo caso è risultato il sesso maschile quello più facilmente infettabile con effetti irrilevanti sulla “fitness”. C’è da sottolineare che diversamente da quanto riscontrato nei maschi transinfettati con *wMel*, quelli infettati con *wPip*, sembrano in grado di indurre elevati livelli di IC unidirezionale (0,5-11% di sviluppo embrionale) già nella generazione G_0 (generazione nata dagli embrioni microiniettati). I risultati ci lasciano ipotizzare che *Wolbachia wPip* sia un ceppo fortemente “mod+” (elevata capacità di indurre IC) anche in rapporto al nuovo ospite e questo può essere messo in relazione con la maggiore affinità genetica tra *wPip* e *wAlb B* rispetto a *wMel*. Tale risultato, seppur preliminare, è di interesse in termini applicativi e funge da ulteriore stimolo a proseguire la ricerca in quanto mai prima d’ora si erano osservati livelli di IC di poco inferiori al 100% in maschi di *Ae. albopictus* portatori di *Wolbachia* esogena.

Le femmine risultate transinfettate con *wPip* pur sopravvivendo più a lungo di quelle transinfettate *wMel* non sono arrivate all’accoppiamento per scarsa vitalità (poco mobili, poco propense al volo e assenza di comportamento alimentare). Tali sintomi sono stati precedentemente descritti in individui di *D. melanogaster* transinfettati con *wMel* ceppo “popcorn” (Reynolds *et al.*, 2003). Questo ceppo di batterio, isolato da alcune colonie di laboratorio di *D. melanogaster*, è un mutante di *wMel* che risulta patogeno per i suoi ospiti in quanto va incontro a ripetuti cicli di replicazione che lo portano ad invadere anche tessuti somatici, in particolare quello nervoso (Min e Benzer, 1997). Probabilmente l’insuccesso nel conseguimento di femmine transinfette riproduttive è, nel nostro caso, proprio l’elevata carica batterica causata dalla tecnica microiniettiva adottata che non consente un sistema di quantificazione sia nelle popolazioni naturali che in quelle transinfettate. Questi aspetti sono attualmente i punti più deboli della metodica e saranno gli obiettivi delle future ricerche che dovranno avvalersi di tecnologie sino ad ora non impiegate per quantificare i livelli di densità batterica come anche analizzare la distribuzione tissutale dell’infezione. Infine verrà presa in considerazione la possibilità di preparare purificati microbiologici che consentano di trasferire il batterio in purezza senza contaminazioni citoplasmatiche, quantificandone la densità prima del trasferimento. I risultati ottenuti, anche se preliminari, forniscono tuttavia importanti indicazioni sulla realizzazione della transinfezione generando spunti per ulteriori ricerche e costituiscono le basi di partenza

per future implementazioni metodologiche mediante le quali ci si auspica sarà possibile ottenere sempre nuove informazioni sui meccanismi di base che legano *Wolbachia* ai suoi ospiti e giungere alla realizzazione di linee di *Ae. albopictus* transinfettate, riproduttivamente isolate dalla popolazione selvatica e con caratteristiche dell'infezione tali da permettere la loro applicazione nella lotta alla zanzara tigre.

BIBLIOGRAFIA

ADHAMI J. e MURATI N., 1987. Presence du mosquito *Aedes albopictus* en Albanie. *In albanese. Revista Mjebesore* 1: 13-16.

ANDREASEN M.H. e CURTIS C.F., 2005. Optimal life stage for radiation sterilization of *Anopheles* males and their fitness for release. *Medical and Veterinary Entomology*, 19: 238-244.

ANGELINI R., FINARELLI A.C., ANGELINI P., PO C., PETROPULACOS K., MACINI P., FIORENTINI C., FORTUNA C., VENTURI G., ROMI R., MAJORI G., NICOLETTI L., REZZA G. e CASSONE A., 2007. An outbreak of Chikungunya fever in the Province of Ravenna, Italy. *Eurosurveillance weekly release* 12(9).

ANONYMOUS, 1975. Oh, New Delhi; Oh Geneva. *Nature*, 256: 355-357.

ARMBRUSTER P., DASMKY JR. W.E., GIORDANO R., BIRUNGI J., MUNSTERMANN L.E. e CONN J.E., 2003. Infection of New and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) by the intracellular Parasite *Wolbachia*: implications for Host Mitochondrial DNA Evolution. *Journal of Medical Entomology*. 40(3): 356-360.

ARUNACHALAM N. e CURTIS C.F., 1985. Integration of radiation with cytoplasmic incompatibility for genetic control in the *Culex pipiens* complex (Diptera: culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 22(6): 648-653.

BAILEY D.L., LOWE R.E., FOWLER J.E.F. e DAME D.A., 1979. Sterilizing and packaging males of *Anopheles albimanus* Wiedemann for field release. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28: 902-908.

