

## Prospettive di controllo microbiologico degli insetti

### IL CONTESTO GENERALE E DI MERCATO

L'interesse della comunità scientifica nel settore della *discovery* e nello sviluppo di soluzioni alternative e a basso impatto ambientale per il contenimento degli organismi nocivi in agricoltura è in continua crescita. Significativi sono anche gli investimenti industriali in questo ambito, con particolare riguardo al settore dei cosiddetti agenti di controllo biologico (BCA) da impiegare a integrazione ai sistemi tradizionali basati sull'uso di agrofarmaci di origine sintetica.

All'interno del mercato globale dei pesticidi (BCC Research LLC, CHM029E, 2014) il segmento dei biopesticidi segna il maggior tasso di crescita, con stime che si approssimano su valori del + 10-15% annuo (Global Industry Analysts, Inc., MCP-1573, 2012). Questo interesse è legato a vari fattori, tra i quali il ritiro dal mercato di agrofarmaci di largo impiego; i costi relativamente elevati di sviluppo di nuovi formulati sintetici; la riduzione dei livelli di residui (*Maximum Residue Level*, MRL) ammessi nei prodotti agrari e zootecnici; il trend positivo degli alimenti biologici; l'introduzione nel mercato di formulazioni bioinsetticide sempre più efficaci e con più ampio spettro di attività biologiche contro organismi bersaglio, tali da risultare competitive e di facile applicabilità, alla stregua di normali insetticidi convenzionali (Copping e Menn, 2000; Chandrasekaran et al., 2012; Senthil-Nathan, 2013); i limitati effetti indesiderati nei confronti di insetti utili, dei problemi della farmaco resistenza (Copping e Menn, 2000; Goettel et al., 2001; EPA 2006) o della contaminazione dell'aria e dell'acqua, quindi anche dei rischi per la salute umana e per l'ambiente.

\* Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia vegetale ed Entomologia, Università di Sassari

Nell'ambito del recente contesto normativo sulla gestione integrata dei parassiti (IPM), l'implementazione dei nuovi regolamenti comunitari favorisce sempre più lo sviluppo e la registrazione pre-commerciale di sostanze a minore impatto ambientale efficaci per il controllo degli organismi nocivi (Direttiva CE 2009/128; Reg. CE N. 1107/2009).

Un ruolo importante è ricoperto dagli insetticidi di origine microbica, rappresentati da numerosi microrganismi associati agli insetti e che si comportano da agenti entomopatogeni, tra cui batteri, funghi, virus, protozoi, nematodi (Vega e Kaya, 2012).

## I PRINCIPALI AGENTI ENTOMOPATOGENI

### *Batteri*

I batteri sono largamente diffusi nell'ambiente e, nel tempo, hanno instaurato un'ampia varietà di interazioni con gli insetti, inclusi i rapporti di simbiosi. Benché molte specie batteriche siano utili per gli stessi insetti, alcune di queste si comportano come agenti patogeni. Questi ultimi hanno evoluto una molteplicità di strategie per superare le difese dei loro ospiti, incluso lo sviluppo di tossine insetticide spesso ad azione molto specifica.

I batteri costituiscono gli agenti entomopatogeni più importanti, con specie soprattutto sporigene ma anche non sporigene (Ruiu, 2015).

Il genere *Bacillus* include le specie con maggiore interesse applicativo. La ricerca degli ultimi decenni è stata dominata da *Bacillus thuringiensis* (Bt), che agisce come insetticida sia sulle larve di Lepidotteri, ma anche nei riguardi di Ditteri e Coleotteri (Palma et al., 2014), ed è utilizzato in commercio da più di 40 anni (Gelernter e Schwab, 1993).

Nella sua forma vegetativa è debolmente tossico, ma durante la sporulazione produce pro-tossine di natura proteica che tipicamente si aggregano in corpi parasporali (cristalli), caratterizzati da una specifica azione insetticida. Questi cristalli, ingeriti dagli insetti insieme al cibo, si dissolvono nell'intestino medio, se sufficientemente basico nel caso dei lepidotteri, e rilasciano proteine con peso molecolare variabile (range 30 - 160 kDa), che, a opera di enzimi digestivi (es. tripsina), liberano tossine attive in grado di interagire con le cellule epiteliali della superficie intestinale, provocandone la degenerazione, seguita dalla paralisi e morte dell'insetto.

Diversi ceppi di Bt producono differenti tossine, di cui le più note sono l' $\alpha$ -esotossina, (termolabile), la  $\beta$ -esotossina o Turingiensina (termostabile), le

