



Agenti patogeni degli insetti e controllo microbiologico

Eustachio Tarasco

Dipartimento di scienze del Suolo, della Pianta e degli
Alimenti (DiSSPA), Università degli Studi di Bari “Aldo
Moro”. Via Amendola 165/A, 70126 Bari

eustachio.tarasco@uniba.it

L' uso degli agenti patogeni nel controllo biologico

- Gli Invertebrati, ivi compresi Artropodi e Insetti, sono soggetti a malattie, come tutti gli organismi viventi
- La malattia è una condizione in cui uno stato di equilibrio di un organismo con il suo ambiente viene alterato
- Gli **agenti patogeni** sono i responsabili della **trasmissione** della malattia, entrano nel corpo dell'ospite o passivamente, con l'alimentazione, o attivamente, attraverso le aperture naturali o penetrando direttamente attraverso la cuticola
- Una volta all'interno dell'insetto, i patogeni **si moltiplicano rapidamente**, uccidendo l'ospite anche con la produzione di **sostanze tossiche**
- La maggior parte degli agenti patogeni è caratterizzata da **un'alta specificità verso l'ospite** e alcuni di essi, in particolare i Virus, possono infettare gli insetti di un solo genere o di una sola specie
- Epizooziologia: dipende dal trinomio ospite-agente patogeno-ambiente

Alcuni dati comparativi sulla biologia dei principali agenti patogeni degli insetti

	Virus	Batteri	Funghi	Protozoi	Nematodi
Ospiti bersaglio	Lepidotteri ed Imenotteri. Elevata specificità	Lepidotteri, Coleotteri e Ditteri. Spec. della sottosp.	Molti Ceppi specifici	Molti Specifici a livello di famiglia	Molti
Modalità d'azione	Ingestione	Ingestione	Per contatto attraverso la cuticola	Ingestione	Attraverso aperture naturali o cuticola
Rapidità dell'effetto	3-10 giorni; tempi più lunghi per <i>Oryctes virus</i>	30 min - 1 giorno	4-7 giorni	Malattia cronica più che letale	1-5 giorni

Controllo microbiologico e Patologia degli Insetti

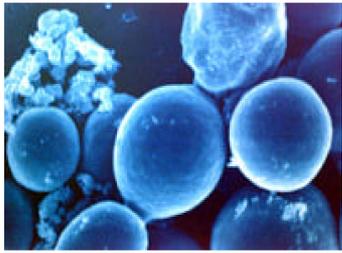
- **Agostino Bassi**, da Lodi, è considerato il padre della Patologia degli Insetti. Dimostra (1835) che il “mal del segno” del baco da seta è causato da un micete, la *Beauveria bassiana*.
- **Louis Pasteur** (1870, Francia). Studia due malattie del baco da seta, una virale e l'altra causata da un protozoo.
- **Metchnikov** (1878, Russia): la prima esperienza significativa di “Lotta microbiologica”
 - il fungo *Metarhizium anisopliae* viene utilizzato per controllare un fitofago del frumento, *Anisoplia austriaca*.
 - Krassiltschik organizza il primo impianto di produzione del fungo a Smela. **Prototipo di biofabbrica**



“ Quando il Fatto parla Ragion tace,
perchè la Ragione è figlia del Fatto, non
il Fatto figlio della Ragione „.

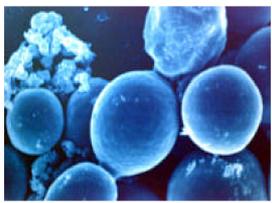
J. Agostino Bassi

- Maestri e Cornalia (1856)
 - tra i primi a segnalare la presenza di particelle rifrangenti (Virus) nell' emolinfa delle larve di Baco da seta affette da "giallume"
 - 1893: prima applicazione di Virus contro *Lymantria dispar* in Ungheria raccogliendo larve malate, macinandole e usandole per il trattamento
- Applicazioni di batteri
 - D' Herelle (1910): *Coccobacillus acridorium* contro Ortotteri
 - Berliner (1911): *Bacillus thuringiensis*
- Glaser (negli anni ' 30)
 - Prime sperimentazioni di campo con nematodi entomoparassiti, *Neoaplectana glaseri*, contro lo Scarabeide *Popillia japonica*
- Dal 1965 la Patologia degli Insetti è parte integrante della Organizzazione Internazionale per il Controllo Biologico (IOBC)



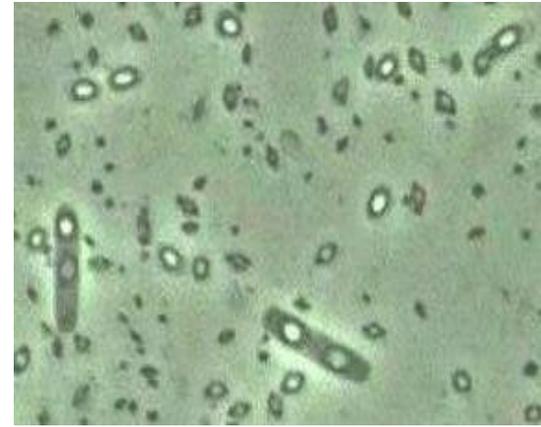
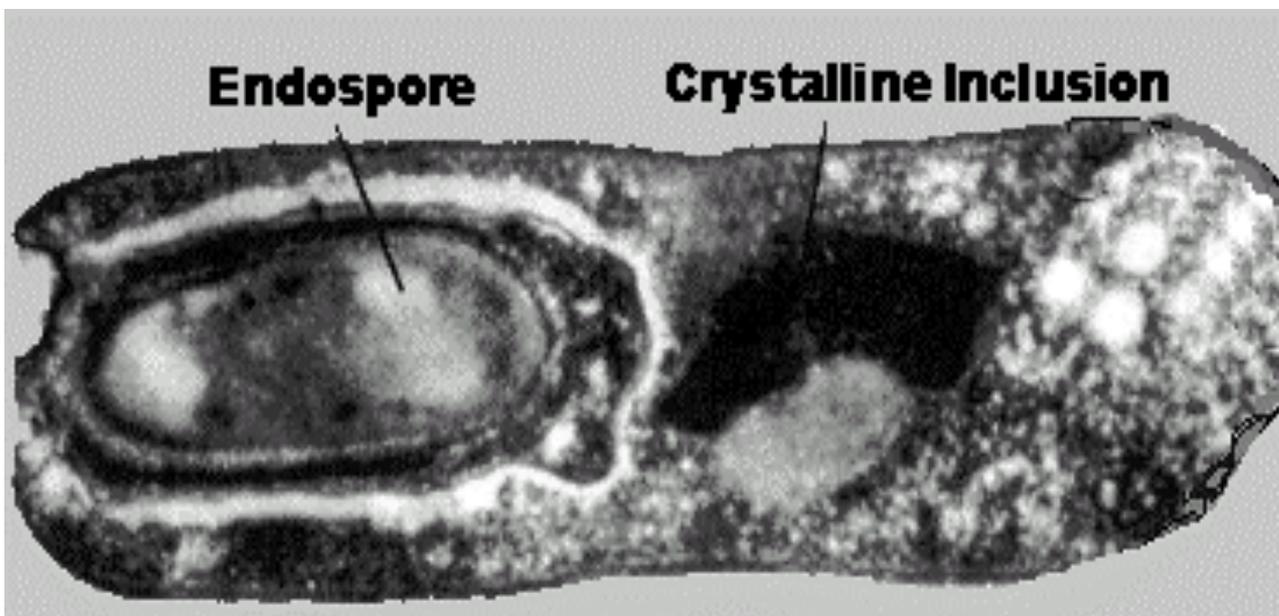
I Batterii

