



Tavole Rotonde sui maggiori problemi
riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia
Sotto gli auspici del MIPAAF

XXIII.

**NUOVE STRATEGIE DI DIFESA DELLE PIANTE
E RESISTENZA DI INSETTI ED ACARI
AGLI AGROFARMACI**

Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Rendiconti Anno LX - 2012

© 2013 Accademia Nazionale Italiana di Entomologia
50125 Firenze - Via Lanciola 12/a

ISBN 978-88-96493-09-0

PRESENTAZIONE

Gli argomenti affrontati nelle due Tavole Rotonde afferenti a questa pubblicazione riguardano i problemi che sono all'attenzione degli operatori del settore agrario e forestale. La difesa delle colture dagli attacchi dei fitofagi è divenuta sempre più complessa per la resistenza agli insetticidi che i fitofagi sono stati capaci di sviluppare nel tempo. Si è imposta, pertanto, la necessità di ricercare nuove strategie e metodologie per il controllo degli agenti patogeni. Le Biotecnologie microbiche offrono oggi indirizzi innovativi per la difesa delle piante, nel rispetto delle direttive comunitarie.

In anni recenti si sono sempre più sviluppate tecniche di transgenesi per il controllo degli insetti dannosi ed i primi risultati appaiono molto promettenti.

*Questi hanno fornito positive risposte per quanto riguarda *Tribolium castaneum*, *Pectinophora gossypiella*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*. Analoghe trasformazioni genetiche sono allo studio anche per i ditteri di grande interesse agrario quali *Ceratitis capitata* e *Bactrocera oleae*.*

Nel complesso, le due giornate scientifiche organizzate dall'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, hanno fornito un quadro aggiornato dello stato attuale delle ricerche nel campo delle strategie di difesa delle piante, utile per tutti coloro che operano nel settore.

ROMANO DALLAI

Presidente Accademia Nazionale Italiana di Entomologia

INDICE

Tavola Rotonda su

ANTAGONISTI, SIMBIONTI E NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO DEGLI INSETTI DANNOSI

FRANCESCO PENNACCHIO, BARBARA GIORDANA – <i>Interazioni multitrofiche degli insetti e nuove strategie di controllo</i>	Pag. 147
MATTEO LORITO, FELICE SCALA – <i>Le biotecnologie per la difesa delle piante in accordo con la nuova direttiva UE 2009/128 sull'uso sostenibile dei pesticidi</i>	» 155
ALBERTO ALMA, ELENA GONELLA – <i>I microrganismi simbiotici: una risorsa per il controllo di agenti patogeni e insetti dannosi</i>	» 159
LUCA RUIU, IGNAZIO FLORIS – <i>Nuove prospettive di controllo microbiologico degli insetti nocivi</i>	» 173
MORENA CASARTELLI – <i>L'intestino medio degli insetti: bersaglio e barriera dei bioinsetticidi</i>	» 177

Tavola Rotonda su

LA RESISTENZA DEGLI INSETTI DI INTERESSE AGRARIO AGLI INSETTICIDI

EMANUELE MAZZONI, PIERO CRAVEDI – <i>La resistenza agli insetticidi dell'afide Myzus persicae (Sulzer)</i> ...	» 187
IAN DENHOLM – <i>Recent advances in understanding and combating insecticide resistance</i>	» 193
GIAN CARLO MANICARDI, STEFANO CASSANELLI – <i>La resistenza agli insetticidi nei lepidotteri: Cydia pomonella come caso studio</i>	» 195
CARLO DUSO, ALBERTO POZZEBON, STEFANO CASSANELLI, PAOLA TIRELLO, THOMAS VAN LEEUWEN – <i>La resistenza ai prodotti fitosanitari in acari fitofagi e predatori: esperienze e casi di studio</i>	» 201
VINCENZO NICOLA TALESA, CINZIA ANTOGNELLI, LETIZIA MEZZASOMA – <i>Ruolo delle colinesterasi nella resistenza agli insetticidi</i>	» 215
KEVIN GORMAN, NEIL MORRISON, LUKE ALPHEY – <i>Next generation insecticide resistance management: transgenic contributions</i>	» 221

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 8 GIUGNO 2012

Tavola Rotonda su:

ANTAGONISTI, SIMBIONTI E NUOVE STRATEGIE
DI CONTROLLO DEGLI INSETTI DANNOSI

Coordinatori:

BARBARA GIORDANA e FRANCESCO PENNACCHIO, Accademici

INTERAZIONI MULTITROFICHE DEGLI INSETTI E NUOVE STRATEGIE DI CONTROLLO

FRANCESCO PENNACCHIO (*) - BARBARA GIORDANA (**)

(*) *Dipartimento di Agraria, Laboratorio di Entomologia "E. Tremblay", Università di Napoli "Federico II", 80055 Portici (NA), Italy; f.pennacchio@unina.it*

(**) *DiPSA, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano, Italy*

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbiotici e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

Insect multitrophic interactions and innovative control strategies

The astonishing biodiversity of parasitic Hymenoptera and the large variety of strategies they use to colonize and exploit their insect hosts offer a wealth of molecular tools that can be profitably used for pest control. The virulence factors encoded by parasitic wasps and their associated symbionts are able to suppress the immune response of the host and to disrupt its physiological and reproductive processes. These molecules can directly target insect pests, and, by disrupting their immune response, they can also enhance the value of the ecological services offered by natural antagonists. The use of these natural bioinsecticides is highly dependent on the development of targeted delivery strategies, which have to be designed to enhance both the efficacy and safety. The fast expansion of molecular technologies opens new avenues of research and makes possible the development of innovative pest control technologies, based on the use of parasitoid-derived molecules and/or on strategies mimicking their effects on insect hosts.

KEY WORDS: virulence factors, host regulation, bioinsecticide, biological control, Hymenoptera, parasitic wasps, bioinsecticide delivery.

INTRODUZIONE

Gli insetti sono responsabili di notevoli perdite nelle colture in tutto il mondo (OERKE e DEHNE, 2004). La necessità di limitare il danno provocato da questi artropodi, a lungo perseguita tramite l'uso di insetticidi di sintesi (CASIDA e QUISTAD, 1998), è sempre stata di importanza primaria in agricoltura. Sfortunatamente, i benefici effetti immediati ottenuti con l'uso intensivo dei mezzi chimici di controllo sono stati ben presto superati dai notevoli problemi che questi pongono, quali lo sviluppo di resistenza negli insetti bersaglio, la contaminazione ambientale e la tossicità per gli insetti non-target. Questa consapevolezza ha portato alla ricerca e allo sfruttamento di alternative di origine biologica, da introdurre nell'ambito di strategie integrate di gestione degli insetti dannosi (IPM) (DENT, 1995).

Lo studio delle relazioni molecolari alla base delle interazioni tra gli insetti e i loro simbiotici, specialmente piante e microrganismi, ha permesso la scoperta di nuovi insetticidi di origine naturale (ROH *et al.*, 2007; BRAVO *et al.*, 2007; DAYAN *et al.*, 2009; KIRST, 2010). Il notevole impegno della ricerca in questo campo ha portato a una rapida espansione delle nostre conoscenze sulle tossine ad attività insetticida, che hanno ormai superato

quelle delle pur ben note tossine *Bt*, consentendo l'identificazione di numerosi antagonisti come fonti biologiche di nuove molecole insetticide (NICHOLSON, 2007).

Il gruppo di insetti antagonisti più ampio e diversificato è rappresentato dagli imenotteri parassitoidi, che utilizzano una ampia varietà di strategie e di molecole per uccidere e/o manipolare la fisiologia delle loro vittime (PENNACCHIO e STRAND, 2006). Entrambe costituiscono di fatto una preziosa fonte di biodiversità molecolare, finora non sfruttata, da cui è possibile attingere nuovi principi attivi da impiegare proficuamente per il controllo degli insetti dannosi.

In questa nota vengono sinteticamente riprese parte delle informazioni, estesamente discusse di recente da PENNACCHIO e MANCINI (2012) e PENNACCHIO *et al.* (2012), sulle potenziali ricadute applicative in agricoltura delle recentissime ricerche sui polidnavirus e il veleno dei parassitoidi. Il principale obiettivo di questo scritto è quello di fornire uno schema concettuale in cui inserire le numerose conoscenze in nostro possesso sulle interazioni molecolari tra i parassitoidi e i loro ospiti, e di esaminare come tali conoscenze possano condurre a ideare nuove tecnologie di controllo su base biologica più ecocompatibili. Questa

area di studio, decisamente agli esordi, si sta rapidamente espandendo e rappresenta la nuova frontiera circa lo sfruttamento della biodiversità naturale, al fine di sviluppare interventi sostenibili e innovativi in agricoltura.

DAL CONTROLLO BIOLOGICO AL CONTROLLO SU BASE BIOLOGICA

L'utilizzo di parassiti, di predatori e di patogeni per limitare la densità delle popolazioni di insetti dannosi è definito controllo biologico (DE BACH, 1964). L'uso di organismi utili è stato molto incoraggiato ed è incluso in molti programmi IPM (BALE *et al.*, 2008). Gli strumenti molecolari adottati da numerosi antagonisti naturali degli insetti per superare le barriere difensive dell'ospite sono ormai ben noti. In tal modo si rendono disponibili nuove conoscenze sui fattori di virulenza che, associate a quelle dei recettori nell'ospite, possono consentire la definizione di tecnologie innovative di controllo. Queste tecnologie, basate sull'uso di molecole e geni prodotti e rilasciati da nemici naturali, rientrano in una definizione più ampia di controllo biologico, che include quindi non solo l'uso dell'organismo vivente, ma anche delle molecole e dei geni che da esso derivano (TREMBLAY, 2003). Un brillante esempio è fornito dall'entomopatogeno *Bacillus thuringiensis*, che, dalla sua scoperta più di cento anni fa, è tuttora usato come fonte di nuove tossine e di geni per il controllo degli insetti (ROH *et al.*, 2007).

Gli Imenotteri parassitoidi sono efficaci antagonisti di numerosi tipi di insetti e la loro strategia di attacco e successivo sfruttamento dell'ospite si basano frequentemente sulle secrezioni riproduttive della femmina, che inducono una drastica riprogrammazione biochimico/fisiologica della vittima, in modo da aumentarne l'idoneità nutrizionale a vantaggio della propria progenie, massimizzandone le opportunità di sviluppo (VINSON *et al.*, 2001). Le secrezioni riproduttive sono costituite da una miscela complessa di veleno e fattori ovarici, talvolta associati a simbionti virali, che vengono rilasciati insieme con l'uovo al momento della parassitizzazione (QUICKE, 1997). Questa peculiare miscela di molecole è in grado di agire sulle principali attività fisiologiche e riproduttive degli insetti e, di conseguenza, i singoli componenti sono interessanti candidati per lo sviluppo di nuovi insetticidi naturali.

Lo straordinario processo di radiazione adattativa degli Imenotteri parassiti ha permesso loro la colonizzazione di un notevolissimo numero di nicchie ecologiche, grazie allo sviluppo di una enorme varietà di strategie di virulenza (PENNACCHIO e STRAND,

2006). Le componenti chiave del corredo ancestrale utilizzato dagli idiobionti (che bloccano lo sviluppo dell'ospite e lo uccidono rapidamente poco dopo l'ovideposizione) sono il veleno, di varia composizione e ricco in neurotossine in grado di determinare la paralisi e la morte dell'ospite, e fattori immunosoppressivi, necessari per prevenire gli effetti negativi della coagulazione e melanizzazione, che limiterebbero la capacità degli ectoparassiti di ingerire l'alimento (PENNACCHIO e STRAND, 2006).

La transizione dall'ectoparassitismo all'endoparassitismo, che si è manifestata diverse volte nel corso dell'evoluzione degli Imenotteri parassiti, ha determinato la comparsa di diverse forme di koinobiosi (sviluppo del parassitoide nell'ospite vivente), caratterizzate da profonde e complesse interazioni tra l'ospite e il parassitoide (WITHFIELD, 1998; 2003). Le drastiche alterazioni fisiologiche che si osservano nell'ospite parassitizzato sono accuratamente modulate sia nel tempo che nello spazio, e la complessa e prolungata regolazione è ottenuta grazie a singolari strategie di rilascio dei fattori di regolazione. Tra queste sono compresi i teratociti, un peculiare tipo cellulare di origine extraembrionale dotato di straordinaria capacità secretoria, e i virus simbionti associati al parassitoide, membri della famiglia dei Polydnaviridae, che sono in grado di coadiuvare ed espandere l'azione del veleno. (PENNACCHIO e STRAND, 2006; PENNACCHIO e MANCINI, 2012). Questi virus, associati ad alcuni icneumonidi e braconidi che parassitizzano larve di lepidotteri, sono stabilmente integrati nei genomi delle vespe come provirus: le particelle virali vengono prodotte esclusivamente nel calice ovarico della vespa e sono in grado di infettare i tessuti dell'ospite parassitizzato esprimendo, senza replicazione, potenti fattori di virulenza. Le principali patologie che si manifestano nelle larve parassitizzate in natura, sono del tutto o in parte indotte dall'infezione virale. I Polidnavirus (PDVs) sono, quindi, una fonte naturale di molecole altamente selettive con un elevato potenziale bioinsetticida.

I parassitoidi e i simbionti a essi associati, però, possono essere realisticamente considerati buoni candidati per il controllo biologico solo se viene integralmente compreso il meccanismo molecolare alla base dell'alterazione della fisiologia dell'ospite che essi mediano. La conoscenza di tale meccanismo offre la possibilità di sviluppare nuove tecnologie di controllo, in grado di sfruttare gli strumenti e di mimare le strategie utilizzate dai parassitoidi per uccidere il proprio ospite: per questa ragione simili strategie costituiscono una innovativa categoria di strumenti di controllo su base biologica.

IMENOTTERI PARASSITOIDI E CONTROLLO
SU BASE BIOLOGICA: ATTUALI CONOSCENZE
E PROSPETTIVE FUTURE

L'uso delle molecole codificate dagli imenotteri parassitoidi e dai loro simbionti virali è già stato sperimentato con risultati incoraggianti. Il primo caso-studio descritto in letteratura riguarda l'uso di una proteina secreta dai teratociti di *Microplitis croceipes* (TSP14), che induce numerose alterazioni patologiche nelle larve parassitizzate delle specie di *Heliothis/Helicoverpa* (JARLFORS *et al.*, 1997). La proteina è attiva per ingestione e quando è espressa in piante di tabacco transgeniche determina una riduzione della velocità di crescita larvale e un aumento della mortalità (MAITI *et al.*, 2003).

Un promettente livello di attività insetticida è stato osservato anche per diversi membri della famiglia genica Cys-motif dell'icnovirus di *Comptosia sonorensis* (CsIV), a dimostrazione che queste molecole codificate dal polidnavirus, con una significativa similarità di sequenza con TSP14, costituiscono una ulteriore fonte di promettenti candidati da studiare più a fondo (FATH-GOODIN *et al.*, 2006). Infatti piante transgeniche esprimenti le proteine Cys-motif presentano una riduzione significativa del danno fogliare in presenza delle larve (GILL *et al.*, 2006).

Queste sperimentazioni pionieristiche sono state accompagnate da studi analoghi svolti in parallelo nei nostri laboratori. Abbiamo prodotto piante di tabacco transgeniche esprimenti *TnBVank1*, uno dei membri della famiglia genica codificante per l'anchirina virale del bracovirus associato a *Toxoneuron nigriceps* (*TnBV*) (RAO *et al.*, dati non pubblicati; FALABELLA *et al.*, 2007). Il prodotto genico ha sia un impatto diretto sulla risposta immunitaria dell'ospite, che effetti pleiotropici su numerose funzioni fisiologiche, associate alla evidente alterazione della organizzazione citoscheletrica delle cellule (THOETKIATTIKUL *et al.*, 2005; FALABELLA *et al.*, 2007; DUCHI *et al.*, 2010; GARGIULO *et al.*, dati non pubblicati). L'alimentazione di larve con piante transgeniche esprimenti *TnBVank1* determina un ritardo significativo dello sviluppo e una maggiore mortalità (RAO *et al.*, dati non pubblicati). Un dato interessante è costituito dal fatto che *TnBVank1* altera il trascrittoma della pianta, causando *up-regulation* di alcuni geni coinvolti nella difesa contro agenti patogeni, cosicché la resistenza della pianta ad alcuni funghi patogeni viene effettivamente aumentata (RAO *et al.*, dati non pubblicati). Le basi funzionali che portano a queste risposte multiple di maggiore tolleranza o resistenza devono ancora essere caratterizzate, ma è

chiaro che le molecole codificate dai PDVs possono avere un ruolo inaspettato nel controllo dei patogeni delle piante.

Gli studi sperimentali qui riportati sono solo alcuni esempi dell'uso potenziale delle vespe parassite per un controllo innovativo degli insetti dannosi. È già disponibile una lista in continua crescita di nuove molecole e geni coinvolti nella complessa rete delle interazioni ospite-parassitoidi, che richiedono di essere caratterizzate più a fondo per essere poi utilizzate. La comprensione dettagliata dei meccanismi molecolari alla base delle modalità di azione dei fattori di virulenza derivati dai parassitoidi ha permesso anche di identificare recettori bersaglio dell'ospite estremamente sensibili e di scoprire nuove importanti funzioni dei geni dell'immunità dell'ospite (FALABELLA *et al.*, 2012). Queste informazioni di primaria importanza in una prospettiva applicativa, consentono di identificare nuovi potenziali geni bersaglio da silenziare tramite RNA interference (RNAi), una tecnologia molto promettente già ora applicata con successo nel controllo degli insetti (PRICE e GATEHOUSE, 2008).

Gli effetti contenuti ma evidenti che le poche molecole derivate da parassitoidi e PDV finora considerate come potenziali bioinsetticidi esercitano sulle popolazioni di insetti, anche se non determinano elevata mortalità, possono senz'altro diminuire in modo significativo la fitness degli insetti bersaglio. Pertanto, questa categoria di molecole, così come qualsiasi altra sostanza con un analogo impatto sulle popolazioni degli insetti dannosi, sono particolarmente indicate per i piani IPM, che prevedono approcci diversificati e complementari. Infatti, la riduzione delle popolazioni di insetti dannosi piuttosto che la loro eradicazione permette una migliore salvaguardia degli equilibri ecologici e un più efficace impiego dell'attività degli insetti utili.

L'utilizzo dei fattori di virulenza, come tali o tramite silenziamento dei loro bersagli mediato da RNAi, richiede che vengano parallelamente affrontati ulteriori importanti aspetti, quali la modalità ottimale del loro rilascio in campo per agevolarne l'assunzione orale da parte dell'insetto bersaglio, la loro stabilità e sufficiente permanenza nell'ambiente fortemente ostile del lume intestinale e, infine, la conoscenza delle vie attraverso le quali esse possono raggiungere in quantità adeguate i loro recettori epiteliali o emocelici. Riguardo a quest'ultimo aspetto, i risultati più interessanti sul trasporto in cellula e transepiteliale di macromolecole sono stati analiticamente considerati in un recente lavoro (PENNACCHIO *et al.*, 2012) e sono ripresi in questa tavola rotonda in un successivo intervento.

VETTORI PER IL RILASCIO IN CAMPO

Diversi approcci biotecnologici sono attivamente al vaglio al riguardo e sono anche stati in parte sperimentati.

Tecnologie molto promettenti, anche se tuttora prevalentemente in fase di studio e con applicazione limitata, si basano sull'uso di nanospensioni del principio attivo (CHIN *et al.*, 2011), oppure sul suo inserimento in microcapsule o in nanoparticelle di varia natura (YANG *et al.*, 2009; ELEK *et al.*, 2010; POPAT *et al.*, 2012).

Una tecnologia invece molto avanzata e ben conosciuta prevede l'utilizzo di virus della famiglia Baculoviridae, patogeni che già di per sé hanno un moderato effetto negativo sulla fitness dell'insetto. Baculovirus ricombinanti (rBAC) con geni codificanti per diversi ormoni di insetti, o per enzimi quali proteasi e JH esterasi, oppure per neurotossine di ragno o scorpione attive sugli insetti sono stati usati con risultati molto promettenti in laboratorio, in serra e anche in campo (KAMITA *et al.*, 2005; INCEGLOU *et al.*, 2006). Nonostante il suo elevato potenziale, l'applicazione è tuttora limitata perché la qualità, quantità e purezza dei prodotti è sottoposta a regolamentazioni molto stringenti per ottenere l'autorizzazione all'uso (ROLDÃO *et al.*, 2011).

Recentemente sono stati sperimentati anche batteri epifiti modificati con una tossina di Bt, ottenendo un buon successo nel controllo della processionaria del pino (ALBERGHINI *et al.*, 2006).

Infine, l'estrema efficacia dell'utilizzo di piante transgeniche è ampiamente documentata ed è rappresentata in modo paradigmatico dalle numerosissime piante, universalmente utilizzate, esprimenti diversi tipi di tossine di Bt.

INGESTIONE E DEGRADAZIONE ENZIMATICA

Una volta ingerite dall'insetto, le molecole permangono più o meno a lungo nell'ambiente sfavorevole costituito dal fluido presente nel lume intestinale, prima di arrivare ai siti di interazione o assorbimento. Il fluido intestinale presenta, a seconda della specie di insetto, un pH acido o basico, che spesso raggiunge valori estremi, ed un potenziale di ossido-riduzione molto variabile che determina in diversa misura condizioni ossidanti o riducenti; ma, soprattutto, in esso vengono riversate le diverse categorie di enzimi idrolitici necessari per la digestione, prodotti dalle ghiandole salivari e dall'epitelio intestinale.

Considerando che le nuove biomolecole proposte per il controllo sono peptidi e proteine, oppure

frammenti di acidi nucleici, è essenziale che venga evitata la loro degradazione enzimatica. Un approccio studiato da tempo e applicato con successo nella ricerca biomedica indirizzata alla somministrazione di farmaci (RYAN *et al.*, 2008; BAILON e WON, 2009; KANG *et al.*, 2009) consiste nel legare covalentemente il principio attivo che si vuole far assumere e un polimero formato da monomeri di polietilenglicole (PEG): il processo è chiamato "pegylazione" e permette di schermare i siti di legame enzimatici, riducendo sensibilmente "l'aggressione" alla molecola bioattiva. La possibilità di modulare le proprietà del polimero di PEG in modo da ottenere una catena lineare singola o doppia, oppure variamente ramificata, può conferire ulteriori vantaggi, mantenendo più a lungo integro il sito attivo della molecola di interesse sia nel lume intestinale che successivamente nei liquidi interni dell'organismo.

Questa tecnologia è stata recentemente applicata al decapeptide Trypsin Modulating Oostatic Factor (TMOF), ormone che può essere utilizzato con successo come insetticida. Il TMOF, rilasciato nell'emolinfa dall'ovario delle femmine di *Aedes aegypti* al termine della digestione del pasto di sangue, si lega a specifici recettori presenti nella membrana basale delle cellule epiteliali dell'intestino medio, inibendo il rilascio di tripsina nel lume intestinale. Il TMOF di *A. aegypti* somministrato oralmente alle larve della zanzara, ne determina la morte, ed è tossico anche per le larve dei lepidotteri *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea*. La "pegylazione" del peptide ne aumenta sensibilmente la resistenza alla degradazione enzimatica da parte delle aminopeptidasi intestinali (SHEN *et al.*, 2009) senza impedirne il passaggio attraverso l'epitelio, in modo da raggiungere il suo recettore sulla membrana basolaterale. Somministrato oralmente, il decapeptide "pegylato" aumenta l'efficacia larvicida *in vivo* in *A. aegypti* (JEFFERS *et al.*, 2012).

TRASFERIMENTO DELLE BIOMOLECOLE AI RECETTORI EPITELIALI O EMOCELICI: SUPERAMENTO DELLA MEMBRANA PERITROFICA (MP) E AUMENTO DEL TEMPO DI CONTATTO CON L'ORLETTO A SPAZZOLA.

La barriera intestinale è formata dalla MP e dall'epitelio intestinale, la cui membrana apicale, rivolta verso il lume, è organizzata a formare un fitto orletto a spazzola. Tra la MP e l'orletto a spazzola è interposto lo spazio ectoperitrofico, occupato dal fluido luminale in cui sono presenti le molecole che hanno attraversato la MP. Nella maggior parte degli insetti, questo fluido scorre

continuamente, muovendosi in direzione opposta rispetto al liquido presente nello spazio endoperitrofico all'interno della MP: questo movimento in controcorrente è responsabile della corretta e completa digestione degli alimenti (TERRA e FERREIRA, 2005). Lo scorrimento continuo del fluido intestinale tenderà, però, a rimuovere e allontanare il bioinsetticida dai siti di interazione con la membrana plasmatica apicale, sfavorendone il legame con i recettori e/o il passaggio transepiteliale.

Un approccio efficace per superare la barriera costituita dalla MP è dato dalla possibilità di aumentarne la permeabilità fisiologica alterando la maglia di fibrille di chitina, con “pori” di definita dimensione, tramite gli enzimi idrolitici chitinasi (RAO *et al.*, 2004), oppure destrutturando, tramite proteasi specifiche come l'ensina, l'impalcatura proteica legata alla chitina (PENG *et al.*, 1999). La maggiore pervietà della MP provocherà di per sé un'alterazione della ricircolazione degli enzimi e un aumento del passaggio verso la cellula di patogeni, ma determinerà anche una maggiore concentrazione del bioinsetticida nello spazio ectoperitrofico, favorendone l'interazione con i recettori presenti sull'orletto a spazzola, come nel caso di tossine Bt (REGEV *et al.*, 1996), o il passaggio transepiteliale attraverso le vie cellulare e/o paracellulare (PENNACCHIO *et al.*, 2012), facilitando l'accesso ai recettori emocelici (FIANDRA *et al.*, 2010).

Le membrane biologiche sono in genere scarsamente permeabili a macromolecole idrofile ed elettricamente cariche come i peptidi, le proteine e gli acidi nucleici. Si può agevolare l'assorbimento coniugando la molecola di interesse con sostanze che garantiscano il più a lungo possibile l'adesione alla superficie assorbente, promuovendo il diretto contatto con i microvilli intestinali, in modo da impedire che la molecola venga rapidamente allontanata dal fisiologico movimento del fluido ectoperitrofico. Anche a questo proposito gli studi in campo farmacologico sono di aiuto, poiché sono state individuate varie categorie di molecole bioadesive, per lo più contraddistinte dal fatto di essere polimeri le cui caratteristiche di adesione alle strutture biologiche sono determinate dalla lunghezza della catena, dalla capacità di formare legami crociati e dal loro numero, e dalla disposizione dei diversi gruppi funzionali (ANDREWS *et al.*, 2009).

Una importante categoria di molecole bioadesive è costituita dal chitosano e dai suoi derivati, particolarmente indicati per favorire l'adesione e il passaggio di DNA, siRNA e oligonucleotidi (MAO *et al.*, 2010) ma anche di proteine e peptidi (AMIDI *et al.*, 2010). Il chitosano è un polisaccari-

de lineare biodegradabile atossico, derivato per deacetilazione dalla chitina, che può variare in peso molecolare (da 3800 a 20000 Da), grado di deacetilazione e viscosità. Ogni subunità deacetilata porta un gruppo aminico primario protonato in soluzione acida, che interagisce con le cariche negative superficiali dei microvilli. Il legame con proteine, DNA, RNA è di tipo elettrostatico in ambiente acido, mentre a pH neutro o basico il legame è dovuto a ponti di idrogeno o a interazioni idrofobiche (MAO *et al.*, 2010). I gruppi funzionali aminici e carbonilici si prestano a manipolazioni chimiche di varia natura, che possono fornire derivati su misura, tali da aumentare la solubilità della molecola, l'adesione alla membrana e la permeazione attraverso l'epitelio (MAO *et al.*, 2010; AMIDI *et al.*, 2010).

Il chitosano e alcuni suoi derivati sono tossici per taluni lepidotteri e afidi (CASALS *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; RABEA *et al.*, 2005, 2006), ed è recente la proposta di un loro impiego per la sintesi di un co-polimero da usare come potenziale vettore di insetticidi (LI *et al.*, 2011). Poiché il chitosano non possiede proprietà anfifiliche e non forma nanomicelle, suoi frammenti di diversa lunghezza sono stati fatti reagire con D, L-lactide, un poliesteri di origine naturale impiegato in diverse applicazioni biomediche. I prodotti di sintesi ottenuti sono anfifilici e formano nanomicelle di varie dimensioni: queste presentano sia gruppi idrofilici superficiali in grado di interagire con i substrati biologici, che gruppi idrofobici che possono legare pesticidi scarsamente idrosolubili. Gli autori (LI *et al.*, 2011) hanno valutato l'efficienza del co-polimero come potenziale sistema per veicolare e rilasciare al tessuto pesticidi, sperimentandone *in vitro* l'interazione con l'insetticida imidacloprid in funzione della dimensione, del numero e delle caratteristiche di superficie delle nanoparticelle.

Particolarmente interessanti nel caso degli insetti, nel cui intestino non viene secreto muco, sono le molecole che si legano al glicocalice, una struttura formata dalle glicoproteine, i glicolipidi e i proteoglicani della membrana plasmatica, particolarmente sviluppata nei microvilli degli epitelii intestinali. Delle numerose molecole che sono state sperimentate nella ricerca biomedica, le lectine sono una categoria di proteine nota da più di 100 anni per la capacità di agglutinare le cellule grazie alla formazione di legami con i residui glicidici (BIES *et al.*, 2004). Il loro possibile utilizzo come vettore di farmaci fu però proposto per la prima volta solo nel 1988 da WOODLEY e NAINSBETT. La consapevolezza che i numerosi glicani presenti nelle membrane biologiche sono espressi con alta specificità nei diversi tipi cellulari, dato

che la combinazione di un numero relativamente piccolo di zuccheri può generare un vasto numero di strutture chimiche diverse, e il fatto che lectine diverse si legano a residui glicidici diversi, spiega perché queste proteine possono essere dei vettori di adesione altamente specifici (BIES *et al.*, 2004). La loro potenzialità come vettori di bioinsetticidi somministrati oralmente è stata già dimostrata anche in insetto: infatti la mannosio-lectina di *Galanthus nivalis* (GNAglutinin), somministrata come proteina di fusione in associazione con il neuropeptide allatostatina (FITCHES *et al.*, 2002), oppure con una tossina di veleno insetticida di ragno (FITCHES *et al.*, 2004; DOWN *et al.*, 2006), ha dato luogo a una tossicità superiore a quella ottenuta con la somministrazione delle singole molecole, sia in larve di lepidottero che nell'afide *Myzus persicae*, che nell'omottero *Nilaparvata lugens*.

Ulteriori approfondimenti e numerosissimi studi recenti hanno chiarito che sia le lectine che i chitosani, oltre ad agire come bioadesivi, favoriscono anche, con modalità diverse, il passaggio attraverso l'intero epitelio intestinale, veicolando le molecole ad essi associate dal lume ai fluidi interni (BIES *et al.*, 2004; DELI, 2009). Le lectine, come dimostrato anche dalla citata sperimentazione con proteine di fusione condotta su insetti dannosi, sono in grado di attraversare la cellula epiteliale intestinale per transitosi (BIES *et al.*, 2004), mentre i chitosani agiscono sulla permeabilità paracellulare, favorendo l'apertura delle giunzioni serrate in mammifero (DELI, 2009; AMIDI *et al.*, 2010) e delle giunzioni settate dell'intestino medio delle larve di lepidotteri (FIANDRA *et al.*, dati non pubblicati).

Accurati studi specifici sulla fisiologia dell'intestino di insetto e la caratterizzazione della sua interazione con queste due categorie di molecole potranno permettere un loro uso più mirato e specifico e suggerire nuovi approcci per aumentare l'effetto della somministrazione orale dei bioinsetticidi.

CONCLUSIONI

I parassitoidi e i PDV a essi associati sono una sorgente naturale di bioinsetticidi di incalcolabile valore. I molteplici fattori di virulenza e di regolazione che essi utilizzano, per sopprimere l'immunità dell'ospite e regolarne la fisiologia e la riproduzione, rappresentano una delle più ampie riserve di biodiversità molecolare che può essere sfruttata per un controllo ecocompatibile degli insetti dannosi. La completa conoscenza del meccani-

simo di azione di queste molecole è indispensabile per l'esatta valutazione sia dei potenziali benefici che dei problemi relativi al loro rilascio nell'ambiente, che deve essere mirato ed efficace. L'uso dei nemici naturali e loro simbiotici come fonte di nuove molecole bioinsetticide e di innovative tecnologie di controllo è certamente un obiettivo a lungo termine, che potrà espandere e rafforzare i benefici contributi forniti dagli agenti di controllo biologici.

RINGRAZIAMENTI

Le ricerche menzionate in questo articolo sono state sostenute dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR-PRIN, 2008FBJP8).

RIASSUNTO

La stupefacente biodiversità che caratterizza gli imenotteri parassiti e l'estrema varietà delle strategie da essi sviluppate nella colonizzazione e sfruttamento degli insetti ospiti offrono una grande abbondanza di strumenti molecolari che possono essere efficacemente utilizzati per il controllo degli insetti dannosi. I fattori di virulenza codificati dalle vespe parassite e dai loro simbiotici sono in grado di sopprimere la risposta immunitaria dell'ospite e di manipolare i suoi processi fisiologici e riproduttivi. Queste molecole agiscono in modo specifico sulle specie dannose bloccandone la risposta immunitaria, rafforzando in questo modo il potenziale ecologico offerto dagli antagonisti naturali. L'uso di questi bioinsetticidi naturali sarà tanto più efficace quanto maggiormente sviluppate e adeguate saranno le tecniche per il loro mirato rilascio in campo e per impedire la degradazione e rapida rimozione nel lume intestinale, in modo da garantire la massima interazione con i recettori epiteliali e/o emocellici e potenziandone l'assorbimento. La rapida crescita delle tecnologie molecolari apre nuove vie per la ricerca e rende possibile lo sviluppo di nuove tecniche di controllo basate sull'utilizzo di molecole derivate dai parassitoidi e/o su strategie che mimano il loro effetto nell'insetto ospite.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERGHINI S., FILIPPINI R., SHEVELEV A.B., SQUARTINI A., BATTISTI A., 2006 - *Extended plant protection by an epiphytic Pseudomonas sp. derivative carrying the cry9Aa gene from Bacillus thuringiensis galleriae against the pine processionary moth Thaumetopoea pityocampa*. - *Biocontrol Sci. Technol.*, 16: 709-715.
- AMIDI M., MASTROBATTISTA E., JISKOOT W., HENNINK W.E., 2010 - *Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens*. - *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62: 59-82.
- ANDREWS G.P., LAVERTY T.P., JONES D.S., 2008 - *Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery*. - *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 71: 505-518.
- BAILON P., WON C.-Y., 2009 - *PEG-modified biopharmaceuticals*. - *Expert Opin. Drug Deliv.*, 6: 1-16.

- BALE, J.S., VAN LENTEREN, J.C., BIGLER, F., 2008 – *Biological control and sustainable food production*. - Phil. Trans. Royal Soc. London B – Biol. Sciences, 363: 761-776.
- BIES C., LEHR C.-M., WOODLEY J.F., 2004 – *Lectin-mediated drug targeting: history and applications*. - Adv. Drug Deliv. Rev., 56: 425-435.
- BRAVO A., GILL S.S., SOBERÓN M., 2007 – *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. - Toxicon, 49: 423-435.
- CASALS P., CARDENAS G., GALVEZ G., VILLAR A., CABRERA G., 2002. – *Agricultural applications of chitosan and derivatives*. Proc 10th IUPAC Int. Congress Chem. Crop Prot., 1: 228.
- CASIDA J.E., QUISTAD G.B., 1998 – *Golden age of insecticide research: past, present, or future?* - Annu. Rev. Entomol., 43: 1-16.
- CHIN C.P., WU H.S., WANG S.S., 2011 – *New approach to pesticide delivery using nanosuspensions: research and applications*. - Ind. Eng. Chem. Res., 50: 7637-7643.
- DAYAN F.E., CANTRELL C.L., DUKE S.O., 2009 – *Natural products in crop protection*. - Bioorg. Med. Chem., 17: 4022-4034.
- DEBACH, P., 1964 – *Biological control of insect pests and weeds*. Chapman and Hall, London, UK.
- DELI M.A., 2009 – *Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery*. - Biochim. Biophys. Acta, 1788: 892-910.
- DENT D.R. (ed.), 1995 – *Integrated Pest Management*. pp. 365. Chapman & Hall, London, UK.
- DOWN R.E., FITCHES E., WILES D.P., CORTI P., BELL H.A., GATEHOUSE J.A., EDWARDS J.P., 2006 – *Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, Nilaparvata lugens (HEMIPTERA:DELPHACIDAE)*. - Pest Manage. Sci., 62: 77-85.
- DUCHI S., CAVALIERE V., FAGNOCCHI L., GRIMALDI M.R., FALABELLA P., GRAZIANI F., GIGLIOTTI S., PENNACCHIO F., GARGIULO G., 2010 – *The impact on microtubule network of a bracovirus I B-like Protein*. - Cell. Mol. Life Sci., 67: 1699-1712.
- ELEK N., HOFFMAN R., RAVIV U., RESH R., ISHAAYA I., MAGDASSI S., 2010 – *Novaluron nanoparticles: Formation and potential use in controlling agricultural insect pests*. - Colloids Surface A Physicochem. Engin. Aspects, 372: 66-72.
- FALABELLA P., RIVIELLO L., PASCALE M., DI LELIO I., TETTAMANTI G., GRIMALDI A., IANNONE C., MONTI M., PUCCI P., TAMBURRO A.M., DE EGUILLEOR M., GIGLIOTTI S., PENNACCHIO F., 2012 – *Functional amyloids in insect immune response*. - Insect Biochem. Mol. Biol. 42:, 203-211.
- FALABELLA P., VARRICCHIO P., PROVOST B., ESPAGNE E., FERRARESE R., GRIMALDI A., DE EGUILLEOR M., FIMIANI G., URSINI M.V., MALVA C., DREZEN J.-M., PENNACCHIO F., 2007 – *Characterization of the IκB-like gene family in polydnaviruses associated with wasps belonging to different Braconid subfamilies*. - J. Gen. Virol., 88: 92-104.
- FATH-GOODIN A., GILL T.A., MARTIN S.B., WEBB B.A., 2006 – *Effect of Campoletis sonorensis cys-motif proteins on Heliothis virescens larval development*. - J. Insect Physiol., 52: 576-585.
- FIANDRA L., TERRACCIANO I., FANTI P., GARONNA A., FERRACANE L., FOGLIANO V., CASARTELLI M., GIORDANA B., RAO R., PENNACCHIO F., 2010 – *A viral chitinase enhances oral activity of TMOF*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 40: 533-540.
- FITCHES E., AUDSLEY N., GATEHOUSE J.A., EDWARDS J.P., 2002 – *Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 32: 1653-1661.
- FITCHES E., EDWARDS M.G., MEE C., GRISHIN E., GATEHOUSE A M R., EDWARDS J.P., GATEHOUSE J.A., 2004 – *Fusion protein containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion*. - J. Insect Physiol., 50: 61-71.
- GILL T.A., FATH-GOODIN A., MAITI I.B., WEBB B.A., 2006 – *Potential uses of cys-motif and other polydnavirus genes in biotechnology*. - Adv. Virus Res., 68: 393-426.
- INCEOGLU A.B., KAMITA S.G., HAMMOCK, B.D., 2006 – *Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook*. - Adv. Virus Res., 68: 323-360.
- JARLFORNS U.E., DAHLMAN D.L., ZHANG D., 1997 – *Effects of Microplitis croceipes teratocytes on host haemolymph protein content and fat body proliferation*. - J. Insect Physiol., 43: 577-585.
- JEFFERS L.A., SHEN H., KHALIL S., BISSINGER B.W., BRANDT A., GUNNOE T.B., ROE R.M., 2012 – *Enhanced activity of an insecticidal protein, trypsin modulating oostatic factor (TMOF), through conjugation with aliphatic polyethylene glycol*. - Pest Manag. Sci., 68: 49-59.
- KAMITA S.G., KANG K.-D., HAMMOCK B.D., INCEOGLU A.B., 2005 – *Genetically Modified Baculoviruses for Pest Insect Control*. - In Comprehensive Molecular Insect Science (Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S., Eds) Vol 6, pp. 271-322. Elsevier, San Diego.
- KANG J.S., DELUCA P.P., LEE K.C., 2009 – *Emerging PEGylated drugs*. - Expert Opin. Emerging Drugs, 14: 363-380.
- KIRST A.H., 2010 – *The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research*. - J. Antibiot. 63: 101-111.
- LI M., HUANG Q., WUB Y., 2011 – *A novel chitosan-poly(lactide) copolymer and its submicron particles as imidacloprid carriers*. - Pest Manag. Sci., 67: 831-836
- MAITI I.B., DEY N., DAHLMAN D.L., WEBB B.A., 2003 – *Antibiosis-type resistance in transgenic plants expressing teratocyte secretory peptide (TSP) gene from hymenopteran endoparasite (Microplitis croceipes)*. - Plant Biotech. 1: 209-219.
- MAO S., SUN W., KISSEL T., 2010 – *Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA*. - Adv. Drug Deliv. Rev., 62 . 12-27.
- NICHOLSON G.M., 2007 – *Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control*. - Toxicon 49: 413-422.
- OERKE E.-C., DEHNE H.-W., 2004 – *Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection*. - Crop Prot., 23: 275-285.
- PENG J., ZHONG J., GRANADOS R., 1999 – *A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae*. - J Insect Physiol., 45: 159-166.
- PENNACCHIO F., GIORDANA B., RAO R., 2012 – *Applications of parasitoid virus and venom research in agriculture*. In: Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens, eds. N. Beckage and J.-M. Drezen, Elsevier: 269-283.
- PENNACCHIO F., MANCINI D., 2012 – *Aphid parasitoid venom and its role in host regulation*. In: Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens, eds. N. Beckage and J.-M. Drezen, Elsevier: 247-254.

- PENNACCHIO F., STRAND M.R., 2006 - *Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera*. - Annu. Rev. Entomol., 51: 233-258.
- POPAT A., LIU J., HU Q., KENNEDY M., PETERS B., LU G.Q., QIAO S.Z., 2012 - *Adsorption and release of bioicides with mesoporous silica nanoparticles*. - Nanoscale 4: 970-975.
- PRICE D.R.G., GATEHOUSE J.A., 2008 - *RNAi-mediated crop protection against insects*. - Trends Biotech. 26: 393-400.
- QUICKE D.L.J., 1997 - *Parasitic Wasps*. - Chapman & Hall, London, UK.
- RABEA E.I., EL BADAWY M., ROGGE T.M., STEVENS C.V., STEURBAUT W., HOFTE M., SMAGGHE G., 2006. - *Enhancement of fungicidal and insecticidal activity by reductive alkylation of chitosan*. - Pest Manag. Sci., 62: 890-897.
- RABEA E.I., EL BADAWY M., ROGGE T.M., STEVENS C.V., HOFTE M., STEURBAUT W., SMAGGHE G., 2005 - *Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives*. - Pest. Manag. Sci., 61: 951-960.
- RAO R., FIANDRA L., GIORDANA B., DE EGUILEOR M., CONGIU T., BURLINI N., ARCIELLO S., CORRADO G., PENNACCHIO F., 2004 - *AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of Bombyx mori larvae*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 34: 1205-1213.
- REGEV A., KELLER M., STRIZHOV N., SNEH B., PRUDOVSKY E., CHET I., GINZBERG I., KONCZ-KALMAN Z., KONCZ C., SCHELL J., ZILBERSTEIN A., 1996 - *Synergistic activity of a Bacillus thuringiensis delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against Spodoptera littoralis larvae*. - Appl. Environ. Microbiol., 62: 3581-3586.
- ROH J.Y., CHOI J.Y., LI M.S., JIN B.R., JE Y.H., 2007 - *Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control*. - J. Microbiol. Biotechnol., 17: 547-559.
- ROLDÃO A., VICENTE T., PEIXOTO C., CARRONDO M.J.T., ALVES P.M., 2011 - *Quality control and analytical methods for baculovirus-based products*. - J. Invert. Pathol., 107: S94-S105.
- RYAN S.M., MANTOVANI G., WANG X., HADDLETON D.M., BRAYDEN D.J., 2008 - *Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects*. - Expert Opin. Drug Deliv., 5: 371-383.
- SHEN H., BRANDT A., WITTING-BISSINGER B.E., GUNNOE T.B., ROE R.M., 2009 - *Novel insecticide polymer chemistry to reduce the enzymatic digestion of a protein pesticide, trypsin modulating oostatic factor (TMOF)*. - Pest. Biochem. Physiol., 93: 144-152.
- TERRA W.R., FERREIRA C., 2005 - *Biochemistry of digestion*. In "Comprehensive Molecular Insect Science", (Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S. Eds.), Vol. 4, pp. 171-224. Elsevier Pergamon Press.
- THOETKIATTIKUL H., BECK M. H., STRAND M.R., 2005 - *Inhibitor κ B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF- κ B activation and suppress the insect immune response*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102: 11426-11431.
- TREMBLAY E., 2003 - *Entomologia Applicata*. - Vol. I. Liguori Editore, Napoli, Italy.
- VINSON S.B., PENNACCHIO F., CONSOLI F., 2001 - *The parasitoid-host endocrine interaction from a nutritional perspective*. In: Manipulating Hormonal Control (Endocrine Interactions), ed. J. Edwards, pp. 263-283. BIOS Scientific Publisher, Oxford, UK.
- WHITFIELD J.B., 1998 - *Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera*. - Annu. Rev. Entomol., 43: 129-151.
- WHITFIELD J.B., 2003 - *Phylogenetic insights into the evolution of parasitism in Hymenoptera*. - Adv. Parasitol., 54: 69-100.
- WOODLEY J.F., NAISBETT B., 1988 - *The potential of lectins for delaying the intestinal transit of drugs*. - Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 15: 125-126.
- YANG F.-L., LI X.-Z., ZHU F., LEI C.-L., 2009 - *Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. J. Agr. Food Chem., 57: 10156-10162.
- ZHANG M.I., TAN T., YUAN H., RUI C., 2003 - *Insecticidal and fungicidal activities of chitosan and oligo-chitosan*. - J. Bioactive Compatible Polym., 18: 391-400.

LE BIOTECNOLOGIE PER LA DIFESA DELLE PIANTE IN ACCORDO CON LA NUOVA DIRETTIVA UE 2009/128 SULL'USO SOSTENIBILE DEI PESTICIDI

MATTEO LORITO (*) - FELICE SCALA (**)

(*) Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II; - e-mail: lorito@unina.it

(**) Istituto CNR per la Protezione delle Piante, Via Università, 100, 80055 Portici, Italy.

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbiotici e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

Biotechnologies for crop protection according to the new EU directive 2009/128 on the sustainable use of pesticides

This paper summarizes the most applied or promising biotechnologies based on the use of microbial antagonists, or their extracts, for sustainable control of diseases caused by phytopathogens in Europe, also in the light of the new EU Directive 2009/128. List of fungal and bacterial antagonists, for which a large set of efficacy data has been collected in last decade, includes species of *Bacillus*, *Trichoderma*, *Coniothyrium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, etc. There is also evidence that their usefulness could be significantly improved by exploiting the potential of bioactive metabolites and synergistic mixtures of different microbes. The delayed expansion of the use of biopesticides products in Europe, as compared to other areas, is discussed. The implementation of the new EU directive 2009/128, with the expected strong reduction of the number of pesticides available for use, provides a great opportunity for bio-products to finally make a strong positive impact on the sustainability of the European farming system.

KEY WORDS: biopesticides, biofertilizers, biotechnology, directive EU2009/128, sustainable crop protection

LE BIOTECNOLOGIE MICROBICHE PIÙ AVANZATE DAL PUNTO VISTA APPLICATIVO

L'uso di microrganismi antagonisti per controllare fitopatogeni, nematodi ed erbe infestanti è cominciato oltre 50 anni fa, ed oggi sono disponibili diversi formulati a base di funghi o batteri antagonisti utilizzabili come biofitofarmaci (AL TOMARE e TRINGOVSKA, 2011; HARMAN G.E., 2011; LORITO *et al.*, 2010). Questi prodotti possono consistere di un singolo organismo o di una miscela di organismi che esplicano la loro attività attraverso complessi meccanismi d'azione.

