

## DNA, SESSO DELLE MOSCHE E GENE EDITING: PROTEGGERE LA FRUTTA SENZA PESTICIDI

GIUSEPPE SACCONI (\*)

Nota presentata dal s.c. Giuliano Gasperi  
(Adunanza del 22 aprile 2021)

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

\*\*\*

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

---

(\*) Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italy.  
E-mail: giuseppe.saccone@unina.it

## INTRODUZIONE

Con la domesticazione di specie animali, vegetali e la nascita dell'agricoltura si potè conciliare la nuova vita sedentaria della nostra specie con la disponibilità di alimenti. Ma nel corso del tempo, e soprattutto con il recente sviluppo dell'agricoltura intensiva si è andato aprendo un nuovo fronte di lotta per la sopravvivenza: la lotta contro gli insetti che danneggiano il raccolto. A inizio del secolo scorso, l'emergere della Genetica ha visto la scoperta del ruolo dei cromosomi nella ereditarietà ma anche nello sviluppo (determinazione del sesso) e la localizzazione dei geni sui medesimi proprio grazie allo studio di insetti sia dannosi come il *Tenebrio molitor* sia innocui come la più famosa *Drosophila melanogaster*. La genetica della *Drosophila*, fondata da Thomas Hunt Morgan (1866-1945; Columbia University, USA; Nobel 1933) ha permesso successivamente, e senza volerlo, di porre le basi per lo sviluppo della tecnica dell'Insetto Sterile (SIT), un approccio *ecofriendly* di biocontrollo di specie di insetti dannosi ma anche della biotecnologia entomologica per sviluppare metodi di controllo ancora più innovativi quali la recente tecnica del "gene drive", un approccio di manipolazioni della genetica delle popolazioni di insetti grazie ad un super vantaggio nella trasmissione ereditaria conferito ad un transgene (presente in insetti rilasciati) in grado di ridurre la riproduzione di una specie dannosa.

## LO SVILUPPO DELLA TECNICA DELL'INSETTO STERILE (SIT)

A metà del secolo scorso, il genetista sovietico Aleksandr Sergeevich Serebrovskii (1892-1948) partendo da concetti di genetica di popolazione, propose un metodo di controllo di insetti dannosi basato sul rilascio di individui maschi portatori di mutazioni che avrebbe ridotto il numero di individui selvatici. Successivamente, fu sviluppato il concetto di sterilizzazione mediante irradiazione e di insetti portatori di nuove mutazioni cromosomiche dominanti letali nei loro gameti. L'idea era derivata anche dagli studi dell'allievo di Morgan, Hermann J. Muller (1890-1967; Nobel nel 1946), che aveva scoperto come i raggi X inducessero mutazioni letali ereditarie nella *Drosophila*. Dopo alcuni decenni, l'idea fu messa in pratica negli Stati Uniti da Edward Knippling (1909-2000) che riuscì a eradicare nell'intera nazione e in quelle limitrofe a sud fino all'istmo di Panama, un insetto dannoso al bestiame, lo

“*screw worm*”, o verme trapanatore, *Cochliomyia hominivorax*, le cui larve si nutrono crescendo nelle ferite degli animali. E' interessante notare che la tecnica è specie-specifica e non intacca la presenza di altre specie di insetti (spesso anche benefici), come invece accade con i pesticidi. E' possibile applicare questa strategia di biocontrollo alle specie dotate di un ciclo vitale abbastanza rapido ed in cui si possibile sviluppare dieta artificiale e un metodo di allevamento massivo (Klassen and Curtis, 2005). Questa tecnica che ha preso il nome di “Sterile Insect Technique”, Tecnica dell'insetto sterile, o SIT, è applicata a varie altre specie dannose all'agricoltura ma anche alla salute umana, come le zanzare. Molti specie di mosche della frutta appartenenti alla famiglia delle mosche Tephritidae sono controllate con la SIT, quali la Mediterranean fruit fly (Medfly; *Ceratitidis capitata*), la Mexican fly (*Anastrepha ludens*), e la Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*), grazie alle intense attività formative, di networking ed organizzative della Pest Control Unit della FAO-IAEA (Seibersdorf, Austria).

