



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**



Indirizzo:

Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Agrari e Forestali in Ambiente Mediterraneo

Ciclo XXVI

**Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi
entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale
e medico-veterinario.**

Dott.ssa **Barbara Virdis**

Direttore della Scuola

Chiar.ma Prof.ssa Alba Pusino

Referente di Indirizzo

Chiar.mo Prof. Ignazio Floris

Docente Guida

Chiar.mo Prof. Ignazio Floris

Anno accademico 2012- 2013



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze e Biotecnologie
dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari**



Indirizzo:

Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Agrari e Forestali in Ambiente Mediterraneo

Ciclo XXVI

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in “Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari” dell’Università degli Studi di Sassari, a.a. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

Barbara Viridis gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support of her PhD scholarship (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007-2013 - Axis IV Human Resources, Objective I.3, Line of Activity I.3.1.)

*Alla mia Famiglia...
e a te, Valerio...*

*“Lasciate che vi dica il segreto
che mi ha portato al successo.
La mia forza risiede
soltanto nella mia tenacia.”*

Louis Pasteur

INDICE

ABSTRACT.....	1
AGENTI DI CONTROLLO BIOLOGICO DEGLI INSETTI NOCIVI.....	2
1. Introduzione	3
2. Batteri entomopatogeni	4
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.1.1. Storia.....	6
2.1.2. Biologia ed ecologia.....	7
2.1.3. Meccanismo di azione.....	10
2.2. <i>Brevibacillus laterosporus</i>	12
2.3. Batteri simbiotici di nematodi entomopatogeni.....	14
2.3.1. Nematodi entomopatogeni (EPNs).....	14
2.3.2. I generi <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	16
2.3.3. Ciclo di vita di <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	17
2.3.4. <i>Photorhabdus</i> e <i>Xenorhabdus</i>	19
2.3.5. Differenze di fase tra <i>Photorhabdus</i> e <i>Xenorhabdus</i>	20
2.3.6. I complessi proteici (Tc).....	21
2.3.7. Il genere <i>Serratia</i>	22
2.4. Biosaggi di laboratorio con batteri entomopatogeni.....	24
2.5. Altri entomopatogeni: funghi e virus.....	25
2.5.1. I funghi entomopatogeni.....	25
2.5.2. Virus entomopatogeni.....	27
3. Insetti target	29
3.1. <i>Ceratitis capitata</i>	29
3.1.1. Posizione tassonomica, morfologia e identificazione.....	29
3.1.2. Biologia.....	31
3.1.3. Dannosità e controllo.....	32
3.2. <i>Musca domestica</i>	35
3.2.1. Ciclo biologico e morfologia.....	35
3.2.2. Dannosità e controllo.....	38
3.3. <i>Lymantria dispar</i>	39
3.3.1. Morfologia.....	41
3.3.2. Ciclo biologico.....	41
3.3.3. Dannosità e controllo.....	43
3.4. <i>Malacosoma neustria</i>	44
3.4.1. Morfologia.....	45
3.4.2. Ciclo biologico.....	45
3.4.3. Dannosità e controllo.....	46
3.5. <i>Galleria mellonella</i>	47

4. Obiettivi della ricerca	49
MATERIALI E METODI.....	50
5. Allevamento degli insetti	51
5.1. Origine e provenienza degli insetti di interesse forestale: <i>L. dispar</i> e <i>M. neustria</i>	51
5.2. Origine e provenienza degli insetti di interesse agrario e medico- veterinario: <i>C. capitata</i> e <i>M. domestica</i>	52
6. Origine e provenienza dei batteri entomopatogeni	55
6.1. Batteri entomopatogeni impiegati nei biosaggi.....	55
6.2. Isolamento di batteri da larve di <i>G.mellonella</i> infettate con EPNs.....	57
6.2.1. Origine e provenienza dei nematodi entomopatogeni.....	57
6.2.2. Isolamento dei batteri da larve di <i>G.mellonella</i> infette.....	59
6.2.3. Identificazione dei batteri isolati.....	60
6.3. Preparazione delle colture microbiche.....	61
7. Biosaggi (metodiche)	63
7.1. Biosaggi dose-risposta su adulti e larve di mosche.....	63
7.1.1. Biosaggi per ingestione su adulti di <i>M.domestica</i> e <i>C.capitata</i>	63
7.1.2. Biosaggi per ingestione su larve di <i>M.domestica</i> e <i>C.capitata</i>	64
7.2. Biosaggi preliminari per iniezione su larve di <i>G.mellonella</i>	66
7.3. Biosaggi per iniezione su larve di <i>L.dispar</i>	66
7.4. Biosaggi per ingestione su larve di <i>M.neustria</i>	67
7.5. Analisi statistica.....	68
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	69
8. Biosaggi (risultati)	70
8.1. Biosaggi su adulti e larve di <i>M.domestica</i> con ceppi di <i>B.laterosporus</i> ...	70
8.2. Biosaggi su adulti di <i>M.domestica</i> con i batteri isolati da larve di <i>G.mellonella</i> infette.....	71
8.3. Biosaggi su adulti di <i>C.capitata</i> con i batteri isolati da larve di <i>G.mellonella</i> infette.....	71
8.4. Biosaggi su larve di <i>M.domestica</i> con i batteri isolati da larve di <i>G.mellonella</i> infette.....	74
8.5. Biosaggi su larve di <i>C.capitata</i> con i batteri isolati da larve di <i>G.mellonella</i> infette.....	77
8.6. Biosaggi su adulti di <i>M.domestica</i> con diversi batteri entomopatogeni...	78
8.7. Biosaggi su adulti di <i>C.capitata</i> con diversi batteri entomopatogeni.....	79
8.8. Biosaggi per iniezione su larve di <i>L.dispar</i> con alcuni ceppi batterici isolati da larve di <i>G.mellonella</i> infette.....	80
8.9. Biosaggi per ingestione su larve di <i>M.neustria</i> con alcuni ceppi batterici isolati da larve di <i>G.mellonella</i> infette.....	81
8.10. Identificazione di alcuni isolati batterici.....	82
9. Discussione e conclusioni	84
BIBLIOGRAFIA.....	88

Isolation and evaluation of entomopathogenic microorganisms on insects with agricultural, forest and medical-veterinary interest.