tossine Vegetative Insecticidal Proteins (VIP) prodotte durante la fase vegetativa, e le più note  $\delta$ -endotossine. Queste ultime, definite anche proteine Cry, sono in grado di legarsi selettivamente a specifici recettori localizzati nell'epitelio intestinale delle larve di specie suscettibili di insetti. Il legame della proteina con i recettori è seguita da un meccanismo che determina la formazione di pori catione-specifici che, distruggendo il flusso ionico dell'epitelio intestinale, portano alla morte le larve in pochi giorni. A oggi si conoscono più di 700 geni che codificano per proteine Cry che risultano suddivisi in diverse famiglie secondo un sistema di nomenclatura quaternario (es. Cry1Aa1), appartenenti a differenti ceppi di Bt, che esibiscono un'elevata specificità di azione nei confronti dei diversi insetti. Questa specificità è legata al meccanismo di riconoscimento a livello dei recettori di membrana nelle specie di insetti target. Recettori che non sono presenti in altri animali e nell'uomo, che dunque non sono sensibili all'azione di queste proteine. I geni che codificano per queste proteine possono essere impiegati nella trasformazione di determinate specie vegetali per conferirle resistenza nei confronti di un particolare tipo di insetto. In tal modo la pianta sarà in grado di sintetizzare la proteina Cry direttamente nella forma attiva, che esplicherà la sua funzione bioinsetticida quando l'insetto dannoso attacca la pianta cibandosi dei suoi tessuti. Geni codificanti per le tossine di Bt sono stati ormai geneticamente inseriti in diverse piante di interesse agrario (es. mais), ampiamente diffuse nelle aree geografiche in cui è consentita la coltivazione di piante geneticamente modificate (OGM).

La Turingiensina, che ha una natura nucleotidica, ha un più ampio spettro d'azione, ed è stata in passato impiegata contro le mosche domestiche. Tuttavia, essa presenta una leggera tossicità anche per i mammiferi, per cui, con qualche eccezione, il suo impiego non è consentito in agricoltura biologica, e i ceppi di Bt che la producono sono stati ritirati dal commercio nei paesi occidentali.

Ceppi del gruppo *Lysinibacillus sphaericus* (precedentemente *Bacillus sphaericus*) sono caratterizzati dalla produzione di una endospora di forma sferica, strettamente associata a corpi parasporali che contengono in rapporto equimolare delle tossine proteiche binarie (BinA and BinB). Le modalità di azione anche in questo caso per ingestione, includono modificazioni nella membrana peritrofica e danneggiamento dell'epitelio intestinale. I principali insetti target delle formulazioni basate su ceppi di *L. sphaericus* sono le zanzare, i simuli e i chironomidi.

Il batterio sporigeno *Paenibacillus popilliae* è l'agente eziologico della cosiddetta "milky disease" di larve di Coleotteri fitofagi. Ceppi appartenenti a

questa specie producono inclusioni parasporali, anche se l'effetto insetticida è maggiormente legato a una azione setticemica del batterio.

Tra gli altri batteri di interesse nella produzione di bioinsetticidi ricordiamo le specie di Actinobacteria *Streptomyces* spp. e *Saccharopolyspora* spp. che hanno guadagnato grande interesse commerciale per la produzione di una varietà di metaboliti che agiscono come potenti insetticidi (i.e avermectine, spinosad). Rilevante anche il caso del *Brevibacillus laterosporus*, batterio entomopatogeno caratterizzato dalla produzione di un tipico corpo parasporale a forma di canoa associato a un lato della spora. Tossine ad azione insetticida prodotte da diversi ceppi appartenenti a questa specie sono attive nei confronti di larve di coleotteri e di ditteri come zanzare e mosche (Ruiu, 2013).

Di recente scoperta e introduzione nei mercati del Nord America, sono alcuni ceppi di Betaproteobacteria appartenenti ai generi *Burkholderia* e *Chromobacterium*, il cui ampio spettro di attività e una modalità di azione sia per ingestione che per contatto, ne consente un utilizzo nei confronti sia di insetti con apparato boccale masticatore (es. coleotteri, lepidotteri) che di fitomizi (es. eterotteri) e acari (Martin et al., 2007).

## *Virus*

I virus, a differenza dei batteri, hanno avuto uno sviluppo applicativo più limitato. Interessano particolarmente tre tipi di virus: i virus delle poliedrosi citoplasmatiche; i virus delle poliedrosi nucleari e i virus delle granulosi.

I baculovirus si distinguono in virus della poliedrosi nucleare (NPV) e in granulovirus (GV); sono in grado di infettare una grande varietà di artropodi e in particolar modo le larve di Lepidotteri, Coleotteri, Ditteri, Imenotteri, Neutotteri, Sifonatteri, Tisanuri e Tricotteri. Il nome baculo è riferito alla forma bastoncellare del capsido di queste particelle virali, all'interno del quale il DNA è condensato in una struttura nucleoproteica. Alcune applicazioni importanti di questi virus hanno riguardato il controllo di *Limantria*, *Proctionaria* e *Carpocapsa*, per i quali sono stati sviluppati insetticidi virali. I baculovirus sono di solito altamente patogeni e sono utilizzati efficacemente anche nella loro forma naturale come agenti di biocontrollo contro numerosi insetti nocivi (Moscardi, 1999). In Italia, pioniere nell'impiego di baculovirus fu Magnoler (1967, 1968) il quale sperimentò delle valide applicazioni per la protezione delle sugherete sarde da attacchi del Lepidottero defogliatore *Lymantria dispar*, usando macerati di larve raccolte in natura della stessa *L. dispar* e di *Malacosoma neustria* infettate da virus della poliedrosi nucleare.

I baculovirus devono essere ingeriti per provocare l'infezione. Dopo l'ingestione, entrano attraverso l'intestino medio e da lì si diffondono in tutto il corpo dell'insetto, anche se su alcuni ospiti, l'infezione può essere limitata all'intestino o al tessuto adiposo. Una caratteristica comune ai baculovirus è che le particelle virali sono incorporate in una matrice proteica. La presenza di corpi di occlusione gioca un ruolo fondamentale nella loro potenziale applicazione in strategie di lotta biologica in quanto permette al virus di sopravvivere fuori dell'ospite (Cory, 2000).