BAKER R.H., REISEN W.K., SAKAI R.K., HAYES C.G., ASLAMKHAN M.,

- SAIFUDDIN U.T., MAHMOOD F., PERVEEN A. e JAVED S., 1979. Field assessment of mating competitiveness of males *Culex tritaeniorhynchus* carrying a complex chromosomal aberration. *Annals of the Entomological Society Of America*, 72: 751-758.
- BANDI C., ANDERSON T.C., GENCHI C. e BLAXTER M.L., 1998. Phylogeny of *Wolbachia*-like bacteria in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 265: 2407-13.
- BAUMHOVER A.H, GRAHAM A.J., BITTER B.A., HOPKINS D.E., NEW W.D., DUDLEY F.H. e BUSHLAND R.C., 1955. Screwworm control through releases of sterilized flies. *Journal of Economic Entomology*, 48: 462-466.
- BELLINI R., CARRIERI M., BURGIO G. e BACCHI M., 1996. Efficacy of different ovitraps and binomial sampling in *Aedes albopictus* surveillance activity. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 12(4): 632-636.
- BELLINI R., CARRIERI M., BACCHI M. e BENEDETTI A., 1996a. Secondo anno di attività del programma di lotta a *Aedes albopictus* a Desenzano del Garda, Sirmione e Lonato. *Disinfestazione*, 13(1): 55-61.
- BELLINI R., CARRIERI M. e BACCHI M., 1996b. Optimization of *Aedes albopictus* surveillance and control activities in northern Italy. 10th Ann. Meet. Soc. Vector Ecol. Europ. Reg. A.E.D.E.S., Strasbourg, France, 2-6 September: 88-89.
- BELLINI R., CARRIERI M., BACCHI M., FONTI P. e CELLI G., 1998. Possible utilization of metallic copper to inhibit *Aedes albopictus* (Skuse) larval development. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(4): 451-456.
- BELLINI R., MEDICI A., CARRIERI M., CALVITTI M., CIRIO U. e MAINI S., 2002. Applicazione della tecnica del maschio sterile nella lotta contro *Aedes albopictus* in Italia: ottimizzazione delle fasi di allevamento massale e messaggio.

- Atti XIX Congresso Italiano di Entomologia, Catania, 10-15 Giugno 2002, II:*
993-998.
- BELLINI R., CALVITTI M., MEDICI A. e MAINI S., 2005. Preliminary evidences on SIT application against *Aedes albopictus* Skuse in Italy. *Proc. FAO-IAEA International Conference on Area-Wide Control of Insect Pest*. Vienna, May 9-13 pp 61-68.
- BELLINI R., CALVITTI M., MEDICI A., CARRIERI M., CELLI G. e MAINI S., 2007. Use of the Sterile Insect Technique against *Aedes albopictus* in Italy: First Results of a Pilot Trial, *In: Vreysen M.J.B., Robinson A.S., e Hendrichs J. (Eds.), Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*. Springer, pp 505-515. Dordrecht, The Netherlands.
- BIRUNGI J. e MUNSTERMANN L.E., 2002. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brasil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 95: 125-132.
- BLACK W.C., FERRARI J.A., RAI K.S. e SPENCER D., 2000. Breeding structure of a colonising species: *Aedes albopictus* in the Unites States. *Heredity*, 60: 171-181.
- BOLLER E.F., 1972. Behavioural aspects of mass-rearing insects. *Entomophaga*, 17: 9-25.
- BOLLER E.F. e BUSH G.L., 1976. Incompatible races of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) their origin and potential use in biological control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 20: 237-247.
- BOURTZIS K., NIRGIANAKI A., ONYANGO P e SAVAKIS C., 1994. A prokaryotic DNA sequence in *Drosophila melanogaster*. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains. *Insect Molecular Biology*, 3: 131-142.

- BOURTZIS K., NIRGIANAKI A., MARKAKIS G. e SAVAKIS C., 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics*, 144: 1063-1073.
- BOURTZIS K., DOBSON S.L., BRAIG H.R. e O' NEILL S.L., 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked. *Nature*, 391: 852-853.
- BOURTZIS K. e O' NEILL S.L., 1998. *Wolbachia* infections and arthropod reproduction. *Bioscience*, 48: 287-293.
- BOURTZIS K. e ROBINSON A., 2006. Insect pest control using *Wolbachia* and/or irradiation. In: Bourtzis K and Miller A (Eds.) *Insect Symbiosis*, Vol. 2, pp. 225-246. CRC Taylor and Francis.
- BOYLE L., O' NEILL S.L., ROBERTSON H.M. e KARR T.L., 1993. Inter- and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*, 260: 1796-1799.
- BOX G.E.P., HUNTER W.G. e HUNTER J.S., 1978. *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 653.
- BRAIG H.R., GUZMAN H., TESH R.B. e O' NEILL S.L., 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature*, 367: 453-455.
- BRAIG H.R., ZHOU W., DOBSON S.L. e O' NEILL S.L., 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology*, 180: 2373-2378.
- BREEUWER J.A.J. 1997. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity* 79: 41-47.
- BREEUWER J.A.J. e WERREN J.H., 1990. Microorganisms associated with

- chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346: 558-560.
- BREEUWER J.A.J, STOUTHAMER R., BARNES S.M., PELLETIER D.A., WEISBURG W.G. e WERREN J.H., 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitic wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 1: 25-36.
- CALLAINI G., DALLAI R. e RIPARBELLI M.G., 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of Cell Science*, 110: 271-280.
- CHAMPION DE CRESPIGNY F.E., PITT T.D. e WEDELL N., 2006. *Wolbachia* increases male mating rate in *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 1964-1972.
- CHAMPION DE CRESPIGNY F.E. e WEDELL N., 2006. *Wolbachia* infection reduces sperm competitive ability in an insect. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 273: 1455-1458.
- CHARLAT S., CALMET C. e MERÇOT H., 2001. On the mod resc model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types. *Genetics*, 159: 1415-1422.
- CHARLAT S., BOURTZIS K. e MERÇOT H., 2002. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. In: Seckbach J. (Ed.) *Symbiosis, Mechanisms and Model Systems, Vol. 4, Cellular Origin and Life in Extreme Habitats*, pp. 623-644. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands.
- CHARLAT S., HURST G.D.D., e MERÇOT H. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*, 19(4): 217-223
- CHELLAPAH W.T. e CHELLAPAH G.R., 1968. Susceptibility of four common Singapore mosquitoes to *Dirofilaria immitis*. *Leidy Journal of Medical*