ABSTRACT

The insecticidal potential of various entomopathogenic bacteria was evaluated by ingestion and/or injection bioassays against noxious insects including *Musca domestica*, *Ceratitis capitata*, *Lymantria dispar*, and *Malacosoma neustria*. Bacteria involved in the study included newly isolated soil occurring strains, reference strains (i.e. *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Photorhabdus luminescens* and *Xenorhabdus nematophila*), and others isolated from *Galleria mellonella* larvae infected with an original collection of entomopathogenic nematods. The new bacterial isolates were identified by phylogenetic analysis involving 16S rRNA gene sequencing.

As a result of bioassays, significant differences in the insecticidal potential emerged for diverse bacterial strains and different insect targets. *B. thuringiensis*, *P. luminescens* and *X. nematophila* were generally highly toxic against lepidopteran larvae, while different *B. laterosporus* strains showed variable degrees of toxicity against the house fly.

Among the others, significant was the pathogenic potential of *Bacillus firmus*, *Paenibacillus tundrae* and *Bacillus psychrodurans*, and of new species belonging to the genera *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Alcaligenes*.

These results are discussed in comparison with previous knowledge in the field, highlighting the prospect of a possible use of new bacterial strains for further studies focusing on the development of new actives for the microbial pest management.

AGENTI DI CONTROLLO MICROBIOLOGICO DEGLI INSETTI NOCIVI

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

1. Introduzione

Il controllo biologico degli insetti nocivi non è sicuramente frutto di un'idea recente, ma nasce da un concetto che avrebbe radici molto più antiche. Così, ad esempio, già gli antichi cinesi immettevano nei silos le formiche di *Pheoras* per combattere gli insetti che danneggiavano i raccolti. Tuttavia, la mancanza iniziale di fondamenti teorici e l'urgenza di contrastare pullulazioni di insetti nocivi ha senz'altro rallentato l'affermarsi di questo approccio al loro contenimento.

L'uso di agrofarmaci, o "pesticidi" a base di composti chimici sintetici, negli ultimi decenni ha rappresentato una delle soluzioni più comuni in relazione alla loro maggiore efficacia e facilità di impiego. La sensibilizzazione verso i temi legati alla tutela dell'ambiente, ai rischi di inquinamento, alla contaminazione e avvelenamenti, alla maggiore attenzione dei consumatori di prodotti agricoli finiti, unitamente ad un'evoluzione della legislazione internazionale sempre più in direzione ecosostenibile, hanno favorito lo sviluppo e introduzione nel mercato di prodotti sintetici con decrescente impatto ambientale. A questo si aggiunge un'incrementata attenzione verso le tecniche di controllo alternativo come l'impiego di insetticidi microbiologici.

In linea con principi del controllo integrato, anche noto come Integrated Pest Management (IPM), l'affermarsi dell'uso di insetticidi di origine microbica in integrazione o rotazione con i principi attivi di origine chimica, rappresenta un'alternativa promettente già oggi e per il prossimo futuro.

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 amplifichino l'effetto (Ruiu & Floris, 2012).

In questo scenario, le recenti acquisizioni scientifiche relative alle interazioni tra gli agenti entomopatogeni presenti in natura e le popolazioni di insetti ospiti sta aprendo nuove prospettive per il biocontenimento di diversi insetti nocivi.

Gli organismi entomopatogeni maggiormente utilizzati per il controllo microbico includono batteri, virus, funghi protozoi e nematodi.

L'obiettivo generale del presente studio è stato quello di isolare e valutare il potenziale insetticida di nuovi batteri entomopatogeni in comparazione con batteri già noti. In particolare sono stati reperiti nuovi isolati batterici provenienti da recenti

collezioni della sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia del Dipartimento di Agraria (Università degli Studi di Sassari) e della società di ricerca Bioecopest Srl (Spin Off sostenuto dell'Università degli Studi di Sassari), in aggiunta a quelli ottenuti con nuovi isolamenti condotti durante questo studio. Nuovi ceppi batterici sono stati isolati da insetti infettati con nematodi entomopatogeni. Successivamente, gli isolati batterici sono stati saggiati per verificare l'azione insetticida nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario. Specifiche osservazioni e approfondimenti hanno riguardato gli isolati che sono risultati maggiormente efficaci.

2. Batteri entomopatogeni

Nell'ambito dei numerosi microrganismi associati agli insetti, solo alcuni esplicano effetti patologici. Fra questi, denominati batteri entomopatogeni, i membri dei due generi *Clostridium* e *Bacillus*, hanno storicamente rappresentato il gruppo principale e più importante ai fini applicativi. Si tratta di batteri Gram positivi e capaci di riprodursi per sporulazione.

In particolare, il genere *Bacillus* comprende un gran numero di specie delle quali diverse sono agenti patogeni per l'uomo. L'identificazione di queste specie è stata tradizionalmente basata su caratteristiche morfologiche e fisiologiche, mentre attualmente si basa sulla sequenza del gene che codifica per il 16S rRNA (Xu & Coté, 2003). Tale genere è attualmente diviso in due differenti gruppi che includono diversi batteri entomopatogeni come *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*.