- Procarioti unicellulari
 - Sono ubiquitari
 - Mancano di un vero nucleo e di mitocondri
 - Si riproducono per scissione binaria
 - Sporigeni e asporigeni
 - Patogeni obbligati o facoltativi (saprofiti o simbionti)
- Famiglie più importanti
 - Bacillaceae
 - Enterobacteriaceae
- ***Bacillus* spp.**
 - Infettano principalmente stadi larvali di fitofagi
 - **Sintomi:** riduzione del turgore dell'ospite infettato; disfunzioni dell'apparato digerente (con vomito e diarrea); cambio di colore

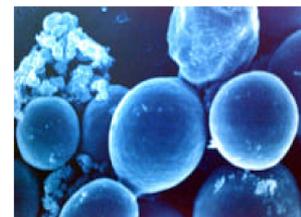


Bacillus thuringiensis (*Bt*)

- E' l'agente patogeno più diffuso ed utilizzato
- 1901: in Giappone Ishiwata isola un batterio dal Baco da seta (*Bacillus sotto*)
- 1911: Berliner isola in Thuringia (Germania) un batterio simile da *Anagasta kuehniella* (***Bacillus thuringiensis***)
- Sporeine® (1938): primo formulato commerciale a base di *Bt*, in Francia
- Anni '50 -'60: le ricerche di Steinhaus rilanciano l'interesse sul *Bt* e sui preparati microbiologici
- 1957: compare il Thuricide®, ancora oggi in commercio
- Negli anni 70 arriva il *Bt* var. *kurstaki*, più attivo rispetto ai precedenti.



ciclo biologico del Bt

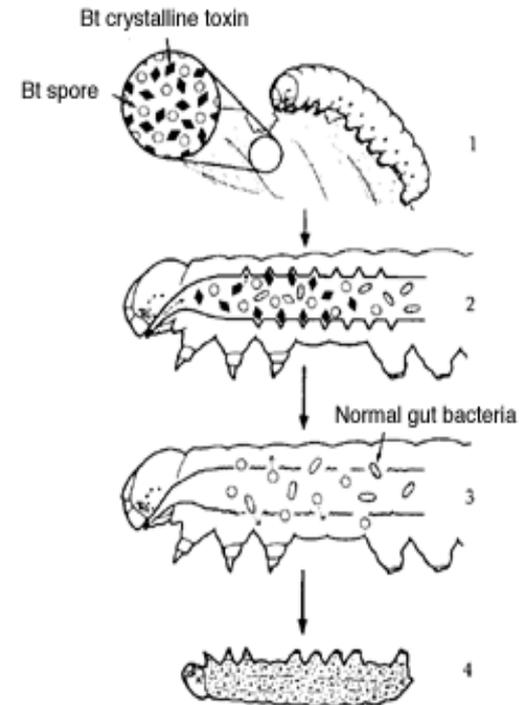


- Batterio ubiquitario, patogeno facoltativo, aerobio e sporigeno. Ciclo vitale con 2 fasi di crescita: Fase vegetativa (con abbondanza di nutrienti e una crescita esponenziale) e Sporulazione (nutrimento scarsamente disponibile). La sporulazione produce, oltre alla **spora**, un **corpo parasporale** con 1 o più inclusioni cristalline sintetizzate nella cellula madre contenenti proteine (95%) e carboidrati (5%). Questi cristalli proteici hanno proprietà insetticide e sono detti tossine-*Bt*, δ -endotossine o ICPs (Insecticidal Crystal Proteins).

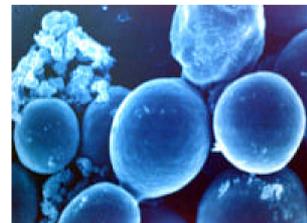
Azione del Bt

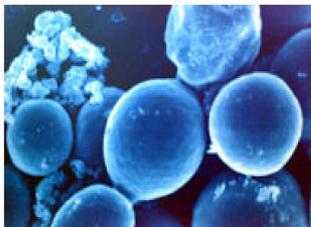
- Agisce per ingestione
- Nell'intestino, in condizioni di pH particolari (alcalino nel caso dei lepidotteri, acido nel caso dei coleotteri), il cristallo si dissolve e la protossina viene attivata
- Le tossine attivate si attaccano a specifici recettori presenti sulla membrana intestinale
 - Buona parte della specificità delle tossine dipende da questi siti di ricezione

Action of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on caterpillars



- 1) Caterpillar consumes foliage treated with Bt (spores and crystalline toxin).
- 2) Within minutes, the toxin binds to specific receptors in the gut wall, and the caterpillar stops feeding.
- 3) Within hours, the gut wall breaks down, allowing normal gut bacteria to enter the body cavity; the toxin dissolves.
- 4) In 1-2 days, the caterpillar dies from septicemia as the bacteria proliferate in its blood.





Azione del Bt

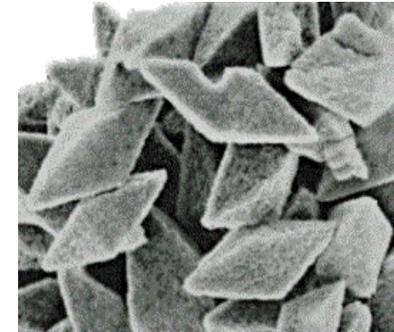
- Le tossine entrano nelle cellule forando la membrana e distruggendone le funzioni
 - I pori alterano l'equilibrio osmotico della cellula
- Le cellule collassano, i microvilli intestinali vengono gradatamente riassorbiti con un progressivo disfacimento delle pareti dell'epitelio intestinale
- I batteri si diffondono nel corpo dell'insetto
 - L'emolinfa è un'ottimo substrato di crescita
- La morte dell'insetto per setticemia sopraggiunge nell'arco di 1-3 giorni dall'inizio dell'infezione