- Entomology*, 5: 358-361.
- CIRIO U., 1975. The Procida Medfly pilot experiment. Status of The Medfly control after two years of the Sterile Insect release. IAEA, *Panel Proc. Series, STI/PUB/392*, pp39-49.
- CIRIO U., 1977. Control of Mediterranean Fruit fly (Diptera Tephritidae) by Sterile Insect Technique. *Bollettino del Laboratorio Entomologico Agrario di Portici*, 32: 180-189.
- CIRIO U. e SALEMME S., 1975. Contributo al miglioramento dell'allevamento di *Ceratitis capitata* Wied (Diptera Tephritidae). *Bollettino del Laboratorio Entomologico Agrario di Portici*, 32: 180-189.
- CLARK M.E., VENETI Z., BOURTZIS K. e KARR T.L., 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*: the cyst as basic cellular unit of CI expression. *Mechanisms of Development*, 120: 185-198.
- COLONNA R., LIFRIERI L., CARRIERI M., VERONESI R. e BELLINI R., 2004. Evaluation of SUMILARV® 0,5 G performances against mosquitoes in catch basin in Northern Italy. *3rd Workshop Europ. Mosq. Control Assoc.*, Osijek, Croatia, October 6-9, pag.24-25.
- CRAIG GB., 1967. Mosquitos: female monogamy induced by male accessory glands substance. *Science*, 156: 1499-1501.
- CURTIS C.F., 1968. Possible use of translocations to fix desirable genes in insect pest populations. *Nature*, 218, 368-369.
- CURTIS C.F. 1992. Selfish gene in mosquitoes. *Nature*, 357-450.
- DALLA POZZA G. e MAJORI G., 1992. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8: 1-3.

- DAME D.A., WOODARD D.B., FORD H.R. e WEIDHAAS D.E., 1964. Field behavior of sexually sterile *Anopheles quadrimaculatus* males. *Mosquito News*, 24: 6-14.
- DAME D.A., LOFGREN C.S., FORD H.R., BOSTON M.D., BALDWIN K.F. e JEFFERY G.M., 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador II. Methods of rearing, Sterilization, and distribution. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23: 282-287.
- DAVIDSON G., 1974. *Genetic control of Insect Pests*. Academic Press. New York.
- DAVIS C.W.C., 1967. A comparative study of larval embryogenesis in the mosquito *Culex fatigans* Wiedemann (Diptera: Culicidae) and the sheep-fly *Lucilia sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae). I, Description of embryonic development. *Australian Journal of Zoology*, 15: 547-79.
- DAVIS S.A., BAX N. e GREWE P., 2001. Engineered underdominance allows efficient and economical introgression of traits into pest populations. *Journal of Theoretical Biology*, 212: 83-98.
- DOBSON S.L, KOSTAS BOURTZIS K, O'NEILL S.L. 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 153-160.
- DOBSON S.L. 2003. *Wolbachia pipientis*: impotent by association. In: Bourtzis K e Miller A. (Eds.) *Insect Symbiosis*, Vol. 1, pp. 199-215. CRC Taylor and Francis.
- DOBSON S.L., MARSLAND E.J. e RATTANADECHAKUL W., 2001. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in single and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 38: 382-387.

- DOBSON S.L. e RATTANADECHAKUL W., 2001. A novel technique for removing *Wolbachia* infections from *Aedes albopictus*. *Journal of Medical Entomology*, 38: 844-849
- DOBSON S.L., FOX C.F. e JIGGINS F.M., 2002a. The effect of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated systems. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 269: 437-445.
- DOBSON S.L., MARSHLAND E.J., RATTANADECHAKUL W., 2002b. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics*, 160: 1087-1094.
- DOBSON S.L., MARSHLAND E.J., VENETI Z., BOURTZIS K. e O' NEILL S.L., 2002c. Characterization of *Wolbachia* host cell range via the in vitro establishment of infections. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2): 656-660.
- DOBSON S.L., RATTANADECHAKUL W. e MARSLAND E.J., 2004. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, 93: 135-142.
- DRANCOURT M. e RAOULT D., 1994. Taxonomic position of the Rickettsiae: Current Knowledge. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 13-24.
- DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. e RURANGIRWA F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designations of *Ehrlichia equi* and "HGE" agent" as subjective synonymous of *Ehrlichia phagocytophilla*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 2145-2165.

- DURON O. e WEILL M., 2006. *Wolbachia* infection influence the development of *Culex pipiens* embryo in Incompatible crosses. *Heredity*, 96: 493-500.
- DUTTON T.J. e SINKINS S.P., 2004. Strain-specific quantification of *Wolbachia* density in *Aedes albopictus* and effect of larval rearing conditions. *Insect Molecular Biology*, 13(3): 317-322.
- FACCHINELLI L., VALERIO L., POMBI M., REITER P., CONSTANTINI C. e DELLA TORRE A., 2007. Development of a novel stick trap for container-breeding mosquitos and evaluation of its sampling properties to monitor urban population of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 21: 183-195.
- FAY R. e ELIASON D.A., 1966. A preferred oviposition site as surveillaince metod for *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 26: 531-535.
- FLOATE D.K., KYEI-POKU G.K. e COGHLIN P.C., 2006. Overview and relevance of *Wolbachia* bacteria in biocontrol research. *Biocontrol Science and Technology* 16(8): 767-788.
- FRENG L.C., 1938. The geographical distribution of mosquitos in China. Proc. 7th Int. Congress Entomol. Berlin, pp.1579-1588.
- FRY A., PALMER M.R. e RAND D.M., 2004. Variable effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 93: 379-389.
- FUCHS M.S, CRAIG G.B. e DESPOMMIER D.D., 1969. The protein nature of the substance inducing female monogamy in *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 15: 701-709.
- GERRARD D.J. e CHIANG H.G., 1970. Density estimation of corn rootworm egg population based upon frequency of occurrence. *Ecology*, 51: 237-245.