Sulla base dei nuovi criteri di classificazione, alcune specie entomopatogene, precedentemente appartenenti al genere *Bacillus*, sono state riclassificate nel genere *Paenibacillus* (*P. popilliae*, *P. lentimorbus*, *P. larvae* e *P. pulvifaciens*). Per ragioni analoghe è stato recentemente riposizionato il gruppo di *Brevibacillus brevis* (precedentemente *Bacillus brevis*), che include l'entomopatogeno *Brevibacillus laterosporus*.

Benchè gli sporigeni abbiano costituito il principale gruppo di agenti di controllo batterico degli insetti, più recentemente nuovi microrganismi entomopatogeni sono stati scoperti e caratterizzati. Fra questi, ad esempio è significativo il caso di nuove specie batteriche entomopatogene come

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

Chromobacterium subtsugae sp. Nov. (Martin *et al.*, 2007) e *Burkholderia rinojensis* sp. nov. (Cordova-Kreylos *et al.*, 2014) che manifestano 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.

Interessante anche il caso di *Yersinia entomophaga* che agisce specificamente sull'intestino degli insetti suscettibili con l'azione di un complesso proteico contenente tossine e chitinasi (Hurst *et al.*, 2011).

Come messo in evidenza in Ruiu *et al.* (2013), l'avvento delle nuove biotecnologie "omiche", come la genomica e la proteomica, sta permettendo di mettere in evidenza il ruolo di diverse molecole implicate nell'azione insetticida e di comprendere più a fondo i meccanismi d'azione. Interessante ad esempio il caso dell'ascomicete *B. bassiana*, il cui genoma è stato solo recentemente interamente sequenziato portando alla luce numerosi geni di virulenza specie-specifici (Xiao *et al.*, 2012). Si generano così preziose informazioni su "nuovi" e "vecchi" agenti entomopatogeni impiegabili nei programmi di controllo integrato degli insetti nocivi.

Nella presente sezione introduttiva, si tratteranno in particolare le specie che sono state oggetto del presente lavoro di ricerca, tralasciando, non certo per minore importanza, quelle che non hanno preso parte alle attività sperimentali e quindi alla discussione dei risultati ottenuti.

2.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*Bt*) è un batterio caratterizzato dalla capacità di produrre dei corpi parasporali che contengono endotossine con specifica attività insetticida. Nell'ambito dei batteri entomopatogeni, rappresenta la specie maggiormente studiata ed il biopesticida più largamente utilizzato nel mondo, costituendo inoltre, un'importante risorsa del mercato degli insetticidi biologici.

Formulazioni contenenti *B. thuringiensis* sono utilizzate per il controllo di numerosi insetti forestali per i quali sono richieste applicazioni per via aerea. Così ad esempio, *Bt* var. *kurstaki* è impiegato per il controllo di *Lymantria dispar* (Linneo, 1758) e *Choristoneura fumiferana* (Clemens, 1865) in Nord America (Smith & Barry, 1998) ed in prove sperimentali in Sardegna per il controllo di defogliatori forestali (Lentini & Luciano, 1995). Attualmente vi sono numerosi prodotti commerciali a base di *Bt* disponibili sul mercato degli insetticidi biologici.

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

Così ad esempio *Bt* var. *kurstaki* è largamente utilizzato per il controllo di Lepidotteri infestanti diverse colture ortive e da frutto, mentre *Bt* var. *israelensis* è impiegato per il controllo di zanzare.

Inoltre, piante ingegnerizzate, contenenti geni codificanti per entomotossine di *Bt* vengono attualmente commercializzate negli Stati Uniti ed in altre parti del mondo in cui l'uso di organismi geneticamente modificati (OGM) è permesso (Glare & O'Callagan, 2000).

2.1.1. Storia

B. thuringiensis è stato inizialmente descritto da uno studioso giapponese, Ishwata, all'inizio del ventesimo secolo, come un agente della malattia nota come "sotto bacillus disease" del baco da seta *Bombix mori* (Linneo, 1758).

Nel 1911 in Thuringia (Germania), Berliner isolò la specie tipo *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* da un'altra larva di lepidottero.

La produzione di un corpo parasporale cristallino è stata dimostrata nel 1915 da Aoki. In seguito, una serie di ricerche hanno dimostrato la tossicità di *Bt* nei confronti di larve appartenenti a differenti specie degli ordini lepidotteri, ditteri, coleotteri, imenotteri, mallofagi, protozoi, nonché nei confronti di nematodi.

Il primo prodotto commerciale contenente *Bt* è stato commercializzato in Francia nel 1938, sotto il nome di Sporeine, mentre il primo utilizzo commerciale di *Bt* negli USA risale al 1958.

Il primo prodotto commerciale, Thuricide, era basato su *Bt* var. *thuringiensis* mentre successivamente su *Bt* var. *kurstaki*. Nel 1970 i Laboratori Abbott rilasciarono il Dipel (*Bt* var. *kurstaki*).

Fino a quel momento si pensava che *Bt* fosse attivo solo contro i lepidotteri, finché, nel 1977 fu scoperta la tossicità di *Bt* var. *israelensis* contro ditteri nematoceri (Goldberg & Margalit, 1977) e nel 1983 di *Bt* var. *tenebrionis* contro larve di coleotteri (Krieg *et al.*, 1983).

Allo stato attuale, migliaia di ceppi di *Bt* sono mantenuti in collezioni in tutto il mondo e questo numero è destinato a crescere come conseguenza dei programmi di ricerca in atto e miranti all'isolamento e screening di nuovi ceppi.

Inoltre ci si aspetta che nuovi ceppi manifestino attività insetticida nei confronti di insetti appartenenti a differenti ordini e famiglie.