Dopo la migrazione fuori dall'Africa della Medfly ed il suo arrivo nel bacino della California, estesa zona agricola a frutta, negli anni ottanta, ci furono forti contestazioni delle popolazioni urbane contro l'uso del *malathion*, pesticida che veniva spruzzato dall'alto con aerei. Fu quindi iniziato un progetto di controllo della *Medfly*, ancora oggi attivo in California, alternativo a questi pesticidi. La biofattoria che produce insetti della Medfly (fino a miliardi per settimana) e che serve la California in modo massivo si trova in Guatemala. Anche in Spagna, la regione di Valencia si è dotata di una sua biofattoria della Medfly ed applica la SIT per proteggere la produzione ed esportazione di agrumi. Anni fa la ENEA in Italia ha iniziato un progetto di biofattoria in Sicilia non ancora andato a buon fine.

#### LO SVILUPPO DI CEPPI MUTANTI DI MEDFLY PER SELEZIONARE E RILASCIARE I SOLI MASCHI: APPROCCI DI GENETICA CLASSICA

E' stato presto chiarito che è possibile migliorare l'efficienza della SIT, se vengono rilasciati individui sterili del solo sesso maschile: le femmine sterili infatti danneggiano comunque con l'ovipositore la frutta, e “distraggono” i maschi sterili dall'accoppiarsi con le femmine selvatiche. L'accoppiamento che bisogna favorire è tra maschi sterili rilasciati dalla biofattoria e le femmine selvatiche della popolazione che

danneggiano la frutta; a tal fine il numero di maschi sterili rilasciati è almeno 10-20 volte superiore al numero di maschi selvatici presenti nella zona. Ma come riuscire a separare i maschi dalle femmine in modo massivo, rapido ed efficace?

Tre decenni fa, studi di mutagenesi indotti con radiazioni presso la FAO-IAEA (Seibersdorf, Austria) hanno portato a isolare varie mutazioni geniche nella *Medfly*. Tra esse, due sono risultate molto utili per separare i maschi dalle femmine in modo semplice e a stadi di sviluppo precoci: 1) un ceppo con mutazione temperatura-sensibile letale embrionale e recessiva (*tsl/tsl*) e 2) un ceppo con pupe color bianco (*wp/wp*) invece che marrone. La casuale scoperta di un ceppo eterozigote di *Medfly*, che porta una traslocazione sul cromosoma Y di un segmento autosomico contenente i due geni selvatici *tsl+* e *wp+* e sull'autosoma integro, gli alleli recessivi mutanti *tsl* e *wp* ha permesso ai genetisti della IAEA di ottenere il ceppo *Vienna 8*, in cui si possono produrre solo maschi a comando, trattando gli embrioni con shock a caldo per varie ore, dato che sopravvivono solo gli XY con il gene normale *tsl+*. Inoltre, a stadi pupali è possibile tenere sotto controllo la efficienza di letalità femmina-specifica embrionali, controllando che vi siano solo pupe di colore marrone (XY, con *wp+*) ed aggiungendo un utile *check point* della qualità del *sexing*.

A fine anni Ottanta, con l'avvento delle tecniche di DNA ricombinante applicate anche alla genetica della *Drosophila* fu proposta una nuova strada che prevede l'uso della biotecnologia per controllare in modo più efficace ed economico gli insetti dannosi anche potenziando alcuni aspetti della SIT che bisognava migliorare (Louis *et al.*, 1988). Vari laboratori di ricerca in USA ed Europa si sono dedicati allo studio dei pathway di sviluppo sessuale della *Drosophila* per pura curiosità e all'isolamento molecolare di geni della determinazione del sesso, che quando mutati cambiano il sesso in un senso o in un altro. Inoltre, furono sviluppate mosche transgeniche mediante la trasformazione genetica con elementi trasportabili – “curando” mosche con occhio bianco e ripristinandone il colore rosso e la funzionalità visiva. Si apriva quindi la possibilità di sviluppare insetti transgenici dotati di nuove caratteristiche utili al controllo di insetti selvatici (Louis *et al.*, 1988). È importante evitare il rilascio di femmine insieme ai maschi, sebbene entrambi sterilizzati, perché le femmine comunque danneggiano la frutta con l'ovopositore. Sono stati condotti senza successo tentativi di replicare questo metodo di “sexing” dei maschi basato su *tsl/wp* in altre specie di

Tephritidae per le quali è auspicabile applicare la SIT. La biotecnologia potrebbe risolvere questo problema (Louis *et al.*, 1988; Saccone, 2018).