le tossine prodotte dal Bt

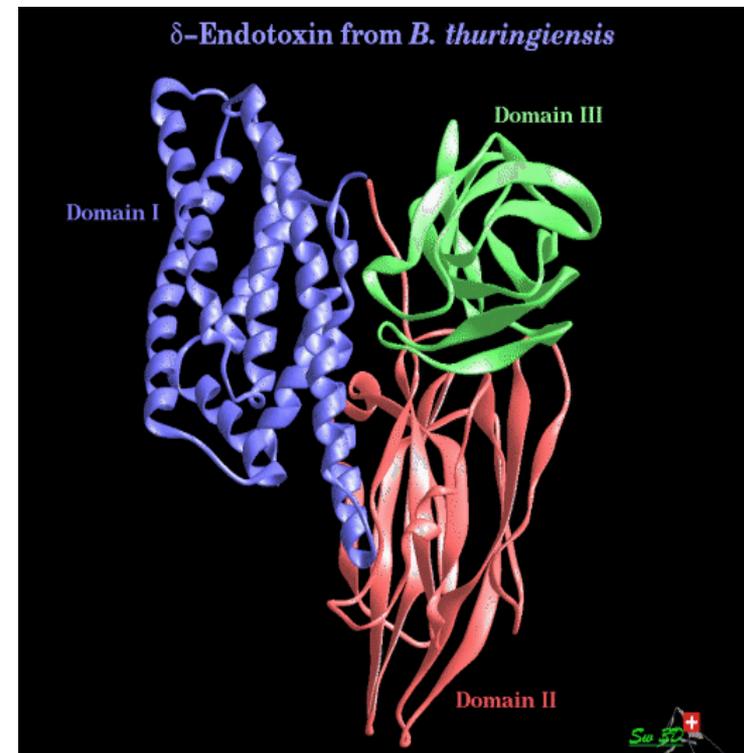
■ δ -endotossine

- Ogni sottospecie ne produce un diverso numero (una o più) con un'azione tossica specifica, capace ciascuna di agire su un dato ospite



■ Metaboliti secondari con attività insetticida

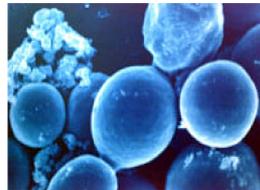
- A seconda della sottospecie
- β -esotossine (termostabili)
- α -esotossine (termolabili)
- Proteine insetticide vegetative - Vips
 - presenti nel supernatante del liquido di coltura vegetativo
 - non formano cristalli proteici



Struttura tridimensionale di δ -endotossina

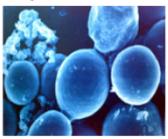
classificazione

- Le sottospecie di *Bt* vengono identificate mediante test **sierologici**....
 - Più di 40 sierotipi riconosciuti sulla base dell'antigene H
- Le cellule vegetative del *Bt* hanno almeno 2 antigeni sulla loro superficie: flagellare (H) e somatico (O)

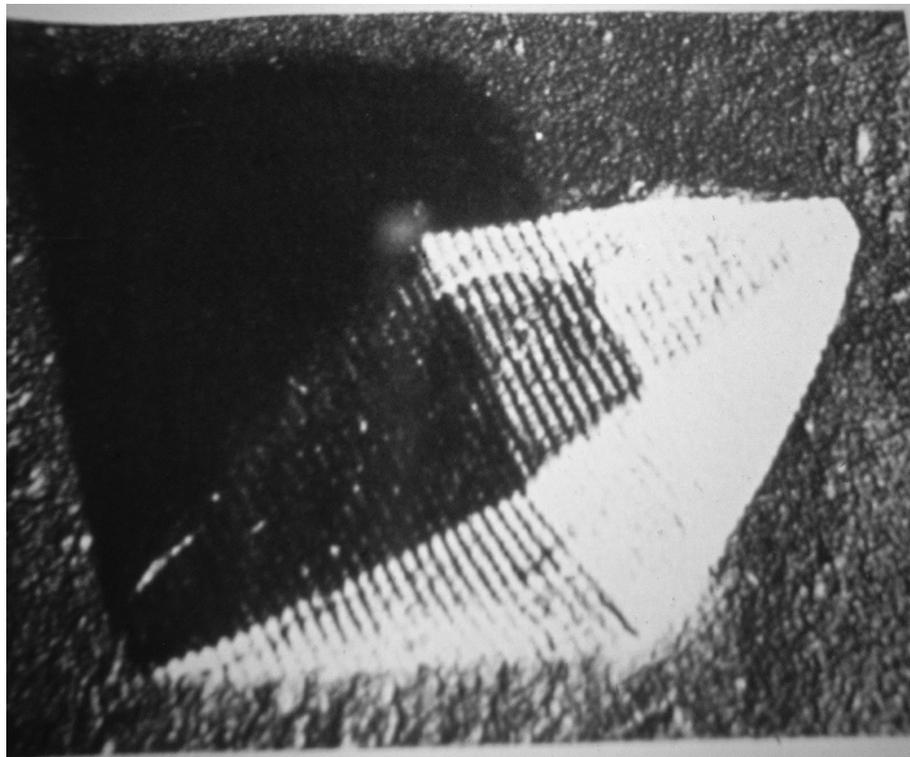
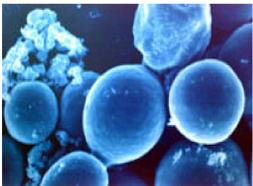


- ... **morfologia** delle inclusioni parasporali ...
 - Cristalli bipiramidali, cuboidali, sferici, irregolari, romboidali
- ...e classificazione delle **δ -endotossine** in base alle loro **proprietà insetticide**
 - CRY I: Lepidotteri
 - CRY II: Lepidotteri e Ditteri
 - CRY III: Coleotteri
 - CRY IV: Ditteri Nematoceri
 - Cyt: citolisina del *Bti*

Bt: le sottospecie



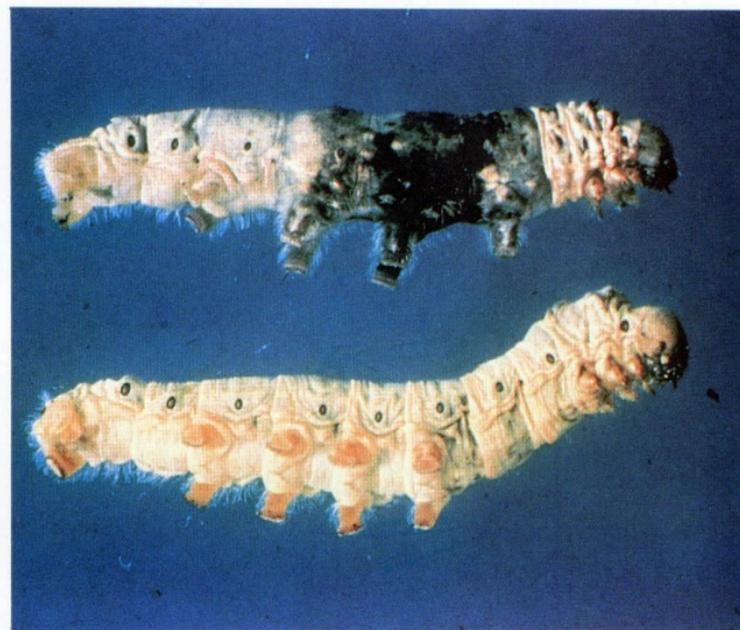
- Attualmente più di 60.000 ceppi isolati nel mondo, una settantina le sottospecie di *Bt* identificate, circa 30 i cristalli proteici diversi, più di 200 le tossine isolate
- Le sottospecie più importanti
 - ***Bt kurstaki*** (*Btk*, ceppo HD-1): isolato nel 1971 (Lab. Abbott), endospora con 1 o più cristalli proteici bipiramidali, attivo, in particolare su larve, di più di 100 specie di Lepidotteri
 - Sino agli anni '70 si utilizzava il *Bt ssp. thuringiensis* che però produceva anche la β -esotossina; successivamente questa sostanza fu bandita ed il *Bt thuringiensis* fu sostituito dal *Bt kurstaki*
 - ***Bt tenebrionis***: isolato nel 1982 da una pupa di *T. molitor*, attivo su Coleotteri (Crisomelidi, Scarabeidi, **ma anche Coccinellidi**)
 - M-One®, Trident®, Ditera®, Novodor®

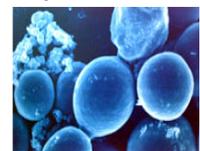


Cristallo proteico
bipiramidale di *Bt* spp.
kurstaki

Infezione di *Bt* spp. *kurstaki* su
Bombyx mori (Lepidoptera:
Bombycidae).