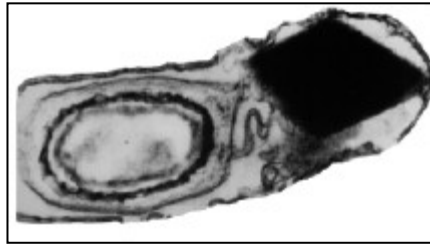


Fig. 2.1 - Sporangio di *B. thuringiensis* var. *kurstaki* con endospora e corpo parasporale biperamidale

(Da: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/)

2.1.2. Biologia ed ecologia

B. thuringiensis è 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 nutritivo, da una fase stazionaria semi-quiescente o di sporulazione. Durante la sporulazione, nel citoplasma dello sporangio batterico vengono prodotti una o più inclusioni parasporali cristalline, che rappresentano il principale componente insetticida (Figura 2.1). 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. Dette tossine Cry (da *Crystal*), sono protossine monomeriche che variano da un ceppo di *Bt* all’altro. Inoltre, differenti tossine Cry variano nella loro attività contro differenti insetti. Forma, dimensione e localizzazione cellulare dei cristalli, cambiano da un ceppo all’altro. Così ad esempio *Bt* var. *finitimus* produce una o due inclusioni associate all’esosporio, mentre nelle 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, ad esempio un lepidottero, le protossine sono solubilizzate nell’ambiente tipicamente alcalino dell’intestino di questi insetti e sotto l’azione di proteasi e altri enzimi 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 un modello proteico che tipicamente presenta tre domini. Il Dominio I (N-terminale) si pensa si inserisca nella membrana delle cellule epiteliali dell'intestino medio degli insetti contribuendo alla formazione di un poro di membrana; 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 (Fig. 2.2). 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*). Oggigiorno, ci sono differenti classi di citolisine (Cyt A, B e C) che sono proteine di 25-28 kDa (Fig. 2.3) (Li *et al.*, 1996).

Dal punto di vista genomico, i plasmidi batterici rappresentano la sede tipica per i geni codificanti le δ -endotossine, anche se non raramente possono essere anche integrati nel DNA genomico.

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 (Tabella 2.1). Durante la fase vegetativa *Bt* secerne esoenzimi quali PI-PLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase C), lecitinasi, chitinasi e proteasi che possono coadiuvare l'ingresso e la proliferazione di cellule vegetative all'interno dell'ospite. Inoltre qualche ceppo produce un'emolisina, nota come thuringiolisina, simile alla cereolisina prodotta da *B. cereus* (Matsuyama *et al.*, 1995). *B. thuringiensis* si pensa produca anche enterotossine analoghe a quelle prodotte da *B. cereus*, le quali sono agenti di diarrea nei vertebrati (Hansen & Hendriksen, 2001).

Qualche ceppo produce la β -esotossina, anche conosciuta come "fly toxin" o *thuringiensin*, un nucleotide-analogo termostabile e idrosolubile. Tale composto interferisce nella sintesi del mRNA e manifesta tossicità nei confronti di un largo spettro di insetti causando effetti teratogenici ed interferendo sullo sviluppo giovanile e sulla longevità e fecondità degli adulti. Tale tossina rappresenta anche un rischio per i vertebrati, pertanto attualmente la maggior parte dei Paesi europei proibisce l'uso di prodotti basati su *Bt* var. *thuringiensis* contenenti β -esotossina. In passato, molti

prodotti commerciali contenevano *Bt* var. *thuringiensis*, in quanto erano particolarmente tossici contro le mosche.

Una nuova classe di tossine prodotte dal *Bt*, vegetative insecticidal proteins (VIP), sono state recentemente scoperte. Queste tossine vengono prodotte durante la fase vegetativa ed hanno un largo spettro di azione insetticida.

La produzione di tossine non specifiche, con particolare riferimento alla β -esotossina, è stata oggetto di discussione in merito alla sicurezza di tali pesticidi biologici e, recentemente, sono stati condotti numerosi studi sul loro impatto ambientale.

Un altro aspetto lungamente dibattuto, riguarda il contributo delle spore alla tossicità. Infatti, benché sia ben noto che la tossicità derivi principalmente dall'azione delle endotossine, la presenza di spore può determinare un effetto sinergico (Miyasono *et al.*, 1994; Johnson & McGaughey, 1996). Questo effetto potrebbe essere in parte imputato alla presenza addizionale di tossine sulla parete sporale o ad un'azione setticemica causata dalle cellule vegetative derivanti dalle spore ingerite dall'insetto.

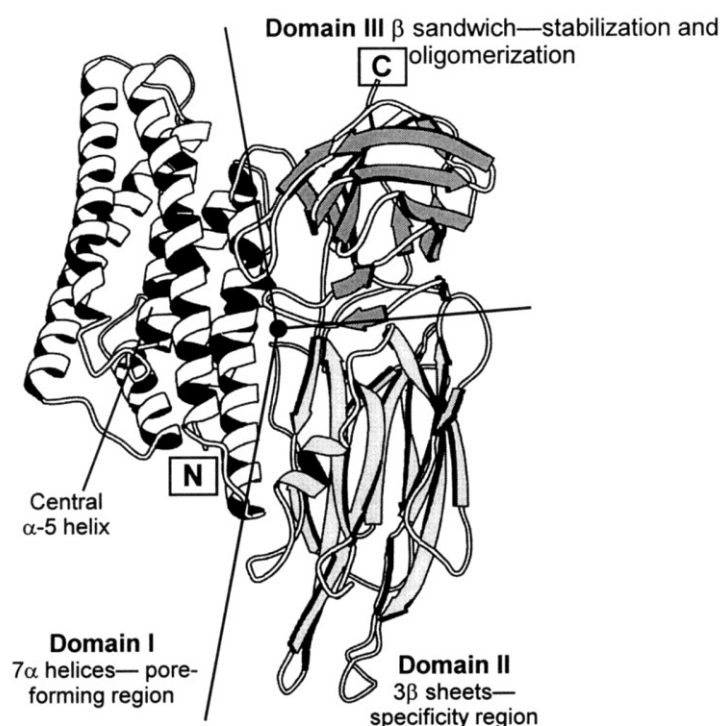


Fig. 2.2 - Modello della struttura tridimensionale della endotossina Cry3 (Li *et al.* 1991).