Recentemente, è stato dimostrato che sostanzialmente i baculovirus non sono infettivi per vertebrati e piante. Anche all'interno degli insetti, il loro spettro d'azione è limitato all'ordine da cui sono stati isolati; alcuni sembrano specie-specifici, altri infettano una serie di ospiti (Barber et al., 1993; Cory et al., 2000).

La maggior parte dei nuovi baculovirus ricombinanti impiegano tossine selettive. La modificazione genetica è stata per lo più effettuata sul virus della poliedrosi nucleare dell'*Autographa californica* (AcNPV), che rappresenta a oggi uno dei virus per cui sono disponibili più informazioni molecolari, tra cui la sequenza di DNA completo (Cory, 2000). Ultimamente, un baculovirus naturale ad azione multipla è stato isolato da *Agrotis ipsilon* (AgipMNPV) (Prater et al., 2006).

Numerose formulazioni virali sono disponibili principalmente per il controllo di larve di Lepidotteri (Arthurs e Lacey, 2004; EPA, 2006). Tra i prodotti registrati in Italia è di rilievo il caso del virus della granulosa di *Cydia pomonella* CpGV.

### *Funghi*

I funghi entomopatogeni sono rappresentati da diversi generi e specie, che sono state oggetto di sperimentazioni per il controllo biologico nei confronti di vari insetti con successi e insuccessi che si sono nel tempo alternati, spesso in relazione al verificarsi di variabili condizioni ambientali (es. temperatura e umidità) che regolano la germinazione dei conidi fungini.

Una delle prime applicazioni significative riguarda la specie *Beauveria bassiana*, a partire dalla fine XIX secolo, la cui azione insetticida si esplica in seguito al contatto dei suoi conidi con il tegumento dell'insetto bersaglio, sul quale, se le condizioni sono idonee, germinano e producono ife fungine che perforano la cuticola e invadono il corpo dell'insetto. Questa "azione meccanica" determina perdita di acqua e disidratazione della vittima, concorrendo a causarne la morte (Pekrul e Grula, 1979).

*Metarhizium anisopliae* è l'altro fungo entomopatogeno essenziale con una vasta gamma di specie di insetti ospiti. Attualmente diversi ceppi sono stati isolati da varie aree geografiche (Fegan et al., 1993; Roberts e St. Leger, 2004) con tossicità estremamente variabile (Goettel e Jaronski, 1997). *M. anisopliae* è utilizzato su larga scala in Paesi come il Brasile, dove 100.000 ha di canna da zucchero sono trattati tutti gli anni (Faria e Magalhães, 2001).

Lo sviluppo e l'applicazione di agenti microbici fungini per il biocontrollo di insetti nocivi implica test per valutare i possibili rischi sull'uomo e gli animali (Goettel et al., 2001).

Diversamente dai batteri, i funghi infettano gli insetti non solo attraverso l'apparato boccale e l'intestino, ma anche attraverso la cuticola. Essi sono pertanto insetticidi di contatto, non veleni per ingestione. L'invasione dell'ospite avviene tramite rottura della cuticola a opera di una miscela di lipasi, proteasi e chitinasi. Dopo l'invasione dell'ospite, possono produrre tossine. In ambiente umido sporulano sia immediatamente prima che l'insetto muoia, che subito dopo. Le spore (o conidi aeriferi) sul corpo dell'insetto possono diffondersi nell'ambiente e infettare insetti sani, provocando epidemie (chiamate epizootiche). Il principale svantaggio al loro impiego è il ristretto intervallo di condizioni ambientali e climatiche adatte: quasi tutti richiedono elevata umidità e temperature moderate. Inoltre, va precisato che l'uso di trattamenti fungicidi nella gestione fitosanitaria di una coltura può pregiudicare l'impiego dei funghi entomopatogeni.

### *Protozoi*

I protozoi entomopatogeni possono infettare una vasta gamma di insetti (Maddox, 1987; Brooks, 1988). Alcuni possono uccidere gli insetti rapidamente, ma la maggior parte sono noti per gli effetti cronici: debilitanti, inducenti inappetenza, agenti sulla longevità, la fecondità e la prolificità. I più importanti patogeni per gli insetti sono i microsporidi, che sono patogeni obbligati, polifagi. Secondo recenti studi di biologia molecolare, i microsporidi sarebbero veri funghi (Vossbrinck e Debrunner-Vossbrinck, 2005). In confronto ad altri agenti patogeni, i microsporidi hanno avuto poco successo perché presentano difficoltà nella coltura in vitro e nella conservazione. Se si potessero manipolare più agevolmente sarebbero utilissimi come fattori di regolazione di popolazioni dannose.

La loro attività biologica è complessa, crescono solo nell'ospite vivo e alcune specie richiedono un ospite intermedio. Come agenti di controllo micro-

bico, tuttavia, alcune specie sono state applicate con discreto successo (Solter e Becnel, 2000).

Un caso è quello di *Nosema locustae* contro le cavallette (Henry e Oma, 1981). Le spore di *Nosema* spp. vengono ingerite dall'ospite e si sviluppano nell'intestino medio, dove germinando invadono le cellule inducendo l'infezione di massa e la distruzione di organi e tessuti. Naturalmente, parassitoidi e predatori di insetti fungono da vettori di distribuzione della malattia provocata da microsporidi (Brooks, 1988).