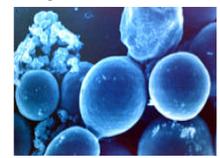
Larva sana sotto per confronto.





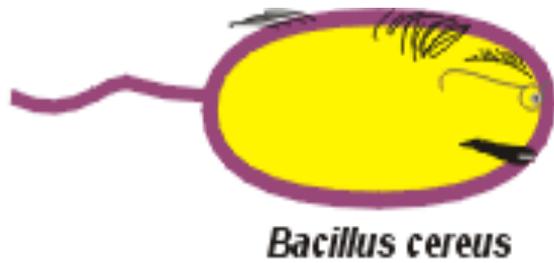
Bt: le sottospecie

- ***Bt israeliensis*** (*Bti*, serotipo H14): isolato nel 1976, cristallo proteico sferico, produce 4 tossine, attivo nei confronti di Ditteri Culicidi (72 specie), Simulidi, Sciaridi, Chironomidi e Tipulidi
 - In Africa occidentale migliaia di km di fiumi vengono ogni anno trattati con il *Bti* contro *Simulium damnosum*, vettore di *Onchocerca filaria*.
 - In Germania ed in Cina programmi di controllo riusciti contro Culicidi
 - Formulati: Tekmertec®, Vectobac®, Bactimos®, Skeetal®
- Alcune delle altre sottospecie: *canadensis*, *galleriae*, *morrisoni*, *aizawai*, *alesti*, *kenyae*, *thompsoni*, etc.
- La ricerca di nuovi *Bt*, che è tuttora in corso, ha portato in questi ultimi anni all'isolamento di ceppi attivi contro Imenotteri, Emitteri, Mallofagi, Nematodi e Protozoi



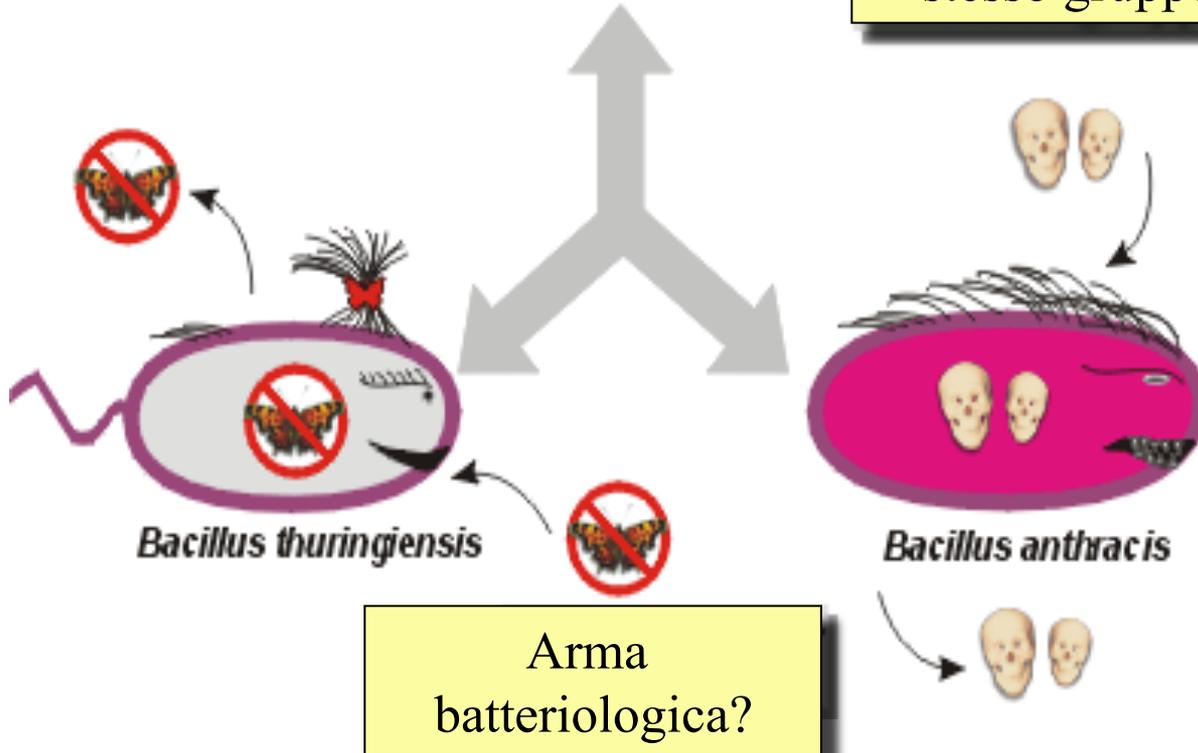
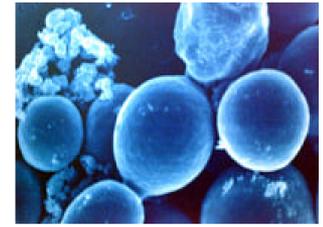
caratteristiche ecologiche

- Il *Bt* è facilmente biodegradabile in condizioni di campo
 - Temperatura, acqua, pH, radiazioni solari (in special modo gli UV)
- Dopo più di 40 anni di utilizzo su milioni di ettari e diversi biotopi **non c'è stata alcuna segnalazione di effetti negativi sull'ambiente** a seguito dell'uso del *Bt*
 - Svariati test di tossicità hanno ripetutamente confermato che le tossine sono innocue per l'uomo e gli animali superiori (il basso pH intestinale dei mammiferi solubilizza e denatura i cristalli proteici). Il *Bt* è risultato innocuo per uccelli, pesci, vertebrati e invertebrati acquatici e terrestri, compresa l'entomofauna utile (parassiti, predatori e impollinatori)
 - **Unica eccezione** per i ceppi che producono la **β -esotossina**. Meno selettiva delle δ -endotossine, nociva per 55 specie di 10 ordini diversi (i.e. *Pieris brassicae*, *Musca domestica*, *Locusta migratoria*, *Apis mellifera*) oltre a nematodi (*Meloydogine*) e vertebrati (topi).