Fig. 2.3 - Modello della struttura tridimensionale della endotossina CytB (Li *et al.* 1996).

Tabella 2.1 – Varie tossine prodotte da ceppi di *B. thuringiensis*.

Tossine	Attività
Tossine Cry	Formazione del poro sulla membrana
Tossine Cyt	Attività citolitica
Tossine Vip	Largo spettro di azione sugli insetti
Beta-esotossine	Inibizione della RNA polimerasi
Thuricina	Batteriocina
Emolisina	Attività emolitica
Fosfolipasi-C	Alterazione della membrana cellulare
Enterotossine (<i>Bacillus cereus</i> -type)	Diarrea nei vertebrati

2.1.3. Meccanismo di azione

È generalmente accettato che le tossine attivate di *B. thuringiensis*, si leghino a specifici recettori sulla membrana plasmatica delle cellule epiteliali dell'intestino medio, generando dei pori e causando sulle stesse un flusso di ioni ed acqua, sfocianti nella lisi osmotica (Figura 2.4).

L'azione biotossica delle δ -endotossine di *B. thuringiensis* ed i relativi effetti istopatologici sull'intestino sono stati largamente studiati (Knowles & Ellar, 1987). Questi studi hanno messo in evidenza 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.

Tali effetti istopatologici sono stati osservati in diversi insetti appartenenti a differenti gruppi tassonomici come Lepidoptera (Endo & Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Percy & Fast, 1983; Spies & Spence, 1985; Mathavan *et al.*, 1989; Lane *et al.*, 1989; Rausell *et al.*, 2000), Coleoptera (Bauer & Pankratz, 1992) e larve di Diptera, includendo *M. domestica* (Lacey & Federici, 1979; Lahkim-Tsrer *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1986; Weiser & Zizka, 1994), così come Rhyncota (Maddrell *et al.*, 1988) e adulti di Mallophaga (Hill & Pinnock, 1998) e Orthoptera (Quesada-Moraga & Santiagoalvarez, 2001).

Effetti miotossici e neurotossici generalizzati (decremento della risposta a stimoli esterni e conseguente riduzione della capacità motoria fino alla totale paralisi) sono inoltre stati messi in evidenza in Blattodea (Singh & Gill, 1985).

Nell'ambito dello studio degli effetti patologici di *B. thuringiensis* su Diptera, specifiche ricerche sono state condotte su larve di Simulidae (Lacey & Federici, 1979) e Culicidae (Weiser & Zizka, 1994).

Riguardo *Musca domestica* (Linneo, 1758), gli effetti drammatici delle δ -endotossine di *Bt* var. *israelensis* sul sistema neuromuscolare delle larve è stato studiato mediante esperimenti *in vitro* (Singh *et al.*, 1986).

Al contrario, pochi sforzi sono stati dedicati a studiare gli effetti sugli adulti (Younes *et al.*, 1996).