Per raggiungere uno sviluppo commerciale, un ceppo antagonista deve soddisfare criteri di sicurezza riguardanti l'assenza di tossicità e l'incapacità di produrre effetti collaterali indesiderati. Inoltre esso si deve adattare all'ambiente e persistere in campo almeno durante una stagione produttiva. Il ceppo viene selezionato anche in base alla sua competenza per la rizosfera, al suo spettro d'azione contro i patogeni ed alla sua applicabilità ad un largo numero di colture (TUCCI *et al.*, 2011). Inoltre, il ceppo dovrebbe essere efficace in diverse aree geografiche, avere una certa stabilità genetica e biologica anche durante la conservazione, ed essere prodotto in modo

facile ed economico per rendere i costi competitivi rispetto a quelli dei pesticidi di sintesi.

Individuato il ceppo con le migliori caratteristiche, i passi successivi consistono nel produrre una biomassa sufficientemente stabile, anche in condizioni avverse, e sviluppare sistemi di applicazione che assicurino la crescita e l'attività antagonistica nei confronti dei fitopatogeni. Tutto questo richiede un approccio che prenda in considerazione l'uso degli antagonisti caso per caso, poiché non esistono soluzioni generali. Ogni fase del processo che porta alla produzione e all'applicazione di un formulato può essere cruciale: per esempio, lo scaling-up dalla produzione in laboratorio a quella industriale può dar luogo a seri problemi a causa di imprevedibili effetti di tipo biologico. In alcuni casi, infatti, i tempi più lunghi impiegati nella produzione su larga scala, possono portare ad un'alterazione dell'attività metabolica dell'antagonista, con una conseguente riduzione della sua performance nel biocontrollo. In altre situazioni, essendo gli ingredienti dei formulati organismi vivi, si possono verificare cambiamenti genetici e/o interazioni con microrganismi contaminanti che danno come risultato la produzione di un prodotto di qualità non soddisfacente.

I funghi antagonisti possono essere usati in diversi modi. In generale, la biomassa del fungo antagonista (cellule, micelio, spore) ottenuta attraverso l'uso di fermentatori, viene trattata ed incorporata in differenti matrici per la preparazione di formulati granulari, in polvere, liquidi, ecc. Diversi studi hanno messo in evidenza che l'efficacia del prodotto può dipendere dal tipo di formulazione e dalle modalità di somministrazione. Per controllare patogeni tellurici, ad esempio, si è visto che *Trichoderma* è più efficace quando è applicato in forma di spore germinanti contenute in sabbia, oppure incluso in sferette di alginato. *T. virens*, invece, in esperimenti di protezione contro il marciume basale causato da *Pythium*, è stato applicato a semi di cotone con l'aiuto di un adesivante di latex. Per controllare questa malattia i semi possono essere trattati con *T. harzianum* formulato sia in forma liquida come miscela contenente un adesivante acquoso e particolati solidi da spruzzare, sia come miscela contenente polisaccaridi e alcoli da usare come ricoprente.

Sono oggi disponibili sul mercato mondiale qualche centinaio di prodotti a base di batteri, funghi o lieviti antagonisti legalmente registrati ed utilizzabili anche in agricoltura biologica. Una larga parte (circa metà) di questi prodotti sono a base di *Trichoderma* o *Bacillus* (HERMOSA *et al.*, 2012; SHORESH *et al.*, 2010). Essi sono utili per la lotta biologica contro agenti di marciumi dell'apparato radicale, del colletto e della base del fusto di piante ortive, agenti di morie nei semenzai, di tracheofusariosi, di mal del piede dei cereali, di infezioni radicali di specie arboree da frutto, di muffa dell'uva e di colture ortive, e di moniliosi e marciumi acquosi di pomacee e drupacee.

Per la registrazione dei vari prodotti, bisogna acquisire informazioni sui loro meccanismi d'azione, effettuare prove di efficacia relative alle aree geografiche dei paesi in cui si intende registrare il prodotto e mettere a punto metodiche capaci di monitorare la produzione di eventuali metaboliti tossici, permettendo un'efficace valutazione degli eventuali rischi derivanti da un uso su larga scala. Oltre ai prodotti registrati, si vendono e si utilizzano ampiamente una varietà di bioprotettori, biostimolanti e biofertilizzanti non registrati a base di *Trichoderma* o altri antagonisti. La diffusione di questi prodotti è molto ampia, grazie anche alla necessità di ridurre l'applicazione di prodotti fitosanitari di sintesi o di ottenere la certificazione di prodotto proveniente da agricoltura biologica (HARMAN *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda la lotta biologica contro funghi e batteri fitopatogeni con prodotti a base di antagonisti batterici, la caso più eclatante è quello

del ceppo K84 di *A. radiobacter*, che però non risulta ancora registrato in Europa. Ceppi di *Pseudomonas syringae* possono essere impiegati contro *Penicillium expansum* su pere e mele, contro *Botrytis cinerea* su pere e uva, contro *Monilina fructicola* e *Rhizopus stolonifer* su pesche, contro *P. digitatum* su limoni, e come induttori di resistenza contro *Plasmopara viticola* e *Uncinula necator* su uva. *P. fluorescens* è efficace nel controllo di malattie causate soprattutto da funghi terricoli, mentre varie specie di *Bacillus* sono attive soprattutto sulla superficie fogliare e hanno l'utile caratteristica di formare spore sufficientemente resistenti da essere facilmente utilizzabili in formulati commerciali.

Oltre ai microrganismi antagonisti, si possono utilizzare anche molecole da essi derivati. Queste molecole possono agire contro i patogeni sia inibendone direttamente la crescita ed eventualmente causandone la morte, sia indirettamente, inducendo una risposta di difesa nella pianta. Ad esempio, gli enzimi degradativi prodotti dai funghi antagonisti hanno un ruolo chiave nel processo del biocontrollo, e possono rappresentare, specialmente se usati in combinazioni sinergiche, una opportunità per lo sviluppo di nuovi prodotti e strategie di difesa contro i funghi fitopatogeni (LORITO *et al.*, 1994, 1996). Essi hanno una spiccata capacità di sinergizzare l'effetto di fungicidi di sintesi appartenenti a diverse classi e, in particolare, l'effetto di composti azolici che alterano le membrane cellulari (LORITO *et al.*, 1994, 1996). Per questi motivi, le miscele enzimatiche possono essere utilizzate sia tal quali come fungicidi "biologici", sia come coadiuvanti di principi chimici di sintesi, permettendo di ridurre significativamente le concentrazioni di anticrittogamici chimici. Inoltre, l'azione degli enzimi degradativi della parete cellulare dei patogeni fungini e delle piante determina il rilascio di oligosaccaridi che possono innescare reazioni di difesa nella pianta (HANSON e HOWELL, 2004; LORITO *et al.*, 1994, 1996).

Isolati del genere *Trichoderma* possono produrre diverse molecole in grado di indurre resistenza nelle piante. Una di queste molecole è una xilanasi che induce una reazione di resistenza localizzata. Alcuni peptidi e proteine prodotti da *T. virens* inducono la biosintesi di fitolessine terpenoidi e attività perossidasi in piante di cotone (HANSON e HOWELL, 2004). Recentemente, è stato suggerito che ceppi di *T. harzianum* possiedono geni con funzione simile a quelli di avirulenza *Avr4* e *Avr9* trovati nel fungo patogeno del pomodoro *Cladosporium fulvum*, i cui prodotti inducono resistenza nelle piante che hanno i corrispondenti fattori di resistenza.

L'uso commerciale di metaboliti prodotti da microrganismi antagonisti, invece, è stato fino ad ora sostanzialmente limitato dai possibili effetti tossici che questi composti potrebbero avere sull'ambiente e sulla salute dell'uomo. Tuttavia, sono numerosi i prodotti bioattivi sintetizzati sia da funghi sia da batteri antagonisti, e che si stanno valutando come potenziali nuovi biopesticidi (VINALE *et al.*, 2012).

L'IMPATTO ATTESO DELLA NUOVA DIRETTIVA UE SULL'IMPLEMENTAZIONE DELLA LOTTA INTEGRATA

L'uso commerciale degli agenti di lotta biologica come ingredienti attivi di formulazioni biopesticide o biofertilizzanti, sottoforma di agenti vivi, estratti o molecole bioattive, si è generalmente diffuso in Europa meno che in altre aree geografiche. Per esempio, applicazioni su scala molto più ampia si registrano in America centrale e meridionale, India, Cina ecc., dove centinaia di prodotti sono ufficialmente autorizzati per l'uso agricolo e disponibili sul mercato. Il ritardato sviluppo di queste tecnologie nel contesto Europeo si è verificato nonostante i numerosi casi positivi e ben documentati di prodotti a base di ceppi selezionati di *Bacillus*, *Trichoderma*, *Coniothyrium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, etc. utilizzati con successo per almeno un decennio in una varietà di condizioni applicative.

Comunque, la nuova direttiva Europea sull'implementazione della gestione integrata della lotta alle avversità biotiche e abiotiche cambierà radicalmente questa situazione, realizzando condizioni tali da permettere ai prodotti migliori la conquista di porzioni di mercato molto significative. Tra l'altro, il passaggio dalla lotta "convenzionale" a quella "integrata e biologica", che dovrà essere completato entro i prossimi 24 mesi, corrisponderà ad una perdita stimata di circa la metà dei principi attivi utilizzati oggi nei più comuni agro-farmaci.

Ovviamente, questa sorta di nuova rivoluzione "verde" solleva importanti interrogativi. Ci si chiede ad esempio se siamo o no pronti dal punto di vista tecnico-scientifico a cogliere questa opportunità di rinnovamento della pratica agricola europea? Questi prodotti sono veramente pronti ad abbandonare la loro nicchia per giocare un ruolo molto più importante nel sistema di produzione primario della UE? Quanto sono vicini, o quanto sono lontani, dagli alti livelli efficacia, spesso ottenuti contro una varietà di patogeni, tipici degli agrofarmaci convenzionali? Le risposte a queste domande sono complesse, ancora oggetto

di dibattito e saranno definite solo nei prossimi anni. Certamente il livello di conoscenza scientifica di base, di sviluppo tecnico e di esperienza applicativa per numerosi agrobiofarmaci non è mai stato così elevato, anche grazie a importanti avanzamenti realizzati più o meno nell'ultimo quinquennio. Inoltre, è interessante notare come si sia attivato un notevole interesse della grandi Aziende multinazionali tradizionalmente produttrici di pesticidi sintetici nell'incorporare e creare partenariati con piccole e medie imprese il cui "core business" è nel settore della lotta biologica in agricoltura.

RIASSUNTO

Questo lavoro riassume le biotecnologie più applicate e promettenti basate sull'uso di antagonisti microbici, o dei loro estratti, per la lotta sostenibile alle malattie causate da agenti fitopatogeni in Europa, anche alla luce della nuova direttiva UE 2009/128. L'elenco di antagonisti batterici e fungini, per i quali è conosciuta un'ampia casistica di applicazioni con risultati positivi nell'ultimo decennio include specie di *Bacillus*, *Trichoderma*, *Coniothyrium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, ecc. Ci sono anche numerose evidenze che l'utilità di questi microbi può essere notevolmente aumentata con l'uso dei loro metaboliti o di miscele sinergiche tra diversi principi attivi. Si discute anche la ritardata espansione dell'applicazione di questi agenti in Europa rispetto ad altre aree geografiche. Gli effetti della nuova direttiva UE, che tra l'altro causerà una drastica riduzione del numero di agrofarmaci a disposizione, sull'attuale situazione rappresenta una grande opportunità per questi prodotti biologici di avere finalmente un forte impatto positivo sulla sostenibilità della pratica agricola in Europa.

BIBLIOGRAFIA

- ALDOMARE C, TRINGOVSKA I., 2011 – *Beneficial Soil Microorganisms, an Ecological Alternative for Soil Fertility Management*. - Gen., Biof. Loc. Farm. Sys., 7, 161-214.
- HANSON L.E., HOWELL C.R., 2004 – *Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of Trichoderma virens*. - Phytopath., 94:171-176.
- HARMAN, G.E., HOWELL C.R., VITERBO A., LORITO M., 2004 – *Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts*. - Nat. Rev. Microbiol., 2: 43-56.
- HARMAN G.E., 2011- *Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity*. - New Phytol., 189: 647-649.
- HERMOSA, R., VITERBO A., CHET I., MONTE E., 2012 – *Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes*. - Microbiol., 158:17-25.
- LORITO M., PETERBAUER C., HAYES C.K., HARMAN G.E., 1994 – *Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination*. - Microbiol., 140:623-629.
- LORITO M., WOO S.L., D'AMBROSIO M., HARMAN G.E., HAYES C.K., KUBICEK C.P., SCALA F., 1996 – *Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and*

membrane affecting compounds. - Mol. Plant-Micr. Interac., 9: 206-213.

LORITO M, WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E., 2010 – *Translational research on Trichoderma: from ‘omics to the field.* - Ann. Rev. Phytopathol., 48: 395-417.

SHORESH M., HARMAN G.E., MASTOURI F., 2010 – *Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents.* - Ann. Rev. Phytopathol., 48: 21-43.

TUCCI M., RUOCCO M., De MASI L., De PALMA M., LORITO M., 2011 – *The beneficial effect of Trichoderma spp. on tomato is modulated by the plant genotype.* - Mol. Plant Pathol., 12: 341-354.

VINALE F., SIVASITHAMPARAM K., GHISALBERTI E.L., RUOCCO M., WOO S.L., LORITO M., 2012 – *Trichoderma secondary metabolites that affect plant metabolism.* - Nat. Prod. Comm., 7: 1545-1550.

I MICRORGANISMI SIMBIONTI: UNA RISORSA PER IL CONTROLLO DI AGENTI PATOGENI E INSETTI DANNOSI

ALBERTO ALMA (*) - ELENA GONELLA (*)

(*) DISAFA, Università degli Studi di Torino, via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO); alberto.alma@unito.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbiotici e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

Microbial symbionts: a resource for pest and pathogen control

Microbial symbioses in insects are widely distributed in every order. Different microbiotas play a variety of roles in their hosts, with peculiar features for each kind of associations. Symbionts may be obligate or facultative for insects; they may have a nutritional role, or can protect against adversities, or may manipulate the hosts' reproduction. The influence of microbial symbionts in insects' biology, physiology, behaviour and evolution could be considered as a resource for the management of insect-related problems. For this purpose, suitable microbial agents to be exploited for symbiotic control must be identified. In agriculture, interesting control applications have been proposed against noxious insects, such as the Mediterranean fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin), or against insect-transmitted pathogens, like the agent of Pierce Disease of grapevine, vectored by the sharpshooter *Homalodisca vitripennis* (Germar). Microbial symbionts of insects may represent promising control tools also in other model systems such as phytoplasma vectors, honeybee and their pathogens, or emerging pests like *Drosophila suzukii* Matsumura.

KEY WORDS: symbiotic bacteria, symbiotic control, insect vectors, fruit flies, honeybee health.

INTRODUZIONE

I microrganismi simbiotici degli insetti

Tipologie di simbiotici

Le associazioni simbiotiche tra microrganismi e insetti sono molto diffuse, dato che in quasi tutti gli ordini che compongono questo gruppo di artropodi sono presenti simbiosi di diversi tipi con organismi differenti. Le interazioni hanno un profondo impatto sull'ospite, e sono in grado di influenzarne profondamente la biologia, la fisiologia, il comportamento e l'evoluzione. L'importanza delle simbiosi microbiche negli insetti deriva dalla grande varietà che caratterizza le tipologie di simbiosi, ottimizzate nel corso del processo evolutivo dei diversi taxa, secondo le peculiarità dei singoli gruppi. Diverse categorie di simbiotici sono state descritte sulla base delle caratteristiche della relazione tra microrganismi e ospite.

La categoria dei simbiotici primari comprende microrganismi obbligati che svolgono ruoli essenziali per la vita dell'ospite, e che risiedono in cellule specializzate dette batteriociti organizzate in corpi chiamati batteriomi. Le associazioni che coinvolgono simbiotici primari sono generalmente molto antiche, e di conseguenza questi microrganismi sono fortemente coevoluti con l'ospite, fino al punto di avere un repertorio genetico molto

ridotto, che permette loro di svolgere solamente le attività correlate alla relazione simbiotica. I simbiotici primari sono tipicamente associati ad artropodi che si nutrono su diete sbilanciate, e che quindi necessitano di apporti nutrizionali aggiuntivi forniti dai microrganismi.

I simbiotici primari finora conosciuti appartengono ai phyla dei Proteobatteri e dei Bacteroidetes. Uno dei modelli più studiati è quello rappresentato dagli afidi e dal Gammaproteobatterio *Buchnera aphidicola*. Questo simbiotico primario risiede in batteriociti all'interno di un batterioma associato all'intestino medio, e viene trasmesso verticalmente alla progenie (HEDDI & GROSS, 2011). *Buchnera* ha subito un netto processo di coevoluzione con gli insetti che la ospitano, dato che questa simbiosi è stata stabilita circa 200 milioni di anni fa (BAUMANN, 2005). Questo processo ha portato, come per tutti i simbiotici primari, a un'estrema riduzione delle dimensioni del genoma del simbiotico (425-650 kb), e a un aumento della percentuale di AT nella sua composizione rispetto ad altri batteri (GIL *et al.*, 2002; HEDDI & GROSS, 2011). Il processo di riduzione genomica ha condotto all'eliminazione dei geni divenuti inutili in quanto già presenti nell'ambiente costituito dall'insetto (SHIGENOBU *et al.*, 2000), oppure dei geni tipici dei batteri ambientali, come quelli codificanti per la costruzione di strut-

ture della parete cellulare, o quelli coinvolti nella riparazione del DNA (DALE *et al.*, 2003). Al contrario, i geni coinvolti nella sintesi di amminoacidi essenziali sono stati mantenuti nel genoma di *Buchnera*, in quanto il simbionte è responsabile del loro rifornimento all'ospite, che non li ottiene direttamente dalla dieta (LIADOUZE *et al.*, 1996). Inoltre, l'assenza di regolatori o di attenuazione della trascrizione nella biosintesi di questi amminoacidi consente una sovrapproduzione, rispetto ai fabbisogni del simbionte, dei nutrienti che devono essere forniti all'ospite, al contrario di quanto avviene nei batteri non obbligati, nei quali le vie biosintetiche sono ridotte o interrotte alla presenza del prodotto finale (BAUMANN, 2005).

Un altro importante simbionte primario è 'Candidatus Carsonella ruddii', Gammaproteobatterio associato a diverse specie di psille. Questi insetti, che si nutrono nel floema di diverse piante, specialmente dicotiledoni arboree, presentano un batterioma con struttura variabile, spesso caratterizzato da un sincizio multinucleato al cui interno si trovano batteriociti uninucleati contenenti il simbionte. *Carsonella* è tra i batteri con il genoma più ridotto (160kb) e con il minor contenuto in GC (16,5%) (NAKABACHI *et al.*, 2006). Lo studio del genoma di questo simbionte ha evidenziato la mancanza di diversi geni considerati essenziali per la sopravvivenza della cellula batterica, ridisegnando le conoscenze in merito al repertorio genico minimo per un procariote (MOYA *et al.*, 2009).

Un ulteriore esempio di simbionte primario legato a insetti floemomizi è dato dal Gammaproteobatterio 'Ca. Portiera aleyrodidarum' associato agli aleirodidi. *Portiera* è contenuta in batteriomi accoppiati, da tondeggianti a ovali, generalmente di colore arancio. Una peculiarità di questa simbiosi è la modalità di trasmissione verticale: mentre nella maggior parte degli sternorinchi i simbionti lasciano i batteriociti per penetrare nelle cellule germinali, negli aleirodidi gli interi batteriociti migrano negli ovari penetrando nelle uova. Anche in questo caso, l'antichità dell'associazione tra i due organismi ha condotto ad una stretta coevoluzione, che ha permesso a *Portiera* di costituire un gruppo monofiletico all'interno dei Gammaproteobatteri, separato anche da altri simbionti primari (BAUMANN, 2005).

I simbionti primari sono necessari anche per la sopravvivenza degli pseudococcidi. Questi insetti contengono il Betaproteobatterio 'Ca. Tremblaya princeps' all'interno di un singolo batterioma composto di batteriociti di grandi dimensioni. La peculiarità di questo simbionte è la sua capacità di contenere, a sua volta, un simbionte secondario riconducibile ai Gammaproteobatteri (VON DOHLEN *et*

al., 2001), rappresentando dunque l'unico modello finora noto di endosimbiosi tra due procarioti. Mentre le caratteristiche genetiche di *Tremblaya* indicano una stretta coevoluzione con gli ospiti, non si osserva per il Gammaproteobatterio una congruenza filogenetica con l'insetto tale da giustificare un processo coevolutivo. Queste evidenze suggeriscono che, in diverse specie di pseudococcidi, ceppi differenti di *Tremblaya* siano stati infettati da simbionti secondari divergenti, e che la trasmissione unitaria delle varie coppie di simbionti abbia condotto a fenomeni di cospeciazione (VON DOHLEN *et al.*, 2001; BAUMANN, 2005). Le caratteristiche del genoma di *Tremblaya* sono diverse da quelle degli altri simbionti primari. In particolare, il genoma di *Tremblaya* presenta un relativamente elevato contenuto in GC e due copie dell'operone rRNA (BAUMANN, 2005).

Tra gli insetti che si nutrono della linfa delle piante, gli achenorinchi rappresentano un modello di particolare interesse in relazione allo sviluppo delle associazioni con simbionti primari, che in nessun altro gruppo sono così complesse e articolate. In molti casi, infatti, più simbionti primari hanno subito una coevoluzione congiunta in uno stesso ospite, e la riduzione genomica derivante da questo processo ha condotto a un'interdipendenza tra microrganismi, che forniscono fattori complementari concorrendo al rifornimento di nutrienti. Il Bacteroidetes simbionte primario 'Ca. Sulcia muelleri' è diffuso in achenorinchi riconducibili alle superfamiglie Fulgoroidea, Cicadoidea, Cercopoidea e Membracoidea (MORAN *et al.*, 2005a) (Fig. 1). Questo simbionte è stato riscontrato essere deputato al rifornimento all'ospite in amminoacidi essenziali, (WU *et al.*, 2006). Tuttavia *Sulcia*, la cui associazione con gli ospiti è tra le più antiche finora conosciute (250 milioni di anni), e il cui genoma è tra i più ridotti (circa 250 kb), ha perso a causa di una forte erosione genomica la capacità di produrre diversi amminoacidi necessari agli insetti, come la metionina e l'istidina. Attraverso fenomeni di convergenza evolutiva, i diversi *taxa* all'interno degli achenorinchi hanno dunque sviluppato associazioni con altri simbionti primari diversi tra loro, presenti in concomitanza con *Sulcia*, ed in grado di fornire attraverso vie metaboliche diverse tra loro le sostanze mancanti. Nei cicadellidi cicadellini il Gammaproteobatterio 'Ca. Baumannia cicadellinicola' funge da simbionte comprimario insieme a *Sulcia*; i cicadoidei sono confettati da *Sulcia* e dall'afaproteobatterio 'Ca. Hodgkinia cicadicola'; nei cercopidi il simbionte complementare a *Sulcia* è il Betaproteobatterio 'Ca. Zinderia insecticola' (MCCUTCHEON & MORAN, 2010). Il betaproteobatterio 'Ca. Vidania fulgoro-

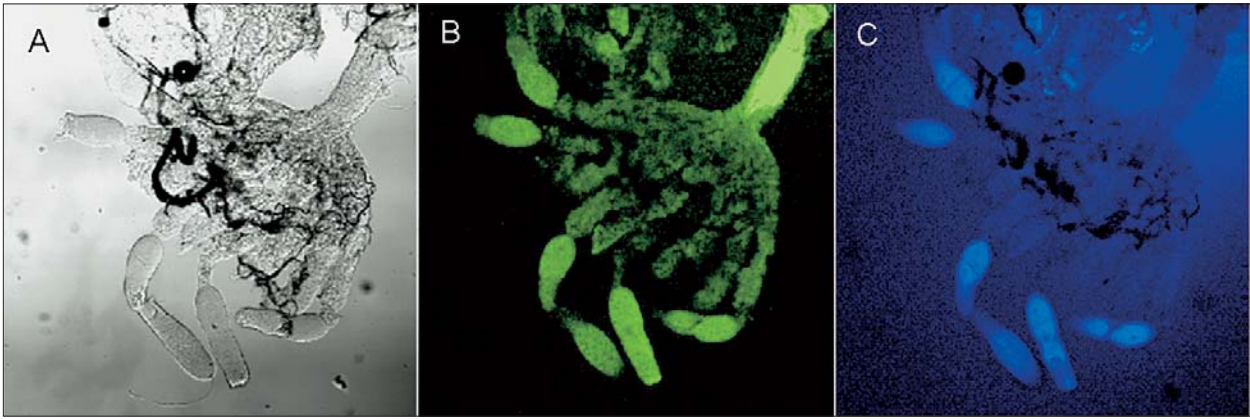


Figura 1

Ovario del cixiide *Hyalesthes obsoletus* visualizzato mediante microscopio a contrasto interferenziale (A). L'organo risulta fortemente colonizzato da batteri, come riscontrato tramite ibridazione *in situ* in fluorescenza (FISH) effettuata con una sonda eubatterica (B). Molti dei batteri visualizzati sono riconducibili al simbiote primario '*Candidatus Sulcia muelleri*', come evidenziato dalla FISH realizzata con sonde *Sulcia*-specifiche (C) (GONELLA *et al.*, 2011).

deae', riscontrato in associazione con il Bacteroidetes in diversi cixiidi, potrebbe essere il simbiote co-primario in questa famiglia (GONELLA *et al.*, 2011).

Oltre agli insetti che si nutrono strettamente di linfa, anche altri fitofagi come i coleotteri curculionoidi sono legati a simbioti primari. Diverse specie in questa superfamiglia sono state descritte ospitare Gammaproteobatteri del genere '*Ca. Nardonella*' in batteriomi situati accanto ai tessuti intestinali e negli oociti. Questi simbioti sono riconducibili a più raggruppamenti filogenetici, con contenuti in GC e caratteristiche evolutive differenti, ed acquisiti dall'ospite in epoche diverse (LEFÈVRE *et al.*, 2004).

Gli artropodi che si nutrono di sangue rappresentano un ulteriore modello nell'ambito delle associazioni con simbioti primari in grado di fornire nutrienti mancanti nella dieta naturale dell'ospite. Un importante esempio è costituito dalle mosche Tsetse del genere *Glossina*, che ospita il simbiote primario '*Ca. Wigglesworthia glossinidia*'. Questo Gammaproteobatterio può avere una localizzazione sia intra- sia extracellulare, dato che occupa sia il citosol di batteriociti che compongono batteriomi localizzati accanto all'intestino anteriore, sia il lume delle ghiandole lattifere (ATTARDO *et al.*, 2008). *Wigglesworthia* è responsabile di fornire all'ospite vitamine del gruppo B e cofattori, mancanti nel pasto di sangue; la sua eliminazione tramite somministrazione di antibiotici comporta nella mosca una pesante riduzione della fertilità (HEDDI & GROSS, 2011). Inoltre, questo simbiote, influenzando la risposta immunitaria dell'ospite, è in grado di rendere la mosca resistente al tripanosoma agente della malattia del sonno (WEISS & AKSOY, 2011).

I pidocchi del genere *Pediculus* ospitano simbioti primari in grado di fornire i nutrienti mancanti nella loro dieta, composta unicamente da sangue umano. Questi simbioti, situati in batteriociti nell'intestino medio, sono trasmessi verticalmente infiltrandosi negli oociti durante il loro sviluppo. Il simbiote primario dei pidocchi umani è stato denominato '*Ca. Riesia pediculicola*', e diverge filogeneticamente da quello dei pidocchi del genere *Pedicinus*, parassiti delle scimmie non antropomorfe, chiamato '*Ca. Puchtella pedicophilus*' (SASAKI-FUKATSU *et al.*, 2006; FUKATSU *et al.*, 2009).

Non solamente gli insetti che si nutrono su diete sbilanciate, come quelli fino ad ora elencati, sono associati a simbioti primari. Un esempio è il caso delle formiche della tribù Camponotini, caratterizzate da una dieta variegata, che ospitano simbioti del genere '*Ca. Blochmannia*'. Questi simbioti, che occupano batteriociti non organizzati in un vero e proprio batterioma, ma intercalati tra le cellule epiteliali dell'intestino medio e all'interno degli oociti, forniscono all'ospite diverse vitamine, cofattori e amminoacidi. Il ruolo nutrizionale di *Blochmannia* in un insetto onnivoro può essere spiegato dal fatto che, in alcune parti dell'anno o in alcuni dei diversi ambienti colonizzati da queste formiche, le risorse alimentari sono particolarmente scarse in alcuni nutrienti, rendendo dunque necessario l'apporto dato dai simbioti.

Una categoria di simbioti contrapposta a quelli primari è rappresentata dai simbioti secondari, che non sono strettamente necessari per la sopravvivenza del proprio ospite. Questi simbioti sono più simili ai microrganismi ambientali o ai patogeni, essendo facoltativi, spesso extracellulari e principalmente trasmessi orizzontalmente tra

popolazioni e specie diverse di insetti, e dunque non coevoluti con gli ospiti. Per questo motivo le interazioni con simbionti secondari sono spesso meno facilmente catalogabili rispetto a quelle con i simbionti primari, e non sempre il ruolo del microorganismo nell'ospite è chiaro. Tuttavia, la presenza di associazioni molto frequenti e mantenute nelle generazioni dell'ospite suggerisce funzioni importanti nel miglioramento della fitness dell'artropode. Alcuni dei simbionti secondari tra i più studiati sono diversi Gammaproteobatteri associati ad afidi, aleirodidi e psille, vale a dire *Regiella insecticola*, *Hamiltonella defensa* e *Serratia symbiotica* (MORAN *et al.*, 2005b). Questi simbionti sono comunemente ritrovati sia nell'emocele dell'insetto, sia all'interno di cellule che formano una guaina che circonda i batteriociti (FUKATSU & ISHIKAWA, 1998). La loro trasmissione è prevalentemente verticale, sebbene un'occasionale trasmissione orizzontale, sia tramite l'alimentazione sia mediante parassitoidi, garantisca la diffusione in ospiti diversi (SANDSTROM *et al.*, 2001). I loro genomi sono ridotti rispetto a quelli dei batteri ambientali strettamente imparentati, e così come osservato per i simbionti primari hanno basse percentuali di GC; tuttavia hanno dimensioni maggiori di quelli dei simbionti primari, e contengono geni persi da questi ultimi, come quelli collegati all'invasione dei tessuti dell'ospite. *R. insecticola*, *H. defensa* e *S. symbiotica* negli afidi sono coinvolti nella scelta delle piante ospiti, nella resistenza agli antagonisti e nella tolleranza alle alte temperature, per quanto molti dei meccanismi alla base di questi processi non sono noti (WILKINSON, 2011).

Un altro gruppo di simbionti secondari di emergente interesse è quello dei batteri acetici, appartenenti alla famiglia Acetobacteriaceae, descritti in associazione con insetti di numerosi ordini, come imenotteri, ditteri ed emitteri. Questi microrganismi, comunemente isolati da piante, fiori e frutti, sono associati al tratto intestinale di insetti che si nutrono su diete a base zuccherina. Il loro intestino, infatti, avendo regioni a pH acido, ambiente aerobico e alta presenza di zuccheri, che i batteri acetici sono in grado di ossidare in acido acetico, rappresenta una nicchia ottimale per questi microrganismi. I principali batteri acetici descritti come simbionti intestinali di insetti appartengono ai generi *Gluconobacter*, *Glocunoacetobacter* e *Acetobacter*, individuati in *Apis mellifera* L., in *Drosophila* spp., in *Bactrocera oleae* (Gmelin) e in *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell); e *Asaia*, osservata in zanzare dei generi *Anopheles* e *Aedes*, nell'imenottero *Marietta leopordiana* Motschulsky, nel lepidottero *Pieris rapae* L. e nell'emittero *Scaphoideus titanus* Ball (CROTTI *et al.*, 2011). La funzione dei batteri acetici

come simbionti degli insetti è in gran parte ignota. La scoperta che questi microrganismi, come riscontrato in *Drosophila melanogaster* Meigen, hanno un ruolo nella modulazione dell'omeostasi intestinale basata sull'interazione con il sistema immunitario innato del moscerino della frutta (RYU *et al.*, 2008), suggerisce l'importanza dei batteri acetici simbionti nella stimolazione immunitaria, e quindi nel mantenimento di uno stato di buona salute per l'insetto (CROTTI *et al.*, 2011).

Oltre a simbionti primari e secondari, un ulteriore gruppo di microrganismi che svolge un ruolo di estremo interesse negli insetti, così come in altri artropodi, è quello dei manipolatori riproduttivi.

L'attività di questi simbionti è mirata all'aumento della produzione di femmine infette a discapito di quella maschile o di femmine non infette. In questo modo i manipolatori riproduttivi, che sono trasmessi maternalmente, sono in grado di diffondersi nelle popolazioni degli ospiti. Le strategie attraverso cui questi microrganismi modificano la riproduzione degli insetti che li ospitano sono molteplici. Attraverso l'induzione di incompatibilità citoplasmatica, gli incroci tra maschi infetti e femmine non infette non danno luogo a progenie, mentre gli incroci tra maschi non infetti e femmine infette hanno successo. Gli induttori di incompatibilità agiscono tramite fattori citoplasmatici che nei maschi provocano una modificazione dei cromosomi presenti negli spermatozoi. Solo nelle uova delle femmine infette sono presenti i fattori che permettono il ripristino dei cromosomi spermatici, consentendo il normale sviluppo di un embrione diploide. Oltre all'induzione di incompatibilità citoplasmatica, i manipolatori riproduttivi possono operare sbilanciando la *sex ratio* delle popolazioni degli ospiti a favore delle femmine, tramite male killing, che consiste nell'uccisione della progenie maschile durante l'embriogenesi, femminizzazione, che comporta nella progenie lo sviluppo di fenotipo femminile da parte di individui con genotipo maschile, o induzione di partenogenesi.

I microrganismi capaci di alterare la riproduzione dei propri ospiti sono estremamente diffusi negli artropodi, grazie alla loro capacità di essere trasmessi orizzontalmente (ad esempio tramite parassitoidi) oltre che verticalmente alla progenie. I diversi meccanismi di alterazione riproduttiva attuati da questi simbionti hanno l'obiettivo di mantenere l'infezione nel tempo.

Il principale manipolatore riproduttivo è l'Alfaproteobatterio *Wolbachia pipientis*. *Wolbachia* infetta i due terzi delle specie di insetti, nonché numerosi altri artropodi (come acari, ragni, scorpioni e crostacei) e nematodi (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Questo simbionte si localizza principal-

mente nelle gonadi femminili all'interno degli oociti, dai quali viene trasmesso maternalmente, tuttavia è stato riscontrato anche in numerosi altri tessuti dei suoi ospiti, come le fibre muscolari, l'intestino, i tessuti cerebrali, i corpi grassi e l'emolinfa (SCHNEIDER *et al.*, 2011). Lo stesso individuo può essere colonizzato da più ceppi diversi di *Wolbachia* (VAUTRIN *et al.*, 2007), oppure da *Wolbachia* e altre specie di manipolatori riproduttivi (ENIGL & SCHAUSBERGER, 2007; GOTTLIEB *et al.*, 2008), anche se la natura di un'eventuale interazione tra batteri diversi è tuttora sconosciuta. L'azione di alterazione riproduttiva è espressa da parte di questo simbionte mediante tutte le diverse strategie sopra descritte. L'induzione di incompatibilità citoplasmatica è la modalità di manipolazione più frequentemente riscontrata, ed è stata descritta in diversi ordini di insetti, oltre che in alcuni aracnidi e isopodi (WERREN *et al.*, 2008). L'induzione di partenogenesi telitoca è meno comune, ed è stata descritta fino ad ora solamente in specie con sviluppo arrenotoco, in cui i maschi si sviluppano da uova non fecondate, come imenotteri e tripidi, oltre ad alcuni acari (STOUTHAMER *et al.*, 1990; WEEKS & BREEUWER, 2001; ARAKAKI *et al.*, 2001). La femminizzazione, in un primo momento descritta solamente negli isopodi, è stata solo di recente documentata in insetti. All'interno di questa classe, la femminizzazione è stata osservata solamente in una specie di lepidotteri (*Eurema hecabe* L.) e in un emittero (*Zyginidia pullula* Boheman) (NEGRI *et al.*, 2006). D'altro canto, il fenomeno del *male killing* è stato descritto in un numero maggiore di insetti, appartenenti a tre diversi ordini (coleotteri, ditteri e lepidotteri), oltre che negli pseudoscorpioni (WERREN *et al.*, 2008).

Un altro importante simbionte agente di distur-

sioni riproduttive è il Bacteroidetes '*Ca. Cardinium hertigi*'. Anche questo batterio è ampiamente distribuito in vari ordini di insetti e in diversi altri artropodi e nematodi, tuttavia nella maggior parte degli ospiti riconosciuti il suo ruolo non è stato ancora chiarito. Alterazioni riproduttive dovute a *Cardinium* sono state descritte per *Encarsia pergandiella* Howard (induzione di partenogenesi), *E. hispida* DeSantis e *Brevipalpus* spp. (femminizzazione), *Bryobia sarothamni* Geijskes e *Eotetranychus suginamensis* (Yokoyama) (induzione di incompatibilità citoplasmatica) (BREEUWER *et al.*, 2011). Così come osservato per *Wolbachia*, anche *Cardinium* è localizzato principalmente nei tessuti riproduttivi, ed in particolare all'interno del follicolo e delle cellule nutrici, tuttavia è stato osservato nei tessuti epidermici e nervosi, nei corpi grassi, nelle ghiandole salivari e in specifici batteriociti (BREEUWER *et al.*, 2011) (Fig. 2). Un aspetto di particolare interesse tuttora da chiarire è se i meccanismi alla base delle alterazioni riproduttive causate da *Cardinium* e *Wolbachia* siano gli stessi, regolati dagli stessi gruppi di geni, oppure se lo stesso fenotipo sia indotto da vie diverse evolutesi separatamente.

Oltre ai più diffusi manipolatori sessuali *Wolbachia* e *Cardinium*, anche alcuni ceppi di altri batteri hanno sviluppato la capacità di alterare la riproduzione dei loro ospiti. Alcuni esempi sono rappresentati da ceppi dell'Alfaproteobatterio *Rickettsia*, induttori di partenogenesi in alcuni imenotteri e agenti di male killing in coleotteri (GOTTLIEB *et al.*, 2011), e del Mollicutes *Spiroplasma*, causa di male killing in *Drosophila* spp. (MONTENEGRO *et al.*, 2005), oppure il Gammaproteobatterio *Arsenophobus nasoniae*, agente di male killing in *Nasonia* spp. (SKINNER, 1985).

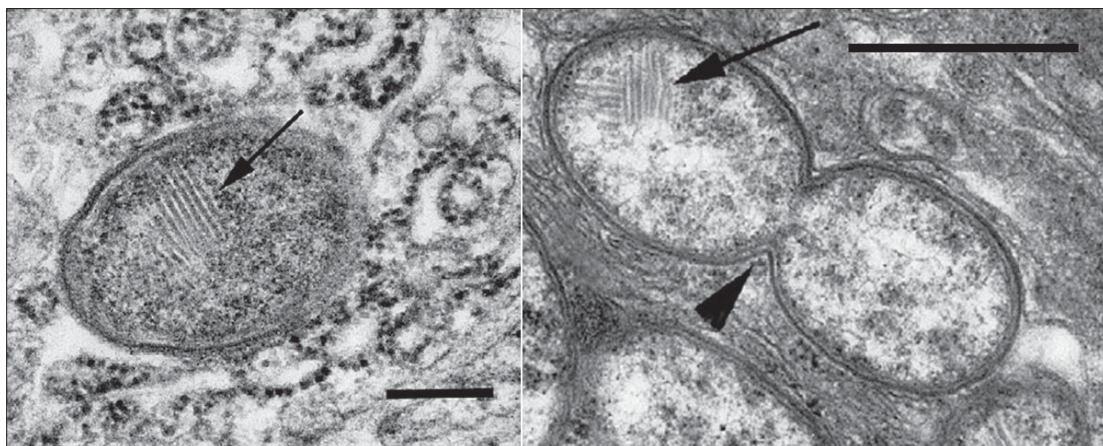


Figura 2

Immagini di microscopia elettronica a trasmissione raffiguranti il manipolatore riproduttivo '*Candidatus Cardinium hertigi*' nel cicadellide *Scaphoideus titanus*, all'interno dei corpi grassi (sinistra, barra = 0,8 μ m) e degli ovari (destra, barra = 0,8 μ m). Le frecce indicano il caratteristico *marker* morfologico che permette di identificare il genere *Cardinium*; la punta di freccia nell'immagine di destra mostra la presenza di cellule in divisione nei tessuti ovarici (SACCHI *et al.*, 2008).

Influenza dei simbioti sulla biologia degli insetti ospiti

I microrganismi simbioti esercitano pesanti effetti su diversi aspetti della vita dei loro insetti ospiti, come la fisiologia, l'ecologia, il comportamento alimentare o riproduttivo. L'influenza dei simbioti sugli ospiti può rendere la simbiosi obbligata, come nel caso dei simbioti primari, in conseguenza a lunghi processi coevolutivi. Tuttavia, anche nel caso dei simbioti facoltativi, il miglioramento della fitness degli ospiti o l'impedimento dello sviluppo per gli individui non infetti rappresentano la chiave per il mantenimento dell'associazione nel tempo. Un'attenzione particolare va posta agli effetti dei simbioti sugli insetti dannosi, a causa dell'effetto che questi possono avere sulla capacità invasiva dell'ospite (FELDHAAR, 2011).

Una funzione molto importante svolta da molti simbioti microbici degli insetti è il rifornimento di sostanze nutritive che non vengono diversamente acquisite dall'ospite, come ad esempio accade nel caso degli insetti che si nutrono su substrati poveri di determinate sostanze. In questi artropodi, i simbioti possono fornire aminoacidi essenziali, steroli o vitamine fondamentali. Altri microrganismi simbioti sono deputati alla demolizione di substrati complessi, come la cellulosa, o alla detossificazione da composti secondari nocivi presenti nei substrati alimentari (DOUGLAS, 2009). Grazie all'apporto nutrizionale aggiuntivo fornito dai microrganismi agli insetti, questi ottengono allargamento della propria gamma di substrati di alimentazione, potendo dunque colonizzare anche nicchie ecologiche povere di fonti alimentari ed ampliando la propria diffusione (DOUGLAS, 2009).

Quando non forniscono vantaggi nutrizionali, i microrganismi simbioti possono contribuire al miglioramento della fitness dell'ospite, attraverso la difesa da patogeni e parassitoidi, (OLIVER *et al.*, 2005), permettendo l'adattamento a stress abiotici (FELDHAAR, 2011), o tramite il mantenimento dell'omeostasi immunitaria (CROTTI *et al.*, 2011). Anche in questo caso l'influenza sull'ecologia dell'ospite può essere netta: la difesa da nemici naturali può condurre a una maggiore presenza di determinate specie in un ambiente a discapito di altre; la resistenza a stress abiotici come le alte temperature può condizionare la capacità degli insetti di sopravvivere in ambienti con temperature diverse (FELDHAAR, 2011); la stimolazione delle difese immunitarie, oltre a proteggere l'ospite da agenti patogeni, portando a una sua teorica proliferazione, può influenzare la capacità degli insetti vettori di microrganismi agenti di malattia di trasmettere questi patogeni a piante o animali (WEISS & AKSOY, 2011).

Anche i manipolatori della riproduzione influenzano pesantemente i propri ospiti. L'impatto sulla riproduzione comporta effetti ecologici ed evolutivi, isolando riproduttivamente popolazioni diverse e quindi contribuendo alla speciazione, diminuendo la diversità genetica delle linee infette, e riducendo le dimensioni delle popolazioni di insetti ospiti (FELDHAAR, 2011).

POTENZIALITÀ APPLICATIVE DEI SIMBIOTI DEGLI INSETTI

Gestione dei simbioti e controllo simbiotico

La conoscenza delle relazioni tra gli insetti e i microrganismi simbioti a essi associati può far luce su alcuni dei meccanismi alla base della vita di questi artropodi. Alla luce delle conoscenze acquisite negli ultimi anni sulle simbiosi microbiche, la gestione dell'entomofauna per la difesa delle piante e delle produzioni agro-alimentari, o per scopi legati alla salute pubblica, può essere effettuata tenendo in considerazione la complessità del sistema-insetto, dove l'insieme degli organismi che interagiscono nella simbiosi costituisce un super-individuo, definito olobionte (ROSEMBERG & ZILBER-ROSEMBERG, 2011). Gli attori microbici all'interno dell'olobionte possono essere impiegati seguendo un approccio chiamato Gestione della Risorsa Microbica (Microbial Resource Management, MRM) (VERSTRAETE, 2007). Questo approccio comporta strategie volte alla risoluzione di problemi pratici di varia natura presenti in un determinato ambiente grazie allo sfruttamento delle attività biologiche svolte dai microrganismi che vi risiedono. Fino a ora il MRM è stato impiegato con successo in vari ecosistemi, per risolvere problematiche ambientali o sanitarie, come nel caso della gestione delle acque reflue o della prebiotica umana. L'applicazione di questo metodo per contrastare problematiche correlate agli insetti può fornire promettenti risultati, per il controllo di agenti dannosi o per la protezione di insetti utili da malattie e stress (CROTTI *et al.*, 2012). Il MRM può essere sviluppato tramite la creazione di protocolli di lotta, secondo la strategia detta Controllo Simbiotico (CS). L'uso dei simbioti come agenti di controllo può essere indirizzato alla lotta diretta ad insetti dannosi, oppure al contenimento di patogeni di piante o animali trasmessi da vettori. L'attività di controllo può essere basata sull'espressione da parte dei simbioti di fattori antagonisti, oppure sullo sbilanciamento delle popolazioni ad opera di manipolatori riproduttivi, o ancora sulla competizione tra simbioti e patogeni nel corpo dell'insetto vettore.

I microrganismi in grado di svolgere un'attività di

controllo devono essere selezionati all'interno della naturale comunità microbica residente nell'insetto bersaglio (ALMA *et al.*, 2010). A tal fine, il presupposto fondamentale è rappresentato dalla caratterizzazione molecolare della comunità microbica associata all'insetto, seguita da ricerche più approfondite sulla localizzazione dei simbionti all'interno del corpo dell'ospite, effettuata tramite microscopia elettronica o ibridazione *in situ*. In seguito, tra i simbionti che compongono la frazione coltivabile del microbiota, uno *screening* accurato dei ceppi riconducibili ai simbionti più promettenti può consentire l'identificazione di isolati *wild-type* che presentano le caratteristiche necessarie per un agente di lotta, oppure i microrganismi di interesse possono essere opportunamente modificati geneticamente per lo sviluppo di tecniche di paratransgenesi. Altre analisi volte a chiarire le interazioni tra ospite e simbionti possono permettere di valutare se i candidati agenti di lotta siano in possesso di importanti requisiti, che includono la stabile associazione con l'ospite, la dominanza all'interno della comunità microbica dei singoli individui, la localizzazione negli stessi organi colonizzati dai patogeni (nel caso della lotta a malattie degli insetti o trasmesse da

questi), la facilità di coltivazione e manipolazione genetica *in vitro*, e la trasmissione verticale e/o orizzontale (ALMA *et al.*, 2010) (Fig. 3). Nel caso sia possibile individuare un agente di controllo efficace, prima di poter mettere in pratica protocolli di lotta basati sul suo utilizzo è necessario valutare i rischi connessi al rilascio nell'ambiente del microrganismo. Questi rischi possono essere rappresentati da una tossicità verso l'artropode o verso gli organismi animali e vegetali con cui questo viene in contatto, da uno sbilanciamento delle comunità microbiche affiliate a questi organismi, oppure, nel caso dell'impiego di protocolli basati sulla paratransgenesi, da problematiche relative all'immissione nell'ambiente di materiale genetico modificato.