- GHELELOVITCH S., 1952. Sur le déterminisme génétique del stérilité dans le croisements entre différentes souched del *Culex autogenicus* Roubaud. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III - Sciences de la Vie - Life Sciences* 234: 2386-2388.
- GIORDANO R., JACKSON J.J. e ROBERTSON H.M., 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabatica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 94: 11439-11444.
- GRENIER S., PINTUREAU B., HEDDI A., LASSABLIÉRE F., JAGER C., LOUIS C., e KHATCHADOURIAN C., 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 265: 1441-1445.
- GROVER K.K., SUGUNA S.G., UPPAL D.K., SINGH K.R.P., ANSARI M.A., CURTIS C.F., SINGH D., SHARMA V.P. e PANICKER K.N., 1976. Field experiments on the competitiveness of males carrying genetic control systems for *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 20: 8-18.
- HARRIS H.L. e BRAIG H.R., 2001. Sperm nuclear basic proteins in *Drosophila simulans* undergoing *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Developmental Biology*, 235: 212.
- HAWLEY W.A., 1988. The biology of *Aedes albopictus* . *Journal of the American Mosquito Association* Suppl. 1: 40 pp.
- HEALTH B.D., BUTCHER R.D.J., WHITFIELD W.G.F. e HUBBARD S.F., 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology*, 9: 313-316.
- HEINRICH J.C. e SCOTT M.J., 2000. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 8229–32.

- HERTIG M., 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, 28: 453-486.
- HERTIG M. e WOLBACH S.B., 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *Journal of Medical Research*, 44: 329-374.
- HIEN D.S., 1976. Biology of *Aedes aegypti* (L., 1752) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1859) (Diptera: Culicidae). V. The gonotrophic cycle and oviposition. *Acta Parasitologica Polonica*, 24: 37-55.
- HOFFMANN A.A., 1998. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 48: 61-67.
- HOFFMANN A.A., TURELLI M. e SIMMONS G.M., 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution*, 40: 6921-701.
- HOFFMANN A.A., CLANCY D.J. e MERTON E., 1994. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 136: 993-999.
- HOFFMANN A.A., CLANCY D.J. e DUNCAN J., 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity*, 76: 1-8.
- HOFFMANN A.A. e TURELLI M., 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. In: O' Neill S.L., Hoffmann A.A., Werren J.H. (Eds.), *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*, pp. 42-80. Oxford University Press, Oxford.
- HOFFMANN A.A., HERCUS M. e DAGHER H., 1998. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 148: 221-232.

- HONÓRIO N.A., DA COSTA SILVA W., LEITE P.J., GONCALVES J.M., LOUNIBOS L.P. e LOURENCO-DE-OLIVEIRA R., 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 191-198.
- HOSHIZAKI S. e SHIMADA T. 1995. PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of *Wolbachia* spread recently? *Insect Molecular Biology*, 4(4): 237-243
- HUANG Y.M., 1972. Contribution to the mosquito fauna of southeast Asia XIV. The subgenus of *Stegomyia* of *Aedes* in southeast Asia. I the *scutellaris* group of species. *Contributions to the American Entomological Institute (Ann Arbor)*, 9(1): 1-109.
- HUIGENS .M.E., DE ALMEIDA R.P., BOONS P.A.H., LUCK R.F. e STOUTHAMER R., 2004. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 271: 509-515.
- HURST G.D.D., JIGGINS F.M., SCHULENBURG J.H.G., BERTRAND D. e WEST S.A., 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266: 735-740.
- ITURBE-ORMAETXE I., BURKE G.R, RIEGLER M. e O' NEILL S.L., 2005. Distribution, expression, and motif variability of Ankyrin domain genes in *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology* 187: 5136-5145.
- JAYARAMAN K.S., 1997. Consortium aims to revive sterile-mosquito project. *Nature*, 389: 6.

- JONES J.C., 1973. Are mosquitos monogamous? *Nature*, 242: 343-344.
- KAMBHAMPATI S., RAI K.S. e BURGUN S.J., 1993. Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito, *Aedes albopictus*. *Evolution*, 47: 673-677.
- KAMIMURA K., 1968. The distribution and habit of medically important mosquitos of Japan. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 19: 15-34.
- KAISER P.E., BAILEY D.L., LOWE R.E., SEAWRIGHT J.A. e DAME D.A., 1979. Mating competitiveness of chemosterilized males of a genetic sexing strain of *Anopheles albimanus* in laboratory and field tests. *Mosquito News*, 39: 768-775.
- KEULS M., 1952. The use of the “studentized range” in connection with an analysis of variance. *Euphytica* 1: 112-122.
- KIDWELL M.G. e RIBEIRO J.M.C, 1992. Can transposable elements be used to drive disease refractoriness genes into vector populations? *Parasitology Today*, 8: 325–329.
- KITTAYAPONG P., BAISLEY K.J., BAIMAI V. e O' NEILL S.L., 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in south-east Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37: 340-345.
- KITTAYAPONG P., BAIMAI V. e O' NEILL S.L., 2002a. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 103-197.
- KITTAYAPONG P., BAISLEY K.J, SHARPE R.J., BAIMAI V. e O' NEILL S.L., 2002b. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfection in *Aedes albopictus* population in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(1): 103-107.