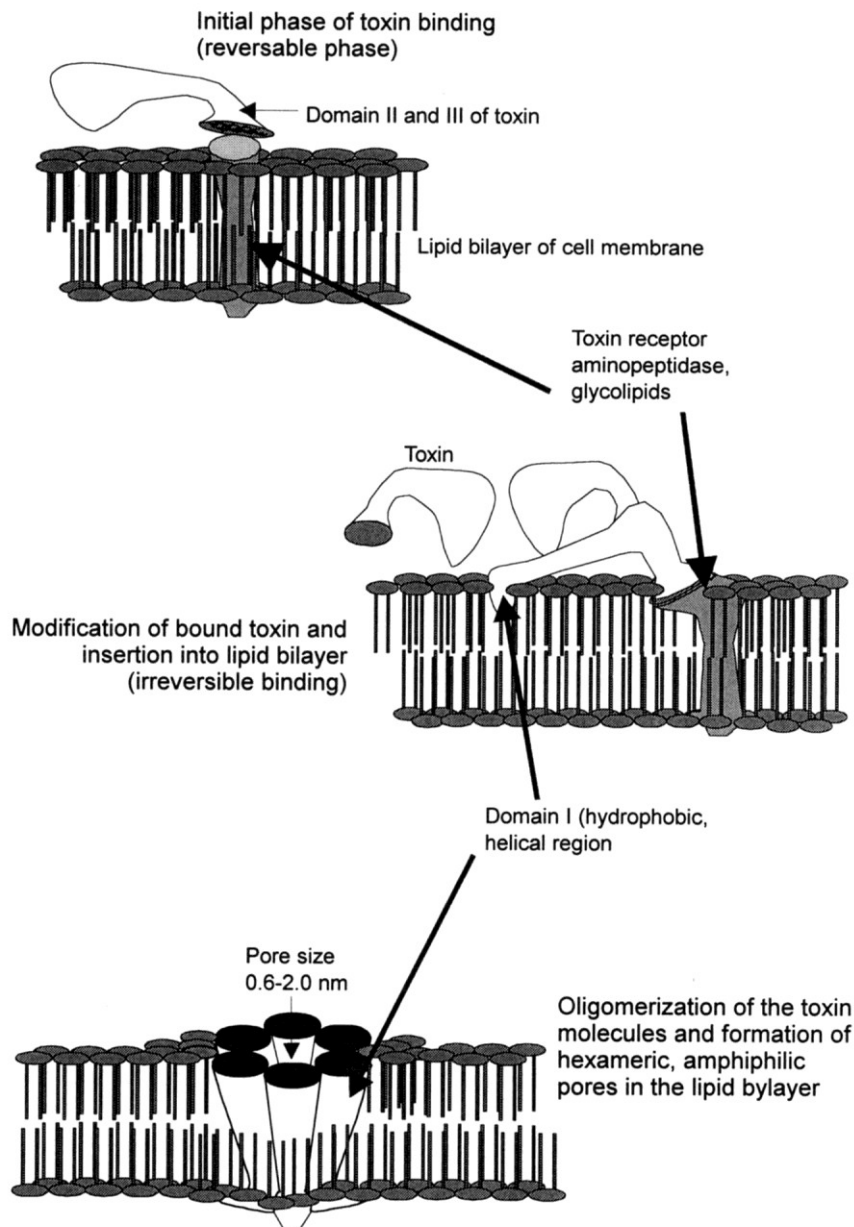


Fig. 2.4 - Meccanismo di azione di una δ -endotossina che include il legame al recettore, l'inserzione nella membrana e la formazione del poro (da Boucias & Pendland, 1998)

2.2. *Brevibacillus laterosporus*

B. laterosporus (Laubach) è un batterio aerobio caratterizzato dalla produzione di un tipico corpo parasporale a forma di canoa (CSPB) che rimane saldamente attaccato ad un lato della spora dopo lisi dello sporangio (Ruiu, 2013). È un microrganismo isolato dall'acqua e dal suolo (Laubach 1916 ; Oliveira *et al.*, 2004), ed è stato anche isolato da insetti (McCray, 1917; Mohsen *et al.*, 1986).

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
 Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
 Università degli Studi di Sassari.

Le proprietà insetticide di *B. laterosporus* sono state dimostrate inizialmente contro le zanzare (Favret & Yousten , 1985; Rivers *et al.*, 1991), nonché contro altri ordini di insetti, soprattutto coleotteri e lepidotteri (Oliveira *et al.* , 2004), e contro nematodi e molluschi (Singer , 1996).

Alcuni ceppi di *B.laterosporus* sono caratterizzati anche dalla produzione di inclusioni parasporali simili a quelle prodotte da *B. thuringiensis* (Smirnova *et al.*, 1996), altamente tossici per le zanzare. Proprio per questo motivo il suo potenziale contro i ditteri è stato recentemente riconsiderato. La tossicità nei confronti di larve e adulti della mosca domestica è stato ampiamente dimostrato (Ruiu *et al.*, 2007)

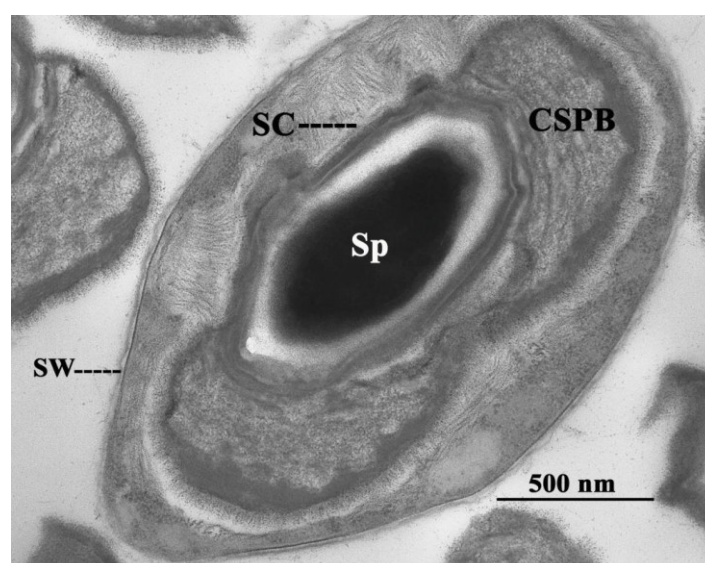


Fig. 2.5 - Sporangio di *B. laterosporus*. SW, parete cellulare; Sp, spora; SC, spore coat; CSPB, corpo parasporale a forma di canoa (Foto da Ruiu, 2013).

Il genoma di *B. laterosporus*, rispetto ad altri batteri entomopatogeni come il *B. thuringiensis*, è scarsamente caratterizzato, anche se la diversità genotipica e differenti livelli di patogenicità sono stati osservati in vari ceppi analizzati (Oliveira *et al.*, 2004). Queste differenze nei livelli di tossicità suggeriscono che possono essere isolate nuove tossine da nuovi ceppi, attive contro diversi insetti.

2.3. Batteri simbiotici di nematodi entomopatogeni

2.3.1. Nematodi entomopatogeni (EPNs)

Il Phylum Nematoda è un raggruppamento sistematico comprendente oltre 20.000 specie. Si tratta di un complesso di organismi (vermi cilindrici) estremamente eterogeneo nella biologia, nelle modalità riproduttive, negli ambienti e nei substrati in cui si sviluppano. Molte specie vivono in associazione con gli insetti, in rapporti che variano dalla simbiosi mutualistica al parassitismo che porta l'ospite alla morte (Deseö Kovács & Rovesti, 1992). Per l'impiego a fini commerciali, i nematodi entomopatogeni utili nel controllo biologico, così come gli insetti e gli acari ausiliari, non richiedono registrazioni e autorizzazioni specifiche presso le autorità nazionali competenti dei paesi europei e negli USA.