Esempi di Controllo Simbiotico applicati all'agricoltura

Tecnica dell'insetto incompatibile applicata a *Ceratitis capitata*

La mosca mediterranea della frutta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), che infesta più di 250 specie di fruttiferi, rappresenta una delle minacce più preoccupanti per la frutticoltura di tutto il mondo. La caratterizzazione della comunità microbica

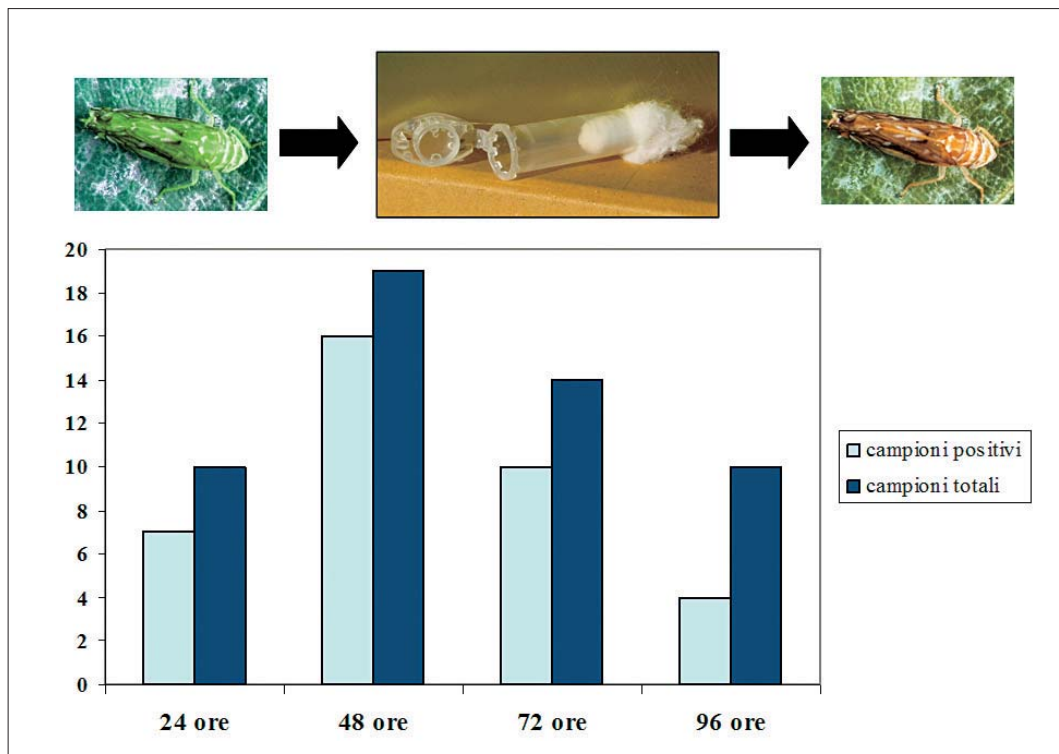


Figura 3

Il batterio acetico *Asaia* sp., candidato agente di controllo simbiotico per la lotta alla Flavescenza dorata della vite trasmessa dal cicadellide *Scaphoideus titanus*, è trasferito orizzontalmente tra individui che condividono il substrato alimentare. La trasmissione orizzontale è stata dimostrata tramite prove di *cofeeding* su dieta artificiale, condotte alimentando su una stessa soluzione zuccherina prima un individuo colonizzato con un ceppo marcato di *Asaia*, e successivamente un esemplare non colonizzato. Il grafico indica le cicadellide risultate positive a PCR quantitativa con primer specifici per il gene marcatore (colonne azzurre) sul totale di individui saggiati (colonne blu), in seguito a diversi periodi di condivisione della dieta (da 24 a 96 ore) (modificato da GONELLA *et al.*, 2012).

associata a questo insetto ha dimostrato che *C. capitata* non è naturalmente infettata da ceppi di *Wolbachia*. Questo simbiote ha recentemente attirato l'interesse della comunità scientifica come potenziale agente di controllo simbiotico, sulla base delle alterazioni riproduttive di cui è responsabile, prima fra tutte l'induzione di incompatibilità citoplasmatica (BOURTZIS & ROBINSON, 2006). L'incompatibilità riproduttiva causata da *Wolbachia* può essere sfruttata per indurre sterilità in popolazioni di campo delle specie bersaglio utilizzando la tecnica dell'insetto incompatibile (Incompatible Insect Technique, IIT) (ZABALOU *et al.*, 2009). Questa tecnica prevede il lancio di maschi infettati da *Wolbachia*, riproduttivamente incompatibili con le femmine di campo, non infette, ed è stata sviluppata in analogia con la tecnica dell'insetto sterile (Sterile Insect Technique, SIT), basata sull'uso di radiazioni o di sterilizzanti chimici applicati a maschi che devono in seguito essere lanciati nei propri ambienti di sviluppo. La tecnica dell'IIT è stata dunque proposta per la lotta a *C. capitata* attraverso la creazione di linee di mosca mediterranea infette da *Wolbachia*. Le linee transinfettate sono state ottenute tramite microiniezioni nel citoplasma embrionale utilizzando la mosca del ciliegio *Rhagoletis cerasi* L. come donatore (ZABALOU *et al.*, 2004). *Wolbachia* è stata riscontrata in maniera permanente nelle linee transinfettate, e il lancio sperimentale di maschi infetti ha permesso la soppressione totale delle popolazioni di laboratorio (ZABALOU *et al.*, 2004). Tuttavia, un aspetto da tenere in considerazione per l'effettiva applicazione in pieno campo dell'IIT è la necessità di lanciare con estrema certezza solamente maschi, dato che il rilascio accidentale di femmine infette da *Wolbachia* vanificherebbe l'azione sterilizzante del lancio (queste femmine sarebbero in grado di produrre una normale progenie in seguito all'accoppiamento con i maschi lanciati), e permetterebbe la diffusione di femmine infette di seconda generazione che comprometterebbero del tutto la strategia di lotta (BOURTZIS & ROBINSON, 2006). La produzione massale di maschi incompatibili di *C. capitata* deve prevedere l'eliminazione delle femmine tramite shock termico embrionale, che è stato dimostrato condurre alla produzione di linee composte di soli maschi senza ridurre l'efficacia dell'incompatibilità citoplasmatica (ZABALOU *et al.*, 2009). Altri possibili fattori che potrebbero ridurre l'efficacia dell'attività di controllo, diminuendo l'efficienza dell'induzione di incompatibilità svolta da *Wolbachia* nei maschi infetti, sono l'età dell'insetto, il numero di accoppiamenti e la temperatura (BOURTZIS & ROBINSON, 2006); tuttavia il ruolo di

questi fattori non è stato ancora chiarito. Date le sue potenzialità, la possibilità dell'impiego dell'IIT contro la mosca mediterranea della frutta rappresenta un ottimo esempio per la sua sperimentazione anche in altri modelli, e sottolinea l'importanza dei manipolatori riproduttivi come agenti di lotta a basso impatto ambientale.

Paratransgenesi per la lotta alla malattia di Pierce della vite

La malattia di Pierce, causata dal Gammaproteobatterio *Xylella fastidiosa*, è una delle più problematiche avversità della vite in nord America, dove causa ingenti danni produttivi. Il principale insetto vettore di *X. fastidiosa* è il cicadellide cicadellino *Homalodisca vitripennis* (Germar). Tra le strategie proposte per il controllo della malattia di Pierce, un approccio di CS è stato proposto al fine di rendere *H. vitripennis* non idonea alla trasmissione del patogeno, tramite l'impiego di insetti paratransgenici. Per la ricerca di possibili agenti di paratransgenesi l'attenzione è stata focalizzata in particolare sui batteri endofiti della vite associati anche alla cicalina, che possano essere modificati per l'espressione di fattori anti *X. fastidiosa*. Tra questi, il Betaproteobatterio *Alcaligenes xylosoxidans denitrificans* è stato selezionato in quanto facilmente manipolabile *in vitro*. La capacità di *A. xylosoxidans denitrificans* di colonizzare il primo tratto intestinale di *H. vitripennis*, che ospita anche *X. fastidiosa*, è stata saggiata introducendo attraverso l'alimentazione un ceppo di *A. xylosoxidans denitrificans* trasformato per la produzione di una proteina fluorescente. L'efficacia della colonizzazione da parte del simbiote dell'intestino di *H. vitripennis*, osservata grazie a indagini di microscopia elettronica, supporta la possibilità di impiegare *A. xylosoxidans denitrificans* come agente di controllo (BEXTINE *et al.*, 2004). Un'indagine seguente è stata indirizzata a verificare la praticabilità dell'impiego di un sistema di distribuzione dell'agente di CS basato sulla pianta. Un ceppo marcato di *A. xylosoxidans denitrificans* è stato usato per valutare la colonizzazione di diverse piante ospiti in seguito all'inoculazione diretta nel vegetale. I risultati di queste prove hanno dimostrato come le piante meno appetibili per *H. vitripennis* fossero anche meno efficientemente colonizzate dal simbiote (BEXTINE *et al.*, 2005).

Per verificare in maniera definitiva che *A. xylosoxidans denitrificans* sia in possesso delle caratteristiche necessarie per un candidato agente di CS, è stato sviluppato un sistema per la valutazione dei rischi, in termini di tossicità per le piante, alterazioni degli ospiti, trasferimento genico orizzontale a ceppi *wild-type* del simbiote, stabilità del trans-

gene, conseguenze legate all'ecologia microbica del sistema pianta, ed effetti sul processo di vinificazione (MILLER *et al.*, 2006).

Modelli di studio con potenzialità applicative

Le simbiosi negli insetti vettori di fitoplasmi alla vite e ai fruttiferi

Un modello che può costituire un interessante base per lo sviluppo di strategie di CS è rappresentato dalla lotta alle fitoplasmosi, un gruppo di malattie che colpiscono svariate specie di piante spontanee e coltivate, e che sono causa di forti perdite economiche in tutta Europa, in particolar modo per quanto concerne la vite e le piante da frutto. Queste fitopatie sono causate da microrganismi privi di parete cellulare appartenenti al genere '*Ca. Phytoplasma*', trasmessi alle piante da psille e cicaline. Alla luce della rilevanza delle fitoplasmosi nel panorama viticolo italiano ed europeo, ricerche concernenti lo studio della comunità microbica associata ai vettori degli agenti eziologici sono state condotte al fine di individuare dei potenziali agenti di controllo. I primi studi sono stati effettuati sul cicadellide *S. titanus*, il vettore del fitoplasma responsabile della Flavescenza dorata (FD). Tra i microrganismi dominanti all'interno della comunità microbica di *S. titanus*, sono stati osservati il Bacteroidetes '*Ca. Cardinium heritigii*' e il batterio acetico *Asaia* sp. (MARZORATI *et al.*, 2006). Il primo, noto manipolatore riproduttivo, è trasmesso verticalmente alla progenie, come dimostrato dal suo ritrovamento nei tessuti riproduttivi delle femmine della cicalina (SACCHI *et al.*, 2008); tuttavia nessuna alterazione della riproduzione è stata individuata in *S. titanus*. Oltre che nelle gonadi femminili, *Cardinium* è stato riscontrato anche in numerosi altri organi, tra cui le ghiandole salivari. Questo suggerisce la possibilità che il simbionte sia trasmesso alla vite, come indicato da studi preliminari che hanno dimostrato la presenza del batterio nel mezzo alimentare (PAJORO *et al.*, 2008). Nonostante l'interesse suscitato dall'eventualità di un ciclo vitale del batterio condiviso tra pianta e insetto, altre caratteristiche di *Cardinium* rendono di difficile applicabilità lo sviluppo di tecniche di lotta basate su questo simbionte, come la sua incoltivabilità o l'apparente assenza di manipolazioni riproduttive nella cicalina. Il secondo simbionte dominante presente in *S. titanus*, vale a dire *Asaia*, è invece un promettente candidato agente per il CS. Infatti, questo batterio acetico, oltre a essere preponderante nel microbiota del cicadellide e a colonizzarne diversi organi, è trasmesso alla progenie tramite un fenomeno detto "egg smearing" (la contaminazione dell'uovo

durante la maturazione nell'ovario, seguita dalla penetrazione al suo interno durante lo sviluppo embrionale) (CROTTI *et al.*, 2009). In aggiunta, *Asaia* può essere trasferita tra individui che condividono il substrato alimentare o in seguito all'accoppiamento (GONELLA *et al.*, 2012). Un'ulteriore caratteristica del simbionte che appare di particolare interesse è la capacità di ceppi provenienti da un determinato insetto di colonizzare ospiti anche molto lontani filogeneticamente da questo. Dato il ritrovamento di *Asaia* anche in insetti vettori di interesse medico, come le zanzare dei generi *Aedes* e *Anopheles*, la versatilità di colonizzazione dimostrata da questo batterio acetico indica la possibilità di sfruttarlo come agente di lotta ad ampio spettro in diversi sistemi (CROTTI *et al.*, 2009).

Oltre a *S. titanus*, anche un altro importante vettore di fitoplasmi alla vite è stato oggetto di indagini relative alla comunità microbica, vale a dire il cixiide *Hyalesthes obsoletus* Signoret. Questo insetto trasmette il fitoplasma responsabile del Legno Nero (LN), di emergente interesse in diversi areali italiani ed europei. Il microbiota affiliato a *H. obsoletus* è risultato essere decisamente più variegato rispetto a quello di *S. titanus*. Numerose specie batteriche sono state osservate, distribuite in vari distretti corporei del cixiide (GONELLA *et al.*, 2011). Tra i simbionti osservati, diverse specie di batteri conosciuti come simbionti primari di altri auchenorrhinchi sono stati identificati in concomitanza in diversi organi. Questo suggerisce che questi simbionti possano concorrere nello svolgere ruoli fondamentali per *H. obsoletus*. Oltre a simbionti già noti, anche un Betaproteobatterio mai descritto in precedenza, denominato '*Ca. Vidania fulgoroideae*', è stato ritrovato con frequenze e distribuzione simili a quelle degli altri simbionti primari. È possibile dunque ipotizzare che *Vidania* svolga una funzione di primaria importanza nel cixiide, e una sua interdipendenza con gli altri simbionti primari non può essere esclusa (GONELLA *et al.*, 2011). Il ruolo e le interazioni tra i simbionti che compongono una così complessa comunità all'interno del corpo di *H. obsoletus* dovranno essere ulteriormente investigate in futuro, in modo da chiarire le potenzialità connesse con lo sfruttamento di uno o più di questi microrganismi nell'ambito della lotta al LN.

Data la rilevanza in termini di perdite economiche rappresentata dalle fitoplasmosi che colpiscono le piante da frutto, anche le psille che trasmettono i fitoplasmi che le causano sono state indagate per la presenza di potenziali agenti di controllo. In particolare, lo psillide *Cacopsylla pyri* L. è stato oggetto di un'accurata caratterizzazione microbica. Molti microrganismi già noti come sim-

bionti primari e secondari di psille sono stati riscontrati, tra cui batteri dei generi *Carsonella*, *Ralstonia*, *Sodalis* e *Arsenophonus*. Inoltre, alte percentuali di infezione sono state osservate per un batterio riconducibile ad una nuova specie, denominata '*Ca. Liberibacter europaeus*' (Cleu) (Fig. 4). Il genere '*Ca. Liberibacter*' comprende importanti agenti patogeni di diverse piante coltivate, in particolare agrumi e solanacee, diffusi in tutto il mondo. Al contrario, Cleu, che oltre a colonizzare diversi distretti corporei di *C. pyri* può essere trasmesso al pero, non induce sintomi nelle piante infette (RADDADI *et al.*, 2011). Per questo motivo è stato suggerito che Cleu abbia un ruolo di simbionte in diverse specie di psille, nonché di endofita del pero e di altre rosacee (RADDADI *et al.*, 2011; CAMEROTA *et al.*, 2012), piuttosto che di fitopatogeno.

L'uso dei simbionti dell'ape nella lotta alla peste americana

L'applicazione di strategie di MRM per la protezione dell'ape (*Apis mellifera* L.) appare di estremo interesse data la grande importanza economica di questo insetto, sia per i prodotti che derivano dal suo allevamento, sia per il suo ruolo di impollinatore. Molte sono le malattie che affliggono questo insetto utile, inoltre l'insorgenza di pesanti fenomeni di mortalità delle colonie osservati in tutto il mondo negli ultimi anni desta notevoli preoccupa-

zioni, a causa delle difficoltà legate alla cura di questa sindrome, che non è riconducibile a un solo agente causale, ma alla concorrenza di più fattori di origine biotica e abiotica che provocano uno stress del sistema immunitario dell'ape. Il mantenimento di una comunità microbica equilibrata nel tratto intestinale è di estrema utilità per il rinforzo delle difese immunitarie e dunque la conservazione di un buono stato di salute nell'ape, così come è stato osservato anche per l'uomo e per altri animali. I numerosi studi concernenti la comunità microbica associata all'ape hanno evidenziato la presenza di diversi *phyla* batterici (MOHR & TEBBE, 2006). I risultati ottenuti da COX-FOSTER *et al.* (2007), in seguito al confronto tra comunità microbiche di esemplari colpiti da moria delle colonie e adulti sani, hanno permesso di ipotizzare un collegamento tra l'indebolimento generale dell'individuo a causa di tale moria e lo sbilanciamento del suo microbiota intestinale. Alla luce di queste evidenze, lo studio del ruolo dei simbionti intestinali dell'ape nel mantenimento di un buono stato di salute risulta di estremo interesse. Tra i microrganismi simbionti riscontrati nell'intestino dell'ape, i batteri acetici e lattici appaiono di particolare rilevanza, in quanto noti, in altri modelli animali, per esercitare un'attività benefica per l'ospite. L'alto tenore zuccherino e l'elevato livello di acidità presenti nel tratto intestinale dell'ape lo rendono una

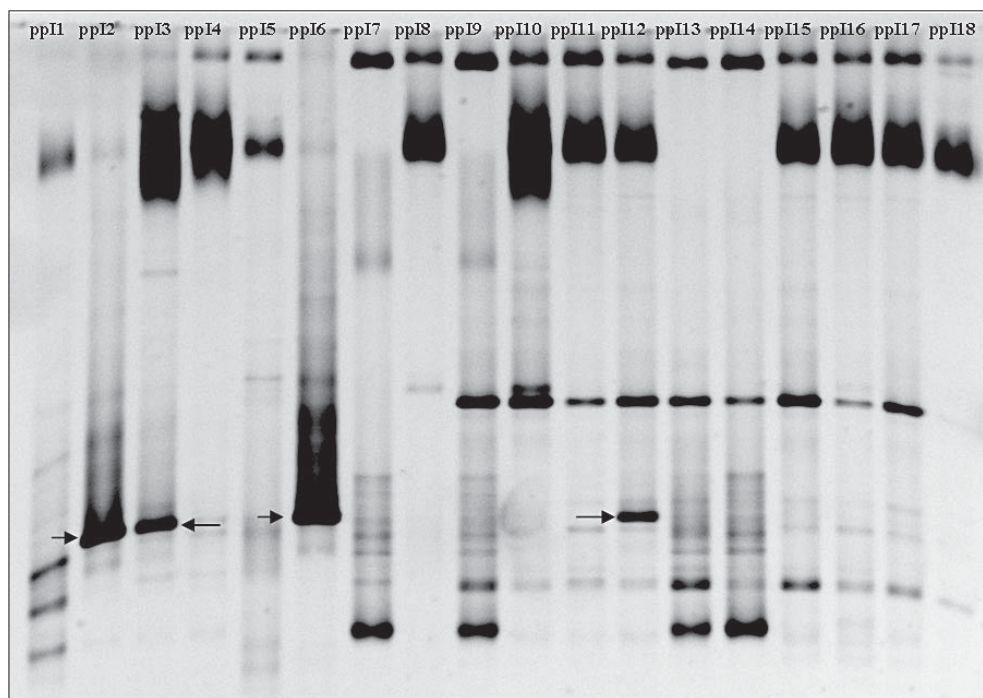


Figura 4

Profili elettroforetici in gradiente denaturante ottenuti dal DNA batterico presente in individui di *Cacopsylla pyri* (indicati dalle sigle in alto). La presenza di diverse bande, che rappresentano specie batteriche differenti, rileva la grande diversità microbica affiliata all'insetto. Le bande indicate dalle frecce corrispondono alla nuova specie '*Candidatus Liberibacter europaeus*' (RADDADI *et al.*, 2011).

nicchia ottimale per lo sviluppo di questi batteri. Diverse specie del genere *Lactobacillus*, tra i batteri acetici, e dei generi *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Saccharibacter*, tra i batteri acetici, sono state rinvenute nell'intestino di *A. mellifera* (MOHR & TEBBE, 2006; 2007). Questi simbiotici potrebbero essere sfruttati in strategie di MRM non solamente per la lotta alla moria delle colonie, ma anche per proteggere l'ape dall'insorgenza dei numerosi altri patogeni che la affliggono. Tra questi, i patogeni batterici che attaccano le larve sono responsabili di malattie particolarmente gravi, vale a dire la peste americana, causata da *Paenibacillus larvae*, e la peste europea, dovuta a *Melissococcus plutonius*. Tali patogeni sono attualmente molto difficili da controllare, dato che l'uso di antibiotici è l'unica cura efficace, ma non permessa in diverse nazioni europee. L'impiego di microrganismi probiotici può rappresentare una promettente alternativa a basso impatto ambientale. Diversi ceppi di batteri lattici, acetici e sporigeni presenti in *A. mellifera* sono noti per la loro capacità di contenere le popolazioni di patogeni tramite la produzione di composti antimicrobici o l'abbassamento del pH, e in effetti sono stati riscontrati inibire *in vitro* la crescita di *P. larvae*. Prove *in vivo* condotte utilizzando larve alimentate con ceppi di batteri lattici e successivamente esposte a *P. larvae* hanno confermato la capacità di questi batteri di proteggere l'ape dal patogeno (FORSGREN *et al.*, 2010), sottolineando la possibilità dell'impiego di batteri probiotici per la protezione delle larve. Nuove strategie per il controllo delle malattie delle api potranno quindi essere formulate sulla base delle evidenze fino a ora acquisite e di studi futuri che dovranno essere condotti per la comprensione dei diversi meccanismi che entrano in gioco nell'inibizione dei patogeni da parte dei simbiotici, come esclusione competitiva, produzione di sostanze antimicrobiche e stimolazione del sistema immunitario.

I simbiotici in *Drosophila suzukii*

Il dittero brachicero *Drosophila suzukii* Matsamura è un moscerino della frutta originario del sud-est asiatico, che di recente è stato introdotto accidentalmente in Europa e in America (HAUSER *et al.*, 2009; CALABRIA *et al.*, 2012). L'introduzione di questo insetto ha destato gravi preoccupazioni per la sua elevata pericolosità per le produzioni frutticole. Infatti, a differenza delle altre specie nel genere *Drosophila*, *D. suzukii* attacca i frutti durante il normale processo di maturazione sulla pianta (GRASSI *et al.*, 2009). Le piante coltivate più gravemente colpite da questo moscerino della frutta sono fragola, piccoli frutti e fruttiferi maggiori, ma

anche diverse specie spontanee sono attaccate. Lo sviluppo di strategie di lotta contro la diffusione di *D. suzukii* è fortemente necessario data la gravità dei danni che questo insetto causa alla frutticoltura. Anche alla luce dei promettenti risultati acquisiti nell'ambito della lotta ad altri insetti e patogeni dannosi, la creazione di protocolli di CS potrebbe condurre a un controllo efficace. Attualmente la comunità batterica residente in *D. suzukii* non è conosciuta, nonostante la caratterizzazione dei lieviti associati all'insetto e alle sue piante ospiti sia stata riportata recentemente (HAMBY *et al.*, 2012). D'altro canto, numerosi studi sono stati indirizzati alla conoscenza del microbiota di altre specie congeneri. I *taxa* più frequentemente ritrovati in *Drosophila* spp. includono le Enterobacteriaceae, i Lactobacillales, e le Acetobacteriaceae, anche se una forte influenza della quantità e del tipo di cibo ingerito dai singoli individui sulla composizione della comunità microbica è stata riscontrata (CHANDLER *et al.*, 2011). L'importanza come candidati agenti di CS dei gruppi batterici osservati in diverse specie nel genere *Drosophila* è nota sulla base delle numerose evidenze ottenute in altri sistemi. Anche il ruolo recentemente riconosciuto per i batteri acetici nel modulare l'omeostasi immunitaria in *D. melanogaster* (ROH *et al.*, 2008) pone le basi verso la possibilità di impiegare questi simbiotici per il contenimento di *D. suzukii*. Oltre a batteri acetici, lattici ed enterobatteriacee, un simbiote frequentemente riscontrato nel genere *Drosophila* è *Wolbachia*, che è stata riconosciuta svolgere ruoli diversi in specie differenti, come quello di induttore di incompatibilità citoplasmatica (WERREN *et al.*, 2008) e di male killing (MONTENEGRO *et al.*, 2005), di simbiote mutualista (HEDGES *et al.*, 2008) e di patogeno (MIN & BENZER, 1997). Data l'importanza di questo Alfabroteobatterio come strumento di CS, è necessario chiarire la natura dell'eventuale interazione tra *Wolbachia* e *D. suzukii*.

Alla luce delle conoscenze esistenti in merito alla composizione della comunità microbica affiliata a *Drosophila* spp., studi mirati alla conoscenza della struttura e del ruolo del microbiota di *D. suzukii* potranno aprire nuovi scenari di lotta a basso impatto ambientale che coinvolgano l'impiego di agenti microbici.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'interesse verso la conoscenza delle relazioni che intercorrono tra gli insetti e i rispettivi microrganismi simbiotici è fortemente cresciuto nel corso degli ultimi anni, come sottolineato dalla presenza

di sempre più numerosi studi in merito. Differenti modelli sono stati fino a ora presi in considerazione; per gli insetti studiati molti importanti meccanismi alla base dei processi fisiologici, metabolici e comportamentali sono stati delucidati, spesso con interessanti implicazioni nell'ambito della gestione di problematiche connesse agli artropodi, come nel caso della creazione di protocolli di CS. Tuttavia, sono ancora numerosi i sistemi che comprendono la presenza di insetti o patogeni dannosi per i quali soluzioni basate sul MRM potrebbero essere di estrema utilità, ma per i quali non esistono ancora conoscenze riguardanti la comunità microbica. Studi futuri che coinvolgano modelli non ancora esplorati potranno fornire ulteriori elementi verso lo sviluppo di strategie di lotta innovative.

RIASSUNTO

Le simbiosi microbiche negli insetti sono ampiamente diffuse in tutti gli ordini. Molte funzioni diverse sono svolte dalle comunità microbiche presenti in ospiti differenti, e ogni tipologia di associazione presenta caratteristiche particolari. I simbionti possono instaurare associazioni obbligate o facoltative con gli insetti; possono contribuire alla nutrizione dell'ospite, proteggerlo dalle avversità biotiche e abiotiche, o manipolarne la riproduzione per garantirsi una più ampia diffusione. L'influenza dei simbionti microbici nella biologia, nella fisiologia, nel comportamento e nell'evoluzione degli insetti può essere considerata come una risorsa che può essere sfruttata per la gestione di problematiche correlate agli insetti. A tal fine, è fondamentale l'identificazione di agenti microbici ottimali, dotati di un elevato potenziale per il controllo simbiotico. In agricoltura, applicazioni di lotta di notevole interesse sono state proposte contro la diffusione di insetti dannosi, come nel caso della mosca mediterranea della frutta *Bactrocera oleae* (Gmelin), o per il controllo di patogeni trasmessi da insetti, come l'agente della malattia di Pierce della vite, trasmesso dalla cicalina *Homalodisca vitripennis* (Germar). I simbionti microbici degli insetti possono rappresentare promettenti strumenti di lotta anche in altri modelli, tra cui i vettori di fitoplasmi, l'ape e i patogeni che la attaccano, o gli insetti nocivi di emergente interesse come *Drosophila suzukii* Matsumura.

BIBLIOGRAFIA

ALMA A., DAFFONCHIO D., GONELLA E., RADDADI N., 2010 – *Microbial symbionts of Auchenorrhyncha transmitting phytoplasmas: a resource for symbiotic control of phytoplasmas*. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*, Weintraub P. & Jones P. Ed., CAB International, Wallingford, UK, pp. 272-292.

ARAKAKI N., MIYOSHI T., NODA H., 2001 – *Wolbachia-mediated parthenogenesis in the predatory thrips Franklinothrips vespiformis (Thysanoptera: Insecta)*. - *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 1011-1016.

ATTARDO G.M., LOHS C., HEDDI A., ALAM U.H., YILDIRIM S., AKSOY S., 2008 – *Analysis of milk gland structure and function in Glossina morsitans: milk protein production, symbiont populations and fecundity*. - *J. Insect Physiol.*, 54: 1236-1242.

BAUMANN P., 2005 – *Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects*. - *Annu. Rev. Microbiol.*, 59: 155-189.

BEXTINE B.R., LAUZON C., POTTER S.E., LAMPE D., MILLER T.A., 2004 – *Delivery of a genetically marked *Alcaligenes sp.* to the glassy winged sharpshooter for use in a paratransgenic control strategy*. - *Curr. Microbiol.*, 48: 327-331.

BEXTINE B.R., LAMPE D., LAUZON C., JACKSON B., MILLER T.A., 2005 – *Establishment of a genetically marked insect-derived symbiont in multiple host plants*. - *Curr. Microbiol.*, 50: 1-7.

BOURTZIS K., ROBINSON S., – 2006 *Insect pest control using Wolbachia and/or radiation*. In: *Insect Symbiosis Vol. 2*, Bourtzis K. & Miller T.A. Ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 225-246.

BREEUWER H., ROS V.I.D., GROT T.V.M., 2011 – *Cardinium: the next addition to the family of reproductive parasites*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zcori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 207-224.

CALABRIA G., MÀCA J., BACHLI G., SERRA L., PASCUAL M., (2012) *First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe*. - *J. Appl. Entomol.*, 136: 139-147.

CAMEROTA C., RADDADI N., PIZZINAT A., GONELLA E., CROTTI E., TEDESCHI R., MOZES-DAUBE N., EMBER I., ACS Z., KOLBER M., ZCHORI-FEIN E., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2012 – *Incidence of 'Candidatus *Liberibacter europaeus*' and phytoplasmas in *Cacopsylla* species (Hemiptera: Psyllidae) and their host/shelter plants*. - *Phytoparasitica*, 40: 213-221.

CHANDLER J.A., MORGAN LANG J., BHATNAGAR S., EISEN J.A., KOPP A., 2011 – *Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system*. - *Plos Genet.*, 7(9): e1002272.

COX-FOSTER D. L., CONLAN S., HOLMES E. C., PALACIOS G., EVANS J. D., MORAN N. A., QUAN P.-L., BRIESE T., HORNIG M., GEISER D. M., MARTINSON V., VANENGELSDORP D., KALKSTEIN A. L., DRYSDALE A., HUI J., ZHAI J., CUIN L., HUTCHISON S. K., FREDRIK SIMONS J., EGHOLM M., PETTIS J. S., LIPKIN W. I., 2007 – *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*. - *Science*, 318: 283-287.

CROTTI E., BALLOI A., HAMDI C., SANSONNO L., MARZORATI M., GONELLA E., FAVIA G., CHERIF F A., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D., – 2012 *Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems*. *Microbial Biot.*, 5: 307-317.

CROTTI E., DAMIANI C., PAJORO M., GONELLA E., RIZZI A., RICCI I., NEGRI I., SCUPPA P., ROSSI P., BALLARIN P., RADDADI N., MARZORATI M., SACCHI L., CLEMENTI E., GENCHI M., MANDRIOLI M., BANDI C., FAVIA G., ALMA A., DAFFONCHIO D., 2009 – *Asaia, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insect of phylogenetically distant genera and orders*. - *Environ. Microbiol.*, 11(12): 3252-3264.

CROTTI E., GONELLA E., RICCI I., CLEMENTI E., MANDRIOLI M., SACCHI L., FAVIA G., ALMA A., BOURTZIS K., CHERIF F A., BANDI C., DAFFONCHIO D., 2011 – *Secondary symbionts of insects: acetic acid bacteria*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zcori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 45-72.

DALE C., WANG B., MORAN N.A., OCHMAN H., 2003 – *Loss of DNA recombinational repair enzymes in the initial stages of genome degeneration*. - *Mol. Biol. Evol.*, 20: 1188-1194.

- DOUGLAS A.E., 2009 – *The microbial dimension in insect nutritional ecology*. - *Funct. Ecol.*, 23: 38-47.
- ENIGL M., SCHAUSBERGER P., 2007 – *Incidence of the endosymbionts Wolbachia, Cardinium and Spiroplasma in phytoseiid mites and associated prey*. - *Exp. Appl. Acarol.*, 42(2): 75-85.
- FELDHAAR H., 2011 – *Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts*. - *Ecol. Entomol.*, 36: 533-543.
- FORSQREN E., OLOFSSON T.C., V ASQUEZ A., FRIES I., 2010 – *Novel lactic acid bacteria inhibiting Paenibacillus larvae in honey bee larvae*. - *Apidologie*, 41(1): 99-108.
- FUKATSU T., ISHIKAWA H., 1998 – *Differential immunohistochemical visualisation of the primary and secondary intracellular symbiotic bacteria of aphids*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1284-1291.
- FUKATSU T., HOSOKAWA T., KOGA R., NIKOH N., KATO T., HAYAMA S., TAKEFUSHI H., TANAKA I., 2009 – *Intestinal endocellular symbiotic bacterium of the macaque louse Pedicinus obtusus: distinct endosymbiont origins in anthropoid primate lice and the old world monkey louse*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 3796-3799.
- GIL R., SABATER-MUÑOZ B., LATORRE A., SILVA F.J., MOYA A., 2002 – *Extreme genome reduction in Buchnera spp.: toward the minimal genome needed for symbiotic life*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 4454-4458.
- GONELLA E., CROTTI E., RIZZI A., MANDRIOLI M., FAVIA G., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2012 – *Horizontal transmission of the symbiotic bacterium Asaia sp. in the leafhopper Scaphoideus titanus Ball (Hemiptera: Cicadellidae)*. - *BMC Microbiol.*, 12(Suppl 1): S4.
- GONELLA E., NEGRI I., MARZORATI M., MANDRIOLI M., SACCHI L., PAJORO M., CROTTI E., RIZZI A., CLEMENTI E., TEDESCHI R., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D., 2011 – *Bacterial endosymbiont localization in Hyalesthes obsoletus, the insect vector of Bois Noir in Vitis vinifera*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(4): 1423-1435.
- GOTTLIEB Y., GHANIM M., GUEGUEN G., 2008. – *Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies*. - *FASEB J.*, 22: 2591-2599.
- GOTTLIEB Y., PERLMAN S.J., CHIEL E., ZCHORI-FEIN E., 2011 – *Rickettsia get around*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zchori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp.191-206.
- GRASSI A., PALMIERI L., GIORGIO L., 2009 – *Nuovo fitofago per i piccoli frutti in Trentino*. - *Terra Trentina*, 10: 19-23.
- HAMBY K.A., HERNÁNDEZ A., BOUNDY-MILLS K., ZALOM F.G., 2012 – *Associations of Yeasts with Spotted-Wing Drosophila (Drosophila suzukii; Diptera: Drosophilidae) in Cherries and Raspberries*. - *Appl. Environ. Microbiol.* 78(14): 4869–4873.
- HAUSER M., GAIMARI S., DAMUS M., 2009 – *Drosophila suzukii new to North America*. - *FlyTimes*, 43: 12-15.
- HEDDI A., GROSS R., 2011 – *Proteobacteria as primary endosymbionts of arthropods*. In: *Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods*, Zchori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 1-27.
- HEDGES L.M., BROWNLIE J.C., O'NEILL S.L., JOHNSON K.N., 2008 – *Wolbachia and virus protection in insects*. - *Science*, 322: 702.
- LEFÈVRE C., CHARLES H., VALLIER A., DELOBEL B., FARREL B., HEDDI A., 2004 – *Endosymbionts phylogenesis in the dryothoridae weevils: evidence for bacterial replacements*. - *Mol. Biol. Evol.*, 21: 965-973.
- LIADOUZE I., FEBVAY G., GUILLARD J., BONNOT G., 1996 – *Metabolic fate of energetic amino acids in the aposymbiotic pea aphid Acyrthosiphon pisum (Harris) (Homoptera: Aphididae)*. - *Symbiosis*, 21: 115-127.
- MARZORATI M., ALMA A., SACCHI L., PAJORO M., PALERMO S., BRUSETTI L., RADDADI N., BALLOI A., TEDESCHI R., CLEMENTI E., CORONA S., QUAGLINO F., BIANCO P.A., BENINATI T., BANDI C., DAFFONCHIO D., 2006 – *A novel Bacteroidetes symbiont is localized in Scaphoideus titanus, the insect vector of flavescence dorée in Vitis vinifera*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 1467–1475.
- MCCUTCHEON J.P., MORAN N.A., 2010 – *Functional convergence in reduced genomes of bacterial symbionts spanning 200 My of evolution*. - *Genome Biol. Evol.*, 2: 708–718.
- MILLER T.A., LAUZON C., LAMPE D., DURVASULA R., MATTHEWS S., 2006 – *Paratransgenesis applied to control insect-transmitted plant pathogens: the Pierce's disease case*. In: *Insect Symbiosis*, Vol. 2, Bourtzis K. & Miller T.A. Ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 247-263.
- MIN K.-T., BENZER S., 1997 – *Wolbachia, normally a symbiont of Drosophila, can be virulent, causing degeneration and early death*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10792–10796.
- MOHR K.I., TEBBE C.C., 2006 – *Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field*. - *Environ. Microbiol.* 8, 258-272.
- MOHR K.I., TEBBE C.C., 2007 – *Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees*. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75: 573-582.
- MONTENEGRO H., SOLFERINI V.N., KLACZKO L.B., HURST G.D.D., 2005 – *Male-killing Spiroplasma naturally infecting Drosophila melanogaster*. - *Insect Mol. Biol.*, 14(3): 281–287.
- MORAN N.A., TRAN P., GERARDO N.M., 2005a – *Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8802-8810.
- MORAN N.A., RUSSEL J.A., KOGA R., FUKATSU T., 2005b – *Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3302-3310.
- MOYA A., GIL R., LATORRE A., PERETÓ J., PILAR GARCILLÁN-BARCIA M., DE LA CRUZ F., 2009 – *Toward minimal bacterial cells: evolution vs. design*. - *FEMS Microbiol. Rev.*, 33: 225-235.
- NAKABACHI A., YAMASHITA A., TOH H., ISHIKAWA H., DUNBAR H.E., MORAN N.A., HATTORI M., 2006 – *The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont Carsonella*. - *Science*, 314: 267.
- NEGRI I., PELLECCIA M., MAZZOGLIO P.J., PATETTA A., ALMA A., 2006 – *Feminizing Wolbachia in Zyginiid pul-lula (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex-determination system*. - *Proc. R. Soc. B*, 273: 2409-2416.
- OLIVER, K.M., MORAN N.A., HUNTER M.S., 2005 – *Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 12795–12800.
- PAJORO M., MARZORATI M., NEGRI I., SACCHI L., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2008 – *Investigation on the life cycle of ST1-C, the endosymbiont of Scaphoideus titanus*. - *Bull. Insectol.*, 61(1): 217-218.
- RADDADI N., GONELLA E., CAMEROTA C., PIZZINAT A.,

- TEDESCHI R., CROTTI E., MANDRIOLI M., BIANCO P.A., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2011 - 'Candidatus *Liberibacter europaeus*' sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. - *Environ. Microbiol.*, 13(2): 414-426.
- ROH S.W., NAM Y.-D., CHANG H.-W., KIM K.-H., KIM M.-S., RYU J.-H., KIM S.-H., LEE W.-J., BAE J.-W., 2008 - Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in *Drosophila melanogaster*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 6171-6177.
- ROSENBERG E., ZILBER-ROSENBERG I., 2011 - *Symbiosis and Development: The Hologenome Concept*. - *Birth Defects Res C*, 93: 56-66.
- RYU J.H., KIM S.H., LEE H.Y., BAI J.Y., NAM Y.D., BAE J.-W., LEE D.G., KIM J., LEE D., LEE W.J., 2008 - Innate immune homeostasis by the homeobox gene *Caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. - *Science*, 319: 777-782.
- SACCHI L., GENCHI M., CLEMENTI E., BIGLIARDI E., AVANZATI A.M., PAJORO M., NEGRI I., MARZORATI M., GONELLA E., ALMA A., DAFFONCHIO D., BANDI C., 2008 Multiple symbiosis in the leafhopper *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae): details of transovarial transmission of *Cardinium* sp. and yeast-like endosymbionts. - *Tissue Cell*, 40: 231-242.
- SANDSTROM J.P., RUSSEL J.A., WHITE J.P., MORAN N.A., 2001 - Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. - *Mol. Ecol.*, 10, 217-228.
- SASAKI-FUKATSU K., KOGA R., NIKOH N., YOSHIZAWA K., KASAI S., MIHARA M., KOBAYASHI M., TOMITA T., FUKATSU T., 2006 - Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7349-7352.
- SCHNEIDER, D., MILLER W.J., RIEGLER M., 2011. - *Arthropod shopping for Wolbachia*. In: Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods, Zcori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 149-174.
- SHIGENOBU S., WATANABE H., HATTORI M., SAKAKI Y., ISHIKAWA H., 2000. *Genome sequence of the endocellular-bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS*. - *Nature*, 407: 81-86.
- SKINNER S.W., 1985 - *Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting sex ratios in the parasitoid wasp Nasonia vitripennis*. - *Genetics*, 109: 745-754.
- STOUTHAMER R., LUCK R.F., HAMILTON W.D., 1990 - Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. - *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87: 2424-2427.
- VAUTRIN E., CHARLES S., GENIEYS S., VAVRE F., 2007 - Evolution and invasion dynamics of multiple infections with *Wolbachia* investigated using matrix based models. - *J. Theor. Biol.*, 245: 197-209.
- VERSTRAETE, W., 2007 - *Microbial ecology and environmental biotechnology*. - *ISME J.*, 1: 1-4.
- VON DOHLEN C.D., KOHLER S., ALSOP S.T., MCMANUS W.R., 2001 - Mealybug -proteobacterial endosymbionts contain -proteobacterial symbionts. - *Nature*, 412: 433-436.
- WEEKS A.R., BREEUWER J.A., 2001 - *Wolbachia-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites*. - *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268: 2245-2251.
- WEISS B., AKSOY S., 2011 - *Microbiome influences on insect host vector competence*. - *Trends Parasitol.*, 27(11): 514-522.
- WERREN J.H., BALDO L., CLARK M.E., 2008 - *Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology*. - *Nature Rev. Microbiol.*, 6: 741-751.
- WILKINSON T.L., 2011 - *Facultative tenants from the Enterobacteriaceae within phloem-feeding insects*. In: Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods, Zcori-Fein E. & Bourtzis K. Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 73-87.
- WU D., DAUGHERTY S.C., VAN AKEN S.E., PAI G.H., WATKINS K.L., KHOURI H., TALLON L.J., ZABORSKY J.M., DUNBAR H.E., TRAN P.L., MORAN N.A., EISEN J.A., 2006. - *Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters*. - *PLoS Biol.* 4: e188.
- ZABALOU S., APOSTOLAKI A., LIVADARAS I., FRANZ G., ROBINSON A.S., SAVAKIS C., BOURTZIS K., 2009 - *Incompatible insect technique: incompatible males from a Ceratitis capitata genetic sexing strain*. - *Entomol. Exp. Appl.*, 132(3): 232-240.
- ZABALOU, S., REIGLER, M., THEODORAKOPOULOU, M., STAUFFER, C., SAVAKIS, C. BOURTZIS, K., 2004 - *Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control*. - *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101: 15042-15045.

NUOVE PROSPETTIVE DI CONTROLLO MICROBIOLOGICO DEGLI INSETTI NOCIVI

LUCA RUIU (*) - IGNAZIO FLORIS (*)

(*) Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, lucaruiu@uniss.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Antagonisti, simbionti e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

New microbiological control perspectives against insect pests

Among the enormous variety of microorganisms associated to insects, numerous agents of disease, including fungi, bacteria, virus, protozoa, have been identified and studied. During the last decades, both the scientific community and industry worked mostly with *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), an entomopathogenic species characterized by the production of parasporal bodies containing specific insecticidal pore-forming endotoxins (Cry proteins). Due to the wide insecticidal potential variability of different *Bt* strains, in relation to the specificity between insect midgut receptors and activated Cry proteins, a large number of *cry* genes are continuously being identified and sequenced, and more genes continue to be discovered as new bacterial isolates are collected worldwide.

However, the use of microbial based biological control is still relegated to niche contexts, in relation to its narrow efficacy spectrum, to the highly specific mode of action and to the lack of truly transformational associated technologies. In this scenario, the recent discovery of other environmentally safe microbial insecticides is creating new opportunities for the management of certain insect pests. Significant is the recent introduction of a newly discovered strain of *Chromobacterium subtsugae* sp. Nov., an effective bacterium against a broader insect spectrum and showing a more complex mode of action. Significant is also the case of the recently discovered entomopathogen *Brevibacillus laterosporus*.

The availability of new "omics" biotechnologies allows to develop new molecular approaches leading to the discovery of new genes and toxins implicated in the bioinsecticidal action, thus generating new information on the insecticidal action and its molecular features and creating new biological control perspectives.

Key words: bioinsecticides, biological control, *Bt*, *Brevibacillus laterosporus*, *Chromobacterium subtsugae*.

La protezione e salvaguardia dell'ambiente insieme alla necessità di garantire il fabbisogno di sostentamento di una popolazione umana che si espande ad un tasso annuo stimato intorno al 1,15%, sono divenuti aspetti di importanza sempre crescente (United Nations Population Division of the Department of Economic and Social Affairs, May 3, 2011). L'implementazione di nuove tecniche agrarie e tecnologie per il contenimento degli insetti nocivi appare di primaria importanza per permettere agli agricoltori e allevatori di incrementare le produzioni agrarie e zootecniche su una superficie limitata, contenendo i potenziali danni causati dai parassiti (OERKE & DEHENE, 2004).

Questo giustifica la continua crescita registrata nel mercato degli agrofarmaci sia in termini economici che di varietà dei principi attivi disponibili. Con un valore stimato sui 47 miliardi di dollari a livello globale (BCC Research, 2010), il mercato attuale dei pesticidi si caratterizza per un incremento significativo (circa 15% per anno) del segmento dei biopesticidi (Global Industry Analysts, Inc., MCP-1573, Feb 2012).

Risultato, questo, legato anche al ritiro dal mer-

cato di numerosi agrofarmaci, al relativo costo per lo sviluppo di nuovi formulati sintetici ed ai nuovi regolamenti che riducono i livelli di residui (Maximum Residue Level, MRL) ammessi nei prodotti agrari e zootecnici. Infatti, lo scenario legislativo, favorisce lo sviluppo e la registrazione pre-commerciale di sostanze a minore impatto ambientale, ma efficaci per il controllo degli organismi nocivi (i.e. EC Regulation No. 1107/2009). Inoltre, l'uso del controllo integrato, o Integrated Pest Management (IPM), diviene obbligatorio dal 2014 su scala internazionale (EC Directive 2009/128).

Per far fronte alla necessità di ridurre l'impatto ambientale connesso con l'uso di diverse sostanze chimiche di vecchia generazione, la comunità scientifica, accademica e industriale, ha compiuto diversi sforzi negli ultimi decenni per lo sviluppo di alternative efficaci ed ecosostenibili. Fra queste, la scoperta e l'uso di specie microbiche entomopatogene come batteri, virus, protozoi, funghi, microsporidi, nematodi (VEGA & KAYA, 2012). Tipicamente, micopatogeni e nematodi agiscono penetrando attraverso la cuticola della vittima, mentre virus, batteri e protozoi attraverso l'intestino.