#### LO SVILUPPO DI CEPPI TRANSGENICI DI MEDFLY PER SELEZIONARE E RILASCIARE I SOLI MASCHI: APPROCCI DI BIOTECNOLOGIE.

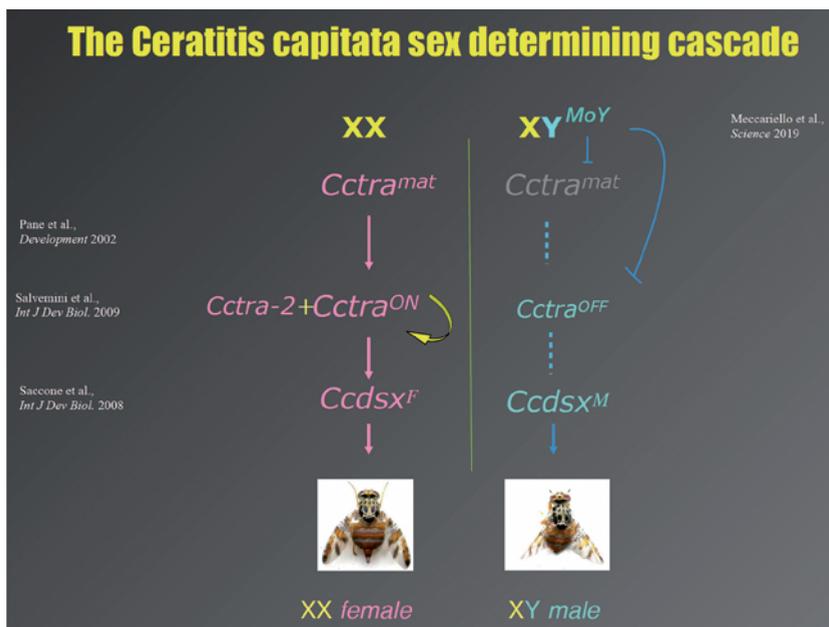
Il gene è un segmento di DNA che può produrre una proteina per influenzare funzionalità specifiche della cellula, che siano ad esempio energetiche, metaboliche, strutturali e di interazione con altre cellule. Sappiamo che sia il DNA, sia le proteine sono chimicamente polimeri lineari che prendono una loro struttura tridimensionale. Le cellule si specializzano in vari tessuti ed organi. La genetica dello sviluppo si occupa di comprendere come avviene il differenziamento delle cellule che pur contenendo medesimo DNA, si comportano in modo differente esprimendo una serie di geni e proteine specifici per quel tipo cellulare. Mentre il DNA ha la famosa forma a doppia elica, le proteine possono avere strutture tra le più varie e quindi anche funzioni drasticamente differenti. Anche le mosche corteggiano, si accoppiano e il maschio feconda con spermatozoi (di tipo X o Y) le uova della femmina (di solo tipo X). Durante il corso dell'embriogenesi e poi durante la fase larvale e la metamorfosi, le cellule continuano a dividersi e moltiplicarsi ingrandendo l'individuo che prende una forma caratteristica della sua specie. Abbiamo compreso nello scorso secolo, che nei vari cromosomi sono contenuti geni “*master*” che vengono attivati precocemente durante lo sviluppo e che deviano il differenziamento verso particolari destini di specializzazione. Il primo concetto utile da introdurre è che i geni “*master*” sono a monte di una gerarchia di geni a valle che rispondono a questi primi segnali differenziativi. Il secondo concetto è il “*pathway genetico*” dello sviluppo, una serie di geni che in successione regolano gli uni gli altri. In modo semplicistico, un primo gene produce una proteina che va ad attivare un secondo gene che produce una seconda proteina che va ad attivare un terzo gene, etc. Durante lo sviluppo, vi saranno cellule nel medesimo organismo in crescita che esprimono uno specifico pathway (magari che porta alla formazione dell'occhio) e cellule che non lo esprimono. Tutto dipende se il “*master gene*” è stato attivato o meno. Ancora non è molto chiaro come inizi la differenza tra due cellule figlie, di cui solo una attiverà il gene maestro. Per la determinazione del sesso, l'inizio della differenza è invece spesso