- KLASSEN W. e CURTIS C., 2004. Contribution to the history of SIT. *In*: Dyck V.A., Hendrichs J. e Robinson A.S. (Eds.), *The Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Areawide Integrated Pest Management*. Dordrecht: Kluwer.
- KRUSKAL W.H., 1952. A non parametric test for the several sample problem. *Annals of Mathematical Statistics*, 23: 525-540.
- KRUSKAL W.H. e WALLIS W.A., 1952. Use of ranks in one criterion variance analysis. *Journal of the American Statistic Association*, 47: 583-621.
- KNIPLING E.F., 1955. Possibility of Insect Control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, 48: 459-462.
- LASSY C.W. e KARR T.L., 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of Development*, 57: 47-58.
- LAVEN H., 1951. Crossing Experiments with *Culex strains*. *Evolution*, 5: 370-375.
- LAVEN H., 1953. Reziprok unterschiedliche Kreuzbarkeit von Stechmücken (Culicidae) und ihre Deutung als plasmatische Vererbung. *Zeitschrift für Induct Abstammungs und Vererbungslehre*. 85: 118-136.
- LAVEN H., 1967. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through Cytoplasmic Incompatibility. *Nature*, 216: 383-384.
- LIEW C. e CURTIS C.F., 2004. Horizontal and vertical dispersal of dengue vector mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, in Singapore. *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 351-360.
- LOFGREN C.S., BOSTON M.D. e BORKOVEC A.B., 1973. Aziridinylphosphine oxides and sulfides as chemosterilants in male pupae of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *Mosquito News*, 33:187-189.

- LOFGREN C.S., DAME D.K.F.A., BREELAND S.G., WEIDHAAS D.E., JEFFERY G., KAISER R., FORD H.R., BOSTON M.D. e BALDWIN K.F., 1974. Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. III Field methods and population control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23: 288-297.
- LORIMER N., LOUNIBOS L.P. e PETERSEN J.L., 1976. Field trials with a translocation homozygote in *Aedes aegypti* for population replacement. *Journal of Economic Entomology*, 69: 405-409.
- LOWE R.E., BAILEY D.L., DAME D.A., SAVAGE K.E. e KAISER P.E., 1980. Efficiency of techniques for the mass release of sterile male *Anopheles albimanus* Wiedemann in El Salvador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 695-703.
- MAKELA M.E. e HUETTEL M.D., 1979. Model for genetic-control of *Heliothis virescens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 54: 225-33.
- MANGIAFICO J.A., 1971. Chikungunya virus infection and transmission in five species of mosquitos. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28: 717-724.
- MARNIX M., VAN MEER M. e STOUTHAMER R., 1999a. Cross-order transfer of *Wolbachia* from *Muscidifurax uniraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) to *Drosophila simulans* (Diptera: Drosophilidae). *Heredity*, 82: 163-169.
- MARNIX M., VAN MEER M., WITTEVELDT J. e STOUTHAMER R., 1999b. Development of a microinjection protocol for the parasitoid *Nasonia vitripennis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 93: 325-329.
- MARTIN BLAND J. e ALTMAN D.G., 2004. The logrank test. *British Medical Journal*, 328: 1073.

- MCGRAW E.A., MERRITT D.J., DROLLER J.N. e O' NEILL S.L., 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 268: 2565–2570.
- MCKIBBEN G.H., VILLAVASO E.J., MCGOVERN W.L. e GREFENSTETTE B., 2001. United States Department of Agriculture research support, methods development and program implementation. In: Dickerson W.A., Brashear A.L., Brumley J.T., Carter F.L., Grefenstette W.J e Harris F.A. (Eds.), *Boll Weevil Eradication in the United States Through 1999*, pp. 117–36. Memphis, TN. Cotton Found. Publ.
- MERÇOT H., LIORENTE B., JACQUES M., ATLAN M. e MONTCHAMP-MOREAU C., 1995. Variability withm the Seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 141: 1015-1023.
- MERÇOT H. e POINSOT D., 1998. Rescuing have been overlooked and discovered on Mount Kilimanjaro. *Nature*, 391: 853.
- MIN K.T. e BENZER S., 1997. *Wolbachia*, normally a simbiote of *Drosophila*, can be virulent causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94: 10792-10796.
- MITCHELL C.J., NIEBYLSKI M.L., SMITH G.C., KARABATOS N., MARTIN D. e MUTEBI J.P., 1992. Isolation of eastern equine encephalitis from *Aedes albopictus* in Florida. *Science*, 257: 526-527.
- MORETTI R. e CALVITTI M., 2004. Intrinsic and extrinsic competition between *Eretmocerus mundus* and a greenhouse selected strain of *Encarsia formosa* on *Bemisia tabaci*. *Proceedings of The 2nd European Whitefly Symposium*. Cavtat (Croatia) 5-9 Ottobre 2004.
- MORRIS A.C., EGGLESTON P. e CRAMPTON J.M., 1989. Genetic transformation of the mosquito *Aedes aegypti* by micro-injection of DNA. *Medical and Veterinary Entomology*, 3: 1-7.