### *Nematodi*

I nematodi entomopatogeni (Kaya e Gaugler, 1993; Grewal et al., 2005) rappresentano un particolare gruppo di agenti di controllo biologico caratterizzato da una regolamentazione più permissiva per l'uso in agricoltura. Questi microrganismi, normalmente penetrano attivamente nel corpo degli insetti attraverso le cavità naturali o mediante azione combinata enzimatica (chitinasi, proteasi) e meccanica (Bedding e Molyneux, 1982). Raggiunto l'emocele, rilasciano i loro batteri simbiotici che trovano così un "brodo di coltura" idoneo allo sviluppo e alla proliferazione. In questa fase i batteri rilasciano tossine che indeboliscono l'ospite e producono una varietà di metaboliti che creano le condizioni adatte alla proliferazione dei nematodi che si avvantaggiano così dell'azione batterica. L'ospite in breve tempo viene condotto a morte.

Batteri dei generi *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* rappresentano i principali endosimbionti di nematodi entomopatogeni. I primi sono tipicamente associati a nematodi del genere *Heterorhabditis*, mentre i secondi al genere *Steinernema*. Un'ampia varietà di fattori di virulenza sono stati caratterizzati. Fra questi i complessi proteici (Tc) ad azione insetticida e le proteine PIR (Shapiro-Ilan et al., 2012).

### PROBLEMATICHE

Uno degli interrogativi principali che si pongono al momento dell'uso di un preparato a base di entomopatogeni è relativo all'effetto sugli entomofagi e su altri insetti utili, come le api o il baco da seta, e sull'uomo.

Per quanto riguarda i batteri ad esempio, il Bt, che rappresenta anche la specie più studiata, può provocare la morte delle larve del baco da seta in

caso di deriva di applicazioni su lepidotteri dannosi, per cui in Giappone e in Cina, dove la sericoltura è praticata in modo intensivo, viene usato solo in casi di estrema necessità e in zone ben lontane dagli allevamenti. Per le api invece diversi studi ne dimostrano l'innocuità, per cui i trattamenti si possono fare anche nel periodo di volo di questi imenotteri. Limitata è anche la suscettibilità delle formiche e altri insetti predatori e parassiti, e come precedentemente ricordato, è stata ampiamente dimostrata anche l'assoluta innocuità per l'uomo.

I virus poliedrici hanno elevata specificità rispetto all'ospite per cui il baco da seta è poco suscettibile alle virosi che attaccano gli altri lepidotteri e le api lo sono rispetto a quelle che attaccano altri imenotteri. Infine, nessuna tossicità significativa è stata osservata sugli animali a sangue caldo, incluso l'uomo.

I funghi presentano un'ampia gamma di tossicità in relazione sia alle specie che ai ceppi, passando da condizioni di assoluta innocuità fino a casi di patogenicità per gli animali superiori, che evidentemente non riguardano le specie fungine entomopatogene in commercio.

I protozoi entomopatogeni finora studiati, infine, non sembrano essere dannosi per l'uomo.

Nonostante il successo di differenti prodotti, l'impiego del controllo microbiologico è ancora relegato a contesti di nicchia, in relazione al meccanismo di azione spesso molto specifico. Ulteriori studi e ricerche sono necessari per sviluppare soluzioni innovative che possano rispondere alle richieste degli utilizzatori finali e del legislatore in termini sia di efficacia che di sostenibilità ambientale. Al presente stato dell'arte, questi bioinsetticidi sono ancora lontani dalle loro potenzialità d'impiego a causa della mancanza di tecnologie a essi associate che ne incrementino l'efficacia (Glare et al., 2012).

Nel caso più importante dei batteri entomopatogeni, ad esempio, l'efficacia è spesso associata con una loro corretta applicazione. Nel caso di prodotti che agiscono per ingestione (es. prodotti a base di Bt), la tempistica (timing) è fondamentale per garantire che le tossine batteriche rimangano stabili nell'ambiente finché non vengono ingerite dall'insetto bersaglio. Un altro aspetto è quello di garantire una copertura adeguata dei substrati (ad esempio, foglie) frequentati o mangiati dagli insetti. Questo ha portato allo sviluppo di formulazioni con l'obiettivo di massimizzare la *shelf life* e la persistenza, migliorando la dispersione e l'adesione, l'efficienza e, soprattutto, l'efficacia del trattamento. Una varietà di coadiuvanti e additivi per formulazioni microbiche sono stati sviluppati dall'industria. Questi includono disperdenti,



tensioattivi, tamponi di pH, agenti antischiuma, vettori, fagostimolanti e attrattivi. A seconda dell'applicazione e delle condizioni ambientali, una scelta di formulazioni solide e liquide è disponibile. Le prime comprendono polveri, granuli, pellets e polveri bagnabili (WP), mentre sospensioni liquide possono consistere in sospensioni concentrate (SC), emulsioni e incapsulazioni. Le tecnologie avanzate volte ad aumentare gli effetti residui comprendono microincapsulazioni e microgranuli.

La disponibilità delle moderne biotecnologie “omiche” permette lo sviluppo di nuovi approcci molecolari che stanno conducendo alla scoperta di nuovi geni e tossine di origine microbica implicati nei meccanismi bioinsetticidi, generando preziose informazioni per ottimizzare il loro impiego nel controllo biologico e creare nuove prospettive di difesa eco-compatibile.