Il loro impiego è pratico (si distribuiscono con le attrezzature di cui le aziende sono normalmente dotate), non hanno tempi di carenza, sono compatibili con gli altri mezzi di difesa (sia biologici che chimici) e non comportano l'impiego di protezioni da parte degli operatori che li manipolano e li distribuiscono.

Vengono commercializzati in contenitori di plastica assieme ad argilla inerte facilmente disperdibile in acqua. I contenitori devono essere spediti e stoccati a temperature comprese tra 4 e 6°C. In queste condizioni la conservazione può durare da 3 a 6 settimane (variabile in funzione della specie).

Le specie più importanti appartengono ai generi *Steinernema* e *Heterorhabditis* che penetrano le loro vittime attraverso le aperture del corpo o attivamente attraverso l'esoscheletro.

Una volta dentro l'ospite, il nematode rilascia dei microrganismi simbiotici che moltiplicandosi provocano la morte dell'insetto in un tempo variabile a seconda della specie (es. 24-72 ore). Gli insetti uccisi diventano giallo-marroni, o rossastri a seconda della specie.

L'attività dei microrganismi trasforma l'interno dell'insetto in un substrato ideale per la riproduzione del nematode il quale compie uno o due cicli riproduttivi, sino a generare migliaia di individui infettivi che abbandonano il cadavere ormai putrefatto dell'insetto, in cerca di nuovi ospiti.

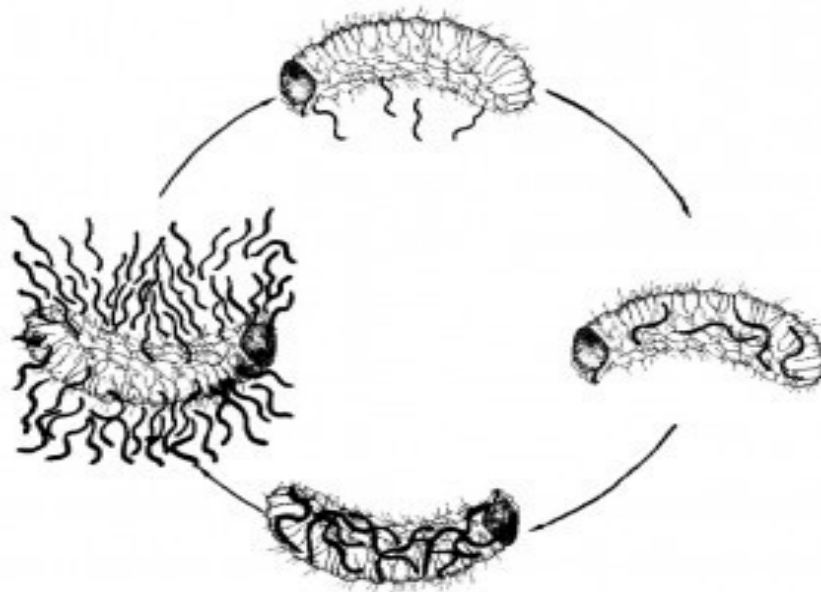


Fig. 2.6 - Ciclo di vita tipico di un nematode entomopatogeno

L'evoluzione da uovo ad adulto avviene attraverso 4 età larvali, di cui solo la 3°, definita "forma infestante", è capace di persistere liberamente nell'ambiente (se le condizioni sono idonee anche per mesi o anni senza alimentarsi) e penetrare attivamente negli ospiti attraverso le aperture naturali (bocca, ano e spiracoli tracheali).

In *Steinernema* non è confermata la possibilità di penetrazione diretta (perforazione dell'esoscheletro dell'artropode nei punti meno sclerotizzati) documentata per altri generi, tra cui l'affine *Heterorhabditis*.

La sopravvivenza all'esterno dell'ospite è permessa da particolari adattamenti morfologici e fisiologici quali il persistere all'esterno della cuticola di 2° età che protegge da agenti biotici e abiotici avversi e l'inattività trofica (dovuta alla bocca chiusa, faringe collassata, intestino non funzionante).

La persistenza in un ambiente poco umido è possibile solamente se il disseccamento avviene in modo graduale.

Le forme infestanti ricercano attivamente gli ospiti da parassitizzare. Per il loro spostamento è necessaria la presenza di un velo liquido. Se nel terreno non sono presenti potenziali ospiti le larve di terzo stadio di *Steinernema* possono assumere una forma rilassata di quiescenza o muoversi in maniera caratteristica, restando attaccate alle particelle di terreno con la parte caudale e ondeggiando l'estremità cefalica

("nictating"). In prossimità dell'insetto bersaglio lo aggrediscono attraverso un balzo che può raggiungere anche i 15 mm.

Certamente esistono fattori che governano l'individuazione di un ospite idoneo, presumibilmente prodotti dell'attività metabolica, gradienti di concentrazione di CO₂ e di temperatura (Deseö Kovács e Rovesti, 1992).

Una volta penetrate nell'ospite, le forme infestanti si liberano della cuticola protettiva e diffondono nell'emocele dove si nutrono di emolinfa. L'inizio dell'attività trofica attiva i batteri simbiotici che si moltiplicano e si spostano attraverso il canale digerente veicolati dall'alimento.

Una volta espulsi, invadono i tessuti dell'ospite che vengono degradati. Per i nematodi, quindi, vengono a crearsi nelle condizioni ottimali di sviluppo potendo utilizzare un *pabulum* composto dai prodotti di demolizione dei tessuti dell'ospite per l'attività batterica e dai batteri stessi.

La moltiplicazione di *Xenorhabdus* spp. all'interno dell'ospite è possibile grazie alla liberazione di "immunodepressori" (di natura incerta) da parte del nematode nelle fasi iniziali dell'infezione e di sostanze antibiotiche prodotte dagli stessi batteri. In ambiente favorevole i nematodi completano lo sviluppo raggiungendo lo stadio adulto.