Fra le prime applicazioni significative, è doveroso ricordare quelle con il fungo entomopatogeno *Beauveria bassiana* già alla fine XIX secolo, la cui azione bioinsetticida 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 & GRULA, 1979). Diverse specie fungine, sono poi state oggetto di sperimentazioni di controllo biologico nei confronti degli insetti. Fra queste, specie appartenenti ai generi *Achersonia*, *Agerata*, *Verticillium*, *Sphaerostilbe*, *Podonectria*, *Myriangiium*, *Hirsutella*, *Metarhizium*. Successi e insuccessi si sono nel tempo alternati, spesso in relazione al verificarsi di variabili condizioni ambientali (i.e. temperatura e umidità), fattori che regolano la germinazione dei conidi fungini (FAWCETT, 1944). Il potenziale dei batteri entomopatogeni nel controllo biologico storicamente è stato riconosciuto molto dopo, in seguito all'introduzione della specie *Bacillus popilliae* contro il coleottero giapponese *Popillia japonica* (STEINHAUS, 1975). Il paradigma del controllo microbiologico, si è poi evoluto radicalmente con la scoperta di nuovi ceppi di *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) attivi nei confronti di specifici insetti e che si sono dimostrati competitivi con gli insetticidi chimici in termini di costo e performance. Il ceppo HD-1, della sierovarietà *kurstaki* (DE BARJAC & LEMILLE, 1970), è così divenuto il punto di riferimento per il controllo biologico dei lepidotteri in ambito agrario e forestale, oggi affiancato da altri ceppi commercialmente disponibili come SA-11 ed EG2348, quest'ultimo ottenuto attraverso un processo naturale di coniugazione che garantisce l'espressione di un range di diverse entomotossine e una conseguente elevata efficacia insetticida. La successiva scoperta di un ceppo di *Bt* appartenente alla sierovarietà *israelensis* (*Bti*) divenne fondamentale per il controllo microbico di ditteri nematoceri, ed in particolare di zanzare e simuliidi (GOLDBERG & MARGALIT, 1977). In seguito, viene individuato un ceppo attivo nei confronti di coleotteri, appartenente alla sierovarietà *tenebrionis* (KRIEG *et al.*, 1983).

Fra i batteri entomopatogeni, il *Bt* è certamente la specie più studiata e rappresentata da centinaia di ceppi differenti. Si tratta di un microrganismo ubiquitario che si può facilmente isolare dal suolo e dal filloplano. Può inoltre essere isolato da insetti. Il ciclo biologico di *Bt* è caratterizzato da una fase di divisione vegetativa esponenziale seguita, in condizioni di stress nutrizionale, da una fase stazionaria semi-quiescente o di sporulazione. Durante la sporulazione, nel citoplasma dello spo-

rangio batterico vengono prodotte una o più inclusioni parasporali cristalline, che rappresentano il principale componente insetticida. Tali inclusioni cristalline, contengono le δ -endotossine, proteine responsabili della tossicità verso differenti insetti. Le proteine contenute in tali "cristalli" costituiscono circa il 20-30 % dell'insieme delle proteine presenti in fase di sporulazione. Le proteine dei cristalli, anche dette tossine Cry, sono protossine monomeriche che variano da un ceppo di *Bt* all'altro. Inoltre, differenti tossine Cry variano nella loro attività contro differenti insetti. Anche forma, dimensione e localizzazione cellulare dei cristalli sono ceppo specifiche (DE MAAGD *et al.*, 2003).

Così ad esempio *Bt* var. *finitimus* produce una o due inclusioni associate all'esosporio, mentre nella generalità dei casi le inclusioni parasporali sono localizzate nel citoplasma dello sporangio al di fuori dell'esosporio. Le protossine nel cristallo sono legate mediante ponti disolfuro tra le estremità C-terminali. Una volta ingerite dall'insetto, queste vengono solubilizzate nell'intestino e sotto l'azione di proteasi danno origine alle tossine attive. Questo processo è alla base della specificità del meccanismo di azione sugli insetti. Lo studio della struttura atomica delle tossine Cry (LI *et al.*, 1991) ha portato alla identificazione di tre domini. Il Dominio I (N-terminale) si pensa si inserisca nella membrana delle cellule epiteliali dell'intestino medio degli insetti causando la formazione di un poro; il Dominio II rappresenta la regione maggiormente variabile che si lega a recettori dell'epitelio e determina la specificità della tossina; il Dominio III contiene la regione conservata C-terminale che si pensa dia stabilità alla struttura proteica e potrebbe anche giocare un ruolo nella specificità del legame recettore-tossina (PIGOTT & ELLAR, 2007). Inoltre, qualche ceppo di *Bt* produce delle proteine citolitiche, anche dette tossine Cyt, incluse nel corpo parasporale. La prima tossina Cyt (Cyt A) caratterizzata, è prodotta da *Bt* var. *israelensis* (*Bti*). Attualmente, sono note differenti classi di citolisine (Cyt A, B e C), proteine di 25-28 kDa (LI *et al.*, 1996). I geni codificanti le δ -endotossine sono normalmente localizzati su plasmidi che contengono più di un gene codificante per tossina. Oltre alle δ -endotossine, diversi ceppi di *Bt* hanno l'abilità di produrre altre tossine, durante la fase di crescita vegetativa o durante la sporulazione. Una nuova classe di tossine prodotte dal *Bt*, vegetative insecticidal proteins (VIP), è stata recentemente scoperta. Si tratta di molecole espresse durante la fase vegetativa e che presentano un più ampio spettro di azione insetticida.

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. Tuttavia, si stima un futuro incremento nell'impiego dei bioinsetticidi, in combinazione o rotazione con gli insetticidi sintetici. Ma, 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, i bioinsetticidi non hanno ancora raggiunto il loro potenziale a causa della mancanza di tecnologie ad essi associate che ne incrementino l'efficacia (GLARE *et al.*, 2012). Con questa prospettiva, nuovi microrganismi entomopatogeni sono stati scoperti e caratterizzati. Fra questi, è significativo il caso della nuova specie batterica *Chromobacterium subtsugae* sp. Nov. che manifesta un'azione sia per ingestione che per contatto a più ampio spettro e che colpisce sia gli insetti con apparato boccale masticatore (es. coleotteri, lepidotteri) che i fitomizi (es. eterotteri) e gli acari (MARTIN *et al.*, 2007).

Significativo anche il caso del batterio entomopatogeno *Brevibacillus laterosporus*, caratterizzato dalla proprietà di produrre un tipico corpo parasporale lamellare a forma di canoa attaccato ad un lato della spora. Si tratta di una specie originariamente isolata in acqua (LAUBACH, 1916), nel suolo e nelle api (MCCRAY, 1917). Più di recente, le sue proprietà insetticide sono state dimostrate nei confronti di larve di zanzare (*Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*) e *Simulium vittatum* (FAVRET & YOUSTEN, 1985; RIVERS *et al.*, 1991), larve di Coleotteri e Lepidotteri, ed anche nei confronti di Nematodi e Molluschi (SINGER, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2004). In alcuni ceppi di *B. laterosporus* è inoltre stata osservata la produzione di inclusioni parasporali simili a quelle prodotte da *B. thuringiensis* (SMIRNOVA *et al.*, 1996). Entomotossine proteiche prodotte da *B. laterosporus* sono state recentemente identificate per il controllo di nematodi parassiti e di coleotteri dannosi alle piante (BONE *et al.*, 1991; BOETS *et al.*, 2004) nonché nei confronti di *Musca domestica* (RUIU *et al.*, 2006 e 2007a). L'impiego di *B. laterosporus* è stato sperimentato anche in condizioni di campo sui substrati di sviluppo larvale in aziende zootecniche (RUIU *et al.*, 2008 e 2011). È stata inoltre messa in evidenza la sua compatibilità con l'entomofauna utile non-target (RUIU *et al.*, 2007b e c). Anche nel caso di *B. laterosporus*, similmente a quanto osservato per *B. thuringiensis* (LACEY & FEDERICI, 1979; KNOWLES & ELLAR, 1987; LANE *et al.*, 1989), dopo l'ingestione, l'azione biotossica determina effetti istopatologici sull'intestino medio di mos-

che trattate che includono il progressivo disfacimento dell'epitelio intestinale, con distruzione dei microvilli, vacuolizzazione del reticolo endoplasmatico, degenerazione mitocondriale, aumento di strutture simili a lisosomi, perdita di ribosomi, disorganizzazione del reticolo endoplasmatico rugoso, deterioramento della tunica muscolare con i relativi tessuti connettivi ed infine lisi cellulare (RUIU *et al.*, 2012).

L'avvento delle nuove biotecnologie "omiche", come la genomica e la proteomica, consente di chiarire il ruolo di diverse molecole implicate nell'azione insetticida e i loro livelli di espressione nei microrganismi entomopatogeni. Anche se ancora molto resta da capire, questo approccio molecolare sta permettendo di studiare più nel dettaglio i meccanismi molecolari che sottendono l'azione insetticida non solo di nuovi agenti entomopatogeni, ma anche di quelli noti da tempo e per i quali i meccanismi di azione non sono del tutto compresi, come per l'ascomicete *B. bassiana*. In questo caso, il recente sequenziamento dell'intero genoma ha portato a ipotizzare un percorso evolutivo convergente verso la patogenicità nei confronti degli insetti, mettendo in luce numerosi geni di virulenza specie-specifici (XIAO *et al.*, 2012).

Il moderno approccio allo studio sta generando informazioni e strumenti innovativi che aprono nuove frontiere per l'impiego con successo di "nuovi" e "vecchi" agenti entomopatogeni in programmi di controllo integrato di diversi insetti nocivi.

RIASSUNTO

Nell'ambito dei numerosi microrganismi associati agli insetti, diversi studi sono stati dedicati agli agenti entomopatogeni tra cui funghi, batteri, virus, protozoi. Durante gli ultimi decenni, la comunità scientifica e l'industria hanno lavorato principalmente con *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), una specie entomopatogena che si caratterizza per la produzione di corpi parasporali contenenti specifiche entomotossine (proteine Cry). A causa dell'ampia variabilità insetticida tra differenti ceppi di *Bt*, legata alla specificità recettore intestinale-proteina Cry, un ampio numero di geni *cry* sono continuamente identificati e sequenziati in tutto il mondo, facendo seguito a nuovi isolamenti e lavori di caratterizzazione molecolare.

Tuttavia, l'impiego del controllo microbiologico è ancora limitato a contesti di nicchia, in relazione al ristretto spettro di azione dei bioinsetticidi disponibili, alla loro elevata specificità e alla mancanza di tecnologie associate che ne amplificano l'effetto.

In questo scenario, la recente scoperta di altri insetticidi microbici a basso impatto ambientale sta aprendo nuove prospettive per il controllo biologico di diversi insetti nocivi. Significativa è la recente introduzione di un nuovo ceppo di *Chromobacterium subtsugae* sp. Nov., un batterio efficace contro un ampio spettro di insetti che mostra un meccanismo di azione più complesso. Rilevante anche il

caso di *Brevibacillus laterosporus*, batterio entomopatogeno recentemente scoperto.

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, così generando preziose informazioni che consentono di ottimizzare il loro impiego nel controllo biologico e creare nuove prospettive di difesa eco-compatibile.

BIBLIOGRAFIA

- DE BARJAC H., LEMILLE F., 1970 – *Presence of flagellar antigenic subfactors in Serotype 3 of Bacillus thuringiensis*. - J. Invertebr. Pathol., 15: 139-140.
- BOETS A., ARNAUT G., VAN RIE J., DAMME N., 2004 – United States Patent Class 800279000.
- BONE . W., SINGER S., 1991 – United States Patent No. 5,045,314
- DE MAAGD R.A., BRAVO A., BERRY C., CRICKMORE N., SCHNEPF H.E., 2003 – *Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria*. - Annu. Rev. Genet., 37: 409-433.
- FAVRET E.M., YOUSTEN A.A., 1985 – *Insecticidal activity of Bacillus laterosporus*. - J. Invertebr. Pathol., 45: 195-203.
- FAWCETT H.S., 1944 – *Fungus and bacterial diseases of insects as factors in biological control*. - Bot. Rev., 10: 327-348.
- 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: 250-258.
- GOLDBERG L.J., MARGALIT J., 1977 – *A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti and Culex pipiens*. - Mosquito News 37: 355-358.
- KNOWLES B.H., ELLAR D.J., 1987 – *Colloid-osmotic is a general feature of the mechanism of action of Bacillus thuringiensis delta-endotoxins with different insect specificity*. - Biochim. Biophys. Acta, 924: 509-518.
- KRIEG A., HUGER A.M., LANGENBRUCH G.A., SCHNETTER W., 1983 – *Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera*. - J. Appl. Entomol., 96: 500-508.
- LACEY L.A., FEDERICI B.A., 1979 – *Pathogenesis and midgut histopathology of Bacillus thuringiensis in Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae)*. - J. Invertebr. Pathol., 33: 171-182.
- LANE N.J., HARRISON J.B., LEE W.M., 1989 – *Changes in microvilli and golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial delta-endotoxin*. - J. Cell Sci., 93: 337-347.
- LAUBACH A.C., 1916 – *Studies on aerobic, sporebearing, non pathogenic bacteria. Spore bearing organism in water*. - J. Bacteriol., 1: 505-512.
- LI J., CARROL J., ELLAR D.J., 1991 – *Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from Bacillus thuringiensis at 2.5 Å resolution*. - Nature, 353: 815-821.
- LI J., KONI P.A., ELLAR D.J., 1996 – *Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin cytB from Bacillus thuringiensis sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation*. - J. Mol. Biol., 257: 129-152.
- MARTIN P.A.W., HIROSE E., ALDRICH J.R., 2007 – *Toxicity of Chromobacterium subsugae to southern sink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)*. - J. Econ. Entomol., 100: 680-684.
- MCCRAY A.H., 1917 – *Spore-forming bacteria in the apiary*. - J. Agricult. Res., 8: 399-420.
- OERKE E.C., DEHNE H.W., 2004 – *Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection*. - Crop Protection, 23: 275-285.
- OLIVEIRA E.J., RABINOVITCH L., MONNERAT R.G., PASSOS L.K., ZAHNER V., 2004 – *Molecular characterization of Brevibacillus laterosporus and its potential use in biological control*. - Appl. Environ. Microbiol., 70: 6657-6664.
- PEKRUL S., GRULA E.A., 1979 – *Mode of infection of the corn earworm (Heliothis zea) by Beauveria bassiana as revealed by scanning electron microscopy*. - J. Invertebr. Pathol., 34: 238-247.
- PIGOTT C.R., ELLAR D.J., 2007 – *Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity*. Microbiol. - Mol. Biol. Rev., 71: 255-281
- RIVERS D.B., VANN C.N., ZIMMACK H.L., DEAN D.H., 1991 – *Mosquitocidal Activity of Bacillus laterosporus*. - J. Invertebr. Pathol., 58: 444-447.
- RUIU L., DELRIO G., ELLAR D. J., FLORIS I., PAGLIETTI B., RUBINO S., SATTÀ A., 2006 – *Lethal and sublethal effects of Brevibacillus laterosporus on the housefly (Musca domestica)*. - Entomol. Exp. Appl., 118: 137-144.
- RUIU L., FLORIS I., SATTÀ A., ELLAR D. J., 2007a – *Toxicity of a Brevibacillus laterosporus strain lacking parasporal crystals against Musca domestica and Aedes aegypti*. - Biol. Control, 43: 136-143.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2007b – *Susceptibility of the house fly pupal parasitoid Muscidifurax raptor (Hymenoptera: Pteromalidae) to the entomopathogenic bacteria Bacillus thuringiensis and Brevibacillus laterosporus*. Biol. Control, 43: 188-194.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2007c – *Susceptibility of the honeybee (Apis mellifera L.) to entomopathogenic bacterial toxins used for the biological control*. - Redia, 15: 105-108.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2008 – *Immature house fly (Musca domestica) control in breeding sites with a new Brevibacillus laterosporus formulation*. - Environ. Entom., 37: 505-509.
- 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: 345-350.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I., 2012 – *Observations on house fly larvae midgut ultrastructure after Brevibacillus laterosporus ingestion*. - J. Invertebr. Pathol., 111: 211-216.
- SINGER S., 1996 – *The utility of morphological group II Bacillus*. - Adv. Appl. Microbiol., 42: 219-261.
- SMIRNOVA T.A., MINENKOVA I.B., ORLOVA M.V., LECADET M.M., AZIZBEKYAN R.R., 1996 – *The crystal-forming strains of Bacillus laterosporus*. - Res. Microbiol., 147: 343-350.
- STEINHAUS E.A., 1975 – *Disease in a minor chord*. - Ohio State University Press, Columbus, 488 pp.
- VEGA F.E., KAYA H.K., 2012 – *Insect Pathology*. - Second Edition, Elsevier Inc., 512 pp.
- XIAO G., YING S., ZHENG P., WANG Z.L., ZHANG S., XIE X.Q., SHANG Y., LEGER R.J., ZHAO G.P., WANG C., FENG M.G., 2012 – *Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity of Beauveria bassiana*. - Sci. Rep., 2: 483 DOI: 10.1038/srep00483

L'INTESTINO MEDIO DEGLI INSETTI: BERSAGLIO E BARRIERA DEI BIOINSETTICIDI

MORENA CASARTELLI (*)

(*) *Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, via Celoria 26, 20133 Milano; morena.casartelli@unimi.it*
Lettura tenuta durante la Tavola rotonda "Antagonisti, simbionti e nuove strategie di controllo degli insetti dannosi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 8 giugno 2012.

The insect midgut: target and barrier for bioinsecticides

Sustainable agriculture aims at limiting the employment of chemical compounds for pest control and promotes the adoption of bioinsecticides, environmentally-safe molecules of natural origin which have high specificity against pests and thus harmless for non-target organisms. In recent decades a variety of biocontrol methods employing peptidic or proteinaceous insect-specific toxins derived from microorganisms, plants, insects or insect enemies have been examined in the laboratory and field. The insect midgut represents a target of orally administered bioinsecticides or, if the compounds have a hemocelic target, it represents the barrier that has to be crossed to exert their activity. At present, proteins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) are the active ingredient in the most widely used biopesticides. Bt toxins target receptors located on the apical membranes of the midgut cells of susceptible insects where they form pores that lead to cell osmotic shock and, consequently, to the death of the insect for starvation and septicemia. By contrast, bioinsecticides which target hemocelic receptors have to cross unaltered the midgut barrier, constituted by the peritrophic membrane and the midgut epithelium. The latter can be crossed through the transcellular and/or the paracellular route. During the last years, the study of the functional features of these two pathways shed light on the mechanisms involved in peptide and protein transport across the insect midgut epithelium and opened new perspectives for the design of appropriate strategies to increase their absorption.

Key words: Bt toxins; plant lectins; protein and peptide absorption; transcellular and paracellular route.

L'agricoltura moderna deve integrare al meglio le esigenze di produttività e di redditività delle aziende con quelle di sicurezza degli alimenti, rispetto della natura e della biodiversità. Per raggiungere questo obiettivo è importante sviluppare nuove strategie per il controllo degli insetti dannosi che permettano la riduzione dell'utilizzo degli insetticidi chimici di sintesi. Queste sostanze, infatti, sebbene abbiamo significativamente ridotto i danni causati dai fitofagi e siano oggi molto meno tossiche rispetto ai prodotti del passato, presentano ancora alcune caratteristiche negative, come l'azione ad ampio spettro e la possibilità di sviluppo di ceppi di insetti resistenti (WHETSTONE e HAMMOCK, 2007). Per questa ragione numerosi gruppi di ricerca sono oggi impegnati nell'individuazione di nuove strategie di controllo degli insetti dannosi ed in particolare nell'identificazione di molecole di origine naturale ad attività insetticida. L'interesse è rivolto all'individuazione di proteine e peptidi prodotti da virus, batteri, funghi, piante, insetti o loro nemici naturali, come parassitoidi e predatori, in grado di interferire con i complessi processi fisiologici di questa classe di Artropodi (BALE *et al.*, 2008; DAYAN *et al.*, 2009; WHETSTONE e HAMMOCK, 2007). Parallelamente,

gli studi sono anche rivolti all'individuazione dell'appropriato metodo di somministrazione affinché le molecole ad attività insetticida possano raggiungere in forma attiva i loro target (WHETSTONE e HAMMOCK, 2007).

I bioinsetticidi somministrati oralmente raggiungono il lume intestinale dove entrano in contatto con la barriera intestinale, costituita dalla membrana peritrofica e dall'epitelio intestinale. La membrana peritrofica è una sottile lamina acellulare costituita da una maglia di microfibrille di chitina a cui sono associate proteine, glicoproteine e proteoglicani. Essa avvolge il contenuto intestinale separando così lo spazio endoperitrofico da quello ectoperitrofico, a diretto contatto con la membrana apicale delle cellule intestinali, e rappresenta un'importante barriera al passaggio di patogeni e macromolecole potenzialmente tossiche (LEHANE, 1997). L'epitelio intestinale è deputato alla produzione di enzimi digestivi (TERRA e FERREIRA, 1994) e all'assorbimento delle sostanze nutritive (GIORDANA *et al.*, 1998). Le cellule che svolgono queste fondamentali funzioni sono le cellule colonnari. Esse sono cellule polarizzate che presentano la membrana apicale, ossia quella rivolta verso il lume, ripiegata a formare un orletto

a spazzola. Nello stadio larvale dei Lepidotteri, accanto a questo tipo cellulare, si possono osservare anche le cellule a coppa, che conferiscono all'epitelio intestinale peculiari caratteristiche funzionali (GIORDANA *et al.*, 1998).

Considerato il fondamentale ruolo fisiologico svolto dall'epitelio intestinale, esso rappresenta un possibile bersaglio per i bioinsetticidi, oppure la barriera che deve essere superata affinché le molecole ad attività tossica con target emocelico possano esercitare la loro azione. Sebbene da diverso tempo ci siano evidenze che proteine e peptidi possano superare intatti la barriera intestinale di insetto (JEFFERS e ROE, 2008), solo recentemente sono stati compiuti approfonditi studi per indagare i meccanismi fisiologici coinvolti nell'assorbimento di queste macromolecole nell'intestino di insetto (CASARTELLI *et al.*, 2005; 2007; 2008; FIANDRA *et al.*, 2009). Queste ricerche sono di fondamentale importanza per individuare adeguati metodi di somministrazione dei bioinsetticidi di natura proteica con target emocelico e per mettere a punto opportune strategie per aumentarne il passaggio attraverso la barriera intestinale, affinché possano raggiungere i target emocelici in quantità sufficiente per esercitare la loro attività tossica (FIANDRA *et al.*, 2010).

Attualmente, dell'intero mercato degli insetticidi, i bioinsetticidi rappresentano solo circa il 3%, di cui più del 90% è costituito da tossine del *Bacillus thuringiensis* (Bt); esse rappresentano quindi la principale alternativa naturale agli insetticidi chimici di sintesi. *B. thuringiensis* è un batterio Gram positivo aerobio che durante la fase di sporulazione produce inclusioni cristalline formate da proteine ad attività insetticida: le tossine Cry e le tossine Cyt. Queste δ -endotossine sono altamente specifiche per gli insetti target (Lepidotteri, Coleotteri e Ditteri), non presentano tossicità nei confronti di vertebrati e piante e sono completamente biodegradabili. Rappresentano quindi una valida alternativa per il controllo degli insetti dannosi in agricoltura e degli insetti vettori di malattie. Queste proteine hanno la capacità di inserirsi nel dominio apicale della membrana plasmatica delle cellule assorbenti intestinali dell'insetto target e di formare un poro (BRAVO *et al.*, 2011). Le numerose tossine fino ad oggi identificate (più di 500) sono state classificate sulla base della sequenza amminoacidica primaria in più di 60 gruppi e sulla base del possibile meccanismo d'azione in 4 famiglie (BRAVO *et al.*, 2011). La più numerosa è rappresentata dalla famiglia di tossine Cry con tre domini (3d-Cry) (circa 40 gruppi, più di 200 tossine). Le tossine appartenenti a questa famiglia hanno una struttura tridimensionale organizzata in tre domini. Il dominio I è implica-

to nell'oligomerizzazione della tossina, nell'inserzione in membrana e nella formazione del poro; i domini II e III sono invece coinvolti nel riconoscimento di specifiche proteine presenti a livello della membrana apicale delle cellule assorbenti intestinali che fungono da recettori per la tossina. Questi due domini sono quindi i responsabili della specie-specificità delle differenti tossine (BRAVO *et al.*, 2011). Il meccanismo d'azione proposto per le tossine attive contro i Lepidotteri prevede differenti step, qui di seguito brevemente riassunti (BRAVO *et al.*, 2011):

- le inclusioni cristalline ingerite dalla larva vengono solubilizzate nel lume intestinale, un ambiente con condizioni fortemente riducenti e con pH fortemente alcalino;
- nel lume intestinale vengono così liberate le protossine, ossia la forma inattiva delle tossine, che vengono attivate mediante taglio proteolitico ad opera delle proteasi intestinali;
- la tossina in forma monomerica si lega a proteine presenti sulla membrana apicale delle cellule assorbenti, definite recettori primari. Nel caso delle tossine Cry1A, attive contro numerosi Lepidotteri, i recettori primari sono proteine appartenenti alla famiglia delle caderine. È stato recentemente dimostrato che anche nel caso di insetti appartenenti all'ordine dei Ditteri e dei Coleotteri le caderine fungono da recettore primario;
- il legame con il recettore primario rende possibile un ulteriore taglio proteolitico della tossina che porta all'eliminazione di un breve peptide all'estremità N-terminale della proteina, ossia quello che corrisponde all' α -elica 1 del dominio I;
- questo taglio proteolitico induce la formazione di strutture oligomeriche che mostrano elevata affinità per i recettori secondari, proteine ancorate alla membrana apicale delle cellule assorbenti mediante un residuo di glicosilfosfatidilinositolo (GPI-anchored proteins). Tra i recettori secondari identificati nei Lepidotteri e nei Ditteri possiamo ricordare l'aminopeptidasi N e la fosfatasi alcalina; recentemente è stato dimostrato che quest'ultimo enzima funge da recettore anche nei Coleotteri;
- in seguito al legame con i recettori secondari, gli oligomeri si inseriscono nella membrana apicale delle cellule assorbenti a livello dei microdomini di membrana (zattere lipidiche o lipid rafts) dove sono espressi gli stessi recettori secondari, con la conseguente formazione di pori selettivi per gli ioni potassio;
- questi pori causano un grave shock osmotico nelle cellule intestinali, che determina la loro rottura e infine la morte dell'insetto.

Sebbene il meccanismo d'azione delle tossine Cry sia stato descritto in dettaglio solo nei Lepidotteri, l'identificazione degli stessi recettori nei 3 differenti ordini di insetto sensibili alle tossine Bt e il fatto che quelle attive nei confronti di questi insetti appartengano tutte alla famiglia di tossine Cry con tre domini suggeriscono che il meccanismo d'azione di queste tossine sia lo stesso nei 3 ordini (BRAVO *et al.*, 2011).

È stato proposto un modello alternativo per spiegare la tossicità delle tossine Cry (ZHANG *et al.*, 2006). Questo modello prevede che l'interazione delle tossine 3d-Cry in forma monomeriche con il recettore primario attivi una cascata del segnale intracellulare: l'interazione della tossina con la caderina attiva una proteina G che a sua volta attiva l'enzima adenilato ciclasi con il conseguente aumento della concentrazione intracellulare di cAMP. Gli aumentati livelli di cAMP attivano la proteina chinasi A, che avvia un pathway intracellulare del segnale che porta alla destabilizzazione del citoscheletro e all'alterazione dell'attività di specifici canali di membrana: la perdita dell'integrità strutturale e funzionale della cellula innesca processi di morte cellulare. Questo modello prevede che la morte delle cellule di insetto avvenga senza l'interazione della tossina con il recettore secondario, quindi senza la formazione della struttura oligomerica della tossina e la conseguente formazione del poro. Occorre però precisare che l'elaborazione di questo modello deriva da studi eseguiti *in vitro*, su cellule di insetto in coltura (cellule High Five di ovario di *Tricoplusia ni*) esprimenti il gene eterologo della caderina che in *Manduca sexta* funge da recettore primario per la Cry1Ab, la tossina utilizzata per questo studio, quindi cellule che non sono il naturale target della tossina. Inoltre, ad oggi, non ci sono evidenze sperimentali che dimostrino il coinvolgimento di questo meccanismo nella morte delle cellule dell'intestino larvale *in vivo*. Oltre a ciò, dati sperimentali indicano che l'interazione tra il recettore primario e le tossine non può essere l'unico evento responsabile della morte dell'insetto. Sono state infatti prodotte delle tossine modificate, denominate tossine CryMod, che mancano dell' α -elica 1 del dominio I, ossia di quella breve sequenza amminoacidica che viene eliminata in seguito a taglio proteolitico dopo l'interazione della tossina con il recettore primario. Queste tossine mostrano attività tossica inalterata nei confronti di larve che hanno sviluppato resistenza perché presentano il recettore primario mutato e quindi incapace di legare la tossina (SOBERON *et al.*, 2007); questa evidenza è una chiara indicazione che, come precedentemente detto, l'interazione tra

questo recettore e le tossine non può essere l'unico evento responsabile della morte dell'insetto.

Numerosi sono i prodotti a base di Bt oggi utilizzati per il controllo degli insetti dannosi per l'agricoltura e contro differenti specie di Ditteri. Essi sono rappresentati da formulati a base di spore e cristalli o da piante transgeniche esprimenti tossine Bt. Quest'ultimo metodo di somministrazione si è dimostrato particolarmente efficace perché nella pianta transgenica la tossina è espressa in modo continuo ed è protetta dalle radiazioni solari a cui è sensibile. Il principale problema legato all'utilizzo dei prodotti a base di Bt, specialmente nel caso delle piante geneticamente modificate, è determinato dallo sviluppo di resistenza, che dipende in primo luogo dall'insorgenza di mutazioni che interferiscono con il meccanismo d'azione delle tossine. Queste mutazioni possono portare ad alterazioni nel processo di attivazione delle tossine o ad alterazioni nei recettori che hanno come conseguenza una riduzione del binding alle membrane apicali delle cellule intestinali (BRAVO *et al.*, 2011). Differenti sono le strategie messe in atto per ritardare o limitare l'insorgenza di resistenza quando si utilizzano piante geneticamente modificate; le più comuni ed efficaci sono la creazione di aree rifugio o la produzione di piante Bt esprimenti differenti tossine attive contro una determinata specie di insetto che abbiano recettori differenti (BRAVO *et al.*, 2011). Diverse sono anche le strategie per aumentare l'attività tossica delle proteine Cry, riassunte in una recente review (PARDO-LOPEZ *et al.*, 2009). È stato ad esempio dimostrato che la somministrazione combinata di tossine Cry e chitinasi, enzimi in grado di alterare la maglia di chitina della membrana peritrofica, a larve di *Spodoptera littoralis* e *Helicoverpa armigera* determina un sensibile aumento dell'efficacia del bioinsetticida. Il maggiore effetto larvicida è probabilmente da imputare ad un aumento della permeabilità della tossina attraverso la membrana peritrofica e quindi ad un maggior numero di proteine Cry che possono raggiungere la membrana apicale delle cellule colonnari dove sono collocati i recettori. È stato anche dimostrato che numerosi inibitori delle serin proteasi, somministrati ad una concentrazione molto inferiore a quella tossica in combinazione con le tossine Cry, ne potenziano l'attività insetticida, probabilmente perché riducono la degradazione delle stesse tossine Cry ad opera di specifiche proteasi intestinali. Nel caso di tossine Cry attive contro i Ditteri, è stato osservato che la somministrazione combinata con proteine Cyt determina un aumento della loro attività tossica e la soppressione della resistenza in popolazioni di *Culex quinquefasciatus* resistenti alle tossine

Cry. E' bene ricordare che le tossine Cyt sono proteine con attività citolitica prodotte da alcuni ceppi di *B. thuringiensis*, in particolare da quelli che mostrano attività insetticida contro i Ditteri. Esse hanno la capacità di formare pori nelle membrane, ma non hanno nessuna relazione filogenetica con le tossine Cry. Le proteine Cyt non si legano a recettori proteici presenti nella membrana, ma interagiscono direttamente con i lipidi di membrana, inserendosi nel doppio stato fosfolipidico e formando un poro o distruggendo l'organizzazione del doppio strato lipidico con un meccanismo simile a quello dei detergenti. Per quanto riguarda la sinergia tra alcune proteine Cry attive contro i Ditteri e le tossine Cyt o la capacità di queste ultime di bypassare la resistenza in popolazioni di larve di zanzara che hanno sviluppato resistenza alle tossine Cry, il meccanismo proposto è il seguente: le tossine Cyt si inseriscono nella membrana apicale delle cellule assorbenti intestinali ed espongono regioni che vengono riconosciute dalle proteine Cry; le proteine Cyt possono così fungere da recettore per le tossine Cry, facilitando l'oligomerizzazione e la formazione del poro. L'attività tossica delle proteine Cry è stata potenziata anche somministrando oralmente a larve di lepidottero la tossina in combinazione con frammenti di caderina denominati CR12-MPED che, oltre ad essere in grado di legare la tossina, hanno la capacità di inserirsi nella membrana apicale delle cellule intestinali. L'effetto sinergico con le tossine Cry è determinato, come nel caso delle proteine Cyt, dall'aumento del numero dei siti di binding per la tossina a livello dell'orletto a spazzola. Ciò promuove l'oligomerizzazione della tossina e quindi aumenta la probabilità che le proteine Cry interagiscano con i recettori secondari. Tra le strategie per aumentare l'attività tossica delle proteine Cry vanno infine ricordate modificazioni nei geni che codificano per le tossine stesse, come ad esempio: a) l'introduzione di specifici siti di taglio proteolitico intramolecolari per migliorare il processo di attivazione e, di conseguenza, aumentare il binding ai recettori di membrana; b) la creazione di tossine ibride che presentino attività tossica nei confronti di un più ampio spettro di insetti o maggiore entomopatogenicità rispetto alle tossine parentali da cui esse derivano; c) la delezione di piccole regioni della tossina, come nel caso delle tossine CryMod precedentemente citate, che mancano dell' α -elica 1 del dominio I, ossia di quella breve sequenza amminoacidica che viene eliminata in seguito a taglio proteolitico dopo l'interazione della tossina con il recettore primario. Queste tossine formano oligomeri anche in assenza dell'interazione con il recettore primario e, oltre a

presentare una aumentata tossicità, possono essere particolarmente utili per contrastare fenomeni di resistenza dovuti a mutazioni nel recettore primario stesso che lo rendono incapace di legare la tossina.

Da quanto riportato, emerge chiaramente come una conoscenza dettagliata del meccanismo d'azione di un bioinsetticida e della sua interazione con l'organo bersaglio sia fondamentale per individuare opportune strategie volte migliorarne l'efficacia.

Un altro esempio di bioinsetticida efficace per ingestione orale è rappresentato dalle lectine prodotte dalle piante. Alcune lectine sono presenti nei semi e in differenti tessuti di riserva come tuberi, bulbi, rizomi; altre invece, sono presenti in tessuti che non hanno funzione di riserva, come foglie e fiori, e la loro espressione viene indotta in condizioni di stress biotico o abiotico (attacco di insetti fitofagi, siccità, basse temperature, elevata concentrazione salina) (MICHIELS *et al.*, 2010; VANDENBORRE *et al.*, 2011). La caratteristica che accomuna tutte le lectine è quella di essere proteine con un dominio in grado di legare in modo specifico e reversibile i carboidrati, sia semplici monosaccaridi sia complessi glicani. Negli ultimi decenni le lectine prodotte dalle piante hanno suscitato molto interesse perché mostrano una elevata attività tossica nei confronti di molti insetti fitofagi (Lepidotteri, Ditteri, Coleotteri ed Emittteri). La somministrazione orale di queste proteine (aggiunte nella dieta artificiale o espresse in piante transgeniche) provoca differenti effetti tossici (MICHIELS *et al.*, 2010; VANDENBORRE *et al.*, 2011):

- alterazione dei processi digestivi;
- alterazione della crescita e dello sviluppo;
- riduzione del numero di uova deposte;
- alterazione dell'espressione genica nelle cellule intestinali (ad esempio di geni coinvolti nell'organizzazione del citoscheletro, nei processi di detossificazione, nel metabolismo energetico e di geni che codificano per enzimi digestivi);
- morte dell'insetto.

Il meccanismo d'azione di queste proteine non è stato ancora chiarito. È noto che alcune lectine si legano alla membrana peritrofica e alla membrana apicale delle cellule assorbenti intestinali, mentre altre vengono internalizzate nelle cellule assorbenti, superano l'epitelio intestinale e si ritrovano nell'emolinfa, nei tubuli Malpighiani, nel corpo grasso, negli ovaroli (MICHIELS *et al.*, 2010). È stato ad esempio dimostrato che larve di *Ostrinia nubilalis* alimentate con dieta contenente WGA (Wheat Germ Agglutinin) presentano alterazioni strutturali della membrana peritrofica e della membrana apicale delle cellule colonnari dell'epi-

telio intestinale (HOPKINS e HARPER, 2001; VANDENBORRE *et al.*, 2011). In questo caso l'effetto tossico della lectina è da attribuire ad una riduzione della funzione di barriera di queste strutture e/o delle capacità di assorbimento dei nutrienti da parte dell'epitelio intestinale. Anche nel caso di lectine che non causano alterazioni strutturali dei microvilli, il binding alla membrana apicale delle cellule assorbenti potrebbe impedire le normali funzioni digestive e di assorbimento dell'epitelio stesso (CACCIA *et al.*, 2012). Per quanto riguarda invece le lectine in grado di superare la barriera intestinale, come ad esempio la GNA (*Galanthus nivalis* Agglutinin), e di raggiungere così l'emocele e specifici tessuti e organi non sono state fatte ad oggi ipotesi sul loro meccanismo d'azione.

Come precedentemente detto, è stato ampiamente dimostrato che peptidi e proteine sono in grado di superare la barriera intestinale di insetto. Va però precisato che l'epitelio intestinale di questi Artropodi, e l'intestino medio delle larve di lepidottero in particolare (GIORDANA *et al.*, 1998), presenta peculiari caratteristiche funzionali che, se studiate in dettaglio, possono fornire importanti informazioni su come aumentare l'assorbimento di peptidi e proteine ad attività insetticida. Negli ultimi anni abbiamo focalizzato i nostri studi sulla caratterizzazione delle proprietà funzionali delle due vie che queste macromolecole possono utilizzare per superare l'epitelio intestinale: la via transcellulare e la via paracellulare. Il primo pathway implica il superamento dei domini apicale e basolaterale della membrana plasmatica della cellula e il complesso processo cellulare che permette l'assorbimento della macromolecola prende il nome di transitosi (TUMA e HUBBARD, 2003). Tale processo prevede che la macromolecola venga endocitata ad un dominio della membrana plasmatica, trasportata nel citosol all'interno di vescicole e rilasciata per escitosi a livello del dominio di membrana opposto rispetto a quello dove è avvenuta l'internalizzazione. Il secondo pathway, la via paracellulare, è rappresentato dal canale acquoso compreso tra le membrane laterali di due cellule adiacenti, la cui permeabilità è regolata dalla giunzione settata.

Le proprietà funzionali della via paracellulare dell'intestino di insetto sono ancora poco conosciute. Abbiamo così iniziato la caratterizzazione *in vitro* di questa via di permeazione nell'intestino larvale di lepidottero. Abbiamo dimostrato che essa presenta una selettività rispetto alla carica e alla dimensione degli ioni (FIANDRA *et al.*, 2006) e che peptidi e molecole organiche come il proctolin o la fluoresceina superano l'epitelio intestinale esclusivamente attraverso questa via (FIANDRA *et*

al., 2009). Inoltre, la permeabilità della via paracellulare è modulabile: un aumento della concentrazione intracellulare dello ione calcio o di cAMP determina un aumento della permeabilità di questa via di permeazione (FIANDRA *et al.*, 2006). Utilizzando un acido grasso a catena media (C10) che in mammifero causa un aumento della permeabilità della giunzione stretta mobilizzando il calcio dai depositi intracellulari (CANO-CEBRIAN *et al.*, 2005), stiamo ora studiando uno dei pathway intracellulari che può portare nelle cellule di intestino di insetto ad un aumento della concentrazione intracellulare di calcio. Abbiamo dimostrato che intestini larvali di lepidottero isolati in camere di Ussing e incubati in presenza di C10, presentano un aumento della permeabilità della via paracellulare agli ioni e un aumento del flusso di proctolin e fluoresceina. Abbiamo chiarito che l'acido grasso attiva nelle cellule intestinali di lepidottero una via di trasduzione del segnale inositide-dipendente. Più precisamente, il C10 attiva la fosfolipasi C che porta alla produzione di inositolo trifosfato (IP3) e al conseguente rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico. Lo ione calcio si lega alla calmodulina e il complesso porta all'attivazione della chinasi che fosforila la catena leggera della miosina (MLCK). Ciò determina una probabile riorganizzazione del citoscheletro connesso alla giunzione settata che ha come conseguenza un aumento della permeabilità della via paracellulare (CASARTELLI *et al.*, dati non pubblicati). Rimane ancora da chiarire come la fosforilazione della catena leggera della miosina causi tale riorganizzazione del citoscheletro. È bene sottolineare che l'individuazione dei meccanismi cellulari coinvolti nella regolazione della permeabilità di questa via di permeazione può risultare particolarmente utile per mettere a punto opportune strategie di somministrazione per piccole molecole organiche, come peptidi attivi, con target emocelico.

Per quanto riguarda lo studio della via transcellulare, abbiamo dimostrato che l'albumina, da noi scelta come proteina modello, è in grado di superare l'epitelio intestinale delle larve di lepidottero, montato in un opportuno apparato di perfusione, per transitosi (CASARTELLI *et al.*, 2005). Utilizzando cellule colonnari in coltura abbiamo chiarito che l'albumina viene internalizzata a livello della membrana apicale con un meccanismo di endocitosi mediata da clatrina da un recettore omologo alla megalina (CASARTELLI *et al.*, 2008), recettore multiligando espresso in molti epitelii assorbenti di mammifero (MOESTRUP e VERROUST, 2001; CHRISTENSEN e BIRN, 2002). La megalina-like di insetto è in grado di riconoscere, oltre all'albumina, altri ligandi (insulina, transferrina,

gentamicina) (CASARTELLI *et al.*, 2008; CASARTELLI *et al.*, dati non pubblicati) e potrebbe quindi essere, come in mammifero, un recettore scavenger in grado di riconoscere e internalizzare molteplici substrati. Le proprietà di questo recettore potrebbero quindi rivelarsi particolarmente utili per veicolare proteine di interesse attraverso l'intestino di insetto, e la stessa albumina, internalizzata in modo molto efficiente da questo recettore, potrebbe fungere da vettore per molecole di interesse ad attività insetticida.

Un efficace metodo per veicolare molecole poco permeabili attraverso la membrana plasmatica è rappresentato dai Cell Penetrating Peptides (CPP). In differenti tipi cellulari di mammifero, è stato dimostrato che i CPP, piccoli peptidi caratterizzati dalla presenza di numerosi residui di lisina e arginina, sono in grado di superare la membrana plasmatica e di fungere da vettori per differenti tipi di cargo (proteine, peptidi, acidi nucleici) ad essi associati (SCHMIDT *et al.*, 2010; MADANI *et al.*, 2011). Il meccanismo coinvolto nella loro internalizzazione non è stato ancora del tutto chiarito. È stato dimostrato che l'internalizzazione di alcuni CPP è mediata da meccanismi endocitotici, ma in molti casi si è osservato che l'ingresso in cellula avviene anche in presenza di inibitori dell'endocitosi (FUTAKI *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2007).

Abbiamo recentemente dimostrato che il CPP Tat può essere utilizzato come vettore per cargo proteici anche nelle cellule intestinali di lepidottero (CERMENATI *et al.*, 2011). In cellule colonnari di intestino larvale di lepidottero in coltura abbiamo dimostrato che la proteina di fusione formata dal CPP Tat e dalla enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) viene internalizzata con maggior efficienza rispetto alla sola eGFP. Abbiamo anche chiarito che il meccanismo coinvolto nell'internalizzazione della Tat-eGFP è indipendente da energia poiché né inibitori metabolici né specifici inibitori dell'endocitosi mediata da clatrina interferiscono con l'ingresso in cellula della proteina di fusione. Poiché le cellule colonnari in coltura sono in sospensione ed espongono alla soluzione di incubazione sia il dominio apicale che quello basolaterale della membrana plasmatica, per verificare se la membrana apicale è effettivamente coinvolta nell'internalizzazione della Tat-eGFP, abbiamo isolato e montato l'intestino in un opportuno apparato di perfusione. La eGFP e la Tat-eGFP sono state aggiunte nel comparto luminale dell'apparato e dopo tre ore di incubazione gli intestini sono stati osservati in microscopia confocale. I tessuti incubati in presenza di Tat-eGFP mostrano un segnale fluorescente molto più intenso di quello osservato negli intestini incubati con la sola eGFP, chiara indicazione che il CPP Tat è in grado di pro-

muovere l'internalizzazione della proteina eGFP attraverso la membrana apicale delle cellule di intestino larvale di lepidottero. Con il medesimo approccio sperimentale abbiamo anche misurato il flusso trans-epiteliale della eGFP e della Tat-eGFP. Abbiamo così dimostrato che il CPP Tat non solo aumenta l'internalizzazione della proteina cargo, ma incrementa in modo significativo il suo trasporto trans-epiteliale. Questi risultati aprono nuove prospettive per una efficace somministrazione orale di macromolecole ad attività insetticida i cui target siano localizzati nelle cellule dell'epitelio intestinale di insetto o nel compartimento emocelico.

RIASSUNTO

L'agricoltura sostenibile cerca di limitare l'uso intensivo degli insetticidi chimici di sintesi per il controllo degli insetti dannosi alle colture a favore dei bioinsetticidi, molecole di origine naturale a basso impatto sull'ambiente, sugli organismi non bersaglio e sulla salute umana. Per questa ragione numerosi gruppi di ricerca sono oggi impegnati nell'individuazione di nuove strategie di controllo degli insetti dannosi e nell'identificazione di molecole di origine naturale ad attività insetticida. L'interesse è rivolto all'individuazione di proteine e peptidi prodotti da microorganismi, piante, insetti o loro nemici naturali. L'intestino medio di insetto rappresenta un bersaglio per i bioinsetticidi somministrati per via orale, oppure la barriera che deve essere superata affinché le molecole ad attività tossica con target emocelico possano esercitare la loro azione. I bioinsetticidi più diffusi in commercio sono i prodotti a base di tossine del batterio *Bacillus thuringiensis*, proteine che si legano a recettori presenti sulle membrane apicali delle cellule dell'intestino degli insetti sensibili e causano pori che portano allo shock osmotico delle cellule e alla morte dell'insetto per inedia e setticemia. Le molecole entomocide con target emocelico devono invece superare inalterate la barriera intestinale, costituita dalla membrana peritrofica e dall'epitelio intestinale. Quest'ultimo può essere attraversato tramite la via transcellulare e/o la via paracellulare. Negli ultimi anni lo studio delle proprietà funzionali di queste due vie di permeazione ha permesso di chiarire quali siano i meccanismi coinvolti nell'assorbimento di peptidi e proteine a livello dell'epitelio intestinale d'insetto e di elaborare opportune strategie per aumentarne il trasporto.

BIBLIOGRAFIA

- BALE J.S., VAN LENTEREN J.C., BIGLER F., 2008 - *Biological control and sustainable food production*. - Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363: 761-776.
- BRAVO A., LIKITVIVATANAVONG S., GILL S.S., SOBERON M., 2011 - *Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide*. - Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41: 423-431.
- CACCIA S., VAN DAMME E.J.M., DE VOS W.H., SMAGGHE G., 2012 - *Mechanism of entomotoxicity of the plant lectin from *Hippeastrum hybrid (Amaryllis)* in *Spodoptera littoralis larvae**. - Journal of Insect Physiology, 58: 1177-1183.