#### ESEMPI APPLICATIVI

##### *Ambito agrario*

Un'applicazione estesa e importante in campo frutticolo riguarda l'impiego del virus della granulosa (CpGV) della Carpocapsa (*Cydia pomonella*). Viene applicato in sospensione acquosa poco prima e/o durante la schiusa delle uova con dosaggi da 50 a 100 ml/ha, da solo o in associazione con semiochimici (kairomone) (Pasqualini et al., 2005) o lieviti (Knight et al., 2013). Le larve neonate ingeriscono i corpi di occlusione (granuli), i quali si dissolvono rapidamente nelle condizioni alcaline dell'intestino e rilasciano dei virioni che passano attraverso la membrana peritrofica (infezione transitoria) prima di invadere la maggior parte dei principali tessuti del corpo (Federici, 1997). Numerose prove sperimentali hanno dimostrato la buona attività di CpGV in una varietà di condizioni in Europa, Sud Africa, Australia, Nuova Zelanda, Sud America e Nord America (Falcon e Huber, 1991; Guillon e Biache, 1995; Huber, 1986; Jaques, 1990; Vail et al., 1991). La specificità di CpGV per Carpocapsa e alcune specie strettamente collegate, nonché la sicurezza per gli organismi non bersaglio è stata accuratamente documentata (Gröner, 1986). Nonostante la sua promessa, lo sviluppo commerciale e l'adozione di CpGV è stata limitata (Cross et al., 1999). Le principali preoccupazioni espresse dai coltivatori sono: la breve attività residua e la necessità di utilizzare più applicazioni; la bassa velocità d'azione, la scarsa efficacia in condizioni di alta densità di popolazione; gli elevati costi delle formulazioni (Glen e Clark, 1985; Jaques et al., 1987) e il rischio di resistenza (Zingg, 2008). Tuttavia,

più di recente, una serie di prodotti di nuova formulazione sul mercato sono stati registrati in Nord America e approvati per l'uso in frutteti biologici, i quali attenuano alcuni dei limiti segnalati.

### *Ambito forestale*

Le applicazioni di *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) nei biotopi forestali sono numerose, anche in Italia. Una sintesi dei risultati e delle prospettive di utilizzo per il controllo della processionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) è stata ad esempio riportata da Battisti et al. (1998).

In Toscana, nel 2003-2004, nel complesso boschivo del Demanio Regionale nella Foresta di Santa Luce (PI), a prevalenza di *Quercus cerris*, sono stati trattati 1.640 ha all'inizio di una progradazione di *Thaumetopoea processionea* con Btk (FORAY 48 B a 12.7 BIU/l). Il trattamento realizzato sulle giovani larve con 4,5 l/ha, a fine aprile, mediante elicottero, ha determinato una mortalità larvale superiore al 96% (Roversi et al., 2008).

In Sardegna, a partire dai primi anni '80, è stata condotta una lunga esperienza di sperimentazione e applicazione di formulati a base di Btk per il controllo dei Lepidotteri defogliatori delle sugherete: *Lymantria dispar*, *Malacosoma neustria* e *Tortrix viridana* L. (Luciano e Lentini, 2012). Dal 2001 al 2010 sono stati trattati oltre 100 mila ettari di bosco con mezzi aerei, conseguendo elevati livelli di mortalità larvale (dal 56,4 al 97,1%) in funzione delle differenti formulazioni impiegate. In generale, i risultati sono stati soddisfacenti in termine di protezione delle sugherete. Le difficoltà hanno riguardato alcuni aspetti tecnici e soprattutto di carattere burocratico e amministrativo con ripercussioni, talvolta, sulla tempestività e sull'efficienza degli interventi aerei. Ad esempio solo dal 2009 gli elicotteri impiegati per la distribuzione delle formulazioni di Bt sono stati dotati di efficienti sistemi di GPS per i trattamenti spray (AG NAV INC.), tali da garantire un uniforme copertura. In alcuni casi non è stato possibile acquisire in tempo utile i formulati sperimentali per i ritardi nell'erogazione dei finanziamenti, considerato che sono necessari, nel caso del Foray circa 90 giorni per la produzione e il trasporto dagli USA alla Sardegna. Tuttavia, l'ostacolo principale è risultato di carattere legislativo, in relazione all'autorizzazione all'impiego dei formulati e al ricorso ai mezzi aerei per i trattamenti.

Un altro ambito di impiego di agenti di controllo biologico per il contenimento dei defogliatori forestali è rappresentato dal caso del fungo *Entomophaga maimaiga*, un agente entomopatogeno specie-specifico per la *L. dispar*.

Questo fungo attualmente non è presente nell'Europa occidentale, ma la sua introduzione dagli areali di origine permetterebbe di contenere lo sviluppo delle popolazioni della specie dannosa. I promettenti risultati di questi studi, svolti da un gruppo di ricercatori in Sardegna ha permesso di mettere in evidenza l'efficacia di ceppi del fungo di origine balcanica su popolazioni di *L. dispar* di diverse aree geografiche della penisola italiana e delle maggiori isole (Contarini et al., 2015).