- MOUNTON L. e HENRI H., 2006. Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility. *Parasitology*, 132: 1–8.
- NEWMAN D., 1939. The distribution of the range in samples from a normal population, expressed in terms of an independent estimate of the standard deviation. *Biometrika* 31: 20-30.
- OCHMAN, H. e WILSON A.C., 1987. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *Journal of Molecular. Evolution*, 26: 74-86
- OH H.W., KIM G.M., SHIN S.W., BAE K.S., AHN Y.J. e PARK H-Y., 2000. Ultrastructure and molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a spider, *Nephila clavata*. *Insect Molecular biology*, 9(5): 539-543.
- OLSEN K., REYNOLDS K.T. e HOFFMANN A.A., 2001. A field cage test of the effects of the endosymbiont *Wolbachia* on *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 86: 731-737.
- O' NEILL S.L. e KARR T.L., 1990. Bidirectional Cytoplasmic incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, 348: 178-180
- O' NEILL S.L., GIORDANO R., COLBERT A. M., KARR T.L. e ROBERTSON H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89: 2699-2702.
- OTSUKA Y. e TAKAOKA H., 1997. Elimination of *Wolbachia pipientis* from *Aedes albopictus*. *Medical Entomology and Zoology*, 48: 257-260.
- PAL R. e LACHANCE L.E., 1974. The operational feasibility of genetic methods for control of insects of medical and veterinary importance. *Annual Reviews of Entomology*, 19: 269-291.

- PATTERSON R.S., BOSTON M.D., FORD H.R. e LOFGREN C.S., 1971. Techniques for sterilizing large numbers of mosquitoes. *Mosquito News*, 31: 85-90.
- PERROT-MINNOT M.J., GUO L.R. e WERREN J.H., 1996. Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on incompatibility. *Genetics*, 143: 961-972.
- POINSOT D., BOURTZIS K., MARKAKIS G., SAVAKIS C. e MERCOT H., 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* to *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics*, 150: 227-237.
- POINSOT D. e MERÇOT H., 1999. *Wolbachia* can rescue from cytoplasmic incompatibility while being unable to induce it. In: Wagner et al., (Eds.) *From Symbiosis to Eukaryotism — Endocytobiology VII*, pp. 221-234. Universities of Geneva, Switzerland, and Freiburg im Breisgau, Germany.
- PORTARRO J.K. e BARR A.R., 1975. "Curing" *Wolbachia* infection in *Culex pipiens*. *Journal of Medical Entomology*, 12: 265.
- PRESGRAVES D.C., 2000. A genetic test of the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Genetics*, 154: 771.
- RASGON J.L. e SCOTT W.T., 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics*, 165: 2029-2038.
- REED K.M. e WERREN J.H., 1995. Induction of paternal genome loss by the paternal-sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. *Molecular Reproduction and Development*, 40: 408-418.
- REISEN W.K., SAKAI R.K., BAKER R.H., RATHOR H.R., RAANA K., AZRA K. e NIAZ S., 1980. Field competitiveness of *Culex tritaeniorynchus* Giles males

- carrying a complex chromosomal aberration: a second experiment. *Annals of the Entomological Society of America*, 73: 479-484.
- REISEN W.K., ASMAN S.M., MILBY M.M., BOCK M.E., STODDARD P.E., MEYER R.P. e REEVES V.C., 1981. Attempted suppression of a semi-isolated population of *Culex tarsalis* by release of irradiated males. *Mosquito News*, 41: 736-744.
- REISEN W.K., MILBY M.M., ASMAN S.M., BOCK M.E., MEYER R.P., McDONALD P.T. e REEVES T.C., 1982. Attempted suppression of a semi-isolated *Culex tarsalis* population by the release of irradiated males: a second experiment using males from a recent colonized strain. *Mosquito News*, 42: 565-575.
- REISEN W.K., KNOP N.F. e PELOQUIN J.J., 1985. Swarming and mating behaviour of laboratory and field strains of *Culex tarsalis* (Diptera: Culcidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 78: 667-673.
- REITER P., 1998. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come. *Journal Of the American Mosquito Control Association*, 14: 83-94.
- REYNOLDS K.T. e HOFFMANN A.A., 2002. Male age, host effects and weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternal transmitted *Wolbachia*. *Genetical Research*, 80: 79-87.
- REYNOLDS K.T., THOMSON L.J. e HOFFMAN A.A., 2003. The effects of host age, host nuclear background and temperature on phenotypic effects of the virulent *Wolbachia* strain popcorn in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 164: 1027-1024.
- RIBEIRO J.M.C. e KIDWELL M.G., 1994. Transposable elements as population drive mechanisms: specification of critical parameter values. *Journal of Medical*

- Entomology*, 31: 10–16.
- RICCI I., CANCRINI G., GABRIELLI S., D'AMELIO S., FAVI G. 2002. Searching for *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae): large polymerase chain reaction survey and new identifications. *J Med Entomol.* 39 (4): 562-7
- RICHARDSON R.L., ELLISON J.R. e AVEROFF W.W., 1982. Autocidal control of Screwworms in North America. *Science*, 215: 361-365.
- RIEGLER M., CHARLAT S., STAUFFER C. e MERCOT H., 2004. *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: Investigating the outcomes of Host-Symbiont coevolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:273-279.
- RIGAUD T. e JUCHAULT P., 1993. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillum vulgare* Latr. *Genetics*, 133: 247-252.
- RIGAUD T., 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts
In: O' Neill S.L., Hoffmann A.A. e Werren J.H. (Eds.), Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford: Oxford University Press: pp. 81-101.
- ROBINSON A.S., 1976. Progress in the use of chromosomal translocations for the control of insect pests. *Biological Reviews*, 51: 1–24.
- ROMI R., DALLA POZZA G. e MAJORI G., 1993. *Aedes albopictus* in Italia implicazioni igienico-sanitarie. *Ambiente Risorse Salute* 18 (6): 41-46.
- ROMI R., 1995. History and updating of the spread of *Aedes albopictus* in Italy. *Parassitologia*, 37: 99-103.