- CANO-CEBRIAN M.J., ZORNOZA T., GRANERO L., POLACHE A., 2005 – *Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery*. - Current Drug Delivery, 2: 9-22.
- CASARTELLI M., CORTI P., LEONARDI M.G., FIANDRA L., BURLINI N., PENNACCHIO F., GIORDANA B., 2005 – *Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva*. - Journal of Insect Physiology, 51: 933-940.
- CASARTELLI M., CERMENATI G., CORTI P., FIANDRA L., GRIMALDI A., SANTO N., PENNACCHIO F., GIORDANA B., 2007 – *Absorption of horseradish peroxidase in Bombyx mori larval midgut*. - Journal of Insect Physiology, 53: 517-525.
- CASARTELLI M., CERMENATI G., RODIGHIERO S., PENNACCHIO F., GIORDANA B., 2008 – *A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect (Bombyx mori, Lepidoptera)*. - American Journal of Physiology, 295: R1290-R1300.
- CERMENATI G., TERRACCIANO I., CASTELLI I., GIORDANA B., RAO R., PENNACCHIO F., CASARTELLI M., 2011 – *The CPP Tat enhances eGFP cell internalization and transepithelial transport by the larval midgut of Bombyx mori (Lepidoptera, Bombycidae)*. - Journal of Insect Physiology, 57: 1689-1697.
- CHRISTENSEN E.L., BIRN H., 2002 – *Megalyn and cubilin: multifunctional endocytic receptors*. - Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3: 258-268.
- DAYAN F.E., CANTRELL C.L., DUKE S.O., 2009 – *Natural products in crop protection*. - Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17: 4022-4034.
- FIANDRA L., CASARTELLI M., GIORDANA B., 2006 – *The paracellular pathway in the lepidopteran larval midgut: modulation by intracellular mediators*. - Comparative Biochemistry and Physiology, 144A: 464-473.
- FIANDRA L., CASARTELLI M., CERMENATI G., BURLINI N., GIORDANA B., 2009 – *The intestinal barrier in lepidopteran larvae: Permeability of the peritrophic membrane and of the midgut epithelium to two biologically active peptides*. - Journal of Insect Physiology, 55: 10-18.
- FIANDRA L., TERRACCIANO I., FANTI P., GARONNA A., FERRACANE L., FOGLIANO V., CASARTELLI M., GIORDANA B., RAO R., PENNACCHIO F., 2010 – *A viral chitinase enhances oral activity of TMOF*. - Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40: 533-540.
- FUTAKI S., NAKASE I., TADOKORO A., TAKEUCHI T., JONES A.T., 2007 – *Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms*. - Biochemical Society Transactions, 35: 784-787.
- GIORDANA B., LEONARDI M.G., CASARTELLI M., CONSONI P., PARENTI P., 1998 – *K⁺-neutral amino acid symport of Bombyx mori larval midgut: a system operative in extreme conditions*. - American Journal of Physiology, 274: R1361-R1371.
- HOPKINS T.L., HARPER M.S., 2001 – *Lepidopteran peritrophic membranes and the effect of dietary germ agglutinin on their formation and structure*. - Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 47: 100-109.
- JEFFERS L.A., ROE R.M., 2008 – *The movement of proteins across the insect and tick digestive system*. - Journal of Insect Physiology, 54: 319-332.
- LEHANE M.L., 1997 – *Peritrophic matrix structure and function*. - Annual Review of Entomology, 42: 525-550.
- MADANI F., LINDBERG S., LANGEL U., FUTAKI S., GRASLUND S., 2011 – *Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides*. - Journal of Biophysics Volume 2011, Article ID 414729, 10 pages doi:10.1155/2011/414729.
- MICHIELS K., VAN DAMME E.J.M., SMAGGHE G., 2010 – *Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectines?* - Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 73:193-212.
- MOESTRUP S.K., VERROUST P.J., 2001 – *Megalyn- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids and hormones in polarized epithelia*. - Annual Review of Nutrition, 21: 407-428.
- PARDO-LOPEZ L., MUNOZ-GARAY C., PORTA H., RODRIGUEZ-ALMAZAN C., SOBERON M., BRACO A., 2009 – *Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. - Peptides, 30: 589-595.
- PATEL L.N., ZARO J.L., SHEN W., 2007 – *Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives*. - Pharmaceutical Research, 24: 1977-1992.
- SCHMIDT N., MISHRA A., LAI G.H., WONG G.C.L., 2010 – *Arginine-rich cell-penetrating peptides*. - FEBS Letters, 584: 1806-1813.
- SOBERÓN M., PARDO-LÓPEZ L., LÓPEZ I., GÓMEZ I., TABASHNIK B., BRAVO A., 2007 – *Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance*. - Science, 318: 1640-1642.
- TERRA W.R., FERREIRA C., 1994 – *Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function*. - Comparative Biochemistry and Physiology, 109B: 1-62.
- TUMA P.L., HUBBARD A.L., 2003 – *Transcytosis: crossing cellular barriers*. - Physiological Reviews, 83: 871-932.
- VANDENBORRE G., SMAGGHE G., VAN DAMME E.J.M., 2011 – *Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects*. - Phytochemistry, 72: 1538-1550.
- WHETSTONE P.A., HAMMOCK B.D., 2007 – *Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control*. - Toxicon, 49: 576-596.
- ZHANG X., CANDAS M., GRIKO N.B., TAUSSIG R., BULLA JR. L.A., 2006 – *A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis*. - Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America, 103: 9897-9902.

SEDUTA PUBBLICA, FIRENZE 16 NOVEMBRE 2012

Tavola Rotonda su:

LA RESISTENZA DEGLI INSETTI
DI INTERESSE AGRARIO AGLI INSETTICIDI

Coordinatore:
PIERO CRAVEDI, Accademico

LA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI DELL'AFIDE *MYZUS PERSICAE* (SULZER)

EMANUELE MAZZONI (*) - PIERO CRAVEDI (*)

(*) Istituto di Entomologia e Patologia vegetale – Facoltà di Agraria - Università Cattolica del Sacro Cuore - Via E. Parmense, 84, 29122 Piacenza - emanuele.mazzoni@unicatt.it
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi”. Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Insecticide resistance in the aphid Myzus persicae (Sulzer)

Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) is a key pest in Italian peach orchards but also in many herbaceous crops. Insecticide treatments selected resistant populations. Several resistance mechanisms in *M. persicae* are known: esterases and mixed function oxydases overproduction and target site insensitivity for carbamates, pyrethroids and also for cyclodienic insecticides. More recently a highly specific target site resistance mechanisms have been found against neonicotinoid insecticides. These resistance mechanisms allow aphids to survive when sprayed with traditional aphicides. In Italy resistant strains are widely distributed but they are more frequent where agriculture is more intense. Management strategies are discussed.

KEY WORDS: *Myzus persicae*, peach, nicotinic receptor, esterase E4/FE4, modified acetylcholinesterase, kdr

INTRODUZIONE

Il problema della resistenza agli insetticidi negli Afidi ed Aleirodidi è particolarmente sentito a causa di una serie di fattori che conferiscono a molte delle specie appartenenti questo gruppo sistematico un ruolo chiave nella difesa delle colture. La notevole polifagia, spesso a danno di colture a elevato reddito, unita a una grande capacità riproduttiva, li rendono i soggetti ideali per lo sviluppo e la selezione di popolazioni resistenti ai prodotti fitosanitari. A livello mondiale le specie che maggiormente destano preoccupazioni sono gli afidi *Myzus persicae* (Sulzer) e *Aphis gossypii* Glover e gli aleirodidi *Bemisia tabaci* (Gennadius) e *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood).

In Italia l'importanza fitosanitaria di queste specie varia in funzione dell'ambiente ma in linea di massima *M. persicae* e *B. tabaci* rappresentano le avversità di maggior rilievo economico.

L'afide verde del pesco, particolarmente nell'Italia settentrionale, è una specie chiave nella difesa fitosanitaria del pesco e di varie colture erbacee (BARBAGALLO *et al.*, 2007).

Il grande impatto economico della specie ha causato nel tempo un'elevata pressione di selezione ad opera degli insetticidi impiegati per il suo controllo. Le segnalazioni di resistenza agli agrofarmaci sono numerose. I primi rapporti di insuccessi dei trattamenti risalgono già alla metà del secolo scorso. Tuttavia, nonostante il problema fosse ampiamente noto, è solo dopo il 1970 circa che si è

iniziato a comprendere quali fossero i meccanismi di resistenza coinvolti.

Nel corso degli anni, i cambiamenti di strategia fitosanitaria, di volta in volta adottati per il contenimento delle popolazioni di questa specie, hanno spesso selezionato popolazioni resistenti. L'introduzione di nuovi principi attivi, con meccanismi d'azione radicalmente differenti da quelli già presenti in commercio, ha determinato la temporanea illusione di aver risolto il problema della resistenza. Tuttavia, anche insetticidi ritenuti inizialmente molto efficaci e “sicuri”, per quanto riguarda lo sviluppo di resistenze, presto o tardi, hanno mostrato una minor efficacia. Un classico esempio di questo preoccupante fenomeno è rappresentato dagli insetticidi appartenenti alla classe dei neonicotinoidi (modalità d'azione IRAC 4A – agonisti del recettore nicotinic dell'acetilcolina - nAChR). Questi insetticidi, in anni recenti, hanno rappresentato ampiamente il più consolidato e diffuso strumento per la lotta contro gli afidi fornendo, fin dalla loro introduzione, una valida alternativa a vecchi prodotti e dimostrando ampiamente di essere un utile supporto sia alle strategie di lotta integrata che alla gestione della resistenza agli insetticidi.

Le segnalazioni di popolazioni sulle quali i trattamenti con neonicotinoidi dimostrano una minor efficacia si sono moltiplicate nel corso degli ultimi anni (FOSTER *et al.*, 2008; TOOR *et al.*, 2008; PHILIPPOU *et al.*, 2010; PUINEAN *et al.*, 2010), arrivando a forme di resistenza conclamate causate da mutazioni speci-

fiche nella sequenza amminoacidica del recettore nicotinico dell'acetilcolina (BASS *et al.*, 2011).

Il fenomeno delle resistenze multiple è noto da anni sia in *M. persicae* che in varie altre specie di insetti. La coesistenza di differenti meccanismi che interagiscono con diverse classi di principi attivi può portare praticamente all'immunità le popolazioni coinvolte (FIELD *et al.*, 1997; DEWAR *et al.*, 1998). Tali meccanismi possono essere raggruppati in due grandi gruppi: resistenze metaboliche, prodotte da enzimi in grado di detossificare e/o sequestrare le molecole dell'insetticida, e resistenze target-site, causate da alterazioni del sito bersaglio che lo rendono molto meno sensibile all'azione dell'insetticida.

LE RESISTENZE METABOLICHE

La resistenza causata da esterasi

La prima forma di resistenza caratterizzata nelle popolazioni di *M. persicae* è stata una resistenza di tipo metabolico. Agli inizi degli anni '70 è stata infatti correlata la resistenza, sia agli esteri fosforici che ad altri insetticidi caratterizzati dalla presenza di un gruppo estere nella loro molecola, all'attività di enzimi appartenenti al gruppo delle esterasi (NEEDHAM & SAWICKI, 1971). Successivamente è stato evidenziato e quantificato il legame tra livello di resistenza nei confronti degli organofosforici e attività enzimatica (DEVONSHIRE *et al.*, 1992). Ai livelli di resistenza indicati come S (sensibile), R1 (moderatamente resistente), R2 (molto resistente) e R3 (estremamente resistente) sono stati abbinati i valori di assorbanza ottenuti in un test spettrofotometrico in grado di misurare l'attività esterasica totale attraverso l'idrolisi del substrato artificiale 1-naftilacetato. Tale metodo si è dimostrato essere di particolare utilità per caratterizzare la resistenza prodotta da esterasi mediante un test "in vitro" di rapida e semplice attuazione (DEVONSHIRE *et al.*, 1992; MAZZONI & CRAVEDI, 2002).

Nei cloni con più elevata resistenza fino all'1% delle proteine totali dell'afide può essere costituito da questi enzimi (DEVONSHIRE *et al.*, 1998).

La caratterizzazione biochimica di queste esterasi ha portato alla scoperta che questo meccanismo di resistenza in *M. persicae* è causato dalla sovrapproduzione di due varianti dello stesso enzima indicate come E4 e FE4 (fast E4). I due enzimi sono molto simili: le sequenze amminoacidiche differiscono di soli 9 sostituzioni di amminoacidi (DEVONSHIRE *et al.*, 1998) e le loro masse molecolari sono molto simili (circa 65 kDa per l'esterasi E4 e 66 kDa per l'esterasi FE4). Esistono poi altre leggere differenze di attività per queste

due molecole: FE4 mostra una maggior velocità nella corsa elettroforetica (Devonshire *et al.*, 1998) e riesce anche a idrolizzare gli insetticidi più velocemente rispetto a E4, anche se questo ha scarsi effetti sul livello di resistenza prodotto (DEVONSHIRE *et al.*, 1983) perché il principale effetto sarebbe dovuto da una azione di "sequestro" più che di idrolisi (DEVONSHIRE & MOORES, 1982; DEVONSHIRE *et al.*, 1998).

La sovrapproduzione è generata dall'amplificazione del gene codificante presente in un numero di copie che può arrivare a svariate decine (FIELD *et al.*, 1999; BIZZARO *et al.*, 2005; RIVI *et al.*, 2013). Ad oggi è noto che l'amplificazione riguarda alternativamente una delle due forme e che le rispettive popolazioni hanno una distribuzione differente. Le popolazioni con esterasi E4 si ritrovano principalmente nell'Europa settentrionale mentre quelle con esterasi FE4 sono prevalenti nelle aree mediterranee. Tuttavia le migrazioni degli afidi portano a spostamenti su lunghissime distanze con possibilità di ritrovare rimescolamenti dei genotipi (HARRINGTON *et al.*, ; FOSTER *et al.*, 1998; MARGARITPOULOS *et al.*, 2003; FENTON *et al.*, 2005). Inoltre l'amplificazione del gene E4 è legata a variazioni del cariotipo (Blackman *et al.*, 1995). Mentre i geni amplificati sono localizzati sull'autosoma 3T nei ceppi E4, in quelli FE4 sono normalmente distribuiti in vari autosomi (BLACKMAN *et al.*, 1995). Recentemente è stata dimostrata la presenza di variazioni del cariotipo anche in popolazioni "FE4" raccolte in varie regioni italiane (RIVI *et al.*, 2012). Tali variazioni del cariotipo che nei cloni E4 sono legate all'amplificazioni del gene e alla resistenza, nei cloni FE4 non sono invece risultate collegate alla resistenza causata da esterasi (RIVI *et al.*, 2013).

La resistenza causata da monossigenasi

La resistenza causata da "ossigenasi a funzione mista" basate sul citocromo P450 (MFO) è nota da tempo ed è stata ampiamente dimostrata in vari gruppi di insetti, dai Lepidotteri ai Ditteri, solo per indicare i più importanti (GAO QI *et al.*, 2012; KARATOLOS *et al.*, 2012; REYES *et al.*, 2012; SCHULER, 2012; SHANG *et al.*, 2012; DAVID *et al.*, 2013; Nwane *et al.*, 2013; RIVERON *et al.*, 2013). In *M. persicae*, nonostante i dati tossicologici dimostrino per via indiretta, cioè con l'uso di sinergizzanti come il piperonil butossido, il coinvolgimento di questi enzimi nella resistenza ad alcune classi di insetticidi (piretroidi e neonicotinoidi), ad oggi, le conferme biochimiche del fenomeno sono mancanti perché esistono documentate difficoltà ad ottenere misure di questa attività enzimatica a causa di probabili meccanismi di interferenza (PHILIPPOU *et al.*, 2010).

Recenti indagini sui possibili meccanismi di resistenza posseduti da un clone greco, hanno evidenziato, nella resistenza ai neonicotinoidi, il coinvolgimento di un gene (CYP6CY3), codificante un citocromo P450. La maggior quantità di MFO deriverebbe da una amplificazione e da alterazioni nella regolazione dell'espressione del suddetto gene (PUINEAN *et al.*, 2010). Anche in Italia osservazioni preliminari, al momento non confermate da analisi biomolecolari, portano a supporre un elevato grado di coinvolgimento di questi sistemi enzimatici nel conferire resistenza ad ampio spettro a numerose molecole insetticide (MAZZONI *et al.*, 2012).

LE RESISTENZE TARGET-SITE

La resistenza causata da acetilcolinesterasi insensibile

Fino all'inizio degli anni 2000 la maggior parte delle popolazioni raccolte in Italia mostravano una attività esterasica totale piuttosto elevata e compatibile con livelli di resistenza significativi nei confronti di esteri fosforici e altre molecole insetticide con legami estere (MAZZONI & CRAVEDI, 2002). Le variazioni nello scenario dei principi attivi disponibili e utilizzati hanno successivamente modificato l'importanza di questo meccanismo di resistenza. L'introduzione di un aficida ad elevata specificità e meno sensibile all'azione inibitoria delle esterasi come il pirimicarb aveva fornito un utile strumento per limitare l'effetto negativo di questi enzimi. Tuttavia nei primi anni '90 è stata trovata la presenza di un nuovo meccanismo di resistenza più specifico e in grado di conferire livelli di resistenza più elevati nei confronti proprio del pirimicarb e del suo gruppo chimico di appartenenza: gli insetticidi di-metilcarbammati (MOORES *et al.*, 1994). La scoperta è avvenuta in Grecia e successivamente è stata segnalata anche in altre aree, Italia compresa (MAZZONI & CRAVEDI, 2002). Tale resistenza è stata evidenziata in origine mediante biosaggi e per mezzo di saggio biochimici impiegando il saggio di Ellman (ELLMAN, 1959) in presenza dell'inibitore specifico (pirimicarb) (MOORES *et al.*, 1988; MOORES *et al.*, 1994). La causa genetica è rimasta sconosciuta fino al 2003 quando un gruppo di ricerca giapponese ha evidenziato il legame tra la resistenza e una mutazione puntiforme del gene codificante l'acetilcolinesterasi 2 (ACE-2) (NABESHIMA *et al.*, 2003). Tale mutazione produce la sostituzione della serina in posizione 431 con una fenilalanina (S431F) modificando la sensibilità dell'enzima per il pirimicarb ed il triazamate (MOORES *et al.*, 1994). Successivamente l'importanza di tale mutazione nel conferire resistenza

al pirimicarb è stata confermata anche in altre specie di afidi di notevole interesse economico come l'afide del cotone, *Aphis gossypii* Glover (BENTING & NAUEN, 2004). Inoltre la mutazione del codone codificante l'aminoacido in posizione 431 rimuove un sito di restrizione per l'endonucleasi SspI nell'allele "wild-type". Ciò ha consentito di sviluppare un protocollo di diagnosi basato su PCR-RFLP per identificare contemporaneamente più mutazioni presenti nello stesso individuo (CASSANELLI *et al.*, 2005).

La resistenza causata da mutazioni del canale del sodio

Verso la fine degli anni '90 è stata scoperta una nuova mutazione puntiforme in grado di inibire significativamente l'azione degli insetticidi piretroidi (FIELD *et al.*, 1997). Oltre a questa mutazione, comunemente nota come mutazione *kdr* e che, come in altre specie, produce la sostituzione L1014F, sono state trovate anche altre due mutazioni del gene codificante il canale del sodio voltaggio dipendente. La prima, relativamente comune a molte specie di insetti, è denominata *s-kdr* e porta alla sostituzione M918T (DAVIES *et al.*, 2007; DU & DONG, 2008) mentre la seconda segnalata per la prima volta in un clone raccolto a Piacenza, produce la sostituzione F979S (CASSANELLI *et al.*, 2005). Tale mutazione, trovata abbinata alla mutazione *kdr*, sembra produrre significativi incrementi dei fattori di resistenza ai piretroidi. I fattori di resistenza (RF) stimati nei confronti di un piretroide come il fluvalinate passano da circa 15 a circa 90 quando alla mutazione L1014F (*kdr*) si abbina la mutazione F979S entrambe in eterozigosi. Il fattore di resistenza risulta di poco inferiore a quello stimato per popolazioni con la mutazione *kdr* in omozigosi abbinata alla mutazione M918T (*s-kdr*) in eterozigosi (RF ~ 115) (CRINITI *et al.*, 2008). Più recentemente una nuova variante della mutazione *s-kdr* (M918L) è stata trovata in vari paesi europei (FONTAINE *et al.*, 2011) e in Italia (DOSSA *et al.*, 2012): Tale mutazione porta alla sostituzione della metionina in posizione 918 non con una treonina ma con una leucina. Al momento è solo parzialmente noto l'effetto che tale mutazione esercita sui livelli di resistenza ai piretroidi (FONTAINE *et al.*, 2011; DOSSA *et al.*, 2012). In Italia le mutazioni classiche *kdr* e *s-kdr* sembrano essere estremamente diffuse mentre le F979S e M918L vengono riscontrate solo raramente (MAZZONI, *comm. pers.*)

La resistenza ai neonicotinoidi

Gli insetticidi del gruppo dei neonicotinoidi, ad oggi, rappresentano il più consolidato e diffuso

strumento per la lotta contro l'afide verde del pesco e fin dalla loro introduzione sono stati una valida alternativa ai vecchi prodotti dimostrando di essere un utile supporto alle strategie di lotta integrata e contribuendo, contemporaneamente, alla gestione della resistenza agli insetticidi (CRAVEDI & MAZZONI, 2004; ELBERT *et al.*, 2008). Tuttavia recenti e significativi cali di efficacia sono stati dimostrati in Francia, Spagna, Italia e Grecia (PHILIPPOU *et al.*, 2010; ANONIMO 2011; MAZZONI *et al.*, 2012; SLATER *et al.*, 2012). Nel primo caso, identificato in Grecia, è stato messo in evidenza il possibile coinvolgimento di resistenze metaboliche ma successivamente, in un clone raccolto in Francia, è stata trovata una mutazione localizzata nella subunità beta 1 del recettore nicotinico dell'acetilcolina. Tale mutazione porta alla sostituzione di una arginina con una treonina in posizione 81 (R81T) (BASS *et al.*, 2011). La sostituzione di un singolo amminoacido riduce l'affinità dell'insetticida per il recettore e al tempo stesso rende la nuova sequenza amminoacidica molto simile a quella dei vertebrati per i quali in neonicotinoidi dimostrano una bassa tossicità (BASS *et al.*, 2011). La presenza della mutazione, eventualmente abbinata a resistenze metaboliche, porta a fattori di resistenza di varie centinaia di volte (MAZZONI *et al.*, 2012; SLATER *et al.*, 2012).

ALTRI MECCANISMI DI RESISTENZA

Altre forme di resistenza note riguardano una resistenza target-site specifica per i ciclodienici (ANTHONY *et al.*, 1998). Tale meccanismo di resistenza non ha tuttavia al momento significati pratici: i ciclodienici sono prodotti "fuorilegge" e non risultano resistenze incrociate con altre molecole impiegate come aficidi.

Più interessante è invece la scoperta che i geni codificanti per varie proteine cuticolari sono sovra-espressi in cloni di *M. persicae* caratterizzati da elevati livelli di resistenza a vari insetticidi. L'uso di biosaggi con metodiche di applicazione differenti (applicazione topica a confronto con applicazione per ingestione) modifica in modo significativo i fattori di resistenza suggerendo la possibilità che una alterata permeabilità cuticolare possa influenzare la sopravvivenza ai trattamenti e quindi anche i livelli di resistenza agli insetticidi. Ulteriori prove a favore derivano anche dall'uso di insetticidi marcati con radionuclidi (³H-imidacloprid) e dal non completo effetto di recupero della sensibilità utilizzando i sinergizzanti come il piperonilbutossido (PUINEAN *et al.*, 2010).

CONCLUSIONI

Al momento molte fondamentali domande sulla resistenza agli insetticidi richiedono ricerche approfondite per poter giungere a risposte soddisfacenti che possano avere le necessarie ricadute nel campo dell'entomologia agraria.

La difesa contro gli insetti dannosi deve necessariamente tener conto della loro "plasticità" per ritardare / mitigare lo sviluppo ed affermazione della resistenza agli insetticidi.

Gli insetti si stanno evolvendo e la loro sopravvivenza ai trattamenti insetticidi è basata su molti e differenti meccanismi che agiscono contemporaneamente a livello di singolo individuo. Le nostre strategie di difesa fitosanitaria devono quindi adattarsi a loro volta a questo fenomeno articolandosi in "approcci multipli". Nessun principio attivo è completamente e definitivamente immune allo sviluppo di resistenze e quindi l'approccio deve essere: "quali conoscenze servono e devono essere applicate per ritardare il più a lungo possibile la resistenza alle molecole insetticide?"

RIASSUNTO

L'intenso uso di insetticidi per combattere le infestazioni *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) ha selezionato popolazioni resistenti ai principi attivi che sono stati utilizzati nell'arco degli ultimi decenni. Le ricerche, iniziate negli anni '70 hanno evidenziato vari meccanismi di resistenza: sovrapproduzione di esterasi e di monossigenasi, insensibilità dei siti bersaglio specifici per i carbammati, per i piretroidi, per i ciclodienici e, scoperta solo recentemente, anche per i neonicotinoidi. Tali forme di resistenza sono in grado di consentire agli esemplari portatori di sopravvivere ai trattamenti con gli aficidi tradizionali.

In Italia le popolazioni più resistenti provengono principalmente da aree dove l'agricoltura è più intensiva. Ciò è molto preoccupante poiché in genere nelle strategie di difesa non viene posta adeguata attenzione al problema "resistenza" per la cui soluzione non si può fare affidamento solo alla possibilità di impiegare nuovi principi attivi quando quelli vecchi mostrano segni di inefficacia.

BIBLIOGRAFIA

- ANONYMOUS (2011) *IRAC NEWSLETTER ISSUE 25 – Myzus resistance alert!* IRAC. Available from: http://www.irac-online.org/wp-content/uploads/2009/11/eConnection_issue25v1.0.pdf, 2012.
- ANTHONY N., UNRUH T., GANSER D., FRENCH CONSTANT R., 1998 – *Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, Myzus persicae.* – Mol. Gen. Genet., 260: 165-175.
- BARBAGALLO S., COCUZZA G., CRAVEDI P., KOMAZAKI S., 2007 – *IPM case studies: deciduous fruit trees.* In: *Aphids as crop pests*, Emden H.F.v. & Harrington R. Eds., CABI, Wallingford, pp. 651-661.

- BASS C., PUINEAN A.M., ANDREWS M., CULTER P., DANIELS M., ELIAS J., PAUL V.L., CROSTHWAITE A.J., DENHOLM I., FIELD L.M., FOSTER S.P., LIND R., WILLIAMSON M.S., SLATER R., 2011 – *Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid Myzus persicae*. - BMC Neuroscience, 12: (31 May 2011).
- BENTING J., NAUEN R., 2004 – *Biochemical evidence that an S431F mutation in acetylcholinesterase-1 of Aphis gossypii mediates resistance to pirimicarb and omethoate*. - Pest Manag. Sci., 60: 1051-1055.
- BIZZARO D., MAZZONI E., BARBOLINI E., GIANNINI S., CASSANELLI S., PAVESI F., CRAVEDI P., MANICARDI G.C., 2005 – *Relationship among expression, amplification, and methylation of FE4 esterase genes in Italian populations of Myzus persicae (Sulzer) (Homoptera: Aphididae)*. - Pest. Bioch. Physiol., 81: 51-58.
- BLACKMAN R.L., SPENCE J.M., FIELD L.M., DEVONSHIRE A.L., 1995 – *Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in Myzus persicae (Homoptera: Aphididae)*. - Heredity, 75: 297-302.
- CASSANELLI S., CERCHIARI B., GIANNINI S., BIZZARO D., MAZZONI E., MANICARDI G.C., 2005 – *Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and kdr insecticide resistance in the peach potato aphid Myzus persicae*. - Pest Manag. Sci., 61: 91-96.
- CRAVEDI P., MAZZONI E., 2004 – *Insecticide resistance management of the green peach aphid in Italian peach orchards*. - Bull. OILB/SROP, 27: 75-78.
- CRINITI A., MAZZONI E., CASSANELLI S., CRAVEDI P., TONDELLI A., BIZZARO D., MANICARDI G.C., 2008 – *Biochemical and molecular diagnosis of insecticide resistance conferred by esterase, MACE, kdr and super-kdr based mechanisms in Italian strains of the peach potato aphid, Myzus persicae (Sulzer)*. - Pest. Biochem. Physiol., 90: 168-174.
- DAVID J.P., ISMAIL H.M., CHANDORPROUST A., PAINE M.J.I., 2013 – *Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on earth. (Special Issue: Cytochrome P450 and its impact on planet Earth)*. - Phil. Trans. R. Soc. London, Series B, Biological Sciences: 20120429.
- DAVIES T.G.E., FIELD L.M., USHERWOOD P.N.R., WILLIAMSON M.S., 2007 – *DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels*. - IUBMB life, 59: 151-162.
- DEVONSHIRE A.L., DEVINE G.J., MOORES G.D., 1992 – *Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of Myzus persicae (Homoptera: Aphididae)*. - Bull. Entomol. Res., 82: 459-463.
- DEVONSHIRE A.L., FIELD L.M., FOSTER S.P., MOORES G.D., WILLIAMSON M.S., BLACKMAN R.L., 1998 – *The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae*. - Phil. Trans. R. Soc. London. Series B, Biological Sciences, 353: 1677-1684.
- DEVONSHIRE A.L., MOORES G.D., CHIANG C.L., 1983 – *The biochemistry of insecticide resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae*. In: Pesticide chemistry: human welfare and the environment, Proceedings of the 5th International Congress of Pesticide Chemistry, Kyoto, Japan, 29 August - 4 September 1982. ume 3. Mode of action, metabolism and toxicology, pp 191-196.
- DEVONSHIRE A.L., MOORES G.D., 1982 – *A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach—potato aphids (Myzus persicae)*. - Pest. Biochem. Physiol., 18: 235-246.
- DEWAR A., HAYLOCK L., FOSTER S., DEVONSHIRE A., HARRINGTON R., 1998 – *Three into one will go - the evolution of resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae*. - British Sugar Beet Review, 66: 14-19.
- DOSSA, G.S.C., ZIMMER, T.C., NAUEN, R., 2012 – *Characterisation of insecticide resistance in clonal cultures of Myzus persicae (Homoptera: Aphididae) obtained from an Italian field population in 2010*. In: Tropentag 2012, Resilience of agricultural systems against crises 19-21/09/2012 Gottingen.
- DU Y.Z. & DONG K., 2008 – *Molecular basis of knockdown resistance to pyrethroid insecticides*. In: Recent advances in insect physiology, toxicology and molecular biology, Liu N. Ed., Research Signpost, Trivandrum., pp. 29-40.
- ELBERT A., HAAS M., SPRINGER B., THIELERT W., NAUEN R., 2008 – *Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection*. - Pest Manag. Science, 64: 1099-1105.
- ELLMAN G.L., 1959 – *Tissue sulfhydryl groups*. - Arch. Biochem. Biophys., 82: 70-77.
- FENTON B., MALLOCH G., WOODFORD J.A.T., FOSTER S.P., ANSTEAD J., DENHOLM I., KING L., PICKUP J., 2005 – *The attack of the clones: tracking the movement of insecticide-resistant peach-potato aphids Myzus persicae (Homoptera: Aphididae)*. - Bull. Entomol. Res., 95: 483-494.
- FIELD L.M., ANDERSON A.P., DENHOLM I., FOSTER S.P., HARLING Z.K., JAVED N., MARTINEZTORRES D., MOORES G.D., WILLIAMSON M.S., DEVONSHIRE A.L., 1997 – *Use of biochemical and DNA diagnostics for characterising multiple mechanisms of insecticide resistance in the peach-potato aphid, Myzus persicae (Sulzer)*. - Pest. Sci., 51: 283-289.
- FIELD L.M., BLACKMAN R.L., TYLERSMITH C., DEVONSHIRE A.L., 1999 – *Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant Myzus persicae (Sulzer)*. - Biochem. J. (London), 339: 737-742.
- FONTAINE S., CADDoux L., BRAZIER C., BERTHO C., BERTOLLA P., MICOUD A., ROY L., 2011 - *Uncommon associations in target resistance among French populations of Myzus persicae from oilseed rape crops*. - Pest Manag. Sci., 67: 881-885.
- FOSTER S.P., COX D., OLIPHANT L., MITCHINSON S., DENHOLM I., 2008 – *Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, Myzus persicae (Homoptera: Aphididae)*. - Pest Manag. Sci., 64: 1111-1114.
- FOSTER S.P., DENHOLM I., HARLING Z.K., MOORES G.D., DEVONSHIRE A.L., 1998 – *Intensification of insecticide resistance in UK field populations of the peach-potato aphid, Myzus persicae (Homoptera: Aphididae) in 1996*. - Bull. Entomol. Res., 88: 127-130.
- GAO QI, LI MEI, SHENG CHENGFA, SCOTT J.G., QIU XINGHUI, 2012 – *Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies (Musca domestica)*. - Pest. Biochem. Physiol., 104: 252-260.
- HARRINGTON R., DEWAR A.M., DEVONSHIRE A.L., FEATHER M., FOSTER S.P., HALLSWORTH P., HARLING Z., HAYLOCK L.A., PARKER S.J., STEVENS M., 1997 – *Monitoring and forecasting aphid vectors of beet viruses: a working system*. - Proceedings of the 60th IIRB Congress, Cambridge, UK, 1-3 July 1997. pp. 465-468.
- KARATOLOS N., WILLIAMSON M.S., DENHOLM I., GORMAN K., FFRENCHCONSTANT R.H., BASS C., 2012 – *Overexpression of a cytochrome P450 is associated with resist-*

- ance to pyriproxyfen in the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. - PLoS ONE; 2012.7: 2, e31077.
- MARGARITOPOULOS J.T., BLACKMAN R.L., TSITSIPIS J.A., SANNINO L., 2003 - *Co-existence of different host-adapted forms of the Myzus persicae group (Hemiptera: Aphididae) in southern Italy*. - Bull Entomol. Res., 93: 131-135.
- MAZZONI E., PANINI M., ANACLERIO M., 2012 - *Resistenza agli insetticidi neonicotinoidi in popolazioni emiliano-romagnole dell'afide verde del pesco*. In: Atti delle Giornate Fitopatologiche 13-16 marzo 2012, Milano Marittima (RA), pp. 155-160.
- MAZZONI E., CRAVEDI P., 2002 - *Analysis of insecticide-resistant Myzus persicae (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards*. - Pest Manag. Sci., 58: 975-980.
- MOORES G.D., DEVINE G.J., DEVONSHIRE A.L., 1994 - *Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in Myzus persicae and Myzus nicotianae*. - Pest. Biochem. Physiol., 49: 114-120.
- MOORES G.D., DEVONSHIRE A.L., DENHOLM I., 1988 - *A microtitre plate assay for characterizing insensitive acetylcholinesterase genotypes of insecticide-resistant insects*. - Bull. Entomol. Res., 78: 537-544.
- NABESHIMA T., KOZAKI T., TOMITA T., KONO Y., 2003 - *An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, Myzus persicae*. - Biochem. Bioph. Res. Comm., 307: 15-22.
- NEEDHAM P.H., SAWICKI R.M., 1971 - *Diagnosis of resistance to organophosphorus insecticides in Myzus persicae (Sulz.)*. - Nature, 230: 125-126.
- NWANE P., ETANG J., CHOUAIBOU M., TOTO J.C., KOFFI A., MIMPFOUNDI R., SIMARD F., 2013 - *Multiple insecticide resistance mechanisms in Anopheles gambiae s.l. populations from Cameroon, Central Africa*. - Parasites and Vectors; 6: 41, (22 February 2013).
- PHILIPPOU D., FIELD L., MOORES G., 2010 - *Metabolic enzyme(s) confer imidacloprid resistance in a clone of Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) from Greece*. - Pest Manag. Sci., 66: 390-395.
- PUINEAN A.M., FOSTER S.P., OLIPHANT L., DENHOLM I., FIELD L.M., MILLAR N.S., WILLIAMSON M.S., BASS C., 2010 - *Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid Myzus persicae*. - PLoS Genetics, 6: e1000999.
- REYES M., ROCHA K., ALARCON L., SIEGWART M., SAUPHANOR B., 2012 - *Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad*. - Pest. Biochem. Physiol.; 102: 45-50.
- RIVERON J.M., IRVING H., NDULA M., BARNES K.G., IBRAHIM S.S., PAINE M.J.I., WONDJI C.S., 2013 - *Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles funestus*. - Proc. Nat. Acad. Sci. United States of America, 110: 252-257.
- RIVI M., MONTI V., MAZZONI E., CASSANELLI S., PANINI M., ANACLERIO M., CIGOLINI M., CORRADETTI B., BIZZARO D., MANDRIOLI M., MANICARDI G.C., 2013 - *A1-3 chromosomal translocations in Italian populations of the peach potato aphid Myzus persicae (Sulzer) not linked to esterase-based insecticide resistance*. - Bull. Entomol. Res., DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007485312000685>.
- RIVI M., MONTI V., MAZZONI E., CASSANELLI S., PANINI M., BIZZARO D., MANDRIOLI M., MANICARDI G.C., 2012 - *Karyotype variations in Italian populations of the peach potato aphid Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)*. - Bull. Entomol. Res., 102: 663-671.
- SCHULER M.A., 2012 - *Insect P450s: mounted for battle in their war against toxins*. - Mol. Ecol.; 21: 4157-4159.
- SHANG Q.L., PAN YIOU, FANG KUI, XI JINGHUI, BRENNAN J.A., 2012 - *Biochemical characterization of acetylcholinesterase, cytochrome P450 and cross-resistance in an omethoate-resistant strain of Aphis gossypii Glover*. - Crop Prot.; 31: 15-20.
- SLATER R., PAUL V.L., ANDREWS M., GARBAY M., CAMBLIN P., 2012 - *Identifying the presence of neonicotinoid resistant peach-potato aphid (Myzus persicae) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain*. - Pest Manag. Sci., 68: 634-638.
- TOOR R.F.V., FOSTER S.P., ANSTEAD J.A., MITCHINSON S., FENTON B., KASPROWICZ L., 2008 - *Insecticide resistance and genetic composition of Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae) on field potatoes in New Zealand*. - Crop Prot., 27: 236-247.

RECENT ADVANCES IN UNDERSTANDING AND COMBATING INSECTICIDE RESISTANCE

IAN DENHOLM (*)

(*) *Rothamsted Research and the University of Hertfordshire, UK*; e-mail: ian.denholm@rothamsted.ac.uk
Sintesi della lettura tenuta durante la Tavola Rotonda “La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi”. Seduta pubblica dell’Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

SYNTHESIS – In recent years, a relentless rise witnessed since the 1960s in the number of arthropod species exhibiting resistance to insecticides has slowed down, probably because there is only a finite number of species exposed to sufficiently intense selection for resistance to occur. Instead, many of those species that do encounter continued and intensive exposure to chemicals have shown a gradual broadening of resistance phenotypes caused by cross-resistance, whereby a single mechanism confers protection to several (mostly closely-related) insecticides, and by the appearance of multiple mechanisms in the same individual. The mechanisms can be diverse but most commonly involve either enhanced detoxification by enzymes encoded by multi-gene families (eg. cytochrome P450-dependent monooxygenases), or a mutation to the insecticide’s target site – usually a receptor protein – that reduces toxin binding without altering its normal function. Our understanding of resistance mechanisms is benefiting hugely from advances in transcriptomics and ge-

nomics, enabling genes causing resistance to be identified, cloned, sequenced and their expression analysed far more rapidly than was possible in the past. In many cases, resolution of the underlying changes has led to rapid-throughput diagnostics for use in large-scale monitoring programmes. The tactics available for combating resistance are frequently limited by practical considerations but invariably entail reducing or diversifying selection pressures, taking advantage of compounds with contrasting modes of action and/or non-chemical options for control. Advances in theoretical approaches and computing power also have the potential to contribute to fine-tuning resistance management strategies. Numerous organisations and initiatives have been developed to promote awareness of resistance and to co-ordinate the development and implementation of anti-resistance strategies. New developments with resistance research and management will be reviewed with particular emphasis on neonicotinoid insecticides and hemipteran pest species.

LA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI NEI LEPIDOTTERI: CYDIA POMONELLA COME CASO STUDIO

GIAN CARLO MANICARDI (*) - STEFANO CASSANELLI (*)

(*) *Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia.*

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Cydia pomonella as a tool for the study of insecticide resistance in Lepidoptera

The codling moth, *Cydia pomonella* (Cp) is a major pest in most pome fruit orchards worldwide. Under the selective pressure caused by an increasing number of chemical treatments, Cp has developed a reduced sensitivity towards different pesticides. In this paper, we overviewed the mechanisms of insecticide resistance in Cp populations with particular emphasis on data collected in Emilia-Romagna orchards showing that the reduced susceptibility to insecticide treatments seems to be mainly caused by an increased MFO activity with a minor contribution of GST. Target-site mutations within AChE-1 seems a rare phenomenon world wide, since they were found in Spain only. Given the complexity of the mechanisms of resistance found so far in Cp, only the availability of breeding population that can be maintained under selection pressure, will allow to explore the genetic basis of resistance with greater chance of success.

The understanding of the molecular basis of the resistance mechanisms is the starting point in order to allow the adoption of novel pest management strategies directed to circumvent and/or delay resistance outbreaks and to control the insensitive pests.

KEY WORDS: codling moth; insecticide resistance; MFO; GST; Esterase; target site mutations;

L'ordine dei lepidotteri comprende oltre un centinaio di famiglie e, di queste, una ventina sono considerate dannose per agricoltura. In Italia i maggiori problemi sono relativi a 4 specie: *Cydia pomonella* (carpocapsa) e *C. molesta*, *Lobesia botrana* a cui va aggiunta la recente diffusione di *Tuta absoluta*.

In questo lavoro intendiamo soffermare la nostra attenzione sulla carpocapsa (Cp), uno degli insetti più dannosi per le Pomacee; si tratta di una specie ad origine eurasiatica che durante gli ultimi due secoli ha avuto una diffusione cosmopolita seguendo la diffusione delle sue piante ospiti (BARNES, 1991). Le sue larve, carpo-faghe, danneggiano direttamente i frutti, provocando ingenti perdite produttive, sia in relazione alla qualità che alla quantità, per la frutticoltura mondiale delle Pomacee. Nei frutti di pera e melo le larve entrano attraverso un qualsiasi punto dell'epicarpo. Su frutti non maturi, la larva penetra nella zona sottoepidermica scavando una galleria spiralata, in seguito si dirige verso la zona carpellare per nutrirsi dei semi. Sui frutti maturi, la larva entra invece direttamente nella polpa, raggiunge e divora i semi. Gli attacchi sferrati dal fitofago, se non controllati tempestivamente attraverso adeguate pratiche di prevenzione, provocano gravi lesioni dei frutti che, così danneggiati, finiscono per cadere al

suolo. A causa dell'alto valore della coltura ospite e degli standard di qualità rigorosi per i mercati locali e di esportazione vi è un tolleranza zero per i danni.

Nell'intento di minimizzare le infestazioni è stato fatto un ampio uso di insetticidi col risultato di favorire la selezione di popolazioni resistenti ad una vasta gamma di prodotti chimici nelle principali zone di produzione delle pomacee (REYES *et al.*, 2007). Nonostante l'introduzione di mezzi di lotta alternativi quali l'impiego della confusione sessuale (WITZGALL *et al.*, 2008), delle applicazioni dei granulovirus (LACEY *et al.*, 2008) e, in alcuni paesi, della tecnica dell'insetto sterile (TARET *et al.*, 2010), nei programmi di gestione integrata l'applicazione di insetticidi ad ampio spettro è ancora ampiamente diffusa (CANELA *et al.*, 2000; LACEY *et al.*, 2008).

SITUAZIONE GENERALE RELATIVA ALLA COMPARSA E DIFFUSIONE DELLA RESISTENZA AGLI AGROFARMACI IN CARPOCAPSA

Per molto tempo, il controllo chimico ha rappresentato il metodo di lotta più diffuso per questo fitofago. Nel corso dell'ultimo secolo l'industria agro-chimica ha subito una continua evoluzione guidata dalla necessità di fornire principi attivi ad

azione sempre più efficace nei confronti del fitofago bersaglio e, nei limiti del possibile, con effetti minori sugli insetti utili e sull'ambiente. Per quanto riguarda carpocapsa, si è così passati dall'arseniato di piombo al DDT, quindi agli esteri fosforici, carbammati e piretroidi, per arrivare ai regolatori di crescita (IGR) e ai neonicotinoidi.

I primi casi di resistenza in popolazioni di Cp sono stati segnalati all'inizio del secolo scorso nei confronti di arseniato di piombo (HOUGH, 1928). In seguito, sono stati identificati casi di insensibilità ai trattamenti con DDT (CUTWRIGHT, 1954) e, da allora, si sono susseguite segnalazioni di mancata efficacia praticamente a carico di ogni gruppo chimico utilizzato.

Storicamente, il controllo di *C. pomonella* è stato raggiunto attraverso l'utilizzo di insetticidi ad ampio spettro d'azione e, a partire dalla metà del secolo scorso, si è basato principalmente su insetticidi organofosforici (OP); un OP in particolare, azynphos-methyl, è stato ampiamente utilizzato sin dalla sua introduzione agli inizi degli anni '60 (BARNES e MOFFITT, 1963). Inizialmente, l'uso di azynphos-methyl ha portato alla soppressione di molti parassiti delle Pomacee, riducendo l'introduzione e l'utilizzo di altri insetticidi ad ampio spettro d'azione. Sebbene fossero disponibili OP alternativi, la loro limitata efficacia ed elevata attività residua ha fatto sì che questo principio attivo restasse il più frequentemente utilizzato.

Casi di inefficacia dell'azynphos-methyl sono stati documentati per la prima volta in California nel 1989 (VARELA *et al.*, 1993) mentre resistenza al Parathion, un altro OP, è stata riscontrata su Cp in meleti del Nord Carolina (BUSH *et al.*, 1993). In tali aree, i coltivatori hanno affrontato grandi difficoltà nel mantenimento del controllo di Cp tanto che si è reso necessario incrementare la frequenza dei trattamenti fino al limite massimo legale (VARELA *et al.*, 1993). In altri casi, per aumentare l'efficacia dell'azynphos-methyl, i coltivatori sono ricorsi all'uso addizionale di phosmet (OP), oppure esfenvalerato (piretroide). Recentemente l'azynphos-methyl è stato escluso dai disciplinari mentre è stato mantenuto chlorpyrifos, per il quale non sono stati per ora descritti casi eclatanti di ridotta sensibilità.

In Europa, gli stessi OP utilizzati per controllare la diffusione di Cp, hanno fornito risultati inferiori rispetto agli Stati Uniti per cui sono stati affiancati da altri principi attivi, tra i quali i piretroidi e i regolatori della crescita (IGR). Tra i piretroidi i primi casi di resistenza hanno riguardato la deltametrina (SAUPHANOR *et al.*, 1998a). Le basi molecolari della resistenza ai piretroidi sono state in parte chiarite, essendo dovute alla modificazione

del canale del sodio (mutazione *kdr*) (BRUNBARALE *et al.*, 2005). Attualmente la resistenza dovuta a mutazioni a carico del gene *kdr* risulta ampiamente diffusa essendo stata segnalata in varie nazioni europee (Bulgaria, Repubblica Ceca, Francia, Italia, Spagna, Svizzera), così come in America del Sud, Armenia, Nuova Zelanda e Stati Uniti (REYES *et al.*, 2007; 2009).

Altri potenziali sostituti dell'azynphos-methyl, nel trattamento di alberi da frutto, sono i regolatori di crescita degli insetti (IGRs), nonostante abbiano mostrato anch'essi problemi di efficacia, vista la segnalazione di ceppi resistenti (MOFFITT *et al.*, 1988; SAUPHANOR and BOUVIER, 1995; SAUPHANOR *et al.*, 1998b).