chiaro: gli embrioni di Medfly sono di due tipi, a seconda se lo spermatozoo che ha fecondato portava un cromosoma Y oppure uno X. Gli embrioni XX ed XY partono quindi con una chiara differenza genetica, anzi cromosomica: i primi si svilupperanno in femmine ed i secondi in maschi. Ma è tutto il cromosoma Y ad essere necessario per determinare la mascolinità? Esperimenti di delezione del cromosoma Y di Medfly condotti dal Dr. Gerald Franz alla IAEA negli anni '90 hanno chiarito che basta anche una versione mini del cromosoma Y e che esiste una regione cromosomica contenente un fattore di mascolinità.

Per affrontare lo studio della determinazione del sesso nella Medfly, anche al fine un giorno di poterne manipolare il sesso e produrre maschi a comando trasformando le femmine, siamo partiti dal pathway genetico decifrato nella *D. melanogaster*, in cui il gene "master" *Sex-lethal (Sxl)* viene attivato da due copie di cromosomi X (in embrioni XX) ma rimane spento negli embrioni XY. Negli embrioni XX, *Sxl* a sua volta attiva il gene *transformer (tra)* che attiva le funzioni femmina-specifiche del gene *doublesex (dsx)*, producendone una isoforma femmina-specifica. Grazie alla capacità di molecole di DNA di denaturare (separare le due eliche) e rinaturare (riappaiarsi con sequence complementari al 100% o anche meno) sono state sviluppate tecniche di ibridazione con sonde radioattive per isolare geni omologhi (simili per sequenza) usando geni di riferimento già precedentemente isolati (approccio mediante omologia). E' stato quindi possibile isolare i geni omologhi di *Drosophila* nella Medfly, quali *CcSxl*, *Cctra* e *Ccdsx* (perchè molto simili o abbastanza simili nella sequenza di DNA ed in grado di ibridare molecolarmente *in vitro*) e scoprire che il pathway genetico è conservato nel segmento modulare *Cctra>Ccdsx* (Fig. 1).

*CcSxl* infatti non è espresso in modo sesso-specifico come *Sxl* di *Drosophila* e quindi non viene spento in embrioni XY dal segnale primario mascolinizante presente sul cromosoma Y di Medfly. Invece sia *Cctra* che *Ccdsx* producono mRNA e proteine specifiche di un solo sesso. *Cctra* produce una proteina nelle sole femmine XX a partire da stadi embrionali e *Ccdsx* produce isoforme specifiche di ciascun sesso (come in *Drosophila*). Più difficile è stata la strada per isolare il putativo fattore *M* dal cromosoma Y di Medfly, perchè non potevamo trovare aiuto nella *Drosophila* e nell'approccio di omologia evolutiva: dovevamo cercare un gene di nuovo tipo probabilmente mai descritto prima. Abbiamo dovuto attendere lo sviluppo di nuove tecnologie di sequen-

ziamento del DNA (dette *long reads*), di RNA (mRNA seq) e di approcci bioinformatici (analisi di espressione differenziale), per rispondere con dati molecolari alla domanda se vi fosse e quale fosse un mRNA presente negli embrioni XY ed assente negli embrioni XX, prodotto a partire da un gene mascolinizante Y-linked cioè associato fisicamente al cromosoma Y (Meccariello *et al.*, 2019).



*Fig. 1.* La cascata genetica della determinazione del sesso in *Ceratitis capitata* consiste rispettivamente in un segnale femminizzante ed uno mascolinizante. Quello femminizzante è di origine materna ed è fornito dal gene *Cctra* in uova che se fecondate da spermatozoi X, portano ad embrioni XX in cui *Cctra* viene attivato, attiva *Ccdsx<sup>F</sup>* e si sviluppa una femmina adulta dopo circa 20 giorni. Il segnale mascolinizante è fornito in embrioni XY dal cromosoma Y, che porta il gene *MoY* e che reprime il gene *Cctra* spegnendolo. Il gene *Ccdsx* esprime in tal caso la isoforma M che promuove lo sviluppo di mosche maschili. Il gene *Cctra-2* svolge come in *Drosophila* una funzione ausiliare a quella di *Cctra* in femmine.