Bacillus cereus

Questi 3 *Bacillus* appartengono allo stesso gruppo



- Il *Bt* ed il *B. cereus*, sono geneticamente e fenotipicamente indistinguibili, eccetto che per il plasmidio che codifica alla produzione nel *Bt* del corpo parasporale

- Fanno parte del gruppo anche *B. mycooides* e *B. anthracis*
- *B. cereus* è stato riconosciuto responsabile di numerose intossicazioni alimentari e infezioni oculari

Altri batteri

- Biological insecticides (bacteria)
 - *Bacillus sphaericus* – VectoLex CG e Spherimos (Valent BioSciences)
 - Molto attivo verso larve di zanzare (*Culex* e *Anopheles*, non su *Aedes*)
 - Cristalli proteici stabili (4 °C e pH 7)
 - Produce 2 tossine, binaria (Btx) e zanzaricida (Mtx). I ceppi più virulenti le producono entrambe.
 - Più persistente del *Bti*
 - *Paenibacillus popilliae*
 - Milky spore disease
 - Non produce tossine
 - Invade l'emocele con le cellule vegetative, causando setticemia
 - Azione lenta
 - Processo di produzione complesso

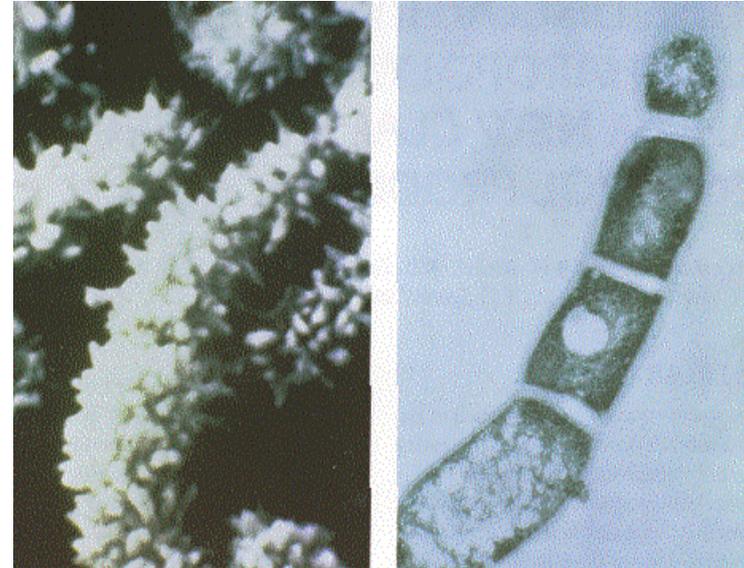


Paenibacillus popilliae

- Enterobacteriaceae (batteri asporigeni)
 - *Serratia entomophila*
 - Invade (Wrightson Seeds). “Ambra disease” su *Costelytra zealandica* (Scarabeidae)
 - *Serratia marcescens*
 - Setticemia in Ortoteri

Spinosad

Natural Product
Microbial insecticide
(micro-organism-derived)

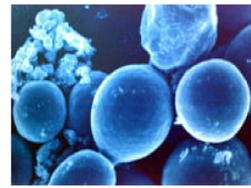


- *Saccharopolyspora spinosa*
 - Nuova specie di Actinomicete (batteri vicini ai funghi), isolata nei Caraibi
 - Principio attivo: Spinosad
 - Metaboliti attivi: Spinosine (soprattutto A e D, ma se ne conoscono più di 30)
 - **Naturalyte**: Nuova classe di agenti di controllo (da **Natural** e metabol-**yte**)
 - Formulati registrati in 60 Paesi su 150 colture. Success® e Laser®
 - Ampio spettro d'azione
 - Tisanotteri (*Frankliniella*),
Lepidotteri (*Lobesia*,
Spodoptera, *Ostrinia*, *Plutella*),
Coleotteri (*Leptinotarsa*), Ditteri
(*Lyriomiza*, *Ceratitis*,
Bactrocera, *Anopheles*)
 - Azione per ingestione e per contatto

Non tossico per gli
ausiliari (tranne che
per *Encarsia* e *Orius*)

Basso impatto ambientale
..... qualche dubbio

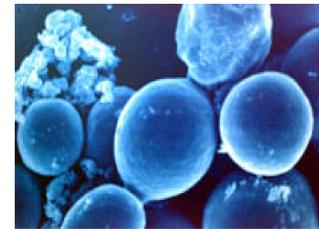
Bt: produzione, conservazione, distribuzione



- ✓ La produzione avviene generalmente in fermentatori, in condizioni di buona ossigenazione, a 40 C e pH neutro
 - ✓ Si utilizzano substrati economici. Esaurito il substrato le cellule entrano nella fase di sporulazione. I prodotti (spore, cristalli proteici e substrato non ancora utilizzato) vengono concentrati mediante centrifugazione. I formulati commerciali (granulari, polveri, sospensioni acquose o oleose, incapsulati, etc.) sono più di 400. Si conserva per lungo tempo.
 - ✓ Per la distribuzione si possono utilizzare le stesse macchine irroratrici dei prodotti chimici. Importante la valutazione del momento dell'intervento, della dimensione delle goccioline, delle dosi d'impiego e delle condizioni climatiche
- ✓ I formulati a base di *Bt* hanno in Italia un valore di mercato intorno a 1,7 milioni di euro, pari a 110 tonnellate di prodotto vendute annualmente.

formulati commerciali

Bt kurstaki

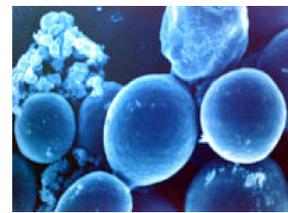


Bt aizawai



Bt tenebrionis

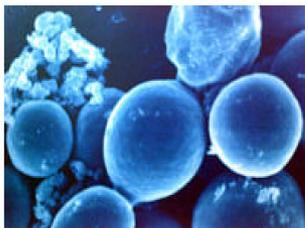
i ceppi modificati geneticamente



- Tra specie (o sottospecie)
 - I geni che codificano per più tossine possono essere inserite in uno stesso batterio ed agire contemporaneamente su più gruppi di insetti
 - Introdurre più tossine non equivale però ad aumentare la patogenicità, perché viene ridotta la quantità di ciascuna tossina. E la patogenicità dipende anche dalla quantità di tossina ingerita
- ✓ Foil®: coniugazione tra *Btk* e *Bt tenebrionis* e agisce su Coleotteri e Lepidotteri
- ✓ Cutlass® e Condor®, Agree® e Design®: tra *Btk* e *Bt aizawai*
- ✓ Novador®: ottenuto per irraggiamento (raggi gamma) del *Bt tenebrionis*

Il Bt nell'ingegneria genetica

- Clonazione dei geni delle tossine *Bt* in altri microrganismi epifiti...
 - *Pseudomonas fluorescens* (MPV®), Match®, M-Peril®)
- ... endofiti ...
 - *Clavibacter xyli* infetta le piante producendo tossine *Bt* durante la crescita (InCide®)
- .. e in piante
 - Piante transgeniche

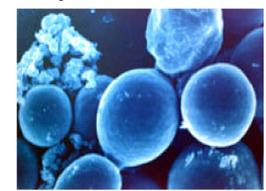


Dal 1996 ad oggi sono state poste in commercio almeno **39 varietà** di sementi transgeniche appartenenti a **12 specie diverse** (oltre ai risaputi soia e mais, anche melone, patata, pomodoro, radicchio e zuccina), e tantissime altre sono in fase di autorizzazione (a livello mondiale, **NON nell'Unione Europea**).