La segnalazione di popolazioni resistenti già poco tempo dopo l'utilizzo di nuovi principi attivi sia in Europa (REYES *et al.*, 2007) che negli Stati Uniti (MOTA-SANCHEZ *et al.*, 2008) suggerisce che questa scarsa efficacia sia da attribuirsi al fenomeno della cross-resistenza (fenomeno caratterizzato dallo sviluppo di resistenza anche nei confronti di un principio attivo diverso da quello al quale il fitofago è stato esposto). A questo proposito va ricordato che una potenziale cross-resistenza tra benzoylurea (IGRs), benzoilidrazina (IGRs), piretroidi ed OP è stata evidenziata su popolazioni selezionate in laboratorio con IGRs e piretroidi, (SAUPHANOR *et al.*, 1998c). Da sottolineare anche la ridotta sensibilità nei confronti di thiacloprid, insetticida appartenente alla categoria dei neonicotinoidi, rilevata in popolazioni greche poco tempo dopo la sua registrazione in questo paese (MARGARITOPOULOS *et al.*, 2011). Analoghe segnalazioni nei confronti di principi attivi introdotti di recente provengono anche dalla Francia (e.g., thiacloprid and spinosad) [REYES *et al.*, 2007] o addirittura prima della registrazione ufficiale per il tebufenozide (SAUPHANOR e BOIVIER, 1995). Considerando che i neonicotinoidi non sono ancora stati utilizzati in maniera intensive in Grecia, è molto probabile che la resistenza nei confronti del thiacloprid sia dovuta ad una resistenza metabolica non specifica. I dati precedentemente esposti mettono in evidenza l'esigenza di sviluppare studi sulla cross-resistenza, allo scopo di identificare insetticidi alternativi nella lotta ai lepidotteri.

Dal punto di vista molecolare, sono vari i meccanismi implicati nella detossificazione e metabolizzazione di xenobiotici ed in particolare di insetticidi; i principali sistemi sono: Ossidasi a funzione mista (MFO), CarbosilEsterasi (EST) e Glutathione-transferasi (GST). La resistenza ad un ampio spettro nei confronti degli insetticidi può essere dovuta ad un incremento dell'attività di

ognuno di questi meccanismi (SAUPHANOR *et al.*, 1998^o; BOIVIN *et al.*, 2001; BOUVIER *et al.*, 2001; DUNLEY *et al.*, 2000) anche in relazione allo stadio larvale dell'insetto (BOUVIER *et al.*, 2002).

Dati ottenuti nel corso di uno studio sulla diffusione della resistenza in popolazioni greche di Cp (MARGAREITOPULOS *et al.*, 2011) mostrano che le EST contribuiscono alla comparsa di insensibilità nei confronti di diversi principi attivi in modo apparentemente paradossale. Infatti, è stata trovata una correlazione negativa tra attività esterasica e suscettibilità ad azinphos-methyl e/o phosalone. Dati simili sono stati segnalati anche in popolazioni spagnole (RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Questo risultato inatteso, può essere spiegato ipotizzando la presenza di isoforme di EST con attività idrolasica ridotta nei confronti di substrati specifici usati per il saggio biochimico, ma elevata nei confronti degli insetticidi (BUSH *et al.*, 1993). Altri studi mettono in evidenza correlazioni negative (BUSH *et al.*, 1993; REYES *et al.*, 2007), positive (RODRIGUEZ *et al.*, 2010; SOLENO *et al.*, 2008) ovvero assenza di correlazione (FUENTES-CONTRERAS *et al.*, 2007) tra attività EST e resistenza nei confronti di azinphos-methyl. Queste ampie variabilità di risposte possono essere determinate da specifiche differenze tra popolazioni o/e dalla presenza di diverse pressioni selettive ma non bisogna trascurare la possibilità che siano anche stati influenzate dall'uso di diversi substrati nei protocolli diagnostici (BUSH *et al.*, 1993; REYES *et al.*, 2007; 2011; RODRIGUEZ *et al.*, 2010; REUVENY e COHEN, 2004). Un possibile coinvolgimento delle esterasi nella insensibilità a tebufenozide (REYES *et al.*, 2007) e piretroidi (SAUPHANOR *et al.*, 1997; MARAGRITPOULOS *et al.*, 2011) è stata rilevata anche in popolazioni analizzate allo stadio larvale.

L'analisi di dati di letteratura relativa allo studio dei diversi complessi enzimatici coinvolti nella cosiddetta "resistenza metabolica" mostra come essi contribuiscano in maniera diversa a seconda delle aree geografiche di origine delle popolazioni analizzate (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Per esempio, la detossificazione nei confronti di azinphos-methyl è stata associata ad un incremento dell'attività EST in popolazioni Argentine (SOLENO *et al.*, 2008), un coinvolgimento del sistema MFO è stato segnalato in Italia (IORIATTI *et al.*, 2007) delle GST in Cile (REYES *et al.*, 2004; FUENTES-CONTRERAS *et al.*, 2007). Infine, REUVENY and COHEN (2004) hanno verificato che, in popolazioni israeliane, il principale meccanismo di resistenza sia dovuto ad una scarsa affinità dell'acetilcolinesterasi (AChE) al principio attivo mentre l'attività MFO e GST non sembra essere coinvolta.

Saggi *in vivo* e saggi biochimici svolti su ceppi

francesi dal centro di riferimento internazionale dell'INRA di Avignone, fanno supporre che il meccanismo di resistenza all'azinphos-methyl consista in una modificazione della proteina bersaglio, l'acetilcolinesterasi, la quale diventa insensibile all'azione inibitoria dell'insetticida e/o a un aumento della attività di sistemi di detossificazione (EST e MFO). Analogo risultato è stato raggiunto da ricercatori israeliani (REUVENY *et al.*, 2004). Recentemente, sono stati clonati due geni che codificano per l'acetilcolinesterasi e descritta una mutazione associata alla insensibilità all'azinphos-methyl in un ceppo di origine spagnola (CASSANELLI *et al.*, 2006). Sino ad oggi questa mutazione è stata rinvenuta solo in popolazioni spagnole (REYES *et al.*, 2007; 2009). Al momento non ci sono spiegazioni inequivocabili in grado di giustificare la scarsa diffusione di questa mutazione. Un'ipotesi che si può proporre è che i costi in termini di riduzione di fitness della resistenza metabolica (ampiamente presente a seguito del largo uso di organofosforici) possano essere inferiori rispetto a quelli indotti dalla resistenza target site.

Nonostante l'introduzione di mezzi di lotta alternativi quali l'impiego della confusione sessuale (WITZGALL *et al.*, 2008), delle applicazioni dei granulovirus (LACEY *et al.*, 2008) e, in alcuni paesi della tecnica dell'insetto sterile (TARET *et al.*, 2010), nei programmi di gestione integrata l'applicazione di insetticidi ad ampio spettro è ancora ampiamente diffusa (CANELA *et al.*, 2000, LACEY *et al.*, 2008).

L'analisi dei dati sopra riportati mette in evidenza che l'impiego di prodotti ad ampio spettro d'azione ha favorito lo sviluppo sia di resistenza multipla che di resistenza crociata (SAUPHANOR *et al.*, 1998; STARA e KOCOUREK, 2007; MOTA-SANCHEZ *et al.*, 2008; KNIGHT, 2010), e conseguentemente sono stati segnalati numerosi casi di resistenza sia in Europa che in regioni extraeuropee (REYES *et al.*, 2007, 2009). La Cp può essere considerata un caso speciale tra gli insetti di interesse agrario, dal momento che presenta casi di resistenza/tolleranza praticamente nei confronti di tutti i principi attivi sinora utilizzati per il suo controllo e questo costituisce un problema anche nella fase di sviluppo di nuovi agro farmaci.

LA SITUAZIONE DELLA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI IN EMILIA ROMAGNA

A partire dal 1997 nelle province di Bologna, Modena e Ferrara si sono segnalati numerosi casi di aziende con elevati danni alla raccolta di pere causati da carpocapsa, nonostante il progressivo aumento del numero degli interventi difensivi con insetticidi organofosforici (OP). È stata così ipo-

tizzata la presenza di popolazioni resistenti al trattamento effettuato con azynphos-methyl, un OP dell'ultima generazione, largamente utilizzato nella lotta alla carpocapsa (BOSELLI, 2002).

Il Servizio fitosanitario regionale ha pertanto avviato un'attività di monitoraggio della resistenza agli insetticidi fosfororganici (OPs) e ai regolatori della crescita (IGRs) in popolazioni emiliano-romagnole di *C. pomonella*, mediante l'impiego combinato di analisi biochimiche, volte a saggiare le principali attività detossificanti, e di analisi genetiche, che prevedono la ricerca di eventuali mutazioni nel gene che codifica per l'acetilcolinesterasi 1 (AChE-1) CASSANELLI *et al.*, 2008; 2010).

Per quanto riguarda le popolazioni di campo, la ridotta suscettibilità ai trattamenti sembra essere attribuibile principalmente alle MFO e in seconda battuta alle GST mentre le EST sembrano avere un coinvolgimento marginale (Fig.1). Da sottolineare l'elevata variabilità intra-popolazione che può essere spiegata sia sulla base della eterogeneità genetica che della diversa pressione selettiva esercitata in campo (CASSANELLI *et al.*, 2010). Il profilo metabolico riscontrato concorda con quanto riportato in letteratura per le popolazioni europee di carpocapsa con una ridotta sensibilità ai trattamenti, che prevedono l'uso alternato di OP e IGR (REYES *et al.*, 2007). Il ruolo prevalente della attività detossificante a carico delle MFO è probabilmente riconducibile ad una maggiore copertura offerta da questo sistema detossificante, garantita da un numero più elevato di geni e da una maggiore flessibilità nei confronti del substrato, rispetto alla famiglia delle GST e delle EST.

In generale l'utilizzo dei test biochimici mostra una buona sensibilità (l'aumento delle attività metaboliche in genere si accompagna ad una ridotta efficacia di uno o più principi attivi) ma un ridotta specificità che si traduce nell'impossibilità di associare l'incremento di una o più attività detossificanti con la ridotta suscettibilità ad un singolo principio attivo. Sulla base di queste considerazioni si può affermare che i test biochimici sono strumenti predittivi della ridotta suscettibilità all'agrofarmaco se impiegati a supporto delle prove di campo ma non orientativi nell'utilizzo dei principi alternativi efficaci.

Per aumentare specificità e capacità di orientamento all'uso dei principi alternativi dei test di laboratorio, è richiesta l'identificazione dei singoli geni della famiglia del sistema detossificante prevalente associato al quadro di resistenza.

Queste considerazioni sottolineano l'esigenza di semplificare lo studio dei meccanismi di resistenza mediante la creazione di popolazioni modello selezionate in laboratorio, che permettano di isolare i marcatori funzionali legati effettivamente al fenotipo insensibile dal rumore di fondo imposto dalla variabilità genetica.

A questo proposito, dati raccolti nell'ambito del progetto regionale precedentemente citato mostrano che tre cicli di selezione con tebufenozide (Mimic) condotti su una popolazione romagnola inducono un aumento significativo della attività MFO (circa 4 volte), col dosaggio del principio attivo meno elevato mentre l'incremento è ridotto a circa 2,5 volte nella larve selezionate col dosaggio di 6 mg di p.a./l (Fig. 2) (CASSANELLI *et al.*, 2010). Questo risultato potrebbe essere causato da un effetto tos-

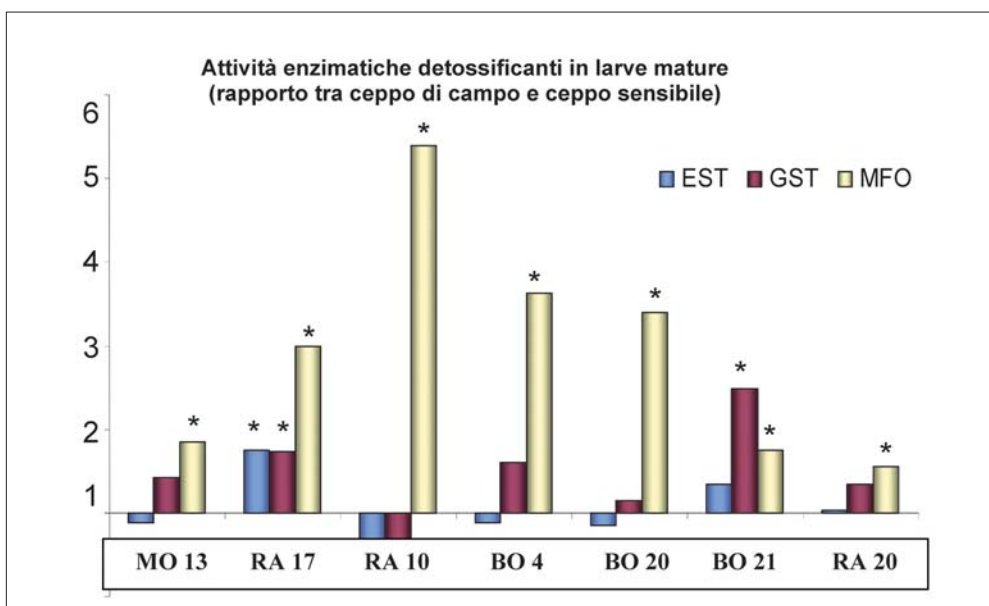


Fig. 1

Attività enzimatiche rispetto ad un ceppo sensibile valutate in diverse popolazioni emiliane di *Cp*. Differenze statisticamente significative sono indicate con un asterisco ($p < 0,05$; Mann-Whitney test).

sico del principio attivo applicato al dosaggio più elevato non totalmente compensato dalle maggiori capacità di detossificazione degli individui resistenti. Questa ipotesi è supportata dall'evidente ritardo nei tempi maturazione larvale che si verifica all'aumentare del dosaggio del principio attivo.

La selezione topica con chlorpyrifos evidenzia una lieve riduzione dell'attività esterasica (circa 1,7 volte) rispetto al controllo (Fig. 3) (CASSANELLI *et al.*, 2010). Questo dato, peraltro già segnalato in popolazioni greche (MARGARITOPOULOS *et al.*, 2011) può essere spiegato ipotizzando che il trattamento con chlorpyrifos abbia selezionato isoforme esterasiche modificate con una bassa affinità per il substrato usato per l'analisi, ma probabilmente dotate di una migliore capacità metabolica nei confronti dell'insetticida.

Non sono state evidenziate mutazioni nel gene *AChE-1* potenzialmente responsabili della resistenza

“target site” (sostituzioni aminoacidiche) (CASSANELLI *et al.*, 2010). Sono invece state individuate mutazioni sinonime (sostituzioni nucleotidiche) che non comportano variazioni nella sequenza aminoacidica nella *AChE-1* ma che possono contribuire alla realizzazione di un panel di marcatori genetici per monitorare variazioni nella composizione della popolazione in risposta ai trattamenti

Data la complessità dei meccanismi di resistenza che sono stati sinora evidenziati in Cp, risulta di importante la disponibilità di popolazione in allevamento sotto selezione, in modo tale da:

- consentire una precisa identificazione, seguita dal clonaggio dei geni dei sistemi detossificanti prevalenti per ottenere marcatori genetici specifici per la ridotta suscettibilità al principio attivo utilizzato per la selezione;
- tracciare il profilo biochimico MFO, GST e EST nei diversi stadi di sviluppo;
- verificare l'eventuale co-selezione della resistenza ad altri principi attivi presenti nella popolazione di campo originaria;
- valutare l'efficacia di nuovi principi attivi.

BIBLIOGRAFIA

- BARNES M.M., 1991 - *Codling moth occurrence, host race formation and damage*. In: Van der Geest L.P.S., Evenhuis H.H. (Eds.) *Tortricid Pests. Their Biology, Natural Enemies and Control*. - Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 313-328.
- BARNES M.M., MOFFITT H.R., 1963 - *Resistance to DDT in the adult codling moth and reference curves for guthion and carbaryl*. - J. Econ. Entomol. 56: 722-725.
- BOIVIN T., CHABERT D'HIERES C., BOUVIER J.C., BESLAY D., SAUPHANOR B., 2001 - *Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, Cydia pomonella*. - Entomol. Exp. Appl., 99: 381-386.
- BOSELLI M., 2002 - *I metodi alternativi nella lotta alla Carpocapsa*. - Agricoltura 3: 58-59.
- BOUVIER J.C., BUÈS-R., BOIVIN T., BOUDINHON L., BESLAY D., SAUPHANOR B., 2001 - *Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved*. - Heredity, 87: 456-462.
- BOUVIER J.C., BOIVIN T., BESLAY D., SAUPHANOR B., 2002 - *Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae*. - Arch. Insect Biochem, Physiol., 51: 55-66.
- BRUN-BARALE A., BOUVIER J.C., PAURON D., BERGÉ J.B., SAUPHANOR B., 2005 - *Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in Cydia pomonella L, and development of a diagnostic test*. - Pest Manag. Sci., 61: 549-554.
- BUSH M.R., ABDEL AAL Y.A.I., ROCK G.C., 1993 - *Parathion resistance and esterase activity in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from Nord Carolina*. - J. Econ. Entomol., 86: 660-666.
- CANELA R., BALCELLS M., DALMAU L., AVILLA J., 2000 - *Ovicidal, larvicidal and juvenilizing activity of a picolinephenoxyanilide against Cydia pomonella*. - Pest Manag. Sci., 56: 586-590.
- CASSANELLI S., REYES M., RAULT M., MANICARDI G.C., SAUPHANOR B., 2006 - *Acetylcholinesterase mutation in an*

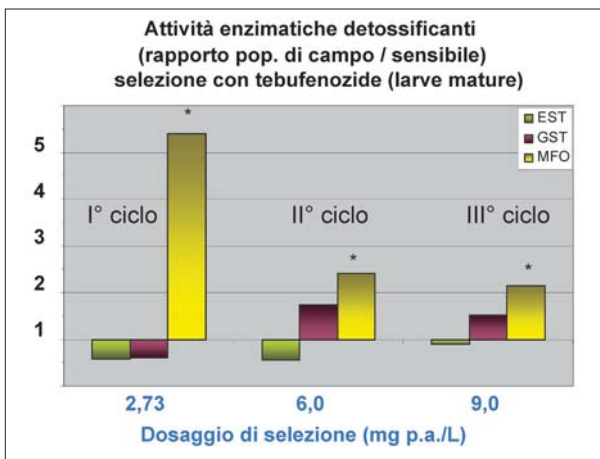


Fig. 2

Attività enzimatiche rispetto ad un ceppo sensibile valutate in una popolazione di Cp sottoposta a selezione con tebufenozide. Differenze statisticamente significative sono indicate con un asterisco ($p < 0,05$; Mann-Whitney test).

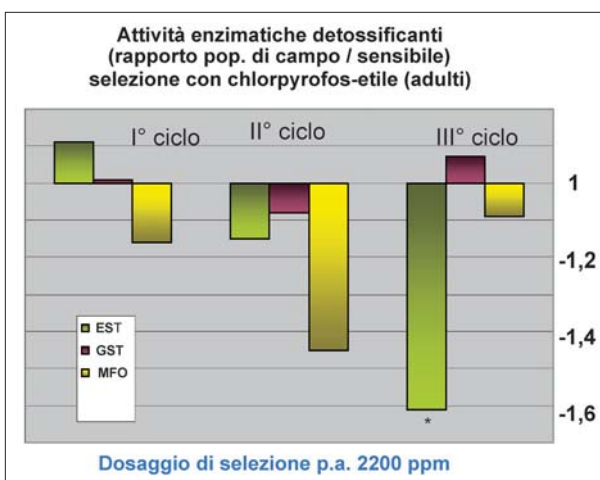


Fig. 3

Attività enzimatiche rispetto ad un ceppo sensibile valutate in una popolazione di Cp sottoposta a selezione con chlorpyrifos-ethyl. Differenze statisticamente significative sono indicate con un asterisco ($p < 0,05$; Mann-Whitney test).

- insecticide resistant population of the codling moth* *Cydia pomonella* (L.). - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 6: 642-653.
- CASSANELLI S., FARINELLI V., ANCESCHI E., BUTTURINI A., CAROLI L., MANICARDI G.C., 2008 – *Analisi biochimiche e molecolari applicate allo studio della resistenza agli agrofarmaci di carpocapsa in Emilia-Romagna*. - *Atti Giornate Fitopatologiche* 2008, I, 93-100 2008
- CASSANELLI S., RIVI M., BUTTURINI A., MELANDRI M., CASALI G., ZANZI L., PAGNI M.A., PRADOLESI G., MANICARDI G.C., 2010 – *Monitoraggio delle resistenze agli insetticidi in popolazioni emiliano-romagnole di carpocapsa con metodi biochimici e molecolari*. - *Atti Giornate Fitopatologiche* 2010, 1: 31-38
- CUTWRIGHT C.R., 1954 – *A codling moth population resistance to DDT*. - *J. Econ. Entomol.*, 47: 189-190
- DUNLEY J.E., WELTER S.C., 2000 – *Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera: Tortricidae)*. - *J. Econ. Entomol.* Jun. 2000, 93 (3): 955-62.
- FUENTES-CONTRERAS E., REYES M., BARROS W., SAUPHANOR B., 2007 – *Evaluation of azinphosmethyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from central Chile*. - *J. Econ. Entomol.*, 100: 551-556.
- HOUGH W.S., 1928 – *Relative resistance to arsenical poisoning of two codling moth strains*. - *J. Econ. Entomol.*, 21: 325-329.
- KNIGHT A.L., 2010 – *Cross-resistance between azinphosmethyl and acetamiprid in populations of codling moth, Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), from Washington State*. - *Pest Mang. Sci.*, 66: 865-874
- IORIATTI C., TASIN M., CHARMILLOT P.J., REYES M., SAUPHANOR B., 2007 – *Early resistance to tebufenozide in field populations of Cydia pomonella L.: methods and mechanisms*. - *J. Appl. Entomol.* 131: 453-459.
- LACEY L.A., THOMSON D., VINCENT C., ARTHURS. S.P., 2008 – *Codling moth granulovirus: a comprehensive review*. - *Biocontrol Sci. Technol.*, 18: 639-663.
- VOUDOURIS C.C., SAUPHANOR B., FRANCK P., REYES M., MAMURIS Z., TSITSIPIS J.A., VONTAS J., MARGARITPOULOS J.T., 2011 – *Insecticide resistance status of the codling moth Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece*. - *Pesticide Biochem. Physiol.*, 100: 229-238.
- MOTA-SANCHEZ D., WISE J.C., POPPEN R.V., GUT L.J., HOLLINGWORTH R.M., 2008 – *Resistance of codling moth, Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae), larvae in Michigan to insecticides with different modes of action and the impact on field residual activity*. - *Pest. Manag. Sci.*, 64: 881-890
- MOFFITT H.R., WESTIGARD P.H., MANTEY K.D., VAN DE BAAN H.E., 1988 – *Resistance to diflubenzuron in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae)*. - *J. Econ. Entomol.*, 81: 1511-1515.
- REUVENY H., COHEN E., 2004 – *Evaluation of mechanisms of azinphos-methyl resistance in the codling moth Cydia pomonella (L.)*. - *Arch. Insect. Biochem.*, 57: 92-100.
- REYES M., BOUVIER J.C., BOIVIN T., FUENTES-CONTRERAS E., SAUPHANOR B., 2004 – *Susceptibilidad a insecticidas y actividad enzimática de Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae) provenientes de tres huertos de manzano de la región del Maule*. - *Chile Agric. Tecnol.*, 64: 229-237.
- REYES M., FRANCK P., CHARMILLOT P.J., IORIATTI C., OLIVARES J., PASQUALINI E., SAUPHANOR B., 2007 – *Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, Cydia pomonella*. - *Pest Manag. Sci.*, 63: 890-902.
- REYES M., FRANCK P., OLIVARES J., MARGARITPOULOS J., KNIGHT A., SAUPHANOR B., 2009 – *Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae)*. - *Bull. Entomol. Res.* 99: 359-369.
- REYES M., COLLANGE B., RAULT M., CASSANELLI S., SAUPHANOR B., 2011 – *Combined detoxification mechanisms and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)*. - *Pestic. Biochem. Physiol.*, 99: 25-35.
- RODRÍGUEZ M., BOSCH D., SAUPHANOR B., AVILLA J., 2010 – *Susceptibility to organophosphate insecticides and activity of detoxifying enzymes in Spanish populations of Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)*. - *J. Econ. Entomol.*, 103: 482-491.
- RODRIGUEZ, M., BOSCH D., AVILLA J., 2012 – *Azinphosmethyl and carbaryl resistance in adults of the codling moth (Cydia pomonella (L.), Lepidoptera: Tortricidae) from Northeastern Spain*. - *Pesticide Biochem. Physiol.*, 103: 43-48
- SAUPHANOR B., BOUVIER J.C., 1995 – *Cross resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, Cydia pomonella L.* - *Pestic. Sci.*, 45: 369-75.
- SAUPHANOR B., CUANY A., BOUVIER J.C., BROSE V., BERGE J.B., 1997 – *Mechanism of resistance to deltamethrin in field populations of Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae)*. - *Pesticide Biochem. Physiol.*, 58: 109-117.
- SAUPHANOR B., AVILLA J., CHARMILLOT P.J., IORIATTI C., MATIAS C., WALDNER W., 1998a – *Coping with insecticide resistance in fruit production: the example of codling moth resistance in Europe*. 6th European Congress of Entomology. Budejovic, Czech Republic 23-29-8-1998. In: Brunnhofer V. and Solden T. Eds. *Inst. Entom. Acad. Sc. Czech Rep. And UN. South Bohemia, Jeronymova*: 619-620.
- SAUPHANOR B., BOUVIER J.C., BROSE V., 1998b – *Spectrum of Insecticide Resistance in Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae) in Southeastern France*. - *J. Econ. Entomol.*, 91, 1225-1231.
- SAUPHANOR B., BROSE V., MONIER C., BOUVIER J.C., 1998c – *Differential ovicidal and larvicidal resistance to benzoylureas in the codling moth, Cydia pomonella*. - *Entomol. Exp. Appl.*, 88: 247-53.
- SOLEÑO J., ANGUIANO L., DE D'ANGELO A.P., CICHÓN L., FERNÁNDEZ D., MONTAGNA C., 2008 – *Toxicological and biochemical response to azinphos-methyl in Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Tortricidae) among orchards from the Argentinian Patagonia*. - *Pest Manag. Sci.*, 64: 964-970.
- STARÁ J., KOCOUREK F., 2007 – *Insecticidal resistance and cross-resistance in populations of Cydia pomonella (Lepidoptera: Tortricidae) in Central Europe*. - *J. Econ. Entomol.*, 100: 1587-1595
- TARET G., SEVILLA M., WORNOPYORN V., ISLAM A., AHMAD S., CACERES C., ROBINSON A. S., VREYSEN M.J.B., 2010 – *Mating compatibility among populations of codling moth Cydia pomonella Linnaeus (Lepidoptera: Tortricidae) from different geographic origins*. - *J. Appl. Entomol.*, 134: 207-215
- VARELA L.G., WELTER S.C., JONES V.P., BRUNNER J.F., RIEDL H., 1993 – *Monitoring and characterization of insecticide resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in four western states*. - *J. Econ. Entomol.*, 86: 1-10.
- WITZGALL P., STELINSKI L., GUT L., THOMSON D., 2008 – *Codling moth management and chemical ecology*. - *Annu. Rev. Entomol.*, 53: 503-522.

LA RESISTENZA AI PRODOTTI FITOSANITARI IN ACARI FITOFAGI E PREDATORI: ESPERIENZE E CASI DI STUDIO

CARLO DUSO (*) - ALBERTO POZZEBON (*) - STEFANO CASSANELLI (**)
PAOLA TIRELLO (*) - THOMAS VAN LEEUWEN (***)

(*) Dipartimento DAFNAE, Università di Padova, Italia.

(**) Dipartimento di Scienze della vita, Università di Modena e Reggio Emilia, Italia.

(***) Department of Crop Protection, University of Gent, Belgium.

Letture tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Resistance to pesticides in phytophagous and predatory mites with case-studies in Italy

The spread of mite populations that evolved resistance to pesticides and the detrimental effects of most pesticides to their natural enemies are major factor affecting spider mite outbreaks. *Tetranychus urticae* has been reported as the most resistant pest worldwide. The spread of resistance in spider mite populations as well as resistance mechanisms have been investigated. Problems associated with resistant populations of *T. urticae* in Italy are reviewed. Resistance management should include biological control using predatory mites but knowledge on pesticide side-effects is essential. Progress in toxicological procedures and will improve knowledge on the compatibility of pesticides and beneficials. Resistance in predatory mites has also been investigated and represents a key factor in IPM tactics.

KEY WORDS: Resistance, pesticides, Acari, Tetranychidae, Phytoseiidae.

ALLE ORIGINI DEI PROBLEMI CON GLI ACARI FITOFAGI

I primi documenti scientifici sull'importanza economica degli acari fitofagi in Italia sembrano risalire alla seconda metà dell'Ottocento. CANESTRINI & FANZAGO (1876, 1877) riportarono numerose entità tra i Tetranychidi, in particolare *Tetranychus lintearius* Dufour e *Tetranychus pilosus* Canestrini & Fanzago. La prima specie, posta successivamente in sinonimia con *Tetranychus telarius* da RICCARDO CANESTRINI (1890), era considerata dannosa alla vite, al mais e al sorgo. Le diffuse infestazioni di *T. telarius* nei vigneti dell'Italia settentrionale e in altri Paesi europei attirarono l'interesse di vari autori (TARGIONI-TOZZETTI, 1876; BERLESE, 1886; LUNARDONI, 1890; CUBONI, 1891). Successivamente, BERLESE (1901) pubblicò una monografia sugli acari di interesse agrario, in cui *T. telarius* era considerata la specie più comune e dannosa tra gli acari fitofagi; con ogni probabilità si trattava di *Tetranychus urticae* Koch. La presenza di *Tetranychus pilosus* Canestrini & Fanzago nei vigneti fu riscontrata da TARGIONI-TOZZETTI (in CUBONI, 1891) e PINOLINI (1896); successivamente, questa specie fu posta in

sinonimia con *Panonychus ulmi* (Koch) (ROTA, 1962). Tra gli Eriofioidei, era noto ma non ritenuto dannoso l'agente dell'erinosi della vite *Colomerus vitis* Pagenstecher (TARGIONI-TOZZETTI, 1870; BRIOSI, 1876; CANESTRINI, 1892). Tra gli autori attivi tra la fine dell'Ottocento e l'inizio del Novecento, solo BERLESE (1901) e RIBAGA (1904) si dedicarono allo studio degli acari predatori, in particolare dei Fitoseidi.

L'interesse nei confronti degli acari fitofagi sembrò affievolirsi nei primi decenni del Novecento. L'impiego dello zolfo si era affermato nel controllo dell'oidio della vite e di altre colture dimostrando una certa attività acaricida. Tuttavia, alcuni ricercatori avevano segnalato una diminuzione dell'efficacia acaricida dello zolfo in alcuni areali viticoli (RATHAY, 1894 in GIROLAMI *et al.*, 1991). Tale fenomeno potrebbe essere stato all'origine delle prime infestazioni di *T. urticae* dato che lo zolfo manifesta, a seconda dei formulati, delle dosi e delle condizioni ambientali, effetti negativi sui predatori dei Tetranychidi (BEERS *et al.*, 2009). Lo sviluppo della resistenza allo zolfo negli acari predatori potrebbe aver ridotto l'entità dei problemi legati ai Tetranychidi della vite nella prima metà del Novecento (GIROLAMI *et al.*, 1991).

L'importanza dei Tetranychidi in frutticoltura raggiunse livelli elevati negli anni '50. Nel 1956, gli specialisti europei riuniti a Wageningen per trattare l'argomento posero in evidenza la crescente dannosità di *T. urticae* e di *P. ulmi* in frutticoltura e l'improvvisa comparsa di *Eotetranychus carpini* (Oudemans) in viticoltura (GASSER, 1956). Il quadro relativo ai Tetranychidi dannosi in frutticoltura in Italia fu delineato con precisione negli anni '60 (ROTA, 1962; ZANGHERI & MASUTTI, 1962; NUCIFORA & INSERRA, 1967). Gli effetti negativi di clororganici ed esteri fosforici sugli antagonisti naturali dei Tetranychidi sono stati evocati tra le principali cause di pullulazione di questi fitofagi (VAN DE VRIE *et al.*, 1972) ma il ruolo dei ditiocarbammati e di altri fungicidi in tale contesto è apparso altrettanto importante (GIROLAMI, 1981; GRUYS, 1982). Alcuni insetticidi e fungicidi sono stati impiegati contro gli stessi Tetranychidi con effetti insoddisfacenti o di apparente stimolazione delle infestazioni. I prodotti "acarostimolanti" furono al centro di un dibattito che aveva l'obiettivo di fornire indicazioni applicative ma che rimase sterile, anche se i ricercatori continuano a interrogarsi sui meccanismi che possono causare tali fenomeni (COHEN, 2006). Data l'inefficacia dello zolfo, degli oli minerali e di molti insetticidi si rese necessaria la disponibilità di prodotti caratterizzati da spiccata attività acaricida nel tentativo di porre un freno all'aggressività dei Tetranychidi.

COMPARSA DEGLI ACARICIDI E LORO EVOLUZIONE NEL TEMPO

Negli anni '50 e '60 l'industria sintetizzò i primi acaricidi specifici tra cui alcuni clororganici (ad es. chlorbenseide, dicofol, dienochlor), solforganici (ad es. aramite, tetradifon, propargite) e poi stannorganici (ad es. cyhexatin, fenbutatin oxide). L'avvento degli esteri fosforici e dei carbammati non è stato associato a molecole efficaci nei confronti dei Tetranychidi e la resistenza a queste molecole è comparsa rapidamente (nel 1947 per il parathion). Nel corso del tempo l'impiego degli acaricidi si è esteso dal contesto agrario a quelli medico-veterinario e urbano incontrando difficoltà crescenti in termini di efficacia.

Un'interessante ricostruzione storica degli eventi relativi alla comparsa e all'evoluzione della resistenza su melo (*P. ulmi*) e specie ornamentali (*T. urticae*) è riportata in CRANHAM & HELLE (1985). È disponibile un database (pesticideresistance.org) sui casi di resistenza agli insetticidi/acaricidi incontrati nei più disparati contesti (WHALON *et al.*, 2013) da cui sono state stilate

delle classifiche delle specie di artropodi maggiormente coinvolte nei fenomeni di resistenza (ad es. VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). Da un'elaborazione sviluppata considerando il numero di sostanze attive coinvolte in casi di resistenza, il primato in questa speciale classifica spetta a *T. urticae* (resistente a 92 sostanze attive) e nei primi dieci posti risiedono anche *P. ulmi* (46) e l'acaro ematofago *Rhipicephalus microplus* Canestrini (45). In *T. urticae* la resistenza a carico dei principali gruppi di insetticidi e acaricidi è stata riportata in 389 casi (WHALON *et al.*, 2013). La rapidità con cui la resistenza sviluppa in questa specie è alla base delle difficoltà che si incontrano nel suo controllo. La resistenza di *P. ulmi* agli acaricidi è diffusa (189 casi riportati) e interessa abamectin, benzoximate, chlorpyrifos, clofentezine, cyhexatin, fenpyroximate, hexythiazox, propargite, spiroadiclofen e altre sostanze attive (WHALON *et al.*, 2013). Studi effettuati in Europa hanno rivelato la presenza di ceppi di *P. ulmi* resistenti a chlorpyrifos, clofentezine e hexythiazox (NAUEN *et al.*, 2001). Tale situazione è stata confermata in Italia (ANGELI *et al.*, 1994; AHMAD S. *et al.*, dati non pubblicati). La necessità di arginare i fenomeni di resistenza ha suggerito di intraprendere studi dettagliati sui meccanismi di azione degli acaricidi. L'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) ha classificato gli acaricidi in gruppi accomunati dallo stesso meccanismo di azione (Tabella 1). Questa classificazione è inserita in quella più vasta riguardante le modalità di azione degli insetticidi e comprende anche alcune sostanze ad attività insetticida-acaricida non più impiegate in Italia o ritirate dal mercato. Tale approccio può risultare utile nella comprensione dei fenomeni associati alla resistenza, nella loro prevenzione e gestione mediante appropriate strategie anti-resistenza.

FATTORI COINVOLTI NELLA RESISTENZA AGLI ACARICIDI IN *T. URTICAE*

I problemi connessi alla resistenza agli acaricidi in *T. urticae* sono stati affrontati sia in Europa (ad es. TSAGKARAKOU *et al.*, 1999; NAUEN *et al.*, 2001; STUMPF & NAUEN, 2001, 2002; VAN LEEUWEN *et al.*, 2010) sia in contesti extraeuropei (ad es. HERRON *et al.*, 1994; FUNAYAMA & TAKAHASHI, 1995; HERRON *et al.*, 1997; BEERS *et al.*, 1998; HERRON & ROPHAIL, 1998, 2003; HERRON *et al.*, 1998). Relativamente all'Italia, le informazioni su tale argomento sono state limitate per molto tempo ad uno studio di ROSSI & CONTI (1997) in cui è stata dimostrata la resistenza di *T. urticae* nei confronti di alcuni prodotti acaricidi (dicofol e tetradifon) e

Tabella 1 – Modalità di azione dei principali acaricidi secondo la classificazione IRAC (www.irac-online.org).

Modalità d'azione (Gruppo IRAC)	Sottogruppo (Gruppo chimico)	Sostanze attive (esempi)
Effetti sul sistema nervoso e muscolare		
1 - Inibitori dell'acetilcolinesterasi	A (Carbammati) B (Organofosfati)	Methomyl Pirimiphos-methyl Endosulfan
2 - Antagonisti interazioni GABA-canal del Cl	A (Cloroderivati ciclodienici)	Bifenthrin, Fluvalinate
3 - Modulatore dei canali del Na	A (Piretrine e Piretroidi)	Abamectin, Milbemectin
6 - Attivatori dei canali del Cl	A (Avermectine e Milbemectine)	Amitraz
19 - Agonisti dei recettori della octopamina		
Effetti sulla respirazione muscolare		
12 - Inibitori della ATP-sintetasi	A B (Stannorganici) C	Diafenthuron Azocyclotin, Fenbutatin oxide Propargite
13 - Disaccoppianti della fosforilazione ossidativa (effetti sul flusso protonico)		Chlorfenapyr Acequinocyl
20 - Inibitori del complesso mitocondriale III	B	Pyridaben, Tebufenpyrad
21 - Inibitori del complesso mitocondriale I	A (METI)	Cyenoptyrafen, Cyflumetofen
25 - Inibitori del complesso mitocondriale II	Derivati del beta-ketonitrile	
Effetti sullo sviluppo		
10 - Inibitori dello sviluppo degli acari	A B (Benzoyluree)	Clofentezine, Hexythiazox Etoxazole Flucycloxuron, Flufenoxuron
15 - Inibitori della chitino-sintetasi tipo 0		
23 - Inibitori della acetil-CoA carbossilasi - Sintesi dei lipidi, regolazione della crescita	(Acidi tetronici e tetramici)	Spirodiclofen, Spiromesifen
Acaricidi con modalità d'azione sconosciuta		Benzoximate Chinomethionate Dicofol Bifenazate

insetticidi (fenitrothion e deltamethrin). In seguito, NAUEN *et al.* (2001) hanno riportato l'esistenza di ceppi italiani di *T. urticae* resistenti a clofentezine e hexythiazox.

Lo sviluppo della resistenza negli acari è influenzato da fattori genetici e bio-ecologici e dalle strategie di controllo chimico. Gli adattamenti che consentono ad un acaro di sopravvivere a dosi considerate letali di un insetticida/acaricida possono derivare da una diminuzione della risposta (interazioni prodotto-sito bersaglio) e/o da una ridotta esposizione (es. penetrazione, distribuzione, metabolismo ed escrezione). In molti casi la ridotta sensibilità ad una sostanza attiva si instaura in seguito a variazioni nel sito bersaglio dovute a mutazioni puntiformi e/o ad aumentate capacità di detossificazione di un prodotto (es. esterasi, P450 monossigenasi, glutatione-S-transferasi).

Tra i fattori che hanno favorito lo sviluppo di ceppi resistenti agli acaricidi in *T. urticae* vi sono il breve ciclo di sviluppo ad alte temperature, l'elevata fecondità, la partenogenesi arrenotoca, la polifagia (circa 1100 piante ospiti tra cui orticole, ornamentali, fruttiferi, vite, mais e soia), la limitata mobilità e la tendenza all'imbreding. Queste caratteristiche, unite ad una elevata pressione selettiva, hanno aumentato la comparsa e la diffusione di ceppi resistenti agli acaricidi (GEORGHIOU & LAGUNES-TEJEDA 1991; VAN LEEUWEN *et al.*, 2009, 2010). Le difficoltà insorte nel controllo di *T.*

urticae, così come di *P. ulmi* o *Panonychus citri* (McGregor) sono associate alla comparsa di ceppi multi-resistenti (CRANHAM & HELLE, 1985; KHAJEHALI *et al.*, 2011). Lo studio delle vie di detossificazione dei prodotti fitosanitari può contribuire alla conoscenza di questi fenomeni.

Il sequenziamento del genoma di *T. urticae* ha rivelato straordinari meccanismi di adattamento alla fitofagia che possono contribuire a spiegare la capacità di sviluppare resistenza agli acaricidi mediante meccanismi di detossificazione (GRBIC *et al.*, 2011; DERMAUW *et al.*, 2013). Sono stati individuati numerosi geni per la cisteina peptidasi (digestione proteolitica), 86 geni per il citocromo P450 (espansione dei geni CYP2), 71 geni per le esterasi (CCEs), due nuove cladi CCEs, un unico gene per l'acetilcolinesterasi, un nuovo gruppo di glutatione-S-transferasi (GSTs). L'espressione della maggior parte di questi geni è più elevata che negli insetti e nei mammiferi. Inoltre, sono state individuate 39 proteine per la resistenza a sostanze tossiche (ABC transporters).

Tetranychus urticae ha sviluppato resistenza ad almeno 30 diversi esteri fosforici e carbammati. Sono state riscontrate mutazioni puntiformi nelle acetilcolinesterasi (AChE) divenute «insensibili» (ad es. F331W in AChE1 osservata in ceppi europei e asiatici della specie) (VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). In alcuni ceppi resistenti agli esteri fosforici è stata evidenziata anche la duplicazione

del gene per l'ACHE. La resistenza ai piretroidi in *T. urticae* è stata associata all'aumentata attività di esterasi e monossigenasi. Tra i casi di resistenza *target site* si segnala la mutazione F1538I relativa ai canali del Na riscontrata anche in *Musca domestica* L. e *R. microplus* (TSAGKARAKOU *et al.*, 2009).

Il dicofol è un acaricida che agisce nei confronti di tutti gli stadi di sviluppo degli acari inibendo il complesso mitocondriale II della catena respiratoria (TOMLIN, 2003). La resistenza a dicofol è stata associata a fenomeni di tipo metabolico, che coinvolgono in particolare le monoossigenasi (FERGUSON-KOLMES *et al.*, 1991; KIM *et al.*, 2007).

Gli acaricidi stannorganici agiscono mediante l'inibizione della sintesi dell'ATP a livello mitocondriale. La resistenza nei confronti di questa classe di acaricidi è conferita da mutazioni a livello delle ATPasi (KNOWLES, 1997).

Avermectine e milbemicine agiscono sui canali transmembrana per lo ione Cl dipendenti dal glutammato (Tu_GluCl) o dal GABA (acido gamma-amminobutirrico). Più meccanismi concorrono nel conferire la resistenza ad abamectin: rallentamento nell'assorbimento, aumento nell'escrezione, incremento del metabolismo (VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). In lavori più recenti sono stati approfonditi gli aspetti associati al metabolismo (esterasi, monossigenasi) e riportate tre mutazioni relative ai canali Tu_GluCl (KWON *et al.*, 2010a,b; DERMAUW *et al.*, 2012).

Gli acaricidi appartenenti al gruppo dei METI (Mitochondrial Electron Transport Inhibitors) inibiscono il complesso I della catena respiratoria. Ne fanno parte alcuni prodotti largamente impiegati contro Tetranychidi ed Eriofidi (pyridaben, tebufenpyrad e fenpyroximate) che hanno perso rapidamente efficacia. Nei fenomeni di resistenza sono coinvolti meccanismi di tipo metabolico (P450 monossigenasi) e probabilmente di tipo *target site* (mutazioni che interessano subunità dell'enzima NADH ubiquinone ossidoriduttasi) (VAN LEEUWEN *et al.*, 2010). L'attività di chlorfenapyr si esplica in seguito alla produzione di un metabolita che agisce come disaccoppiante mitocondriale (BLACK *et al.*, 1994). La resistenza a questo acaricida è stata associata all'aumento delle attività delle esterasi e delle monoossigenasi (VAN LEEUWEN *et al.*, 2006b).

Bifenazate, uno dei prodotti più recenti, agisce sul canale ionico per il Cl dipendente dal GABA (GABA_AR) (HIRAGAKI *et al.*, 2012). Alcuni studi hanno dimostrato come la resistenza a bifenazate sia associata a mutazioni del citocromo b del sito Qo del complesso III della catena di trasporto degli elettroni (VAN LEEUWEN *et al.*, 2006a, 2008, 2010, 2011; VAN NIEUWENHUYSE *et al.*, 2009,

2012). Tale acquisizione è stata suffragata dai fenomeni di resistenza incrociata tra bifenazate e acequinocyl, un acaricida inibitore del complesso III. Gli incroci tra ceppi resistenti e sensibili hanno dimostrato un'ereditarietà di tipo materno e il coinvolgimento dei mitocondri (l'attività del bifenazate riduce la sintesi di ATP nei ceppi sensibili).

Clofentezine e hexythiazox interferiscono con lo sviluppo delle uova degli acari. La resistenza a questi acaricidi è stata associata all'aumento delle attività enzimatiche, in particolare delle esterasi (AY & KARA, 2011). Il locus associato a resistenza a etoxazole è localizzato in un piccolo intervallo genomico che coincide con quello della chitinosintetasi (CHS1) espressa negli stadi più sensibili all'acaricida (VAN LEEUWEN *et al.*, 2012).

Lo spirodiclofen interferisce con la biosintesi dei lipidi degli artropodi bersaglio, in particolare con la sintesi dell'acetil-CoA carbossilasi (BRETSCHNEIDER *et al.*, 2007). Inibisce la schiusura delle uova mentre ha una limitata tossicità nei confronti degli adulti pur riducendo la fecondità e la fertilità delle femmine (MARCIC *et al.*, 2010; VAN POTTEMBERGE *et al.*, 2008a; 2008b, 2009). La resistenza in *T. urticae*, ottenuta mediante selezione in laboratorio, ha basi metaboliche (P450 monossigenasi) (RAUCH & NAUEN, 2003; DEMAEGHT *et al.*, 2013).

LA RESISTENZA DI *TETRANYCHUS URTICAE* AGLI ACARICIDI IN ITALIA

In Italia, le infestazioni di *T. urticae* sono frequenti in coltura protetta ma possono verificarsi anche su mais, soia, colture orticole e arboree soprattutto in condizioni di elevata temperatura e bassa umidità relativa. La resistenza di *T. urticae* agli acaricidi in Italia è stata oggetto di progetti PRIN dedicati allo studio della resistenza in fitofagi di importanza economica quali Emitteri (afidi e aleurodidi), Lepidotteri (tortricidi) e Acari. Nel corso di un'indagine, svolta nel 2003 in alcune aree di coltivazione della rosa in serra (Liguria, Lazio, Sicilia e Veneto), sono stati riscontrati danni causati da *T. urticae* nonostante l'applicazione di oltre 10 trattamenti acaricidi per ciclo produttivo. Una situazione simile è stata riportata anche in altri Paesi europei (STAVRINIDES & HADJISTYLLI 2009; KHAJEHALI *et al.* 2011). Ceppi di *T. urticae* raccolti su rosa in coltura protetta e su colture orticole in pieno campo sono stati posti in allevamento presso il Dipartimento DAAPV dell'Università di Padova (attualmente Dipartimento DAFNAE) per indagare sulla loro risposta nei confronti di alcuni acaricidi (TIRELLO *et al.*, 2012b). In una prima serie di

biosaggi è stata riscontrata una marcata resistenza a abamectin, bromopropilate, tebufenpyrad e fenpyroximate. La risposta di questi ceppi agli acaricidi è stata confrontata con quella di un ceppo raccolto in Sardegna su piante orticole non trattate con prodotti fitosanitari. In seguito lo studio si è concentrato su due ceppi raccolti in Veneto (PSE) e Liguria (SAN), mantenuti in allevamento per alcuni mesi senza ulteriore esposizione a prodotti fitosanitari. I biosaggi sono stati condotti su femmine e uova di *T. urticae* impiegando acaricidi largamente impiegati nel controllo dei Tetranychidi (abamectin, bifenazate, clofentezine, etoxazole, fenpyroximate, flufenoxuron, hexythiazox, spirodiclofen, tebufenpyrad). Le femmine sono state trattate mediante microimmersione nella soluzione da saggiare e allevamento in celle chiuse (DENNEHY *et al.*, 1993; DUSO *et al.*, 2008a), le uova mediante immersione delle foglie nella soluzione (CASTAGNOLI *et al.*, 2005). I ceppi PSE e SAN hanno esibito resistenza a numerosi acaricidi e i valori delle dosi letali sono risultati spesso superiori alle dosi di campo. I fattori di resistenza (RR_{50}) dei ceppi PSE e SAN sono stati elevati per abamectin (> 1290 per PSE) e significativi per tebufenpyrad (> 163 per PSE), fenpyroximate (> 74 per SAN) e bifenazate (> 33 per PSE). I biosaggi condotti sulle uova dei ceppi PSE e SAN hanno posto in luce elevati fattori di resistenza nei confronti di hexythiazox (> 70000) e clofentezine (> 66000) mentre sono emersi valori significativi per flufenoxuron (> 61) e etoxazole (> 63 per PSE). Non sono emersi indizi di resistenza a spirodiclofen.