- ROMI R., 2001. *Aedes albopictus* in Italia: un problema sanitario sottovalutato. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 37(2): 241-247.
- ROUSSET F., BOUCHON D., PINTUREAU B., JUCHAULT P. e SOLIGNAC M., 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 250: 91-98.
- ROUSSET E., BRAIG H.R. e O' NEILL S.L., 1999. A stable triple *Wolbachia* infection in *Drosophila* with nearly additive incompatibility effects. *Heredity*, 82: 620-627.
- RUTLEDGE L.C., WARD R.A. e GOULD D.J., 1964. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News*, 24: 407-419.
- SABATINI A., RAINERI V., TROVATO G., COLUZZI M., 1990. *Aedes albopictus* in Italia e possibile diffusione della specie nell'area mediterranea. *Parassitologia*, 32: 301-304.
- SANTAMARIA P., 1987. Injecting eggs. In: Roberts D.B. (Ed.), *Drosophila: A practical approach*, pp 159-173. IRL Press, Oxford.
- SASAKI T., BRAIG H.R. e O' NEILL S.L., 1998. Analysis of *Wolbachia* protein synthesis in *Drosophila* in vivo. *Insect Molecular Biology*, 7: 101-105.
- SASAKI T. e ISHIKAWA H., 2000. Transinfection of *Wolbachia* in the Mediterranean Flour Moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic Microinjection. *Heredity*, 85: 130-135.
- SCHAFFNER F., SCHOLTE E.J., ALMEIDA.P., BELLINI R., ERITJA R., FLACIO E., JEANNIN C., LUKAC Z., MERDIC E., PETRIĆ D., PAJOVIC I., PLUSKOTA B., ROMI R., ROIZ D. e SAMANIDOU-VOYADJOGLOU A., 2007. Current documented distribution of *Aedes albopictus* in Europe. *Consultation on the vector-related risk for CHIK virus transmission in Europe*, Paris, 22 October 2007.

- SCHILTHUIZEN M. e STOUTHAMER R., 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 264: 261-366.
- SCHLIEKELMAN P. e GOULD F., 2000. Pest control by the release of insects carrying a female-killing allele on multiple loci. *Journal of Economic Entomology*, 93: 1566-79.
- SEREBROVSKY A.S., 1940. On the possibility of a new method for the control of insect pests. In: *Int. At. Energy Agency #STI/PUB/224*, pp.123-137. Vienna 1969.
- SHAHID M.A. e CURTIS C.F., 1987. Radiation sterilization and cytoplasmic incompatibility in a tropicalized form strain of the *Culex pipiens* complex (Diptera Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 24: 273-274.
- SHARMA V.P., PATTERSON R.S. e FORD H.R., 1972. A device for the rapid separation of male and female mosquito pupae. *Bulletin of the World Health Organization*, 47: 429-432.
- SHARMA V.P., SUBBARAO T., ADAK T. e RAZDAN R.K., 1979. Integration of radiation with cytoplasmic incompatibility for genetic control in the *Culex pipiens fatigans* (Diptera: culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 15: 155-156.
- SHROYER D.A., 1986. *Aedes albopictus* and arbovirus: a concise review of the literature. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2: 424-428.
- SINKINS S.P., BRAIG H.R. e O' NEILL S.L., 1995a. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 261: 325-330.
- SINKINS S.P., BRAIG H.R., O' NEILL S.L., 1995b. *Wolbachia pipientis*: bacterial densities and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected

- populations of *Aedes albopictus*. *Experimental Parasitology*, 81: 284-291.
- SINKINS S.P. e O' NEILL S.L., 2000. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: Handler A.M. e JAMES A.A.(Eds.) *Insect transgenesis: Methods and Applications*, pp. 271-287. CRC press.
- SMITH C.N., LABRECQUE G.C. e BORKOVEC A.B., 1964. Insect chemosterilants. *Annual Reviews of Entomology*, 9: 269-84.
- SMITTLE B.J., MOUNT G.A. e DAS M., 1968. Apholate and gamma irradiation compared as sterilants for *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Mosquito News*, 28: 201-204.
- SPRENGER D. e WUTHIRANYAGOOOL T., 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County Texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2: 217-219.
- SPSS Inc., 2003. Base System User's Guide, Release 10.0. Distributed by Prentice Hall, Chicago, Illinois USA.
- STOUTHAMER R., 1993. The Use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga*, 38: 3-6.
- STOUTHAMER R., LUCK R.F. e HAMILTON W.D., 1990. Antibiotics causes parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 87: 2424-2427.
- STOUTHAMER R. e KAZMER D.J., 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73: 317-327.
- TELSCHOW A., HAMMERSTEIN P. e WERREN J.H., 2002. The effect of *Wolbachia* on genetic divergence between population: model on two-way migration. *American Naturalist*, 160: S54-S66.

- THOMAS D.D, DONELLY C.A, WOOD R.J, ALPHEY LS. 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 287: 2474–76
- TRAM U. e SULLIVAN W., 2002. Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science*, 296: 1124-1126.
- TURELLI M. AND A.A. HOFFMANN.1991. Rapid Spread of an Inherited Incompatibility Factor in Californian *Drosophila*. *Nature* 353: 440–442.
- TURELLI M. e HOFFMANN A.A., 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: Dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, 140: 1319–1338.
- TURELLI M. e HOFFMANN A.A., 1999. Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing genes into arthropods population. *Insect Molecular Biology*, 8: 243-255.
- URBANELLI S., BELLINI R., CARRIERI M., SALLICANDRO P. e CELLI G.. 2000. Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity*, 4: 331-337.
- VAN MEER M.M.M., VITTEVELDT J. e STOUTHAMER R., 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Molecular Biology*, 8(3): 399-408.
- VANDERPLANK F.L., 1947. Experiments on hybridization of tse tse flies and the possibility of a new method of control. *Transaction of the Royal Entomological Society*, 98: 1-18.
- VANDERPLANK F.L., 1948. Experiments on cross breeding tse tse flies. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 42: 131-152.