- Piante transgeniche di seconda generazione
 - Capacità di sintetizzare più tossine contemporaneamente

Rischi

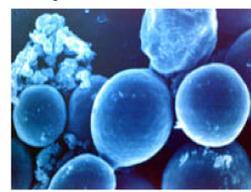
- Topi e patate GM
- Mais-*Bt* e farfalla Monarca



Resistenza alle tossine Bt

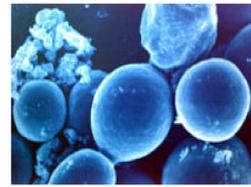
- 16 specie di insetti reistenti alle tossine *Bt*
 - 14 specie in laboratorio e 2 sole specie, *Plodia interpunctella* e *Plutella xylostella*, hanno sviluppato una resistenza al *Btk* in pieno campo
 - Nessuna resistenza invece nei Culicidi verso il *Bti* o il *B. sphaericus*
- Meccanismi di resistenza
 - Riduzione della solubilizzazione del cristallo
 - Cambio dei recettori delle proteine presenti sulla membrana dell' intestino
- Prevenzione
 - Uso di tossine diverse
 - Nel caso di piante GM, uso di piante rifugio
 - la resistenza è recessiva

Biological Insecticides (bacteria)



- *BT* isolates for control of the *Plutella* group of Lepidoptera
 - Bactospeine, **Foray**, Biobit (Valent BioSciences), Dipel (Biocontrol Network, Rincon-Vitova), Cordalene (Agrichem e IntrachemBio), Bactucide (Caffaro e Isagro), Thuricide (Certis)
- *BT* isolates for control of Coleoptera – Novodor (Valent Biosciences)
- *BT* isolates for control of the *Spodoptera* group of Lepidoptera
 - XenTari (Biobest), **Florbac** (Valent BioSciences), Agree (Certis), Certan (Syngenta)
- *BT* isolates for control of Lepidoptera and Coleoptera
 - Crymax (Certis), Lepinox (Certis e Intrachem)
- *BT* encapsulated delta-endotoxins for control of Coleoptera – M-Trak (Ecogen)
- *BT* isolates for control of soil-inhabiting Coleoptera – KM 503 (Kubota)
- *BT* encapsulated delta-endotoxins for control of the *Spodoptera* group of Lepidoptera – Mattch (*kurstaki* + *aizawai*) e M/C (Ecogen)
- *BT* isolates for control of Diptera – Bactimos, Teknar, Gnatrol, Skeetal, **Vectobac**
- *BT* encapsulated delta-endotoxins for control of the *Plutella* group of Lepidoptera – MVP (*kurstaki* + *cryIA*), M-Peril (Ecogen), Guardjet (kubota)

situazione in Italia

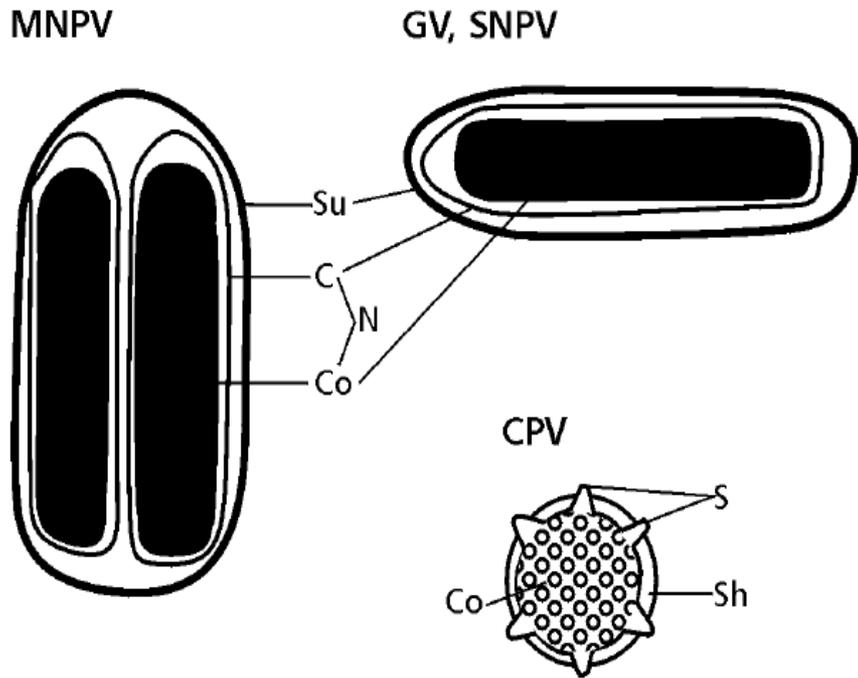


- E' di gran lunga l'agente patogeno più importante e utilizzato
- Mercato in crescita, sia in campo agrario che forestale
 - Importanti le esperienze della Sardegna
- Vi sono ditte produttrici e/o importatrici di prodotti a base di *Bt*
- Un quindicina i formulati commerciali registrati
 - Encore® (*Btk* Z52, **Xi**), Florbac® e Xentari® (*Bt aizawai*, **NC**), gli ultimi in ordine di tempo
- Sottospecie più utilizzate: *Btk*, *Bti*, *Bt tenebrionis* e *Bt aizawai*

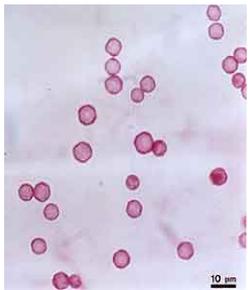


I Virus

- Entità submicroscopiche
- Patogeni endocellulari obbligati
- Struttura: Nucleocapside
 - Genoma virale (DNA o RNA)
 - Capside
 - capsula proteica che racchiude gli acidi nucleici
- Forme delle particelle virali (“virioni”) caratteristiche dei diversi gruppi
 - Classificati come Famiglie o Gruppi
 - Almeno 14 Famiglie annoverano patogeni di invertebrati
- I Virus entomopatogeni
 - **Baculoviridae**, Poxviridae, Reoviridae, Iridoviridae, Parvoviridae, Polydnaviridae, Ascovirus, Birnaviridae, Rhabdoviridae, etc.



Particelle virali
in sezione



- Particelle virali inglobate (in gruppi o singolarmente) in una matrice proteica, il “**Corpo di occlusione**”
- Struttura paragonabile ad una spora; può proteggere il virus per anni
 - **Virus della Poliedrosi Nucleare (NPV)**: Corpi di occlusione generalmente con numerosi virioni
 - **Granulovirus (GV)**: Corpi di occlusione generalmente con 1 solo virione