Abbiamo identificato il gene “*master*” della determinazione del sesso maschile di Medfly, rinominato gene *MoY* (*Maleness-on-the-Y*), come piccolo gene produttore una piccola proteina di nuovo tipo,

mancante di similarità con i 15.000 tipi di domini proteici già conosciuti e depositati nelle banche dati NCBI (Meccariello *et al.*, 2019). *MoY* è in grado di reprimere il gene “master” della determinazione del sesso femminile *Cctra* negli embrioni XY, e indurre lo sviluppo maschile. È stato sorprendente e interessante scoprire che *MoY* è funzionalmente conservato nella mosca dell’olivo *Bactrocera oleae* e nella mosca orientale della frutta *Bactrocera dorsalis*, una specie invasiva che è stata di recente rilevata per la prima volta in Italia e in Europa (Meccariello *et al.*, 2019), ma non nel resto degli insetti i cui genomi sono stati sequenziati (e sono svariate centinaia). Ortologi di *MoY* sono presenti sul cromosoma Y di altre 5 specie del genere *Bactrocera*, suggerendo una sua vasta conservazione evolutiva, e quindi un suo possibile uso per produrre progenie di solo sesso maschile mediante transgenesi. Non sappiamo ad oggi come funziona biochimicamente la proteina MOY nell’indurre la mascolinizzazione.

Il gene *Cctra* di *Medfly* in realtà ha una funzione aggiuntiva epigenetica rispetto al suo omologo di *Drosophila*: deve ricordare la scelta del sesso femminile durante tutto lo sviluppo e lo fa mediante un’auto-regolazione positiva; pertanto ha assunto il ruolo di gene “master” per la determinazione del sesso femminile (Saccone, 2018). *Cctra* è utile anche come risorsa di sequenze regolative, per esprimere con transgeni, nelle sole femmine, proteine letali condizionali (Fu *et al.*, 2007). È utile anche per trasformare le femmine in maschi XX, quando *Cctra* viene spento per alcune ore durante l’embriogenesi con iniezioni di RNA a doppio filamento (RNAi), e produrre progenie di soli maschi. Ortologi di *Cctra* sono stati isolati in tante altre specie di Tephritidae dei generi *Bactrocera* e *Anastrepha*, confermandone il ruolo chiave e l’utilità in campo biotecnologico (Saccone, 2018).

#### L’EDITING GENOMICO IN *CERATITIS* E NELLE ALTRE TEPHRITIDAE: STATO DELL’ARTE E POTENZIALI APPLICAZIONI NEL LORO CONTROLLO

Il sogno di ogni genetista di mutagenizzare a piacere, in modo economico e veloce, un determinato gene, e non più a caso, è stato realizzato nel 2012 con lo sviluppo della tecnica di *gene editing* CRISPR/Cas9, scoperta premiata con il Nobel per la chimica alle due scienziate J. Doudna e E. Charpentier. Da quando la CRISPR/Cas9 è stata applicata anche in *Drosophila* per mutagenizzare geni, per modifi-