### *Ambito zootecnico*

I prodotti a base di microrganismi entomopatogeni impiegati in ambito zootecnico sono soggetti a una differente regolamentazione e vengono definiti biocidi. Benché ceppi di *B. thuringiensis israelensis* (Bti) manifestino attività nei confronti delle larve di insetti di interesse zootecnico come le mosche, essi non hanno trovato significativo impiego in questo ambito in relazione alla limitata efficacia di trattamenti sui substrati organici di sviluppo degli stadi pre-immaginali di questi insetti. Diverse sono per contro le sperimentazioni condotte. Si riporta il caso di una sperimentazione condotta in Sardegna con una formulazione batterica contenente spore di *Brevibacillus laterosporus* ceppo UNISS 18, noto per la sua tossicità nei confronti di *Musca domestica*. Indagini preliminari in laboratorio hanno permesso di individuare una concentrazione di  $1 \times 10^8$  spores /g come concentrazione letale sugli stadi giovanili. La stessa formulazione e concentrazione, è stata in seguito applicata a un dosaggio di 2 l/m<sup>2</sup> sulle letamaie e nei paddock di aziende bovine intensive, ottenendo un significativo contenimento dello sviluppo larvale in questi siti (Ruiu et al., 2008). I promettenti risultati ottenuti sono stati anche confrontati con altri biopesticidi di origine botanica (azadiractina) che hanno confermato l'elevata potenzialità di questo microrganismo per l'impiego nel controllo integrato delle mosche in aziende zootecniche (Ruiu et al., 2011).

### RIASSUNTO

L'interesse per lo sviluppo di soluzioni alternative e a basso impatto ambientale per il contenimento degli organismi nocivi in agricoltura è in continua crescita e riguarda particolarmente il settore dei cosiddetti agenti di controllo biologico. In questo ambito, un ruolo importante è ricoperto dagli insetticidi a base di microrganismi che si comportano da agenti entomopatogeni, tra cui batteri, funghi, virus, protozoi e nematodi. I batteri costituiscono gli agenti più importanti con il genere *Bacillus* e, in particolare, il *Bacillus*

*thuringiensis*, che rappresenta la specie di maggiore interesse applicativo, utilizzata in commercio da più di 40 anni. Tra i virus, hanno avuto sviluppo applicativo quelli delle poliedrosi citoplasmatiche, delle poliedrosi nucleari e delle granulosi. I funghi sono rappresentati da diversi generi e specie, ma le applicazioni più significative riguardano *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Altri agenti importanti sono i microsporidi (*Nosema* spp.). Infine, i nematodi, rappresentano un particolare gruppo di “microorganismi”, che agiscono in associazione con batteri simbiotici. Diverse applicazioni su vasta scala con formulazioni a base di tali agenti microbiologici di controllo hanno riguardato negli ultimi decenni anche l'Italia.

#### ABSTRACT

*Perspectives in the microbial control of insects.* The growing interest in the development of alternative and eco-sustainable pest management solutions in agriculture is associated to a significant development of the biological control agent sector. In this context, microbial based insecticides play a major role and include entomopathogenic bacteria, fungi, virus, protozoa, and nematodes. Bacteria are the most exploited group of entomopathogens and are well represented by the genus *Bacillus* which includes *Bacillus thuringiensis*, the most studied and employed species, with more than 40 years commercial use. Among viruses, agents of cytoplasmic polyhedrosis, nuclear polyhedrosis and the granulosis feature the main cases of application. Fungi include a variety of genera and species, but the most important applications relate to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Other important biological control agents are microsporidia (*Nosema* spp.). Finally, nematodes, are a particular group of “microorganisms” acting in association with symbiotic bacteria. Several large-scale applications of formulations based on these microbial control agents have been made in the last decades also in Italy.

#### BIBLIOGRAFIA

- ARTHURS S.P., LACEY L.A. (2004): *Field evaluation of commercial formulations of the codling moth granulovirus: persistence of activity and success of seasonal applications against natural infestations of codling moth in Pacific Northwest apple orchards*, «Biol Control», 31, pp. 388-397.
- BATTISTI A., LONGO S., TIBERI R., TRIGGIANI O. (1998): *Results and perspectives in the use of Bacillus thuringiensis Berl. var. kurstaki and other pathogens against Thaumatopoea pityocampa (Den. et Schiff.) in Italy (Lep., Thaumatopoeidae)*, «Anz. Schadlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz», 71, pp. 72-76.
- BARBER K.N., KAUPP W.J., HOLMES S.B. (1993): *Specificity testing of the nuclear polyhedrosis virus on the gypsy moth, Lymantria dispar (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae)*, «Can Entomol», 125, pp. 1055-1066.
- BCC RESEARCH LLC, CHM029E (June 2014): <http://www.bccresearch.com/market-research/chemicals/biopesticides-chm029e.html>.
- BEDDING R., MOLYNEUX A. (1982): *Penetration of insect cuticle by infective juveniles of Heterorhabditis spp. (Heterorhabditidae: Nematoda)*, «Nematologica», 28, pp. 354-359.