CPV



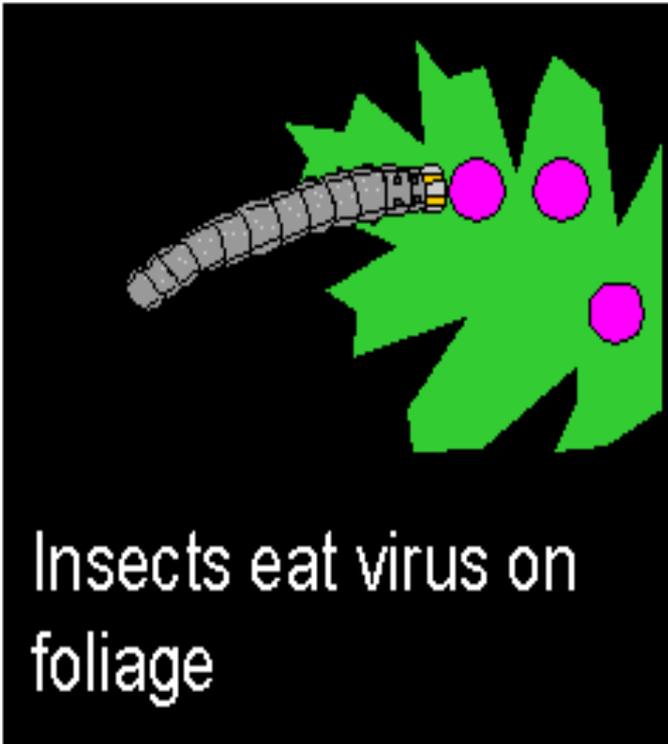
sintomi



NPV

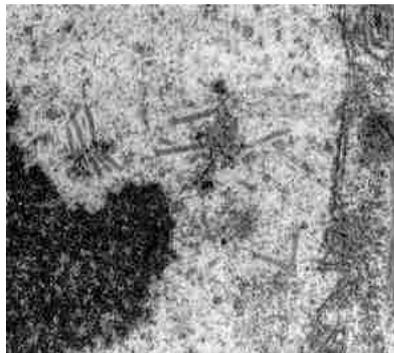
- L'infezione virale debilita l'ospite
 - Crescita stentata, movimenti lenti, maggiore esposizione verso i predatori, cambiamenti emolinfa
- Insetti non gregari si raggruppano all'estremità di rami
- Alterazioni cromatiche verso tonalità più chiare
- Larve flaccide a "V" rovesciato
- Inizio infezione – morte dell'insetto: da 2-3 giorni fino a 2-3 settimane, in relazione alla virulenza del ceppo
 - Questa lentezza d'azione ne ha limitato l'uso finora alle sole aree forestali

come agiscono i virus

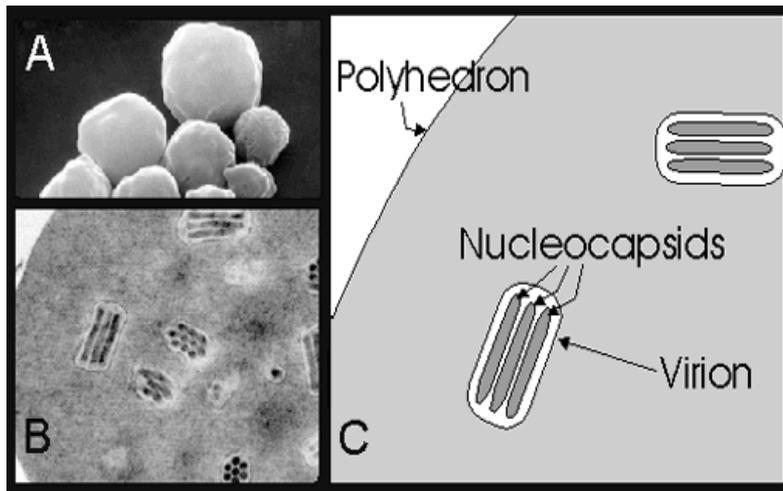


- **Ingestione** dei corpi di occlusione
- Il pH alcalino dell'intestino dissolve la matrice proteica del corpo di occlusione, liberando i virioni
- I virioni attaccano le cellule epiteliali dell'intestino e si portano nel nucleo
- Il genoma del virus si moltiplica nel nucleo cellulare per poi attaccare le cellule vicine
- Passaggio nell'emolinfa e diffusione dell'infezione in tutto il corpo
- Dispersione dei poliedri dopo la morte dell'insetto per rottura del tegumento

Virioni in fase di assemblaggio



- Vento, pioggia, escrementi di animali infetti, parassitoidi e predatori

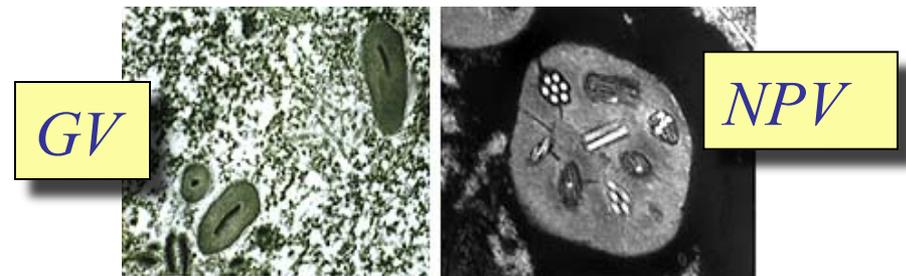


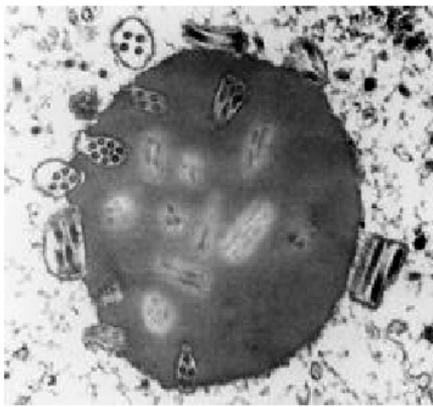
I baculovirus



- Il principale gruppo di Virus usato nella lotta microbiologica
- Specifici
- Innocui per vertebrati e piante
- Impatto ambientale bassissimo

- Tre gruppi (A, B e C)
 - Virus della Poliedrosi nucleare (NPV)
 - Granulovirus (GV)
 - Gruppo C (NOV) dei *Baculovirus* non occlusi





NPV



- Poliedri cubici o esagonali
- Singoli (SNPV) od in gruppi (MNPV) nei corpi di occlusione
- Specie ospiti: circa 120 tra Lepidotteri ed Imenotteri
- Gli NPV sono generalmente specifici, con alcune eccezioni

- I seguenti NPV sono utilizzati e prodotti su scala commerciale
 - *Autographa californica* MNPV
 - Largo spettro d'azione
 - *Lymantria dispar* MNPV
 - *Anticarsia gemmatalis* MNPV
 - *Mamestra brassicae* MNPV
 - Largo spettro d'azione
 - *Neodiprion sertifer* SNPV
 - *Spodoptera* spp. MNPV
 - *Heliothis* spp. SNPV

- Granuli ovali od ovoidali **GV**
- Singoli nei corpi di occlusione
- Crescono male su terreno di coltura, limitato interesse industriale
- Infettano larve di Lepidotteri
 - *Cydia pomonella* GV
 - *Phthorimaea operculella* GV



- Virus senza corpo d'occlusione
- Attaccano Coleotteri, Imenotteri e Acari
 - *Baculovirus Oryctes* usato in Stati meridionali del Pacifico e dell'Oceano Indiano (su palme da cocco)
 - Non sopravvive a lungo nell'ambiente