È stata condotta anche un'indagine sull'attività degli enzimi esterasi (ESTs), glutatione-S-transferasi (GSTs) e citocromo P450 monossigenasi (MFOs) seguendo procedure messe a punto da STUMPF & NAUEN (2002) e VAN LEEUWEN & TIRRY (2007). I saggi enzimatici hanno posto in evidenza un aumento significativo delle attività delle monossigenasi nei ceppi resistenti SAN e PSE (rispettivamente 2,66 e 1,95 volte rispetto al ceppo sensibile). L'attività delle glutatione-S-transferasi è risultata significativamente più elevata nel ceppo SAN (2,12 volte rispetto al ceppo sensibile) mentre una tendenza simile è emersa per le esterasi del ceppo PSE (1,69 volte rispetto al ceppo sensibile).

Prove condotte su altri ceppi di *T. urticae* raccolti in Sicilia e Lazio hanno posto in evidenza una diffusa resistenza a vari acaricidi che conferma le gravi difficoltà incontrate nel controllo di questo fitofago; a titolo di esempio è stato calcolato un $RR > 31000$ nei confronti di abamectin in una popolazione raccolta nel Lazio (DUSO *et al.*, dati non pub-

blicati). La resistenza nei confronti di abamectin indica una situazione osservata anche in altri Paesi ed il ruolo degli enzimi detossificanti è stato suggerito quale meccanismo alla base di questo fenomeno (STUMPF & NAUEN, 2002; KWON *et al.*, 2010a). In realtà l'aumentata attività delle monossigenasi e delle esterasi nei ceppi resistenti considerati non spiega in modo convincente gli elevati fattori di resistenza osservati nello studio. È stato ipotizzato il coinvolgimento di mutazioni (es. G323D) a carico dei canali del Cl dipendenti dal glutammato (KWON *et al.*, 2010b) ma questa mutazione non è stata riscontrata nel ceppo più resistente (VAN LEEUWEN, dati non pubblicati). Relativamente a tebufenpyrad, i valori delle DL_{90} sono risultati di almeno 5 volte superiori alla dose di campo. L'indagine sembra confermare il ruolo dei meccanismi di degradazione ossidativa posti in evidenza in precedenti studi effettuati su questa sostanza attiva e su altri METI (STUMPF & NAUEN 2001; KIM *et al.*, 2004; VAN POTTELBERGE *et al.* 2009a). La resistenza a bifenazate sta diffondendosi in Europa (VAN LEEUWEN *et al.*, 2008, VAN NIEUWENHUYSE *et al.*, 2009) e i valori delle DL_{90} per i ceppi PSE e SAN non sono lontani dalle dosi di campo proposte per questo acaricida. Pertanto, i dati riportati indicano che l'impiego del principio attivo non è esente da rischi. L'elevata resistenza a hexythiazox e clofentezine rappresenta uno dei fattori alla base degli insuccessi osservati nel controllo dei Tetranychidi in varie parti del Mondo (VAN LEEUWEN *et al.*, 2009; HERRON & ROPHAIL 1993; NAUEN *et al.*, 2001; PREE *et al.*, 2002) e tale evento è apparso evidente nelle serre indagate. Flufenoxuron è stato impiegato in alternativa a questi due ovicidi ma i dati ottenuti ne dimostrano la limitata efficacia acaricida a differenza di quanto emerso per spirodiclofen. I dati relativi a etoxazole suggeriscono che tale sostanza attiva sia ancora efficace a differenza di quanto osservato in Giappone (KOBAYASHI *et al.*, 2001; UESUGI *et al.*, 2002), Corea del Sud (LEE *et al.*, 2004) e Olanda (KHAJEHALI *et al.*, 2011). In seguito all'applicazione dell'acaricida, è stata conseguita un'elevata mortalità delle uova anche a basse concentrazioni e le dosi letali riportate sono molto inferiori alla dose di campo. Non è stata riscontrata resistenza incrociata tra etoxazole e hexythiazox evidenziata in precedenti indagini (ASAHARA *et al.*, 2008).

STRATEGIE ANTI-RESISTENZA

L'obiettivo di prevenire la resistenza dev'essere perseguito mediante l'alternanza, la disposizione sequenziale o la rotazione di acaricidi a differente

modalità di azione. Tuttavia, i meccanismi di resistenza metabolica possono conferire resistenza in gruppi di acaricidi a diversa modalità di azione. In tal caso, l'efficacia di specifiche alternanze o rotazioni è destinata a diminuire. I meccanismi di ridotta penetrazione dell'acaricida o il cambio di comportamento dell'acaro possono creare anch'essi resistenza a gruppi differenti di prodotti rendendo necessario un cambio di strategia. Rientrano nelle possibili strategie anti-resistenza anche l'impiego di antagonisti naturali (predatori ed entomopatogeni), l'impiego di estratti vegetali e oli essenziali, la messa a punto di metodi colturali che riducono la vigoria delle piante, come la corretta gestione della concimazione minerale (OPIT *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007; CHOW *et al.*, 2009) o che modificano le condizioni climatiche come il *fogging* (DUSO *et al.*, 2004).

Nell'ambito delle strategie anti-resistenza, vanno considerati con grande attenzione la salvaguardia e/o il potenziamento degli antagonisti naturali di *T. urticae*. Nelle colture protette, l'attenzione dei ricercatori si è concentrata soprattutto su *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, specialista caratterizzato da elevato potenziale demografico (HELLE & SABELIS, 1985) mentre i generalisti come *Neoseiulus californicus* (McGregor) sono stati considerati in tempi più recenti (CASTAGNOLI & SIMONI, 1999; SCHAUSBERGER & WALZER, 2001; RHODES *et al.*, 2006). I lanci inoculativi o inondativi dei Fitoseidi non sortiscono sempre l'effetto sperato in quanto la difesa contro altri fitofagi e le malattie fungine implica l'impiego di prodotti che possono risultare dannosi ai predatori. Le informazioni sugli effetti indesiderati dei prodotti fitosanitari su *P. persimilis* fanno riferimento a ceppi commerciali che sono stati spesso selezionati per la resistenza nei confronti di insetticidi tradizionali (ad es. esteri fosforici). Recenti indagini hanno dimostrato l'elevata sensibilità di ceppi diversi di *P. persimilis* (selvatici o commerciali) nei confronti sia di prodotti organici di sintesi sia di prodotti a base di estratti vegetali (DUSO *et al.*, 2008b, 2009). Recentemente, le interazioni tra prodotti fitosanitari e predatori sono state studiate considerando le principali vie di esposizione (residuale, topica o per ingestione) degli acari ai prodotti. Uno studio comparato su predatori e prede può contribuire a spiegare l'impatto di un prodotto sulle comunità associate ad una determinata coltura (POZZEBON *et al.*, 2011).

La tutela degli antagonisti naturali richiede un continuo aggiornamento dei database sulla selettività dei prodotti fitosanitari. Questi dovrebbero includere sia i dati relativi a prodotti di recente commercializzazione sia quelli che provengono

dalla revisione dei dati pregressi alla luce di nuovi approcci metodologici (HASSAN *et al.*, 1994; BIONDI *et al.*, 2012). Gli studi sulla selettività dei prodotti fitosanitari sono compresi nei dossier necessari all'autorizzazione all'uso. Questi studi sono eseguiti in ottemperanza alla normativa europea (Reg. 1107/2009/EU) che contempla protocolli definiti per le diverse specie di artropodi "non bersaglio" (tra gli acari Fitoseidi *Typhlodromus pyri* Scheuten). Lo studio dell'impatto dei prodotti fitosanitari nei confronti di antagonisti naturali importanti negli ambienti mediterranei e lo sviluppo di nuove metodologie d'indagine sono stati condotti soprattutto da ricercatori indipendenti. Ne costituiscono un esempio gli studi su *Kampimodromus aberrans* (Oudemans), specie di primaria importanza nei vigneti e frutteti dell'Europa meridionale. Le ricerche sulla biologia della specie (KASAP, 2005; OZMAN-SULLIVAN, 2006; LORENZON *et al.*, 2012) hanno consentito di mettere a punto un metodo di allevamento e una procedura per saggiare gli effetti dei prodotti fitosanitari in laboratorio (TIRELLO *et al.*, 2012a; TIRELLO *et al.*, dati non pubblicati). Lo sviluppo di procedure di laboratorio adeguate ha consentito di produrre dati affidabili sulla selettività dei prodotti fitosanitari nei confronti di *P. persimilis* e della sua preda *T. urticae*, ottenendo informazioni sul possibile effetto di un prodotto sul rapporto predatore-preda (DUSO *et al.*, 2008a, 2008b). L'analisi comparativa della risposta demografica di acari fitofagi e predatori in esperimenti di mesocosmo costituisce infatti un altro strumento nello studio dell'impatto dei prodotti fitosanitari sul rapporto predatore-preda (STAVRINIDES & MILLS, 2009). Questo approccio ha il vantaggio di offrire una visione complessiva dell'impatto dei prodotti fitosanitari cercando di simulare quanto avviene in condizioni realistiche d'impiego (STARK & BANKS, 2003). Talvolta, l'impatto di un prodotto fitosanitario nei confronti degli acari predatori va considerato all'interno di complesse relazioni ecologiche. Ad esempio, l'effetto di un fungicida sugli acari predatori generalisti può essere diretto, se dovuto alla tossicità intrinseca del prodotto, oppure indiretto se è mediato dall'effetto del fungicida sull'abbondanza di micelio fungino che costituisce un alimento alternativo per gli acari predatori (POZZEBON *et al.*, 2010). Anche la disponibilità di polline, alimento alternativo per gli acari predatori, può influenzare l'effetto dei prodotti fitosanitari nei confronti degli acari Fitoseidi generalisti: un'elevata disponibilità di polline può favorire la resilienza delle popolazioni di acari Fitoseidi dopo un trattamento insetticida (AHMAD, 2013). La piena comprensione di questi meccanismi necessita di

indagini a diversa scala dimensionale. Infatti, è possibile misurare con precisione la tossicità intrinseca di un prodotto (effetti letali e sub-letali) solo a livello di singolo individuo e in condizioni controllate. Tra gli effetti sub-letali dei prodotti sugli acari Fitoseidi sono considerati soprattutto quelli sulla fecondità (CASTAGNOLI *et al.*, 2005; URBANEJA *et al.*, 2008; LEFEBVRE *et al.*, 2012), sulla risposta funzionale nei confronti della preda (POLETTI *et al.*, 2007), sul tasso di fuga (BOSTANIAN *et al.*, 2009). Lo studio della tossicità letale in laboratorio può essere eseguito mediante biosaggi finalizzati al calcolo della relazione dose-mortalità con la possibilità di evidenziare eventuali fenomeni di resistenza ai prodotti fitosanitari anche tra gli acari predatori.

RESISTENZA NEGLI ACARI PREDATORI

La resistenza ai prodotti fitosanitari può interessare anche gli entomofagi. CROFT (1990) riporta almeno 31 specie di entomofagi (11 specie tra i Fitoseidi) per le quali sono noti casi di resistenza agli insetticidi. Attualmente, sono almeno 15 le specie di Fitoseidi di cui è nota l'esistenza di ceppi resistenti a insetticidi. Le prime segnalazioni di resistenza negli acari predatori risalgono alla fine degli anni '60 quando *M. occidentalis* aveva evidenziato una diffusa insensibilità nei confronti degli esteri fosforici nei frutteti dell'America del Nord; alcuni anni dopo fu dimostrata la resistenza allo zolfo in ceppi di *M. occidentalis* provenienti dai vigneti californiani. Questi eventi hanno contribuito a far raggiungere a tale specie un ruolo di primo piano nel contesto della lotta integrata agli acari fitofagi al punto da promuovere l'introduzione di ceppi resistenti di *M. occidentalis* in Australia (HOY, 2011). Tra le altre specie coinvolte in fenomeni di resistenza nel Nord America si segnalano anche *Neoseiulus fallacis* (Garman), *Amblyseius hibisci* (Chant), *Amblyseius andersoni* (Chant) e *T. pyri* (CROFT, 1990). In Europa, la prima segnalazione di Fitoseidi resistenti ha riguardato un ceppo di *A. andersoni* in grado di tollerare ripetuti interventi con esteri fosforici nei frutteti (IVANCICH GAMBARO, 1975). I livelli di resistenza a esteri fosforici e carbammati esibiti da vari ceppi di *A. andersoni* raccolti nell'Italia settentrionale sono apparsi sorprendenti (DUSO *et al.*, 1992). In Europa sono stati riscontrati ceppi resistenti a insetticidi e a fungicidi anche in altri predatori generalisti come *T. pyri*, *K. aberrans* e *T. exbilaratus* Ragusa (OVERMEER & VAN ZON, 1983; DUSO *et al.*, 1992; VIDAL & KREITER, 1995; AUGER *et al.*, 2004; BONAFOS *et al.*, 2007; TIRELLO *et al.*, 2012a). La resistenza agli esteri fosforici è stata documentata anche in *P. persimilis* (CROFT,

1990). Le segnalazioni di ceppi resistenti in Asia riguardano soprattutto *Amblyseius womersleyi* Schicha (MOCHIZUKI, 1997; SATO *et al.*, 2001, 2004). Lo sviluppo di resistenza ai piretroidi sembra coinvolgere anche specie presenti nell'America del Sud, come *Phytoseiulus macropilis* (Banks), con possibili implicazioni di vasta portata (POLETTI & OMOTO, 2012).

La colonizzazione naturale dei vigneti e dei frutteti da parte dei Fitoseidi può richiedere tempi lunghi. Nel corso degli anni '80 sono state messe a punto delle tecniche di immissione di Fitoseidi che consentono una colonizzazione progressiva di ambienti soggetti a infestazioni di Tetranychidi ed Eriofidi (GIROLAMI, 1981). L'immissione di ceppi di Fitoseidi resistenti ai prodotti fitosanitari è opportuna nei vigneti inseriti in programmi di lotta obbligatoria per contenere la diffusione di dannose fitoplasmi (ad es. la Flavescenza dorata della vite). Il successo delle immissioni di ceppi di Fitoseidi resistenti ai prodotti fitosanitari può essere influenzato dai meccanismi di resistenza. La resistenza nei confronti degli esteri fosforici e dei piretroidi può essere di tipo metabolico, ad esempio modificare l'attività della monossigenasi P450, o *target site* ossia essere associata a modificazioni dell'acetilcolinesterasi (ANBER & OVERMEER, 1988; ANBER & OPPENOORTH, 1989; VAN de BAAN *et al.*, 1985; FITZGERALD & SOLOMON, 1999; SATO *et al.*, 2006, 2007). Si può affermare che gli studi condotti su questo argomento a livello molecolare siano piuttosto scarsi a differenza di quanto sviluppato per i Tetranychidi.

UN CASO DI STUDIO: LE BASI MOLECOLARI DELLA RESISTENZA A CHLORPYRIFOS IN *K. ABERRANS*

I meccanismi di resistenza a chlorpyrifos negli artropodi riguardano principalmente la modificazione strutturale della proteina bersaglio, l'acetilcolinesterasi (AChE), alla quale può affiancarsi l'aumento dell'attività metabolica detossificante delle esterasi (OAKESHOTT *et al.*, 2005; AIKI *et al.*, 2005; OH *et al.*, 2006; ALOUT *et al.*, 2007; KHAJEHALI *et al.*, 2007; ZANG *et al.*, 2013).

La riduzione della suscettibilità dell'acetilcolinesterasi al chlorpyrifos è dovuta a due mutazioni puntiformi non silenti ricorrenti nelle diverse specie, che portano alla sostituzione di una glicina o di una fenilalanina, la cui posizione è conservata evolutivamente, con un diverso amminoacido, variabile da specie a specie. La conseguenza è una riduzione dell'accessibilità degli esteri fosforici al sito catalitico dell'acetilcolinesterasi che diventa insensibile alla loro azione inibitoria. Tuttavia, all'insensibilità è associato un costo di *fitness*, imputabile alla diminuzione dell'affinità dell'enzima per il substrato

naturale, il neurotrasmettitore acetilcolina (OH *et al.*, 2006, KWON *et al.*, 2010a, 2012). Negli acari, le basi molecolari della resistenza di tipo *target site* specifica sono state caratterizzate solo nei Tetranychidi (*T. urticae* e *T. kanzawai*). In questa famiglia l'acetilcolinesterasi è codificata da un singolo gene e le mutazioni consistono nella sostituzione del residuo di glicina con una serina (G228S) o della fenilalanina con un triptofano (F439W) (AIKI *et al.*, 2005; KHAJEHALI *et al.*, 2010). In *T. urticae* la mutazione G228S è associabile a un moderato fattore di resistenza al chlorpyrifos, con un rapporto delle LD50 (RR₅₀) di circa 31 rispetto al ceppo di riferimento sensibile. La mutazione F439W è stata descritta in popolazioni di *T. urticae* e *T. kanzawai* con fattore di resistenza più elevato e variabile fra 78 e 586, suggerendo il contributo di ulteriori meccanismi, oltre a quello *target site*. L'entità della riduzione della sensibilità al chlorpyrifos descritta in alcune popolazioni di *K. aberrans* (RR₅₀ = 539,6 ÷ 145,6; TIRELLO *et al.*, 2012a) è compatibile con l'esistenza di un'acetilcolinesterasi modificata, insensibile all'insetticida. Per verificare quest'ipotesi si è proceduto al clonaggio in *K. aberrans* del gene AChE ortologo a quello in *T. urticae* e all'accertamento, per sequenziamento diretto, della presenza di mutazioni non silenti associate al fenotipo resistente (CASSANELLI *et al.*, in preparazione). Non essendo ancora note sequenze clonate nei Fitoseidi codificanti l'AChE, si è ricorso all'annotazione dei geni *in-silico* nel progetto genoma del fitoseide *M. occidentalis* (HOY, 2009). Sulla base della conservazione di domini funzionali tipici di questa classe enzimatica, nel genoma di *M. occidentalis* l'analisi bioinformatica ha predetto oltre una decina di geni potenzialmente codificanti acetilcolinesterasi. L'esame del trascrittoma in *M. occidentalis* conferma che almeno sette geni AChE sono attivamente trascritti (HOY *et al.*, 2013). Data la prossimità filogenetica dei due Fitoseidi è probabile che anche in *K. aberrans* più geni codifichino per l'AChE, come avviene anche per gli ectoparassiti ematofagi *R. microplus* e *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) (TEMEYER *et al.*, 2010; Vector base: assembly IscaW1.2). Esaminando i domini amminoacidici conservati nelle AChE annotate nel genoma di *M. occidentalis* simili all'AChE del *T. urticae*, è stata impostata la strategia di clonaggio del trascritto prodotto dal gene ortologo in *K. aberrans*. Il sequenziamento di questo trascritto in popolazioni sensibili (LE) e resistenti (PO) al chlorpyrifos in *K. aberrans* (TIRELLO *et al.*, 2012a) ha individuato una mutazione associata in omozigosi al fenotipo resistente, che comporta la sostituzione di un residuo di glicina con una serina in posizione 191 (G191S). Tale sostituzione è analoga a quella (G228S) riscontrata nella popolazione di *T. urticae* moderatamente resistente

al chlorpyrifos (KHAJEHALI *et al.*, 2010). Pur condividendo la medesima sostituzione amminoacidica, la popolazione resistente di *K. aberrans* mostra un fattore di resistenza di gran lunga superiore a quella resistente di *T. urticae* (RR₅₀ 539,6 vs. 31). E' probabile quindi che la mutazione G191S non sia l'unico determinante genetico del fenotipo resistente al chlorpyrifos in *K. aberrans*. Dopo il sequenziamento del trascritto in altre tre popolazioni resistenti e due sensibili di *K. aberrans* non correlate alle precedenti, né fra loro, la sostituzione G191S si è confermata associata in omozigosi al solo fenotipo resistente, rappresentandone di conseguenza, un affidabile marcatore molecolare. Non è da escludere che nei Fitoseidi, dove apparentemente sono presenti più geni per l'AChE, la resistenza bersaglio specifica ricalchi quella caratterizzata in *R. microplus*, dove il fenotipo resistente è dovuto sia a mutazioni puntiformi ripartite fra diversi geni AChE che all'amplificazione selettiva di alcuni loci (TEMEYER *et al.*, 2013). Del resto, l'amplificazione genica a partire da unico locus AChE è stata riscontrata anche in ceppi resistenti al chlorpyrifos in *T. urticae* (KWON *et al.*, 2010b). Tale soluzione evolutiva è probabilmente privilegiata, perché nei ceppi resistenti dotati di un genoma con multiloci per la proteina bersaglio, l'espressione di più acetilcolinesterasi, consentirebbe di alleggerire il costo di *fitness* associato a forme modificate dell'enzima, insensibili all'insetticida ma con una minore affinità per l'acetilcolina (KWON *et al.*, 2012). La coesistenza di acetilcolinesterasi normali e mutate, e la ripartizione di più mutazioni su diversi loci, consentirebbe di ottenere il miglior compromesso fra il pieno mantenimento della funzionalità neurologica e la necessità di contrastare la pressione selettiva esercitata dall'insetticida. I Fitoseidi, come *M. occidentalis* e *K. aberrans*, provvisti probabilmente di AChE multilocus, potrebbero adottare meccanismi simili. In effetti, nel progetto genoma di *M. occidentalis*, sono riscontrabili geni AChE, annotati *in silico*, con sequenza amminoacidica divergente rispetto a quella caratterizzata in *T. urticae*, ma più simili alle AChE clonate in *R. microplus*, di tipo 1 e 3. Nella zecca, mutazioni puntiformi di queste AChE, sono state associate alla ridotta sensibilità agli esteri fosforici (TEMEYER *et al.*, 2013). Confidando sull'elevata omologia di sequenza riscontrata fra l'acetilcolinesterasi clonata in questo studio e quella annotata nel progetto genoma di *M. occidentalis*, è in corso di svolgimento la caratterizzazione di ulteriori copie di acetilcolinesterasi nelle popolazioni resistenti di *K. aberrans*. In conclusione, la resistenza di tipo *target site* specifica agli esteri fosforici nei Fitoseidi, è apparentemente molto più articolata di quella riportata in *T. urticae*, dove è presente di norma, una sola copia

del gene AChE. La disponibilità del progetto genoma di *M. occidentalis* si è dimostrata una valida risorsa per risolvere questa complessità e probabilmente lo sarà anche per lo studio dei meccanismi ausiliari di resistenza al clorpyrifos in *K. aberrans*, quali l'incremento d'espressione di esterasi. Il trascritto isolato in *K. aberrans* è la prima sequenza AChE completa, caratterizzata in vivo e non solo *in silico*, nei Fitoseidi. Una mutazione che comporta la sostituzione G191S in questa AChE, appare fortemente associata alla resistenza al clorpyrifos. Dato che la ridotta suscettibilità all'insetticida rappresenta una caratteristica desiderabile nel predatore, la disponibilità di un suo marcatore molecolare potrà trovare diversi utilizzi. Ad esempio, per tracciare il fenotipo resistente durante la selezione di laboratorio e per verificarne la stabilità in condizioni di campo, quando diverse pressioni selettive o condizioni ambientali potrebbero far emergere costi di *fitness*. Oppure, il marcatore potrà essere impiegato nei programmi di miglioramento genetico del predatore tramite introgressione di ulteriori caratteristiche fenotipiche utili, quali la resistenza ad altri principi attivi o legati al miglioramento della *fitness*, ricorrendo all'incrocio con nuovi ceppi preselezionati in laboratorio o selvaggi. Alternativamente, la mutazione consentirà di seguire il destino della popolazione resistente una volta rilasciata in campo per studi ecologici o di lotta biologica in presenza di popolazioni autoctone che potrebbero "diluire" il fenotipo migliorato.

RIASSUNTO

La diffusione di popolazioni di acari fitofagi resistenti ai prodotti fitosanitari e la tossicità di questi ultimi nei confronti degli acari predatori sono considerate le principali cause scatenanti le pullulazioni dei Tetranychidi. A *Tetranychus urticae* spetta il primato per quanto riguarda il numero di sostanze attive coinvolte in casi di resistenza. La ricerca si è interessata sia alla comparsa e diffusione della resistenza sia allo studio dei meccanismi e delle basi genetiche della resistenza. Un'indagine svolta in Italia ha evidenziato le principali problematiche legate alla resistenza in *T. urticae*. Le strategie anti-resistenza sono basate sulla rotazione e sull'alternanza di sostanze attive a differente modalità di azione ma anche sulla salvaguardia degli antagonisti naturali degli acari fitofagi, in particolare dei Fitoseidi. Sono state messe a punto procedure per la valutazione degli effetti collaterali dei prodotti fitosanitari su numerose specie di Fitoseidi. La resistenza ai prodotti fitosanitari negli acari Fitoseidi è stata oggetto di ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

AIKI Y., KOZAKI T., MIZUNO H., KONO Y., 2005 – *Amino acid substitution in Ace paralogous acetylcholinesterase accompanied by organophosphate resistance in the spider mite Tetranychus kanzawai*. - Pestic. Biochem. Physiol., 82: 154-161.

AHMAD S., 2013 – *The impact of pesticides on apple mite communities*. Doctoral Thesis, Doctoral School of Crop Sciences, University of Padua.

ALOUT H., BERTHOMIEU A., CUI F., TAN Y., BERTICAT C., QIAO C., WEILL M., 2007 – *Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in Culex vishnui and Culex tritaeniorhynchus (Diptera: Culicidae) mosquitoes from China*. - J. Med. Entomol., 44: 463-469.

ANBER H. A. I., OVERMEER W. P. J., 1988 – *Resistance to organophosphates and carbamates in the predacious mite Amblyseius potentillae (Garman) due to insensitive acetylcholinesterase*. - Pestic. Biochem. Physiol., 31: 91-98.

ANBER H.A.I., OPPENOORTH F.J., 1989 – *A mutant esterase degrading organophosphates in a resistant strain of the predacious mite Amblyseius potentillae (Garman)*. - Pestic. Biochem. Physiol., 33: 283-297.

ANGELI G., IORIATTI C., FORTI D., MAINES R., 1994 – *Valutazione della sensibilità a clofentezina di 4 ceppi di Panonychus ulmi Koch (Piemonte, Trentino-Alto Adige)*. - Inf. Fitopat., 44: 38-41.

ASAHARA M., UESUGI R., OSAKABE M.H., 2008 – *Linkage between one of the polygenic hexythiazox resistance genes and an etoxazole resistance gene in the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae)*. J. Econ. Entomol., 101: 1704-1710.

AUGER P., BONAFOS R., KREITER S., 2004 – *Mancozeb resistance patterns among Kampimodromus aberrans and Typhlodromus pyri strains from French vineyards*. - Can. Entomol., 136: 663-673.

AY R., KARA F.E., 2011 – *Toxicity, inheritance and biochemistry of clofentezina resistance in Tetranychus urticae*. Insect Sci., 18: 503-511.

BEERS E.H., MARTINEZ-ROCHA L., TALLEY R.R., DUNLEY J.E., 2009 – *Lethal, sublethal, and behavioral effects of sulfur-containing products in bioassays of three species of orchard mites*. - J. Econ. Entomol., 102: 324-335.

BEERS E.H., RIEDL H., DUNLEY J.E., 1998 – *Resistance to abamectin and reversion to susceptibility to fenbutatin oxide in spider mite (Acari: Tetranychidae) populations in the Pacific Northwest*. - J. Econ. Entomol., 91: 352 - 360.

BERLESE A., 1886 – *Acari dannosi alle piante coltivate*. Premiata Tipografia Sacchetto, Padova, pp. 31.

BERLESE A., 1901 – *Gli acari agrari*. - Riv. Pat. veg. VIII: 227-294.

BIONDI A., MOMMAERTS V., SMAGGHE G., VINUELA E., ZAPPALA L., DESNEUX N., 2012 – *The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods*. - Pest. Manag. Sci., 68: 1523-1536.

BLACK B.C., HOLLINGWORTH R.M., AHAMMADSAHIB K.I., KUKEL C.D., DONOVAN S., 1994 – *Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC303,630 and related halogenated pyrroles*. - Pestic. Biochem. Physiol., 50: 115-128.

BONAFOS R., SERRANO E., AUGER P., KREITER S., 2007 – *Resistance to deltamethrin, lambda-cyhalothrin and chlorpyrifos-ethyl in some populations of Typhlodromus pyri Scheuten and Amblyseius andersoni (Chant) (Acari: Phytoseiidae) from vineyards in the south-west of France*. - Crop. Prot., 26: 169-172.

BOSTANIAN N. J., THISTLEWOOD H. A., HARDMAN J. M., LAURIN M. C., RACETTE G., 2009 – *Effect of seven new orchard pesticides on Galendromus occidentalis in laboratory studies*. - Pest. Manag. Sci., 65: 635-639.

BRETSCHNEIDER T., FISCHER R., NAUEN R., 2007 – *Inhibitors of lipid synthesis: acetyl-CoA-carboxylase*

- inhibitors*. In: Modern Crop Protection Compounds, Krämer W., Schirmer U. Ed., Wiley-WCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, pp. 909 - 925.
- BRIOSI G., 1876 - *Sulla Phytoptosi della vite* (Phytoptus vitis Landois). - Ann. Vitic. Enol. It., X: 23-39.
- CANESTRINI G., 1892 - *Prospetto dell'acarofauna italiana. Famiglia dei Phytoptini*. Atti Soc. Ven. Trent. Sci. Nat., Ser. II, 1: 543-557.
- CANESTRINI G., FANZAGO F., 1876 - *Nuovi acari italiani (seconda serie)*. Atti Soc. Ven. Trent. Sci. Nat., 5: 130-142.
- CANESTRINI G., FANZAGO F., 1877 - *Intorno agli acari italiani*. Atti R. Ist. Ven. Scienze Lettere Arti, ser. V, IV: 69-208.
- CANESTRINI R., 1890 - *Prospetto dell'acarofauna italiana. Famiglia dei Tetranychini*. Atti R. Ist. Ven. Trent., ser. IV, VII: 491-537.
- CASTAGNOLI M., LIGUORI M., SIMONI S., DUSO C., 2005 - *Toxicity of some insecticides to Tetranychus urticae, Neoseiulus californicus and Tydeus californicus*. - Biocontrol, 50: 611-622.
- CASTAGNOLI M., SIMONI S., 1999 - *Effect of long-term feeding history on functional and numerical response of Neoseiulus californicus (Acari: Phytoseiidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 23: 217-234.
- CHEN Y., OPIT G. P., JONAS V. M., WILLIAMS K. A., NECHOLS J. R., MARGOLIES D. C., 2007 - *Twospotted spider mite population level, distribution, and damage on ivy geranium in response to different nitrogen and phosphorus fertilization regimes*. - J. Econ. Entomol., 100: 1821-1830.
- CHOW A., CHAU A., HEINZ K. M., 2009 - *Reducing fertilization for cut roses: effect on crop productivity and twospotted spider mite abundance, distribution, and management*. - J. Econ. Entomol., 102: 1896-1907.
- COHEN E., 2006 - *Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods*. - Pestic. Biochem. Phys. 85: 21-27.
- CRANHAM J.E., HELLE W., 1985 - *Pesticide resistance in Tetranychidae*. In: Spider Mites: Their Biology, vol. 1, Natural Enemies and Control, Helle W. & Sabelis M.W. Ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 405-421.
- CROFT B.A., 1990 - *Arthropod biological control agents and pesticides*. Wiley, N. Y., pp 723.
- CUBONI G., 1891 - *Il rossore della vite e il Tetranychus telarius L.* - Boll. Soc. gen. Vitic. It., 21: 492-495.
- DEMAEGHT P., DERMAUW W., TSAKIRELI D., KHAJEHALI J., NAUEN R., TIRRY L., VONTAS J., LÜMMEN P., VAN LEEUWEN T., 2013 - *Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetroneic acids in Tetranychus urticae: CYP392E10 metabolizes spirodiclofen, but not its corresponding enol*. - Insect Biochem. Mol. Biol., <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.007>.
- DENNEHY T.J., FARNHAM A.W., DENHOLM I., 1993 - *The microimmersion bioassay: a novel method for topical application of pesticides to spider mites*. - Pestic. Sci., 39: 47-54.
- DERMAUW W., ILIAS A., RIGA M., TSAGKARAKOU A., GRBI M., TIRRY L., VAN LEEUWEN T., VONTAS J., 2012 - *The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of Tetranychus urticae: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 42:455-465.
- DERMAUW W., WYBOUW N., ROMBAUTS S., MENTEND B., VONTAS J., GRBI M., CLARK M.R., FEYEREISEN R., VAN LEEUWEN T., 2013 - *A link between host plant adaptation and pesticide resistance in the polyphagous spider mite Tetranychus urticae*. - Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 110: E113-E122.
- DUSO C., CAMPORESE P., VAN DER GEEST L.P.S., 1992 - *Toxicity of a number of pesticides to strains of Typhlodromus pyri and Amblyseius andersoni (Acari: Phytoseiidae)*. - Entomophaga 37: 363-372.
- DUSO C., FANTI M., POZZEBON A., ANGELI G., 2009 - *Is the predatory mite Kampimodromus aberrans a candidate for the control of phytophagous mites in European apple orchards?* - Biocontrol, 54: 369-382.
- DUSO C., MALAGNINI V., POZZEBON A., BUZZETTI F.M., TIRELLO P., 2008 - *A method to assess the effects of pesticides on the predatory mite Phytoseiulus persimilis (Acari Phytoseiidae) in the laboratory*. - Biocontrol Sci. Technol., 18: 1027-1040.
- FERGUSON-KOLMES L.A., SCOTT J.G., DENNEHY T.J., 1991 - *Dicofol resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and pharmacokinetics*. - J. Econ. Entomol., 84: 41-48.
- FITZGERALD J.D., SOLOMON M.G., 1999 - *The predatory mite Typhlodromus pyri: biological characteristics and resistance to insecticides in different mite strains*. - IOBC/WPRS Bull., 22(6): 161-167.
- FUNAYAMA K., TAKAHASHI Y., 1995 - *Resistance to fenpyroximate and pyridaben in two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) in southern Akita Prefecture*. - Bull. Akita Fruit Tree Exp. Sta., 25:19-30.
- GASSER R., 1956 - *Il problema degli acari in frutticoltura, viticoltura e floricoltura*. - Boll. Zool. agr. Bachic., XXII: 81-142.
- GEORGHIOU G.P., LAGUNES-TEJEDA A., 1991 - *The occurrence of resistance to pesticides in arthropods; an index of cases reported through 1989*. FAO, Rome, Italy.
- GIROLAMI V., 1981 - *Danni, soglie di intervento, controllo degli acari della vite*. Atti "III incontro su la difesa integrata della vite," Latina, 3-4 dicembre 1981, Regione Lazio, pp. 111-143.
- GIROLAMI V., PAVAN F., ZANDIGIACOMO P., 1991 - *La fillossera della vite ed altri fitofagi della vite in Friuli e regioni limitrofe nell'ultimo secolo*. - Cong. Int. "Gorizia 1891-1991: cento anni di enologia e di viticoltura", Gorizia, 28.11-1.12.1991, 1- 27.
- GRBI M., VAN LEEUWEN T., CLARK R.M., ROMBAUTS S., ROUZÉ P., GRBI V., OSBORNE E.J., DERMAUW W., NGOC P.C., ORTEGO F., HERNÁNDEZ-CRESPO P., DIAZ I., MARTINEZ M., NAVAJAS M., SUCENA É, MAGALHÃES S., NAGY L., PACE R.M., DJURANOVI S., SMAGGHE G., IGA M., CHRISTIAENS O., VEENSTRA J.A., EWER J., VILLALOBOS R.M., HUTTER J.L., HUDSON S.D., VELEZ M., YI S.V., ZENG J., PIRES-DA SILVA A., ROCH F., CAZAUX M., NAVARRO M., ZHUROV V., ACEVEDO G., BJELICA A., FAWCETT J.A., BONNET E., MARTENS C., BAELE G., WISSLER L., SANCHEZ-RODRIGUEZ A., TIRRY L., BLAIS C., DEMEESTERE K., HENZ S.R., GREGORY T.R., MATHIEU J., VERDON L., FARINELLI L., SCHMUTZ J., LINDQUIST E., FEYEREISEN R., VAN DE PEER Y., 2011 - *The genome of Tetranychus urticae reveals herbivorous pest adaptations*. - Nature, 479: 487- 492.
- GRUYS P., 1982 - *Hits and misses. The ecological approach to pest control in orchards*. - Ent. Exp. Appl. 31: 70-87.
- HASSAN S. A., BIGLER F., BOGENSCHUTZ H., BOLLER E., BRUN J., CALIS J. N. M., COREMANSPELSENEER J., DUSO C., GROVE A., HEIMBACH U., HELYER N., HOKKANEN H., LEWIS G. B., MANSOUR F., MORETH L., POLGAR L., SAMSOEPETERSEN L., SAUPHANOR B., STAUBLI A., STERK G., VAINIO A., VANDEVEIRE M., VIGGIANI G., VOGT H.

- 1994 – *Results of the 6th joint pesticide testing program of the IOBC/WPRS Working group “Pesticides and beneficial organisms”*. - Entomophaga, 39: 107-119.
- HERRON G.A., EDGE V.E., ROPHAIL J., 1994 – *The influence of fenbutatin oxide use on organotin resistance in two-spotted mite Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 18: 753-755.
- HERRON G.A., EDGE V.E., WILSON L.J., ROPHAIL J., 1998 – *Organophosphate resistance in spider mites (Acari: Tetranychidae) from cotton in Australia*. - Exp. Appl. Acarol., 22: 17-30.
- HERRON G.A., LEARMONTH S.E., ROPHAIL J., BARCHIA I., 1997 – *Clofentezine and fenbutatin oxide resistance in the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) from deciduous fruit tree orchards in Western Australia*. - Exp. Appl. Acarol., 21: 163-169.
- HERRON G.A., ROPHAIL J., 1993 – *Effect of clofentezine-hexythiazox resistance on life-table attributes of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 17: 823-830.
- HERRON G.A., ROPHAIL J., 1998 – *Tebufenpyrad (Pyranica®) resistance detected in two-spotted spider mite Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) from apples in Western Australia*. - Exp. Appl. Acarol., 22: 633-641.
- HERRON G.A., ROPHAIL J., 2003 – *First detection of chlorfenapyr (Secure®) resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) from nectarines in an Australian orchard*. - Exp. Appl. Acarol., 31: 131-134.
- HIRAGAKI S., KOBAYASHI T., OCHIAI N., TOSHIMA K., DEKEYSER M.A., MATSUDA K., TAKEDA M., 2012 – *A novel action of highly specific acaricide; bifenazate as a synergist for a GABA-gated chloride channel of Tetranychus urticae [Acari: Tetranychidae]*. - Neurotoxicology, 33: 307-313.
- HOY M.A., 2009 – *The predatory mite Metaseiulus occidentalis: mitey small and mitey large genomes*. - Bioessays, 31: 581-90.
- HOY M.A., 2011 – *Agricultural Acarology: Introduction to Integrated Mite Management*. CRC Press Taylor and Francis Group, pp 430.
- HOY M.A., YU F., MEYER J.M., TARAZONA O.A., JEYAPRAKASH A., WU K., 2013 – *Transcriptome sequencing and annotation of the predatory mite Metaseiulus occidentalis (Acari: Phytoseiidae): a cautionary tale about possible contamination by prey sequences*. - Exp. Appl. Acarol., 59: 283-296.
- IVANCICH GAMBARO P., 1975 – *Selezione di popolazioni di Acari predatori resistenti ad alcuni insetticidi fosforati-organici*. - Inf. Fitopat., 7: 21-25.
- KASAP I., 2005 – *Life-history traits of the predaceous mite Kampimodromus aberrans (Oudemans) (Acarina : Phytoseiidae) on four different types of food*. - Biol. Control, 35: 40-45.
- KHAJEHALI J., VAN LEEUWEN T., GRISPOU M., MOROU E., ALOUT H., WEILL M., TIRRY L., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., 2010 – *Acetylcholinesterase point mutations in European strains of Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates*. - Pest Manag. Sci., 66: 220-228.
- KHAJEHALI J., VAN NIEUWENHUYSE P., DEMAEGHT P., TIRRY L., VAN LEEUWEN T., 2011 – *Acaricide resistance and resistance mechanisms in Tetranychus urticae populations from rose greenhouses in the Netherlands*. - Pest. Manag. Sci., 67:1424-1433.
- KIM M., SHIN D., SUH E., CHO K., 2004 – *An assessment of the chronic toxicity of fenpyroximate and pyridaben to Tetranychus urticae using a demographic bioassay*. Appl. Entomol. Zool., 39: 401-409.
- KIM Y.-J., LEE S.-W., CHO J.-R., PARK H.-M., AHN Y.-J., 2007 – *Multiple Resistance and Biochemical Mechanisms of Dicofol Resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - J Asia-Pacific Entomol, 10: 165-170.
- KNOWLES C.O., 1997 – *Mechanisms of resistance to acaricides*. In: Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals, Sjut V. Ed., Springer, New York, pp. 57-77.
- KOBAYASHI M., KOBAYASHI S., NISHIMORI T. 2001 – *Occurrence of etoxazole resistance individuals of the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae Koch from a limited region*. - Japanese Journal of App. Entomol. Zool., 45: 83-88.
- KWON D.H., CLARK J.M., LEE S.H., 2010a – *Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite*. - Insect Mol. Biol., 19: 195-204.
- KWON D.H., IM J.S., AHN J.J., LEE J.H., CLARK J.M., LEE S.H., 2010b – *Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite*. - Pestic. Biochem. Physiol., 96: 36-42.
- KWON D.H., CHOI J.Y., JE Y.H., LEE S.H., 2012 – *The overexpression of acetylcholinesterase compensates for the reduced catalytic activity caused by resistance-conferring mutations in Tetranychus urticae*. - Insect Biochem Mol Biol 42, 212-219.
- LEE S.Y., AHN K.S., KIM C.S., SHIN S.C., KIM G.H., 2004 – *Inheritance and stability of etoxazole resistance in twospotted spider mite, Tetranychus urticae, and its cross resistance*. - Korean J. Appl. Entomol., 43: 43-48.
- LEFEBVRE M., BOSTANIAN N. J., MAUFFETTE Y., RACETTE G., Thistlewood H. A, Hardman J. M., 2012 – *Laboratory-based toxicological assessments of new insecticides on mortality and fecundity of Neoseiulus fallacis (Acari: Phytoseiidae)*. - J. Econ. Entomol., 105: 866-871.
- LORENZON M., POZZEBON A., DUSO C., 2012 – *Effects of potential food sources on biological and demographic parameters of the predatory mites Kampimodromus aberrans, Typhlodromus pyri and Amblyseius andersoni*. - Exp. Appl. Acarol., 58: 259-278.
- LUNARDONI A., 1890 – *Gli insetti nocivi alla vite. Loro vita, danni e modi per combatterli*. Tipografia Eredi Botta, Roma, pp. 83.
- MARCIC D., OGURLIC I., MUTAVDZIC S., PERIC P., 2010 – *The effects of spiromesifen on life history traits and population growth of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 50: 255-267.
- MOCHIZUKI M., 1997 – *Permethrin resistance and stability in the predatory mite, Amblyseius womersleyi Schicha (Acari: Phytoseiidae)*. - Japanese Journal of App. Entomol. Zool., 41: 1-5.
- NAUEN R., STUMPF N., ELBERT A., ZEBITZ C.P.W., KRAUS W., 2001 – *Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of Tetranychus urticae and Panonychus ulmi (Acari: Tetranychidae)*. - Pest Manag. Sci., 57: 253-261.
- NAUEN R., STUMPF N., ELBERT A., ZEBITZ C.P.W., KRAUS W., 2001 – *Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of Tetranychus urticae and Panonychus ulmi (Acari: Tetranychidae)*. - Pest. Manage. Sci., 57: 253-261.
- NUCIFORA A., INSERRA R., 1967 – *Il Panonychus ulmi (Koch) nei vigneti dell'Etna*. Entomologica, 3: 177-236.