- VAVRE E., FLEURY F., LEPETIT D., FOUILLET P. e BOULETREAU M., 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1711-1723.
- VAZEILLE-FALCOZ M., ADHAMI J., MOUSSHON L. e RDHAIN F., 1999. *Aedes albopictus* from Albania: a potential vector of dengue viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15: 475-478.
- VENETI Z., CLARK M.E., ZABALOU S., KARR T.L., SAVAKIS C. e BOURTZIS K., 2003. Cytoplasmic Incompatibility and Sperm Cyst Infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *Genetics*, 164: 545-552.
- VERANI P., CIUFOLINI M.G. e NICOLETTI L., 1995. Arbovirus surveillance in Italy. *Parassitologia*, 37(2): 105-108.
- WEEKS A.R., TRACY K. e HOFFMANN A.A., 2002. *Wolbachia* dynamics and host effects: what has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology and Evolution*, 17(6): 257-262.
- WEIDHAAS D.E., SCHMIDT C.H. e SEABROOK E.L., 1962. Field studies on the release of sterile males for the control of *Anopheles quadrimaculatus*. *Mosquito News*, 22: 283-290.
- WERREN J.H., 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Reviews of Entomology*, 42: 587-609.
- WERREN J.H., WINDSOR D. e GUO L.R., 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 262: 197-204.
- WERREN J.H., ZHANG W. e GUO L.R. 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 261: 55-63.

- WHITTEN M.J., 1985. The conceptual basis for genetic control. In: G.A. Kerkut e L.I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, pp. 465–528. New York: Pergamon.
- WU M., SUN L.V., VAMATHEVAN J., RIEGLER M., DEBOY. R.C., BROWNLIE J., MCGRAW E.A., MARTIN W., ESSER C., AHMADINEJAD N., WIEGAND C., MADUPU R., BEANAN M.J., BRINKAC L.M., DAUGHERTY C., DURKIN A.S., KOLONAY J.F., NELSON W.C., MOHAMOUD Y., LEE P., BERRY K., YOUNG M.B., UTTERBACK T., WEIDMAN J., NIERMAN W. C., PAULSEN I.T., NELSON K.E., TETTELIN H., O' NEILL S.L. e EISEN J.A., 2004. Phylogenomics of the Reproductive Parasite *Wolbachia pipientis* wMel: A Streamlined Genome Overrun by Mobile Genetic Elements. *PLoS Biology*, 2: 237-341.
- XI Z. e DOBSON S., 2005. Characterization of *Wolbachia* transinfection efficiency by using microinjection of embryonic cytoplasm and embryo homogenate. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3199-3204.
- XI Z., DEAN J., KHOO C. e DOBSON S., 2005a. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian Tiger mosquito) via embrionic microinjection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 903-910.
- XI Z., KHOO C. e DOBSON S., 2005b. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*, 310: 326-328.
- XI Z., KHOO C., e DOBSON S., 2006. Interspecific transfer of *Wolbachia* into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 273: 1317-1322.
- YEN J.H. e BARR A.R., 1971 New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, 232: 657-658.

- YEN J.H. e BARR A.R., 1973. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 22: 242-250.
- ZABALOU S., RIEGLER M., THEODORAKOPOULOU M., STAUFFER C., SAVAKIS C. e BOURTZIS K., 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101(42): 15042-15045.
- ZALOM F.G., ASMAN S.M. e MEYER R.P. 1981. Mating competitiveness of irradiated males of *Culex tarsalis* in a field cage study. *Mosquito News*, 41: 230-232.
- ZHOU W., ROUSSET R., O' NEILL S.L., 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 265: 509-515.

RINGRAZIAMENTI

E' difficile scrivere dei ringraziamenti per molti motivi. Il primo, perché tantissime persone hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi direttamente o indirettamente ed elencarli tutti in una paginetta è impresa assai ardua. Il secondo perché anche con l'enorme gioia di tagliare un altro traguardo importante come il conseguimento del Dottorato, si ha la consapevolezza che questa volta la bella e stimolante vita dello studente sia veramente finita.

Inizio i miei ringraziamenti con il Dr. Luigi Rossi, per avermi dato al momento giusto un forte propellente per tentare il volo ed il Dr. Roberto Balducci compagno di un costante itinerario di crescita.

Un ringraziamento sentito va anche al Dr. Ugo Cirio, che con i suoi racconti di campo mi ha insegnato la Tecnica del SIT.

Ed ora eccole le persone che hanno lavorato con me:

La Prof.ssa Sandra Urbanelli che ringrazio per la sua infinita dedizione nell'affiancarmi.

Romeo Bellini, e tutta la sua equipe, perché la zanzara tigre ne uscirà sconfitta

Riccardo Moretti, una pazienza infinita in laboratorio

Elena Lampazzi, la mamma e la grande allevatrice di zanzare

Angiola Desiderio, una pazienza infinita nella vita...

Ringrazio inoltre il Prof. Kostas Bourtzis ed il Prof. Stephen Dobson, il primo per avermi un giorno presentato Wolbachia ed il secondo per avermi insegnato ad utilizzarla.

Mi scuso con tutte le persone che non ho menzionato.