NOV

Produzione

■ Insecticidal baculovirus

- *Adoxophyes orana* GV (AoGV) – Capex2 (Andermatt)
- *Anagrapha falcifera* NPV (AfMNPV) (Certis)
- *Anticarsia gemmatalis* NPV (AgMNPV) – Poligen, Multigen
- *Autographa californica* NPV (AcMNPV) – Gusano (Certis), VPN 80 (Agricola el Sol)
- *Cydia pomonella* GV (CpGV) – Carposin (Agrichem), Cyd-X (Certis), **Madex** (Andermatt Biocontrol e Intrachem), Granupom (Bayer e Biobest), Pavois (Bayer), Ceprovirusine (Calliope), Virosoft CP-4 (Biotepp), Virin-Gyap (NPO Vector)
- *Helicoverpa zea* NPV – Gemstar (Certis e Rincon-Vitova)
- *Lymantria dispar* NPV – Gypcheck (USDA Forest Service)
- *Mamestra brassicae* NPV – Mamestrin (NPP e Calliope), Virin-EKS (NPO Vector, Virosoft BA3 (Biotepp))
- *Mamestra configurata* NPV – Virosoft (Biotepp)



NPV



Bioinsetticidi a base di virus

- *Neodiprion sertifer*/*N. lecontei* NPV – Neocheck-S (USDA Forest Service), Leconteivirus (Canadian Forest Service), Sertistop (Verdera), Virox (Oxford Virology)
- *Orgyia pseudotsugata* NPV – OpNPV (USDA Forest Service)
- *Plodia interpunctella* GV – NutGuard-V, FruitGuard-V e BioGuard-V (AgriVir)
- *Autographa californica* NPV – Gusano (Certis), VPN 80 (Agricola el Sol)
- *Spodoptera exigua* NPV – Spod-X® (Certis, Brinkman e Rincon-Vitova), Ness-A ed Ness-E (Applied Chemicals Thailand)
- *Spodoptera litura* NPV – Spodo-lure e Spodostar (Agri Life)
- *Syngrapha falcifera* NPV – Protus WG (Prophyta)

Produzione



NPV

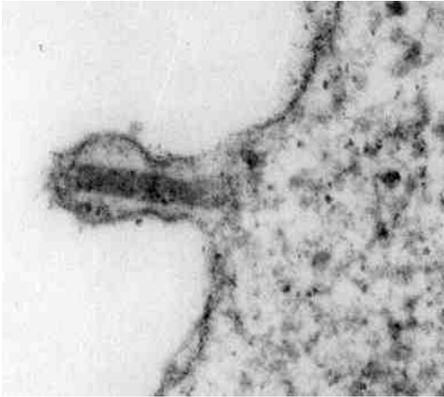
Esempi di Utilizzo di virus in foresta

Lymantria dispar (Gypsy moth) NPV Gypchek ® (USA)
Disparvirus ® (Canada), Biolavirus LD ® (Eu – Czeck Rep.)

Neodiprion sertifer (Sawfly) NPV Neocheck S ® (USDA Forest Service), Virox ® (Regno Unito), Lecontvirus ® (Canada)

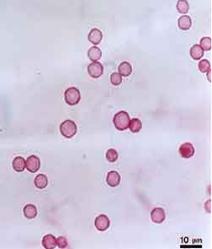


Baculovirus
ricombinante



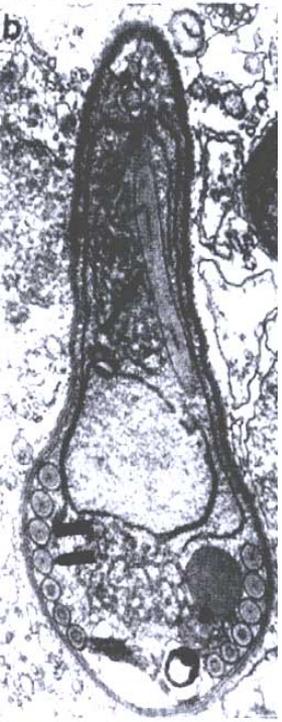
baculovirus GM

- Aumento di stabilità e velocità d' azione
 - Virus ricombinanti + Piretroidi
 - Inserimento di tossine provenienti dallo scorpione algerino (*Androctonus australis*), dallo scorpione giallo (*Leirus quinquestriatus hebraeus*), e dall' acaro *Pyemotes tritici*
 - Inserimento di ormoni o enzimi coinvolti nella muta
 - Dubbi sui rischi potenziali dovuti all' accumulo di questi virus GM una volta rilasciati nell' ambiente
- I baculovirus sono fotolabili (la luce è il principale responsabile di inattivazione)
 - Proteine sinergizzanti
 - Enhancin



Situazione in Italia

- Isolamento e identificazione di Virus da fitofagi malati (Magnoler, Triggiani, Marani, Cavalcaselle, Deseö)
- Pochi lavori sperimentali, soprattutto in campo forestale
- Pochi formulati commerciali disponibili
 - Madex®[®], a base di Granulovirus, utilizzato su Carpocapsa del melo, distribuito da ItrachemBio e Isagro
 - Alcuni in fase di registrazione (es. *Spodoptera exigua* NPV)
- Mancanza di centri di produzione
- Scarsa informazione e mercato ridotto



Protozoi

- Classificati in 6 Regni: Opisthokonta, Amoebozoa, Plantae, Chromalveolata, Rhizaria, Excavata.
- **Le malattie causate dai protozoi in natura si manifestano in maniera cronica**, e generalmente debilitano l'ospite senza portarlo a morte
- L'infezione si ha per **ingestione** delle spore e successiva penetrazione nel tratto digestivo
- Il **Phylum Microspora** è il più importante per la lotta microbiologica; comprende specie parassite obbligate di Artropodi
- I Microsporidi **non sono particolarmente virulenti**, ma **riducono in maniera significativa lo sviluppo e la fecondità dell'ospite**.

I Microsporidi

- Le spore, dopo l'ingestione e la successiva germinazione, estrudono un filamento polare, capace di penetrare la parete delle cellule intestinali ed iniettare al loro interno il proprio contenuto cellulare
- Vivono solo in specifici tessuti dell'ospite (corpi grassi, pareti intestinali o organi riproduttivi)
- *Nosema* e *Vairimorpha* sono i due generi che annoverano specie usate nel controllo biologico. *Nosema locustae* infetta molte specie di Ortoteri, mentre *V. necatrix* attacca i Lepidoteri



I protozoi associati agli insetti

- **Amoebae**

- *Malamoeba, Malpighamoeba, Malpigiella*

- **Apicomplexa**

- *Plasmodium, Theileria, Babesia, Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*

- Ciliophora

- Euglenozoa

- Oxymonadida

- Trichomonadida

- Hypermastigida

- Haplosporidia

- Helicosporidium



Nosema sp.: Infezione di *Bombyx mori*
(larva più piccola e con macchie nere)



Bioinsetticidi a base di Microsporidia

- . *Nosema locustae* – Nolo Bait (Biocontrol Network), Semaspore Bait (Rincon Vitova) Grasshopper Control Semaspore Bait (Beneficial Insect Company), Milky Spore e Milky Spore Dispersal Tubes (Biocontrol Network)
- . *Vairimorpha necatrix* – under development as BCA



Amblyospora sp. Infezione di
larve di Culicidi
(al centro e a destra)