- OAKESHOTT J.G., DEVONSHIRE A.L., CLAUDIANOS C., SUTHERLAND T.D., HORNE I., CAMPBELL P.M., OLLIS D.L., RUSSELL R.J., 2005 - *Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases*. - Chem. Bio. Interact., 157: 269-275.
- OH T.S., KOZAKI H., MIZUNO H., TOMITA T., KONO Y., 2006 - *Expression of Ace-paralogous acetylcholinesterase of Culex tritaeniorhynchus with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system*. Pestic. Biochem. Physiol., 85: 46-51.
- OPIT G. P., CHEN Y., WILLIAMS K. A., NECHOLS J. R., MARGOLIES D. C., 2005 - *Plant age, fertilization, and biological control affect damage caused by twospotted spider mites on ivy geranium: Development of an action threshold*. - J. Am. Soc. Hortic. Sci., 130: 159-166.
- OVERMEER W.P.J., VAN ZON A.Q., 1983 - *Resistance to parathion in the predaceous mite Typhlodromus pyri Scheuten (Acarina: Phytoseiidae)*. - Meded. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent., 48: 247-251.
- OZMAN-SULLIVAN S. K., 2006 - *Life history of Kampimodromus aberrans as a predator of Phytoptus avellanae (Acari: Phytoseiidae, Phytoptidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 38: 15-23.
- PINOLINI D., 1896 - *Gli insetti dannosi alla vite*. Tipografia Novarese, Novara, pp. 254.
- POLETTI M., MAIA A. H. N., OMOTO C., 2007 - *Toxicity of neonicotinoid insecticides to Neoseiulus californicus and Phytoseiulus macropilis (Acari: Phytoseiidae) and their impact on functional response to Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - Biol. Control, 40: 30-36.
- POLETTI M., OMOTO C., 2012 - *Susceptibility to deltamethrin in the predatory mites Neoseiulus californicus and Phytoseiulus macropilis (Acari: Phytoseiidae) populations in protected ornamental crops in Brazil*. - Exp. Appl. Acarol., 58: 385-393.
- POZZEBON A., BORGO M., DUSO C., 2010 - *The effects of fungicides on non-target mites can be mediated by plant pathogens*. - Chemosphere, 79: 8-17.
- POZZEBON A., DUSO C., TIRELLO P., ORTIZ P. B., 2011 - *Toxicity of thiamethoxam to Tetranychus urticae Koch and Phytoseiulus persimilis Athias-Henriot (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) through different routes of exposure*. - Pest. Manag. Sci., 67: 352-359.
- PREE D.J., BITTNER L.A., WHITTY K. J., 2002 - *Characterization of resistance to clofentezine in populations of European red mite from orchards in Ontario*. - Exp. Appl. Acarol., 27: 181-193.
- RAUCH N., NAUEN R., 2003 - *Spirodiclofen resistance risk assessment in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach*. - Pest. Biochem. Physiol., 74: 91-101.
- RHODES E. M., LIBURD O. E., KELTS C., RONDON S. I., FRANCIS R. R., 2006 - *Comparison of single and combination treatments of Phytoseiulus persimilis, Neoseiulus californicus, and Acramite (bifenazate) for control of twospotted spider mites in strawberries*. - Exp. Appl. Acarol., 39: 213-225.
- RIBAGA C., 1904 - *Gamasidi planticoli*. - Riv. Pat. veg., 10: 175-178.
- ROSSI E., CONTI B., 1997 - *Valutazione della risposta ad alcuni acaricidi e insetticidi in ceppi di Tetranychus urticae Koch (Acarina: Tetranychidae) e del suo predatore Phytoseiulus persimilis Athias-Henriot (Acarina: Phytoseiidae)*. - Frustula Entomol., 20: 168-177.
- ROTA P., 1962 - *Osservazioni sugli Acari Tetranychidi dannosi alle piante coltivate e ornamentali in Italia*. - Boll. zool. agr. Bachic., 4: 31-136.
- RUI D., 1952 - *La difesa fitopatologica di attualità della vite*. - Riv. Vitic. Enol. V: 39-51.
- SATO M.E., MIYATA T., KAWAI A., NAKANO O., 2001 - *Methidathion resistance mechanisms in Amblyseius womersleyi Schicha (Acari: Phytoseiidae)*. - Pest. Biochem. Physiol., 69: 1-12.
- SATO M.E., TANAKA T., MIYATA T., 2006 - *Monoxygenase activity in methidathion resistant and susceptible populations of Amblyseius womersleyi (Acari: Phytoseiidae)*. - Exp. Appl. Acarol., 39: 13-24.
- SATO M.E., TANAKA T., MIYATA T., 2007 - *A cytochrome P450 gene involved in methidathion resistance in Amblyseius womersleyi Schicha (Acari: Phytoseiidae)*. - Pestic. Biochem. Physiol., 88: 337-345.
- SCHAUSBERGER P., WALZER A., 2001 - *Combined versus single species release of predaceous mites: predator-predator interactions and pest suppression*. - Biol. Control, 20: 269-278.
- STARK J. D., BANKS J. E., 2003 - *Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods*. - Annu. Rev. Entomol., 48: 505-519.
- STAVRINIDES M. C., MILLS N. J., 2009 - *Demographic effects of pesticides on biological control of Pacific spider mite (Tetranychus pacificus) by the western predatory mite (Galendromus occidentalis)*. - Biol. Control, 48: 267-273.
- STAVRINIDES M.C., HADJISTYLLI M., 2009 - *Two-spotted spider mite in Cyprus: ineffective acaricides, causes and considerations*. - J. Pest Sci 82: 123-128.
- STUMPF N., NAUEN R., 2001 - *Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - J. Econ. Entomol., 94: 1577-1583.
- STUMPF N., NAUEN R., 2001 - *Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - J. Econ. Entomol., 94: 1577-1583.
- STUMPF N., NAUEN R., 2002 - *Biochemical markers linked to abamectin resistance in Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - Pestic. Biochem. Physiol., 72: 111-121.
- TARGIONI-TOZZETTI A., 1870 - *La erinosi della vite e suoi acari (Phytoptus vitis Landois)*. - Bull. Soc. Ent. It., II: 283-287.
- TARGIONI-TOZZETTI A., 1876 - *Relazione intorno ai lavori della Stazione di Entomologia agraria per l'anno 1875*. - Ann. Min. Agric. Ind. Comm., 84: 19-108.
- TEMEYER K.B., OLAFSON P.U., BRAKE D.K., TUCKOW A.P., LI A.Y., PÉREZ DE LEÓN A.A., 2010 - *Acetylcholinesterase of Rhipicephalus (Boophilus) microplus and Phlebotomus papatasi: Gene identification, expression, and biochemical properties of recombinant proteins*. - Pestic. Biochem. Physiol. in press.
- TEMEYER K.B., PRUETT J.H., OLAFSON P.U., 2010 - *Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAcChE1, rBmAcChE2, and rBmAcChE3 of Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. - Vet. Parasitol., 172: 114-121.
- TIRELLO P., POZZEBON A., DUSO C., 2012a - *Resistance to chlorpyrifos in the predatory mite Kampimodromus aberrans*. - Exp. Appl. Acarol., 56: 1-8.
- TIRELLO P., POZZEBON A., CASSANELLI S., VAN LEEUWEN T., DUSO C., 2012b - *Resistance to acaricides in Italian strains of Tetranychus urticae: toxicological and enzymatic assays*. - Exp. Appl. Acarol., 57: 53-64.
- TOMLIN C., 2003 - *The pesticide manual, 13th edn*. Crop Protection Publications, British Crop Protection Council, XXVI + 1344 pp.

- TSAGKARAKOU A., VAN LEEUWEN T., KHAJEHALI J., ILIAS A., GRISPOU M., WILLIAMSON M. S., TIRRY L., VONTAS J., 2009 – *Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae)*. - *Insect Mol. Biol.*, 18: 583-593.
- UESUGI R., GOKA K., OSAKABE M.H., 2002 – *Genetic basis of resistances to chlorfenapyr and etoxazole in the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae)*. - *J. Econ. Entomol.*, 95: 1267-1274.
- URBANEJA A., PASCUAL-RUIZ S., PINA T., ABAD-MOYANO R., VANACLOCHA P., MONTON H., DEMBILIO O., CASTANERA P., JACAS J. A., 2008 – *Efficacy of five selected acaricides against Tetranychus urticae (Acari: tetranychidae) and their side effects on relevant natural enemies occurring in citrus orchards*. - *Pest. Manag. Sci.*, 64: 834-842.
- VAN DE BAAN H.E., KUIJPERS L.A.M., OVERMEER W.P.J., OPPENOORTH F.J., 1985 – *Organophosphorous and carbamate resistance in the predacious mite Typhlodromus pyri due to insensitive acetylcholinesterase*. - *Exp. Appl. Acarol.* 1: 3-10.
- VAN DE VRIE, M., MCMURTRY J.A., HUFFAKER C.B., 1972. – *Ecology of Tetranychid mites and their natural enemies: a review. III. Biology, ecology and pest status and host-plant relations of tetranychids*. - *Hilgardia* 41: 343-432.
- VAN LEEUWEN T., DEMAEGHT P., OSBORNE E.J., DERMAUW W., GOHLKE S., NAUEN R., GRBI M., TIRRY L., MERZENDORFER H., CLARK R.M., 2012 – *Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods*. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109: 4407-4412.
- VAN LEEUWEN T., TIRRY L., 2007 – *Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, Tetranychus urticae*. - *Pest Manag. Sci.*, 63: 150-156.
- VAN LEEUWEN T., TIRRY L., NAUEN R., 2006a – *Complete maternal inheritance of bifenthrin resistance in Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations*.- *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 869-877.
- VAN LEEUWEN T., VAN NIEUWENHUYSE P., VANHOLME B., DERMAUW W., NAUEN R., TIRRY L., 2011 – *Parallel evolution of cytochrome b mediated bifenthrin resistance in the citrus red mite Panonychus citri*. - *Insect Mol. Biol.*, 20: 135-140.
- VAN LEEUWEN T., VAN POTTELBERGE S., TIRRY L., 2006b – *Biochemical analysis of a chlorfenapyr selected resistant strain of Tetranychus urticae Koch*. - *Pest. Manag. Sci.*, 62: 425-433.
- VAN LEEUWEN T., VANHOLME B., VAN POTTELBERGE S., VAN NIEUWENHUYSE P., NAUEN R., TIRRY L., DENHOLM I., 2008 – *Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action*.- *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 5980-5985.
- VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., DERMAUW W., TIRRY L., 2010 – *Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: A review*. - *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 40: 563-572.
- VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., DERMAUW W., TIRRY L., 2010 – *Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and other important Acari: a review*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40: 563-572.
- VAN LEEUWEN T., VONTAS J., TSAGKARAKOU A., TIRRY L., 2009 – *Mechanisms of acaricide resistance in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae*. In: *Biorational Control of Arthropd Pests*, Ishaaya I. & Horowitz A.R. Ed., Springer, The Netherlands, pp 347-393
- VAN NIEUWENHUYSE P., DEMAEGHT P., DERMAUW W., KHALIGHI M., STEVENS C.V., VANHOLME B., TIRRY L., LÜMMEN P., VAN LEEUWEN T., 2012 – *On the mode of action of bifenthrin: New evidence for a mitochondrial target site*. - *Pestic. Biochem. Phys.*, 104: 88-95.
- VAN NIEUWENHUYSE P., VAN LEEUWEN T., KHAJEHALI J., VANHOLME B., TIRRY L., 2009 – *Mutations in the mitochondrial cytochrome b of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenthrin and acequinocyl*. - *Pest Manag. Sci.*, 65: 404-412.
- VAN POTTELBERGE S., VAN LEEUWEN T., KHAJEHALI J., TIRRY L., 2009 – *Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spiroticlofen-resistant strain of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae)*. - *Pest Manag. Sci.*, 65: 358-366.
- VAN POTTELBERGE S., VAN LEEUWEN T., VAN AMERMAET K., TIRRY L., 2008b – *Induction of cytochrome P450 monooxygenase activity in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae and its influence on acaricide toxicity*. - *Pest Biochem. Physiol.*, 91: 128-133.
- Vector base: assembly <https://www.vectorbase.org/organisms/ixodes-scapularis>
- VIDAL C., KREITER S., 1995 – *Resistance to a range of insecticides in the predaceous mite Typhlodromus pyri (Acari: Phytoseiidae): inheritance and physiological mechanisms*. - *J. Econ. Entomol.*, 88: 1097-1105.
- WERMELINGER B., OERTLI J. J., DELUCCHI V., 1985 – *Effect of host plant nitrogen-fertilization on the biology of the 2-spotted spider-mite, Tetranychus urticae*. - *Entomol. Exp. Appl.*, 38: 23-28.
- WHALON M. E., MOTA-SANCHEZ D., HOLLINGWORTH R.M., GUTIERREZ R., 2013 – *Arthropod Pesticide Resistance Database 2012*. www.pesticideresistance.org.
- ZANGHERI S., MASUTTI L., 1962 – *Osservazioni e considerazioni sul problema degli acari della vite nelle Venezie*. - *Riv. Vitic. Enol.*, XV: 1-16.
- ZHANG Y., LIA S., LU X., GUO H.F., WANG L. , ZI J., HE P., FANG J., 2013 – *Overexpression of carboxylesterase-1 and mutation (F439H) of acetylcholinesterase-1 are associated with chlorpyrifos resistance in Laodelphax striatellus*. - *Pestic. Biochem. Physiol.* (in press).

RUOLO DELLE COLINESTERASI NELLA RESISTENZA AGLI INSETTICIDI

VINCENZO NICOLA TALESA (*) - CINZIA ANTOGNETTI (*) - LETIZIA MEZZASOMA (*)

(*) *Università degli Studi di Perugia - Dipartimento di Medicina sperimentale - Sezione di biologia cellulare e molecolare; Sant'Andrea delle Fratte 06132, Perugia; e-mail: talesa@unipg.it; cinzia.antognelli@unipg.it; lmezzaso@unipg.it*
Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

Role of cholinesterases in insecticides resistance

The modern agriculture has received an important advantage from the growing availability of chemical compounds acting as insecticides (e.g., organophosphates, carbamates, pyrethroids). Nevertheless, the intensive use of such insecticides gave rise to the appearance of a number of resistant species where the presence of changes in their enzymatic activities made them less sensitive to the toxicity of the commonly used insecticides. Therefore, the continuous research of new molecules to be employed to this aim is urgently required. In general, insecticides resistance represents a significant example of natural selection and occurs through different mechanisms. Insecticide resistance to organophosphates and carbamates, for instance, can be the result of changes in acetylcholinesterase (AChE) activity, the enzyme present both at cholinergic synapses and neuromuscular junctions of either some Invertebrates and Vertebrates, conferred by the related gene mutations. Detection of AChE altered insecticide-target site mutation is important in guiding informed decisions for resistance management.

KEY WORDS: Cholinesterases, Acetylcholinesterases, Insects, Resistance, Insecticides.

La moderna agricoltura ha ricavato un notevole vantaggio dalla crescente disponibilità di composti chimici con attività insetticida. Tuttavia, il loro uso intensivo ha dato luogo alla comparsa di varie specie resistenti in cui la presenza di modificazioni enzimatiche li rende meno sensibili all'azione tossica dei vari insetticidi utilizzati, richiedendo così la continua ricerca di nuove molecole da utilizzare a questo scopo. Nel suo complesso la resistenza agli insetticidi rappresenta un importante esempio di selezione naturale realizzata mediante l'instaurarsi di meccanismi che portano alla diminuzione della dose effettiva di insetticida con cui gli insetti si trovano ad interagire. Questo risultato può realizzarsi mediante:

- (i) riduzione della penetrazione dell'insetticida all'interno dell'insetto;
- (ii) aumento della capacità metabolica intracellulare dell'insetticida ad opera di esterasi, ossidasi a funzione mista o glutatione S-trasferasi;
- (iii) diminuzione della sensibilità dei target molecolari dell'insetticida che ne rendono inefficace la dose di esposizione.

Uno dei principali target è costituito dalle Acetilcolinesterasi (AChE, EC 3.1.1.7), enzimi presenti a livello delle sinapsi colinergiche di tutti gli animali e delle giunture neuromuscolari di alcuni invertebrati e dei vertebrati (SOREQ & ZAKUT, 1993). La via colinergica rappresenta uno dei

maggiori sistemi di comunicazione intercellulare che opera mediante svariati recettori ed attiva risposte in vari tipi di cellule e tessuti. L'idrolisi dell'acetilcolina da parte delle AChE è il principale passaggio che fa terminare rapidamente la neurotrasmissione colinergica. L'AChE è il target principale di molti composti ad azione insetticida prodotti dall'industria, inclusi gli organofosfati (OP) ed i carbammati (SOREQ & ZAKUT, 1993; MATSUMURA, 1985; HAREL *et al.*, 2000). Allo scopo di poter utilizzare insetticidi ad elevata tossicità per gli insetti, ma a bassa o relativamente bassa tossicità per i mammiferi, le AChE degli insetti sono state un importante campo di studio, soprattutto per quanto concerne l'evidenziazione di differenze tra le loro caratteristiche e quelle delle AChE e Butirilcolinesterasi (BChE, EC 3.1.1.8) dei vertebrati. Anche se la presenza di BChE è stata ipotizzata negli insetti e in altri invertebrati, nei vertebrati sono state purificate solo AChE che presentavano proprietà intermedie tra quelle delle AChE e quelle delle BChE (TOUTANT, 1989). Un'importante differenza è che la propionilcolina è il substrato che viene idrolizzato con efficienza catalitica uguale o maggiore rispetto all'acetilcolina (PRINCIPATO *et al.*, 1981). Sono state realizzate indagini di tipo biochimico sulle AChE di oltre 20 specie di insetti, generalmente condotte su materiale non purificato. La caratte-

rizzazione dei geni delle AChE è stata invece completata in poche specie (PRINCIPATO *et al.*, 1981; HALL & SPIERER, 1986; HALL & MALCOLM, 1991; ANTHONY *et al.*, 1995; ZHU & CLARK, 1995; HUANG *et al.*, 1997; TOMITA *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; LI & HAN, 2002; GAO *et al.*, 2002), incluse due specie di afidi, *Aphis gossypii* (GAO *et al.*, 2002; LI & HAN, 2002) e *Schizaphis graminum* (LI & HAN, 2002).

Le ragioni molecolari dell'induzione della resistenza agli insetticidi sono ben lontane dall'essere ad oggi completamente chiarite. Sono state identificate mutazioni puntiformi, talvolta nella stessa subunità catalitica dell'enzima, capaci di conferire resistenza agli insetticidi (MUTERO *et al.*, 1994; ZHU *et al.*, 1996; VILLATTE *et al.*, 2000; WALSH *et al.*, 2001), anche se, in altri casi, la presenza di AChE resistenti non sembra essere stata associata a nessuna mutazione del relativo gene (TOMITA *et al.*, 2000; BAXTER & BARKER, 1998; REN *et al.*, 2002; FOURNIER *et al.*, 1987).

Negli ultimi anni le ricerche sul tema si sono indirizzate verso la mutagenesi sito-specifica per individuare i residui amminoacidici presenti nel sito attivo dell'enzima, target degli OP. I dati presenti in letteratura ancora non indicano in modo chiaro la correlazione tra mutazione del gene ed induzione della resistenza. I risultati di studi cinetici indicano comunque differenti proprietà cinetiche negli enzimi resistenti. Uno dei problemi principali di tali ricerche è che sono state condotte su estratti non purificati e, quindi, i risultati sono di difficile interpretazione in quanto influenzati in modo imprevedibile dalla presenza di contaminanti di ogni tipo (FOURNIER *et al.*, 1987; MOORES *et al.*, 1994; SHARON & RYAN, 1999). È possibile, quindi, che l'induzione della resistenza non sia soltanto da attribuire alla presenza di un gene mutato, ma, probabilmente, anche alla presenza di differenze nelle modalità di ancoraggio dell'AChE alle membrane o a modificazioni post-traduzionali che comportano la comparsa di proprietà cinetiche modificate, utili ai fini della resistenza (LI & HAN, 2002).

Le colinesterasi sono una classe di idrolasi serina-dipendenti, ubiquitarie nel regno animale, che presentano un elevato polimorfismo legato alla struttura quaternaria; tali enzimi possono essere sia solubili che associati a membrane. Le subunità che costituiscono l'enzima attivo possono essere 1, 2, 4 o multiple di 4. In base alle modalità di ancoraggio alle membrane biologiche si distinguono in forme molecolari globulari (G) ed asimmetriche (A) (queste ultime presenti solo nelle giunzioni neuromuscolari dei Vertebrati). Le forme globulari possono essere presenti nei fluidi organici o associate alle membrane

anche mediante ancore glicolipidiche (MASSOULIÉ *et al.*, 1999) (Fig. 1). Negli invertebrati, sono state descritte solo forme globulari e non vi è alcuna prova dell'esistenza di forme molecolari associate alle membrane mediante una coda collagenica. Per esempio, gli insetti possiedono solo forme GI e GII, e la configurazione molecolare maggiore è un dimero anfifilico legato alla membrana mediante un'ancora glicolipidica (GPI).

Il sito attivo dell'enzima si trova alla fine di una stretta e profonda gorgia catalitica, dove è localizzata la triade catalitica [S200, H440, E327 in Torpedo (AChE)]. Poiché il residuo di serina è presente e caratterizza tutte le AChE sia dei mammiferi che di altre specie dotate di un sistema colinergico, molti insetticidi hanno come target l'inattivazione di questo residuo amminoacidico. Un'altra caratteristica del meccanismo catalitico dell'AChE è la presenza di un sito anionico periferico [W279 in Torpedo (AChE)], posto all'inizio della gorgia catalitica, e responsabile dell'effetto dell'inibizione da eccesso di substrato (SHAFFERMAN *et al.*, 1992 & RADY *et al.*, 1991) (Fig. 2).

È ormai accettato che, a differenza dei mammiferi e di alcune mosche, la maggior parte degli insetti possiede due geni per l'AChE. Gli insetti con un singolo gene includono la mosca della frutta (ADAMS *et al.*, 2000), *Musca domestica* (WALSH *et al.*, 2001), *Haematobia irritans* (TEMEYER & CHEN, 2007), *Bactrocera oleae* (VONTAS *et al.*, 2002), *Bactrocera dorsalis* (HSU *et al.*, 2006), *Ceratitis capitata* (MAGANA *et al.*, 2008), la mosca stabile *Stomoxys calcitrans*, *Lucilia cuprina* (CHEN *et al.*, 2001).

L'allineamento di nove sequenze di AChE (nella specie umana, in *Branchiostoma floridae*, *Torpedo californica*, zanzara africana, afide del cotone, afide verde del pesco e lape) ha permesso l'identificazione di un residuo di cisteina, Cys289 assente nell'AChE umana, in quella dei pesci e degli uccelli, ma conservata negli insetti. Questi dati di allineamento insieme ad esperimenti di mutazione sito-specifica e a dati biochimici relativi alla sensibilità dell'AChE degli Afidi ad inibitori sulfidrilici, hanno permesso di candidare la Cys289 come un possibile bersaglio di nuovi e selettivi inibitori afidi-specifici (ROWLAND *et al.*, 2008).

Tuttavia, esperimenti condotti *in vitro* con alcuni composti (AMTS7 – AMTS20) realizzati per inibire la Cys289, hanno dimostrato una parziale ed irreversibile inibizione dell'AChE umana.

La possibilità di impiegare la Cys289 potrebbe comunque portare ad alcuni vantaggi. In primo luogo, gli insetticidi che colpiscono il residuo di cisteina insetto-specifico dovrebbero essere meno tossici per i mammiferi degli attuali anti-colinesterasi, che agiscono a livello dell'ubiquitario residuo

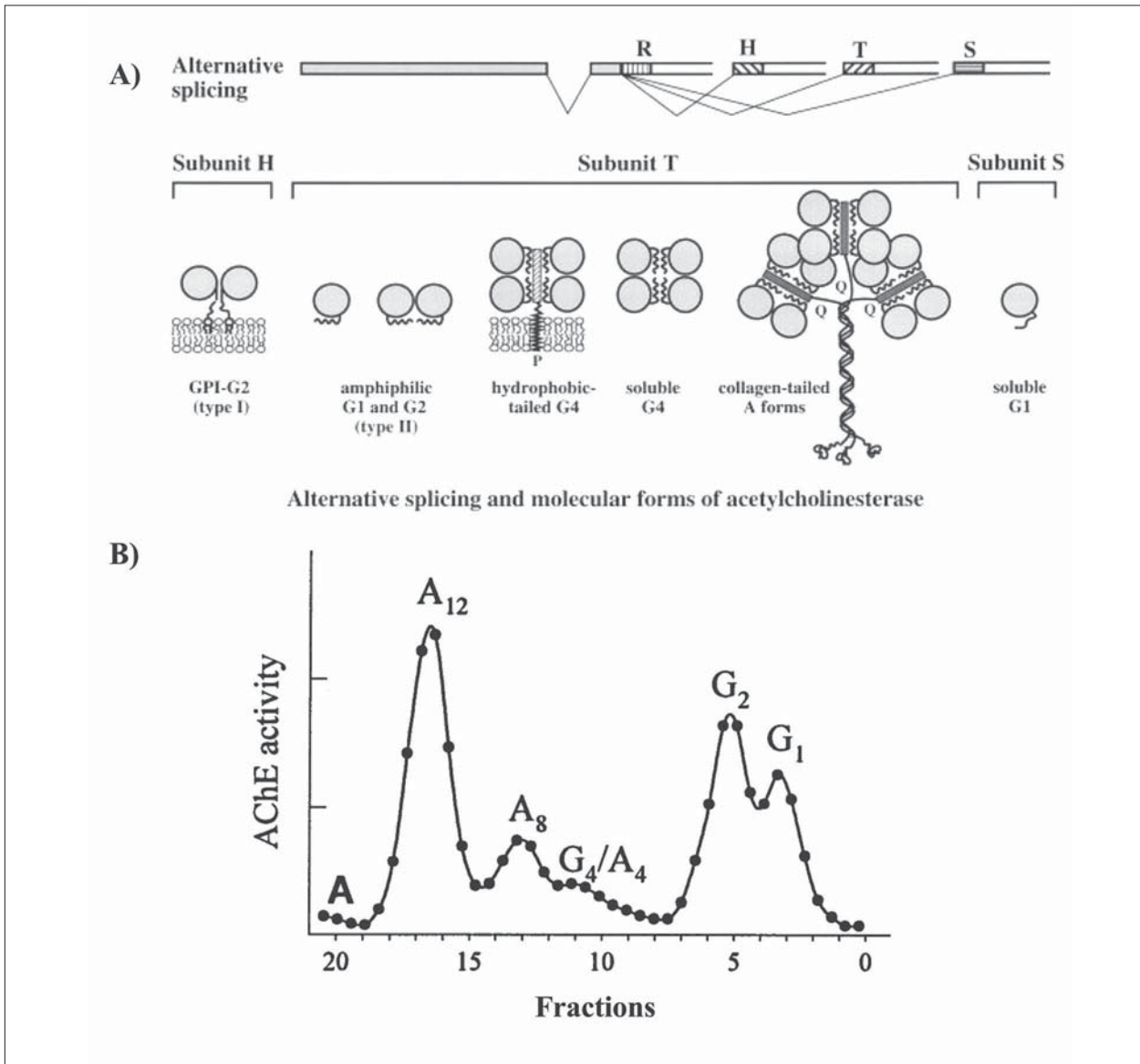


Figura 1

(Da Massoulié *et al* 1999) (A) Le Acetilcolinesterasi possiedono un elevato polimorfismo molecolare; ne esistono forme globulari (G) e asimmetriche (A). Tre forme globulari (G1 G2, e G4) corrispondono a monomeri, dimeri e tetrameri delle subunità catalitiche dell'enzima. Le tre forme asimmetriche (A4, A8 e A12) sono associazioni di uno, due o tre tetrameri catalitici ancorati alle membrane mediante un' ancora collagenica. La dimensione e la forma di queste diverse forme molecolari viene evidenziata mediante centrifugazione su gradiente di saccarosio che permette di determinare i loro coefficienti di sedimentazione. Questo elevato polimorfismo è generato nei vertebrati dallo splicing alternativo di un singolo gene e per modificazione post-traduzionale dei precursori. (B) Profilo di sedimentazione delle forme molecolari asimmetriche (A) e globulari (G) di Acetilcolinesterasi.

di serina di tutte le AChE. In secondo luogo, il residuo di cisteina allevia i problemi di resistenza che si sono verificati con gli attuali insetticidi serina-targeting, utilizzati per decenni, in quanto gli insetti non hanno avuto opportunità di sviluppare resistenza agli insetticidi cisteina-targeting. Terzo, la maggior parte degli insetti sembra avere una AChE con un residuo di cisteina libera all'ingresso del sito attivo; questo consente un approccio generico per sviluppare insetticidi cisteina-targeting. Infine, l'ipotesi offre un basso costo di svi-

luppo per nuovi insetticidi.

La resistenza agli insetticidi dovuta a mutazioni nella regione codificante l'AChE è stata dimostrata in alcuni insetti come ad esempio in *Drosophila melanogaster* (BOUBLIK *et al.*, 2002). I geni sequenziati ed allineati provenienti da ceppi di diverse parti del mondo, sia sensibili che insensibili agli insetticidi, ha rivelato la presenza di quattro diffuse mutazioni, I161V, G265A, F330Y e G368A. Tale confronto dimostra che le mutazioni si trovano sia isolate o in combinazione nella stessa pro-

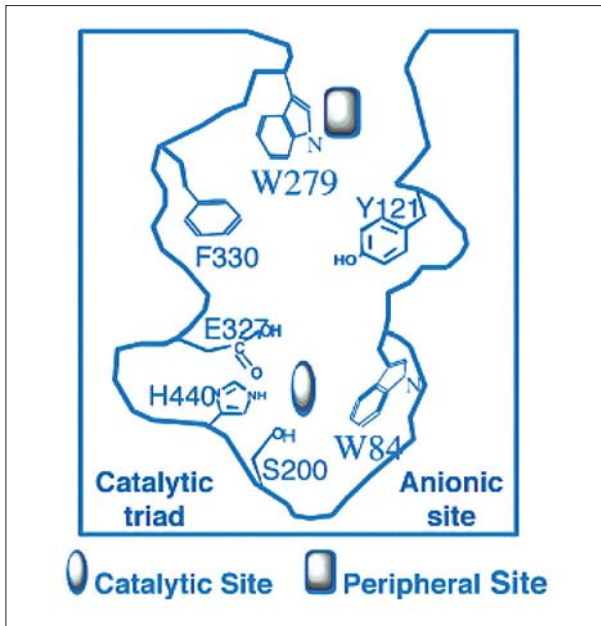


Figura 2

Rappresentazione schematica del sito attivo dell'Acetilcolinesterasi.

teina. Gli studi sull'espressione *in vitro* delle proteine mutate hanno evidenziato che la combinazione di più mutazioni nella stessa proteina ha come conseguenza un aumentato livello e un ampio spettro di resistenza.

In *Aphis gossypii* le sequenze insensibili di AChE differiscono da quelle suscettibili per la presenza di una fenilalanina al posto di una serina in posizione 431 (S431F), mentre tre mutazioni (I298, G401, F466) sono state trovate nella sequenza di *Cochliomyia hominivorax* insensibile agli insetticidi.

L'ancoraggio dell'AChE alle membrane biologiche è determinante per la rapida idrolisi dell'acetilcolina nella sinapsi colinergica (Fig. 3). Si conoscono almeno tre tipi di ancoraggio, tra cui il più diffuso avviene mediante un'ancora glicolipidica (GPI). La resistenza agli organofosfati in *Bactrocera oleae* è associata ad una mutazione che impedisce l'esatto posizionamento dell'inibitore nel sito attivo dell'AChE. Inoltre, è stata individuata, nello stesso gene, una mutazione nella regione codificante per l'ancoraggio glicolipidico. Tale mutazione è costituita da una delezione di tre glutammine su cinque nella regione di un piccolo peptide che, normalmente, viene scisso e sostituito con l'ancora GPI. La proteina risultante è identica per parametri cinetici rispetto a quella nativa, ma comporta il legame di un maggior numero di molecole di AChE alla membrana producendo una maggiore attività enzimatica e incrementando l'insensibilità dell'enzima all'inibitore (KAKANI *et al.*, 2011).

Altri meccanismi di resistenza agli organofosfati sono stati osservati in organismi quale *Tetranychus*

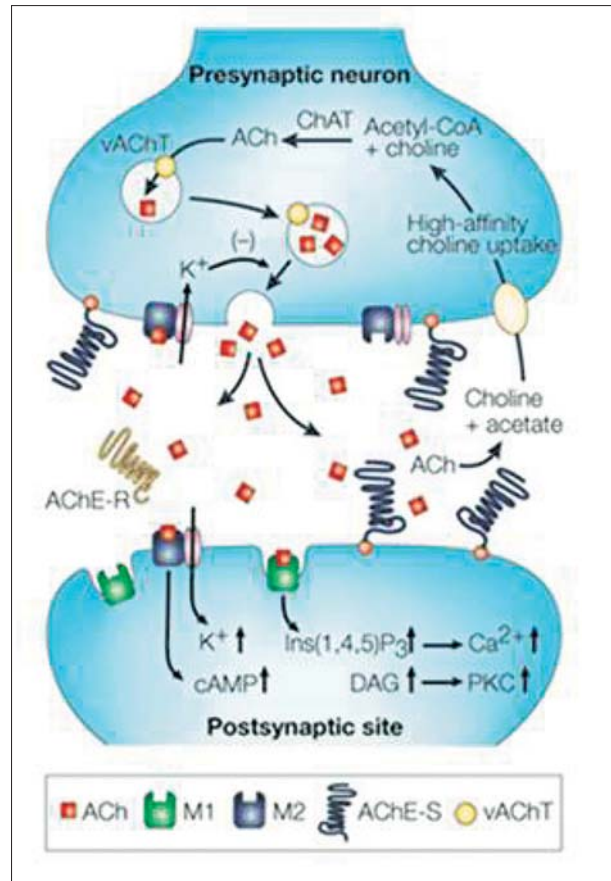


Figura 3

L'Acetilcolinesterasi è legata alla membrana esterna ed orientata in modo che il legame dell'acetilcolina con il suo recettore e la successiva idrolisi del neurotrasmettitore avvengono in circa 150 millisecondi, che equivale all'idrolisi di 5000 molecole di acetilcolina/per molecola di enzima/secondo.

urticae, dove la resistenza agli insetticidi sembra essersi evoluta attraverso una combinazione di accumulo di mutazioni ed una ampia duplicazione genica (KWON *et al.*, 2010).

Le esterasi, come le acetilcolinesterasi, appartengono alle carbossilesterasi, una famiglia genica versatile che comprende proteine con funzioni altamente specializzate; alcune di queste hanno una forte specificità di substrato (come ad esempio l'ormone giovanile esterasi e l'acetilcolinaesterasi), mentre altre sono meno specifiche (comunemente chiamate esterasi) o non possiedono attività catalitica (quali neurologina, gliotactina e neurotactina). Le esterasi sono enzimi capaci di idrolizzare legami estere per generare un acido e un alcol.

Le carbossilesterasi sono coinvolte nel meccanismo di resistenza agli organofosfati, carbammati e, in misura minore, ai piretroidi. Infatti, una vasta gamma di insetticidi contiene legami estere e, quindi, è suscettibile di idrolisi da parte delle esterasi. Inoltre, mutazioni a carico di alcune esterasi sono spesso implicate nella maggior resistenza ad organofosfati e piretroidi in insetti ed acari.

In *Culex pipens*, due loci genici, Est-2 ed Est-3, codificano le esterasi non specifiche attraverso l'amplificazione genica o up-regolazione. Questi loci sono sempre in completo linkage disequilibrium da cui la denominazione di superlocus esterasi. Ad oggi, sono stati identificati nel superlocus, dodici alleli che conferiscono resistenza agli OP (le corrispondenti esterasi sovraespresse sono denominate in parentesi): Ester1 (A1), Ester2 (A2-B2), Ester4 (A4-B4), Ester5 (A5-B5), Ester8 (A8-B8), Ester9 (A9-B9), Ester11 (A11-B11), EsterB1 (B1), EsterB6 (B6), EsterB7 (B7), EsterB10 (B10) e EsterB12 (B12) (YANGYANG *et al.*, 2011).

Due mutazioni presenti nel sito catalitico di alcune esterasi (G137D e W251L) sono in grado di migliorare la performance idrolitica dell'enzima conferendo agli organismi portatori di tali mutazioni una maggiore resistenza agli insetticidi. La presenza della mutazione G137D aumenta l'idrolisi dei dietil- e dimetil-fosfati, rispettivamente di 55 e 33 volte rispetto all'enzima nativo. Inoltre, la mutazione W251L aumenta parimenti la velocità di idrolisi del dime-tilfosfato ma, a differenza dell'altra mutazione, la velocità di idrolisi del dietilfosfato aumenta solo di 10 volte. Questa mutazione mantiene anche la capacità di idrolizzare esteri carbossilici appartenenti al gruppo del malathion (malathion carbossilesterasi, MCE), conferendo una forte resistenza nei confronti di questo composto.

Come abbiamo visto, una mutazione nella regione codificante di un enzima ed in particolare nella regione del sito attivo può aumentare, diminuire o annullare la capacità di metabolizzare un substrato. Esistono alcuni casi in cui una mutazione può conferire ad un enzima la capacità di metabolizzare nuovi substrati. Una singola sostituzione amminoacidica, ad esempio, converte una carbossilesterasi in una organofosfato idrolasi, conferendo resistenza agli insetticidi in alcune specie di insetti. In *Lucilia cuprina* l'esterasi E3 può subire una mutazione (Gly137 Asp) responsabile sia della perdita di attività di tipo carbossilesterasico che dell'acquisizione di una nuova attività idrolasica nei confronti degli OP (NEWCOMB *et al.*, 1997).

BIBLIOGRAFIA

ADAMS M.D., CELNIKER S.E., HOLT R.A., *et al.*, 2000 – *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. - *Science*, 287: 2185-2195.
ANTHONY N., ROCHELEAU T., MOCELIN G., LEE H.J., FRENCH-CONSTANT R., 1995 – *Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito Aedes aegypti*. - *FEBS Lett.*, 368: 461-465.
BAXTER G.D., BARKER S.C., 1998 – *Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, Boophilus microplus: characteri-*

sation and role in organophosphate resistance. *Insect Biochem. - Mol. Biol.*, 28: 581-589.
BOUBLIK Y., SAINT-AGUET P., LOUGARRE A., ARNAUD M., VILLATTE F., ESTRADA-MONDACA S., FOURNIER D., 2002 – *Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues*. - *Protein Eng.*, 15: 43-50.
CHEN Z., NEWCOMB R., FORBES E., MCKENZIE J., BATTERHAM P., 2001 – *The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, Lucilia cuprina*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 805-816.
FOURNIER D., CUANY A., BRIDE J.M., BERGE J.B., 1987 – *Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (Musca domestica L.)*. - *J. Neurochem.*, 49: 1455-1461.
GAO J.R., KAMBHAMPATI S., ZHU K.Y., 2002 – *Molecular cloning and characterization of a greenbug (Schizaphis graminum) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 765-775.
HALL L.M., SPIERER P., 1986 – *The Ace locus of Drosophila melanogaster: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader*. - *EMBO J.*, 5: 2949-2954.
HALL L.M., MALCOLM C.A., 1991 – *The acetylcholinesterase gene of Anopheles stephensi*. - *Cell. Mol. Neurobiol.*, 11: 131-141.
HAREL M., KRYGER G., ROSENBERY T.L., MALLENDER W.D., LEWIS T., FLETCHER R.J., GUSS J.M., SILMAN I., SUSSMAN J.L., 2000 – *Three-dimensional structures of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors*. - *Protein Sci.*, 9: 1063-1072.
HSU J.C., HAYMER D.S., WU W.J., FENG H.T., 2006 – *Mutations in the acetylcholinesterase gene of Bactrocera dorsalis associated with resistance to organophosphorus insecticides*. - *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 396-402.
HUANG Y., QIAO C., WILLIAMSON M.S., DEVONSHIRE A.L., 1997 – *Characterization of the acetylcholinesterase gene from insecticide-resistant houseflies (Musca domestica)*. - *Chin. J. Biotechnol.*, 13: 177-183.
KAKANI E.G., BON S., MASSOULIÉ J., MATHIOPOULOS K.D., 2011 – *Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides*. - *Insect. Biochem. Mol. Biol.*; 41 (3): 150-8.
KWON D.H., CLARK J.M., LEE S.H., 2010 – *Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite*. - *Insect. Mol. Biol.*, 19: 195-204.
LI F., HAN Z.J., 2002 – *Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (Aphis gossypii)*. - *Genome*, 45: 1134-1141.
LI F., HAN Z., 2002 – *Purification and Characterization of Acetylcholinesterase From Cotton Aphid (Aphis gossypii Glover)*. - *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 51: 37-45.
LIU Y., ZHANG H., QIAO C., LIU X., CUI F., 2011 – *Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in Culex pipiens complex from China*. - *Parasit Vectors.*, 4: 236.
MAGAÑA C., HERNÁNDEZ-CRESPO P., BRUN-BARALE A., COUSO-FERRER F., BRIDE J.M., CASTAÑERA P., FEYEREISEN R., ORTEGO F., 2008 – *Mechanisms of resistance to malathion in the medfly Ceratitis capitata*. - *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 38: 756-762.
MASSOULIÉ J., ANSELMET A., BON S., KREJCI E., LEGAY C., MOREL N., SIMON S., 1999 – *The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization*. - *Chem. Biol. Interact.*, 119: 29-42

- MATSUMURA F., 1985 – *Toxicology of Insecticides*. Plenum Press, New York.
- MOORES G.D., DEVINE G.J., DEVONSHIRE A.L., 1994 – *Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in Myzus persicae and Myzus nicotianae*. - Pesticide Biochem. Physiol. 49: 114-120.
- MUTERO A., PRALAVORIO M., BRIDE J., FOURNIER D., 1994 – *Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5922-5926.
- NEWCOMB R.D., CAMPBELL P.M., OLLIS D.L., CHEAH E., RUSSELL R.J., OAKESHOTT J.G., 1997 – *A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly*. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94: 7464-7468.
- PRINCIPATO G.B., AMBROSINI M.V., LIOTTI F.S., GIOVANNINI E., 1981 – *Propionylcholinesterase in Hirudo medicinalis: purification, partial characterization and comparative study with a mammalian acetylcholinesterase*. - Comp. Biochem. Physiol. C., 70: 209-213.
- RADI Z., REINER E., TAYLOR P., 1991 – *Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives*. - Mol. Pharmacol. 39:98-104.
- REN X., HAN Z., WANG Y., 2002 – *Mechanisms of monocrotophos resistance in cotton bollworm, Helicoverpa armigera (Hubner)*. - Arch. Insect Biochem. Physiol., 51: 103-110.
- ROWLAND M., TSIGELNY I., WOLFE M., PEZZEMENTI L., 2008 – *Inactivation of an invertebrate acetylcholinesterase by sulfhydryl reagents: a reconsideration of the implications for insecticide design*. - Chem. Biol. Interact., 175: 73-75.
- SHAFFERMAN A., KRONMAN C., FLASHNER Y., LEITNER M., GROSFELD H., ORDENTLICH A., GOZES Y., COHEN S., ARIEL N., BARAK D., et al., 1992 – *Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding*. - J. Biol. Chem. 267: 17640-8.
- SHARON K., RYAN M.F., 1999 – *Purification, characterization, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, Galleria mellonella (L.)*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 29: 1097-1104.
- SOREQ H., ZAKUT H., 1993 – *Human Cholinesterases and Anticholinesterases*. Academic Press, San Diego.
- TEMEYER K.B., CHEN A.C., 2007 – *Identification and characterization of a cDNA encoding the acetylcholinesterase of Haematobia irritans (L.) (Diptera: Muscidae)*. - DNA Seq., 18: 85-91.
- TOMITA T., HIDOH O., KONO Y., 2000 – *Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, Nephotettix cincticeps*. - Insect. Biochem. Mol. Biol., 30: 325-333.
- TOUTANT J.P., 1989 – *Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms*. - Progr. Neurobiol., 32: 423-446.
- VILLATTE F., ZILIANI P., MARCEL V., MENOZZI P., FOURNIER D., 2000 – *A high number of mutations in insect acetylcholinesterase may provide insecticide resistance*. - Pest. Biochem. Physiol., 67: 95-102.
- VONTAS J.G., HEJAZI M.J., HAWKES N.J., COSMIDIS N., LOUKAS M., JANES R.W., HEMINGWAY J., 2002 – *Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly Bactrocera oleae*. - Insect Mol Biol., 11: 329-336.
- WALSH S.B., DOLDEN T.A., MOORES G.D., KRISTENSEN M., LEWIS T., DEVONSHIRE A.L., WILLIAMSON M.S., 2001 – *Identification and characterization of mutations in housefly (Musca domestica) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance*. - Biochem. J., 359: 175-181.
- ZHU K.Y., CLARK J.M., 1995 – *Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say)*. - Insect Biochem. Mol. Biol., 25: 1129-1138.
- ZHU K.Y., LEE S.H., CLARK J.M., 1996 – *A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle*. - Pestic. Biochem. Physiol., 55: 100-108.

NEXT GENERATION INSECTICIDE RESISTANCE MANAGEMENT: TRANSGENIC CONTRIBUTIONS

KEVIN GORMAN (*) - NEIL MORRISON (*) - LUKE ALPHEY (*)

(*) Oxitec Ltd, 71 Milton Park, Abingdon, OX14 4RX, UK; e-mail: Kevin.Gorman@oxitec.com

Sintesi della lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "La resistenza degli insetti di interesse agrario agli insetticidi". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 16 novembre 2012.

SYNTHESIS – In recent decades insecticides have played an invaluable role in contemporary integrated pest management (IPM) strategies. Although such cultural, physical, biological and chemical combinations are complementary to one another and can reduce over-reliance on single components, true synergism between them is rarely reported. Transgenic technologies for the control of insect pests in an autocidal manner are developing at an increasingly rapid rate, and in the case of Oxitec's genetic technology, offer potential direct synergism with insecticides and a significant insecticide resistance management (IRM) benefit.

It is now over 30 years since the first transgenic insect, *Drosophila melanogaster*, was developed and it has since become a model species for novel transgenic techniques. Indeed, work on *D. melanogaster* was also a precursor to Oxitec's insect control technology. Numerous pest insects have been the target for genetic transformations including fruit flies such as *Ceratitis capitata* (Medfly) and *Bactrocera oleae* (olive fruit fly). The first transgenic coleopteran was *Tribolium castaneum* (red flour beetle) and the first pest moth was *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm); the latter being a devastating global pest of cotton prior to the advent of transgenic *Bt* cotton. The first transgenic mosquito, *Aedes aegypti* (yellow fever mosquito), was published in 1998; this species is the primary vector of several human viral diseases including yellow fever, dengue fever, and chikungunya. The first transgenic strain of a malaria-transmitting mosquito, *Anopheles stephensi* (Asian malaria mosquito), was published in 2000. As these dates illustrate, the ability to insert exogenous DNA into the genomes of pest insects has only relatively recently been developed, nonetheless applications are rapidly being developed.

Oxitec have now successfully applied transgenic insect control techniques in the field. The biological characteristics of transgenic *P. gossypiella* were

examined in large-scale open release experiments in Arizona, USA; they were shown to have similar mating competitiveness to wild-type counterparts and stable expression of the genetically incorporated fluorescent marker. Most notably, 80-95% control of populations of the dengue vector, *Ae. aegypti*, was achieved after several months of releases at distinct sites in the Cayman Islands and north-east Brazil. National regulatory authorities in Europe, the Americas, Asia, and the Middle-east have granted permission to import and study specific Oxitec transgenic insect lines in contained surroundings. Following appropriate biosafety assessments, four of these have granted permission to conduct deliberate open releases into the environment (USA, Cayman Islands, Malaysia and Brazil).

Classic sterile insect technique (SIT) has been in use for many years for area-wide suppression of target pest populations and in some cases even elimination of target pest populations on various scales. To implement SIT, millions of insects are reared under strictly controlled conditions before being subjected to sterilising levels of radiation treatment. Insects are then released at high densities throughout the target area. When the sterilised males mate with wild females, the fertilised eggs are largely non-viable due to radiation-induced lethal genetic mutations in the sperm and few or no viable progeny are produced. Successive releases over multiple generations result in a decline in the wild population. SIT was used effectively to eradicate the New World screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) from the USA and Mexico in recent decades, and the control of Medfly has been enhanced by SIT in many regions. Other successful SIT programmes have targeted Queensland, Mexican, and West Indian fruit flies, codling moth in Canada, and pink bollworm in south-western USA.

SIT has several positive attributes including an environmentally friendly profile and good efficacy

in specific cases. The control agent (sterile males) will actively disperse themselves to seek out the wild pest females, and since these males will only mate with females of the same species, the method is exquisitely species-specific. However, the complexities of consistently mass-rearing and releasing high-quality insects at the correct time and place present a significant challenge.

Oxitec genetic control using lethal transgenes works in a similar manner to SIT, except that it has a number of key advantages. Primarily, instead of sterilisation by irradiation the insects cannot reproduce because they pass on a dominant lethal gene to their offspring. This death of progeny circumvents the irradiation process and any associated concerns, which can include a reduction in fitness as a consequence of radiation exposure, financial, and safety considerations. Oxitec insects carry a genetic fluorescent marker that enables quick and easy identification - so all released insects can be tracked and their performance assessed. The heritable dominant lethals ensure that the strains cannot persist in the environment.

One common constraint to the successful implementation of SIT type strategies is the need for sexing: separation of useful males from females, which are also potentially damaging to crops or as disease vectors. These procedures are frequently unavailable, and can be labour-intensive and costly. Genetic sexing strains, in which both sexes carry the lethal transgene but only females express the phenotype, can offer dramatic improvements in programme efficiency. Transgenic sexing strains can be mass-reared in the presence of a dietary antidote, and withholding the antidote from the pre-release generation conveniently removes the females. Post-release, transgenic males mate with wild females and their female progeny die. Persistent release of such males will result in a crash in the number of females in the field, and a consequent reduction in the reproductive potential of the wild pest popula-

tion. This effect has been demonstrated in caged experiments with both Medfly and olive fly.

The introgression of insecticide-susceptible genes as a consequence of segregation during mating between male heterozygotes and wild females can ‘dilute’ resistance in the wild population. Both modelling and semi-field studies of insecticide-resistance allele frequencies have demonstrated that repeated releases of insecticide-susceptible individuals carrying a female-specific lethal transgene can reduce resistance levels in pest populations, offering a potentially powerful secondary benefit for pest control. Providing the released transgenic insects are susceptible, this approach can provide resistance management benefits for all insecticides and would also serve to protect novel modes of action from the initial onset of resistance in a pre-emptive manner.

Insecticides are most efficient when pest populations are high, whereas Oxitec’s genetic control is most effective when pest populations are lower. Consequently, their synergistic integration can provide:

- control of high pest populations quickly and economically;
- long-term suppression of pest populations below economic thresholds;
- reduction in the level and/or development of insecticide resistance;
- options for the control of sporadic outbreaks /hotspots;
- control of pests for which biocontrol is not effective (e.g. olive fly).

In combination, insecticidal and genetic insect control methods could provide sustainable, economical and safe management of pests. The approach provides, in principle, a contemporary method for controlling pest populations while managing the spread of pest resistance to both conventionally applied and genetically engineered insecticidal toxins.