- BROOKS F.M. (1988): *Entomogenous protozoa*, in Ignoffo CM, Mandava MB (eds), *Handbook of natural pesticides*, vol. V, Microbial Insecticides, Part A, Entomogenous Protozoa and Fungi, CRC Press Inc. Boca Raton, pp. 1-149.
- CHANDRASEKARAN R., REVATHI K., NISHA S., KIRUBAKARAN S.A., SATHISH-NARAYANAN S., SENTHIL-NATHAN S. (2012): *Physiological effect of chitinase purified from Bacillus subtilis against tobacco cutworm Spodoptera litura*, «Fab Pestic Biochem Physiol», 104, pp. 65-71.
- CONTARINI M., RUIU L., PILARSKA D., LUCIANO P. (2015): *Different susceptibility of indigenous populations of Lymantria dispar to the exotic entomopathogen Entomophaga maimaiga*, «Journal of Applied Entomology», article first published online: 4 SEP 2015 DOI: 10.1111/jen.12267.
- COPPING G.L., MENN J.J. (2000): *Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy*, «Pest Manag. Sci.», 56, pp. 651-676.
- CORY J.S. (2000): *Assessing the risks of releasing genetically modified virus insecticides: progress to date*, «Crop Prot», 19, pp. 779-785.
- CORY J.S., HIRST M.L., STERLING P.H., SPEIGHT M.R. (2000): *Native host range nucleopolyhedric virus for control of the browntail moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*, «Environ Entomol», 29, pp. 661-667.
- CROSS J.V., SOLOMON M.G., CHANDLER D., JARRETT P., RICHARDSON P.N., WINSTANLEY D., BATHON H., HUBER J., KELLER B., LANGENBRUCH G.A., ZIMMERMANN G. (1999): *Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe: 1. Microbial agents and nematodes*, «Biocontrol Sci. Technol.», 9, pp. 125-149.
- DIRETTIVA CE 2009/128: *Quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi*, «Gazzetta ufficiale dell'Unione europea», L 309/71, 24.11.2009.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2006): *New biopesticides active ingredients*, [www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product\\_lists](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists).
- FARIA M.R., MAGALHÃES B.P. (2001): *O uso de fungos entomopatogenicos no Brasil*, «Biotecnol Cienc Desenvolvimento», 22, pp. 18-21.
- FALCON L.A., HUBER J. (1991): *Biological control of the codling moth*, in van der Geest, L.P.S., Evenhuis, H.H. (Eds.), *Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 355-369.
- FEDERICI B.A. (1997): *Baculovirus pathogenesis*, in Miller LK (ed.), *The Baculoviruses*, Plenum Press, New York, pp. 33-59.
- FEGAN M., MANNERS J.M., MACLEAN D.J., IRWIN J.A.G., SAMUELS K.D.Z., HOLDOM D.G., LI D.P. (1993): *Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae var. anisopliae*, «Microbiology», 139, pp. 20175-2081.
- GELERNTER W., SCHWAB G.E. (1993): *Transgenic bacteria, viruses, algae and others microorganisms as Bacillus thuringiensis toxin delivery systems*, in Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, (eds), *Bacillus thuringiensis, an environmental pesticide: theory and practice*, Wiley, Chichester, pp. 89-124.
- GLARE T., CARADUS J., GELERNTER W., JACKSON T., KEYHANI N., KOHL J., MARRONE P., MORIN L., STEWART A. (2012): *Have biopesticides come of age?*, «Trends Biotechnol.», 30, pp. 250-258.
- GLEN D.M., CLARK J. (1985): *Death of Cydia pomonella larvae and damage to apple fruit, after field application of codling moth granulosis virus*, «Entomol. Exp. Appl.», 38, pp. 93-96.
- GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS (2012): *Biopesticides - a global strategic business report*, Global Industry Analysts Research Report, MCP-1573.

- GOETTEL M.S., JARONSKI S.T. (1997): *Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts*, in Goettel M.S., Johnson D.L. (eds), *Microbial control of grasshopper and locusts*, «Memoirs of Entomological Society of Canada», vol 171, pp. 83-99.
- GOETTEL M.S., HAJEK A.E., SIEGEL J.P., EVANS H.C. (2001): *Safety of fungal biocontrol agents*, in Butt TM, Jackson C, Magan N (eds), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, CAB International, Wallingford, pp. 347-375.
- GREWAL P.S., EHLERS R.-U., SHAPIRO-ILAN D.I. (2005): *Nematodes as Biocontrol Agents*, CABI, New York, NY.
- GRÖNER A. (1986): *Specificity and safety of baculoviruses*, in Granados, R.R., Federici, B.A. (Eds.), *The Biology of Baculoviruses*, vol. I, *Biological Properties and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 177-202.
- GUILLON M., BIACHE G. (1995): *IPM strategies for control of codling moth (Cydia pomonella L.) (Lepidoptera Olethreutidae) interest of CmGV for long term biological control of pests complex in orchards*, «Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.», 60, pp. 695-705.
- HENRY J.E., OMA E.A. (1981): *Pest control by Nosema locustae, a pathogen of grasshoppers and crickets*, in *Microbial Control Of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, ed. H.D. Burges, Academic Press, New York, pp. 573-586.
- HUBER J. (1986): *Use of baculoviruses in pest management programs*, in Granados, R.R., Federici, B.A. (Eds.), *The Biology of Baculoviruses*, vol. II, *Practical Application for Insect Control*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 181-202.
- KAYA H.K., GAUGLER R. (1993): *Entomopathogenic nematodes*, «Annual Review of Entomology», 38, pp. 181-206.
- KNIGHT A., WITZGALL P. (2013): *Combining mutualistic yeast and pathogenic virus. A novel method for codling moth control*, «J. Chem. Ecol.», 39, pp. 1019-1026. doi: 10.1007/s10886-013-0322-z. [PubMed: 23881444].
- JAQUES R.P. (1990): *Effectiveness of the granulosis virus of the codling moth in orchard trials in Canada*, in Proceedings of the V International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia, 20-24 August 1990, pp. 428-430.
- JAQUES R.P., LAING J.E., LAING D.R., YU D.S.K. (1987): *Effectiveness and persistence of the granulosis virus of the codling moth Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae) on apple*, «Can. Entomol.», 119, pp. 1063-1067.
- LUCIANO P., LENTINI A. (2012): *Ten years of microbiological control program against lepidopterous defoliators in Sardinian cork oak forests*, «IOBC/wprs Bulletin», vol. 76, pp. 175-178.
- MADDOX J.V. (1987): *Protozoan diseases*, in Fuxa JR and Tanada Y (eds), *Epizootiology of insect diseases*, Wiley, New York.
- MAGNOLER A. (1967): *L'applicazione di un virus poliedrico nucleare nella lotta contro larve di Lymantria dispar L.*, «Entomophaga», 12, pp. 199-207.
- MAGNOLER A. (1968): *The differing effectiveness of purified and nonpurified suspensions of the nuclear-polyhedrosis virus of Portetria dispar*, «Journal of Invertebrate Pathology», 11, pp. 326-328.
- MARTIN P.A.W., HIROSE E., ALDRICH J.R. (2007): *Toxicity of Chromobacterium subtugae to southern sink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)*, «J. Econ. Entomol.», 100, pp. 680-684.
- MOSCARDI F. (1999): *Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera*, «Annual Review of Entomology», vol. 44, pp. 257-289.
- PALMA L., MUÑOZ D., BERRY C., MURILLO J., CABALLERO P. (2014): *Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity*, «Toxins», 6, pp. 3296-3325.