carli o inserire sequenze di DNA esogeno, si sono susseguiti a ritmo incalzante studi simili in altre specie di insetti appartenenti non solo ai Ditteri, ma anche agli Imenotteri, Lepidotteri e Coleotteri. Abbiamo messo a punto nei nostri laboratori, un metodo sviluppato in precedenza in *D. melanogaster*, di CRISPR/Cas9 in *Ceratitis capitata*, in *Bactrocera oleae* e *Musca domestica*, basato sull'uso di proteina Cas9 purificata in laboratorio – per renderla più economica – sulla produzione *in vitro* di sgRNA (che permettono il riconoscimento specifico del gene da colpire, sull'assemblaggio del complesso proteina-RNA (Cas9+gRNA) *in vitro* e della iniezione in embrioni di insetto, appena dopo la ovodeposizione (Saccone, 2018). Simili approcci sono stati sviluppati in varie altre specie delle Tephritidae (*Bactrocera dorsalis*, *Anastrepha* spp) (Saccone, 2018). È possibile indurre in via transiente con alta efficienza mutazioni anche bialleliche (2 alleli su i 2 cromosomi omologhi, in ciascuna cellula) nelle cellule somatiche e germinali degli embrioni, dai quali si sviluppa una progenie parzialmente mutante (mosaico) che quando incrociata, dà origine a una successiva progenie che mostra parte degli individui pienamente mutanti (omozigoti). Abbiamo applicato la CRISPR/Cas9 contro il gene *Ctra* e il gene *MoY* e abbiamo potuto osservare nel primo caso completa trasformazione sessuale di femmine in maschi fertili XX e di maschi in femmine XY con ridotta fertilità. Inoltre, possiamo mascolinizzare gli embrioni XX iniettando DNA del gene *MoY* o proteina MOY purificata. Abbiamo quindi nuovi modi di produrre progenie esclusivamente maschile in *Medfly* e in specie correlate. Un'alternativa alla microiniezione di proteina Cas9-sgRNA, disponibile già in *Drosophila*, nel baco da seta *Bombyx mori*, e in varie specie di zanzare (*Anopheles* e *Aedes*), è la produzione di ceppi transgenici che esprimono in modo endogeno la proteina Cas9 e il gRNA gene-specifico, necessari per l'evento di gene editing. In questi ceppi transgenici è possibile anche indurre mediante eventi di ricombinazione omologa, una duplicazione della singola copia del transgene presente su un solo cromosoma, sul sito corrispondente del cromosoma omologo. Un insetto che riceve una sola copia del costrutto transgenico, durante il suo sviluppo e nelle sue cellule germinali, lo duplica, divenendo in pratica un omozigote. Si assiste così a una cosiddetta ereditarietà super-mendeliana anche detta “*gene drive*”, che permette di trasmettere il costrutto genico artificiale e aumentarne la sua frequenza in poche generazioni in popolazioni che simulano quelle selvatiche. Se il costrutto transgenico “*gene drive*” viene progettato così

da avere anche la caratteristica di indurre una trasformazione delle femmine in maschi (ad esempio, usando un gene mascolinizzante, quale ad esempio *MoY* oppure un transgene che inattiva *Ccra*, mediante RNAi o *Cas9*), dopo poche generazioni si assiste al collasso delle popolazioni bersaglio.

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

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

## REFERENZE

- Fu G., Condon K.C., Epton M.J., Gong P., Jin L., Condon G.C., Morrison N.I., Dafa'alla T.H., Alphey L. (2007): *Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing*, «Nat Biotechnol.», Mar, 25 (3), pp. 353-357. Epub Feb 18.
- Klassen W. and Curtis C.F. (2005): *History of the Sterile Insect Technique*, in *Sterile Insect Technique, Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. (Eds.), Springer, pp. 3-36, ISBN 978-1-4020-4051-1.
- Louis C., Savakis C., Kafatos F.C. (1988): *Possibilities for genetic engineering in insects of economic interest*, in *Modern Insect Control: Nuclear Techniques and Biotechnology*, International Atomic Energy Agency, ISBN 92-0-010388-X.
- Meccariello A., Salvemini M., Primo P., Hall B., Koskinioti P., Dalíková M., Gravina A., Gucciardino M.A., Forlenza F., Gregoriou M.E., Ippolito D., Monti S.M., Petrella V., Perrotta M.M., Schmeing S., Ruggiero A., Scolari F., Giordano E., Tsoumani K.T., Marec F., Windbichler N., Nagaraju J., Arunkumar K., Bourtzis K., Mathiopoulos K.D., Ragoussis J., Vitagliano L., Tu Z., Papathanos P.A., Robinson M.D. and Saccone G. (2019): *Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests*. Science 27 Sep 2019, DOI: 10.1126/science.aax1318.
- Saccone G. (2018): *Sex Determination and Gene Editing in Tephritids: Converging on Innovative Biocontrol Strategie*, «Atti Accademia Nazionale. Italiana di Entomologia», LXVI.