- PASQUALINI E., SCHMIDT S., ESPINHA I., CIVOLANI S., DECRISTOFARO A., MOLINARI F., VILLA M., LADURNER E., SAUPHANOR B. AND IORIATTI C. (2005): *Effects of the Kairomone Ethyl (2E, 4Z)-2,4- Decadienoate (DA 2313) on the Oviposition Behaviour of Cydia pomonella: Preliminary Investigations*, «Bulletin of Insectology», 58, 119124.
- PEKRUL S., GRULA E.A. (1979): *Mode of infection of the corn earworm (Heliothis zea) by Beauveria bassiana as revealed by scanning electron microscopy*, «Journal of Invertebrate Pathology», v. 34, pp. 238-247.
- PRATER C.A., REDMOND C.T., BARNEY W., BONNING B.C., POTTER D.A. (2006): *Microbial Control of Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Turfgrass Using Agrotis ipilon Multiple Nucleopolyhedrovirus*, «J. Econ. Entomol.», 99 (4), pp. 1129-1137.
- REG. CE N. 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 309/1, 24.11.2009.
- ROBERTS D.W., St. LEGER R.J. (2004): *Metarizhium spp., Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects*, «Advances in Applied Microbiology», vol. 54, pp. 51.
- ROVERSI P.F., MARIANELLI L., MARZIALI L., TOCCAFONDI P. (2008): *Controllo di Thaumetopoea processionea (L.) su ampie superfici forestali (Lepidoptera Thaumetopoeidae)*, «Notiziario sulla Protezione delle Piante», 22, pp. 165-169.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I. (2008): *Immature house fly (Musca domestica) control in breeding sites with a new Brevibacillus laterosporus formulation*, «Environmental Entomology», 37, pp. 505-509.
- RUIU L. (2013): *Brevibacillus laterosporus, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species*, «Insects», 4, pp. 476-492.
- RUIU L. (2015): *Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management*, «Insects», 6, pp. 352-367.
- SENTHIL-NATHAN S. (2013): *A review of biopesticides and their mode of action against of insect pest*, in Thangavel P, Sridevi G. (eds), *Environmental sustainability: Role of green technologies*, Springer, pp. 49-63.
- SHAPIRO-ILAN D.I., HAN R., DOLINKSI C. (2012): *Entomopathogenic nematode production and application technology*, «Journal of Nematology», 44, pp. 206-217.
- SOLTER L.F., BECNEL J.J. (2000): *Entomopathogenic Microsporidia*, in Lacey LA (ed), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 231-254.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I. (2011): *Comparative applications of Azadirachtin- and Brevibacillus laterosporus-based formulations for house fly management experiments in dairy farms*, «J. Med. Entomol.», 48, pp. 345-350.
- VAIL P.V., BARNETT W., COWAN D.C., SIBBETT S., BEEDE R., TEBBETS J.S. (1991): *Codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) control on commercial walnuts with a granulosis virus*, «J. Econ. Entomol.», 84, pp. 1448-1453.
- VEGA F.E., KAYA H.K. (2012): *Insect Pathology*, Second Edition, Elsevier Inc., 512 pp.
- VOSSBRINCK C.R., DEBRUNNER-VOSSBRINCK B.A. (2005): *Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations*, «Folia Parasitologica», 52, pp. 131-142.
- ZINGG D. (2008): *Madex Plus and Madex I12 overcome virus resistance of codling moth*, in Proceedings 13th International Conference on Organic Fruit Growing Ecofruit (ed. FOEKO), pp. 256-260. Weinsberg: FOEKO.