2.3.2. I generi *Steinernema* e *Heterorhabditis*

Dal punto di vista tassonomico i generi *Steinernema* e *Heterorhabditis* sono compresi nella Classe Secernentea, Ordine Rhabditida, Sottordine Rhabditina, Superfamiglia Rhabditoidea, Famiglia Steinernematidae (Poinar, 1986) e Famiglia Heterorhabditidae, (Poinar, 1976), rispettivamente.

In Italia la prima esperienza di applicazione diretta di nematodi entomopatogeni è avvenuta per iniziativa di Scogliamiglio *et al.* (1968) con l'impiego di *Steinernema carpocapsae* Weiser (allora nota come *Neoapectana carpocapsae* Weiser) nei confronti di *Leptinotarsa decemlineata* Say.

Diverse specie di *Steinernema* (in particolare *Steinernema feltiae* Filipjev e *S. carpocapsae*) sono state successivamente impiegate per il controllo di larve di lepidotteri e coleotteri che vivono nel terreno, hanno comportamento endofitico nelle piante o svernano negli anfratti delle cortecce (tra cui *Temnorhinus* (= *Conorrhynchus*) *mendicus* Gyll., *Synanthedon mypaeformis* Brkh., *Zeuzera pyrina* L. e *Paranthrene*

tabaniformis Rott.) ottenendo risultati soddisfacenti (Boselli *et al.*, 1997; Deseö *et al.*, 1986; Deseö, 1989).

Negli ultimi anni grande interesse è rivolto all'impiego dei nematodi nella lotta a *C. pomonella* (Linneo, 1758) sia in pieno campo (Lacey *et al.*, 1998; Unruh *et al.*, 2001) che per l'eliminazione di larve diapausanti dai contenitori utilizzati per il trasporto della frutta (Lacey & Chauvin, 1999; Cossentine *et al.*, 2002).

L'identificazione morfologica delle specie, basata su alcune caratteristiche dei maschi, è spesso difficoltosa (soprattutto per via di una forte variabilità delle dimensioni del corpo del nematode in funzione dell'ospite e del numero di individui che si sviluppano per ogni ospite) e deve essere sempre confermata mediante incrocio con individui di identità certa. Ulteriori elementi di discriminazione si evidenziano con l'ausilio del microscopio elettronico. Negli ultimi anni, stanno prendendo sempre più piede i metodi biochimici e di biologia molecolare. Sulla base di queste tecniche Stock *et al.* (2001) hanno ricostruito la filogenesi del genere *Steinernema*.

Nell'ambito dei nematodi, *Steinernema* è uno dei generi più importanti sotto il profilo delle applicazioni pratiche in quanto comprende diverse specie impiegate nel controllo biologico di svariati insetti nocivi. Esse appartengono al gruppo dei nematodi entomopatogeni in quanto sono associate a batteri del genere *Xenorhabdus* (portati nella faringe e nel tratto iniziale dell'intestino) alla cui attività si deve la morte dell'insetto bersaglio (causano una malattia rapidamente letale). In natura, tale rapporto è specifico per cui ogni specie di nematode è associata ad un'unica specie batterica, anche se la stessa specie di *Xenorhabdus* può comparire come il simbiote di diverse specie di nematodi (Hazir *et al.*, 2003).

2.3.3. Ciclo di vita di *Steinernema* e *Heterorhabditis*

La forma infettiva dei nematodi penetra l'insetto ospite attraverso la bocca, l'ano, gli spiracoli tracheali o attraverso la penetrazione diretta della cuticola. Se la modalità di ingresso avviene attraverso la bocca o l'ano, il nematode penetra la parete intestinale per raggiungere l'emocele, o mediante gli spiracoli tracheali, penetrando la parete tracheale.

Anche se il batterio è il principale responsabile per la morte della maggior parte degli insetti, anche il nematode può produrre tossine con azione letale per l'insetto (Burman M, 1982), o con effetti inibitori sulla sua risposta immunitaria,

favorendo così i microrganismi simbiotici rilasciati e che si moltiplicano rapidamente determinando la morte dell'ospite per setticemia in un tempo variabile, ma mediamente in 24-72 ore.

Lo stadio invasivo di *Steinernema* trasporta cellule del batterio simbiote (genere *Xenorhabdus*) nella parte anteriore dell'intestino. La riproduzione del nematode continua oltre 2-3 generazioni, fino a quando lo stato nutrizionale del cadavere si deteriora. Mutano in successione alla quarta fase in cui diventano maschi e femmine adulti della prima generazione.

Dopo l'accoppiamento, le femmine depongono le uova che si schiudono come larve del primo stadio mutando successivamente alla seconda, terza e quarta fase.

I giovani nematodi del quarto stadio si sviluppano in femmine e maschi adulti della seconda generazione. Gli adulti si accoppiano e le uova prodotte dalle femmine di seconda generazione si schiudono come larve di primo stadio che mutano alla seconda fase. La riproduzione del nematode continua fino a quando le risorse del cadavere sono esaurite, solitamente permettendo per due o tre generazioni

Se l'approvvigionamento di cibo è limitato, le uova prodotte dalle femmine della prima generazione si sviluppano direttamente in larve infettive lasciando il cadavere in cerca di nuovi ospiti. Possono non nutrirsi e sopravvivere nel terreno per diversi mesi.

Il ciclo di vita di *Heterorhabditis* è simile a quello di *Steinernema*, con la differenza che i nematodi *Heterorhabditis* si sviluppano in femmine ermafrodite (sostituendo la prima generazione nella *Steinernema*) e successivamente, in maschi e femmine. In tal modo, l'infezione dell'ospite da un singolo ermafrodita *Heterorhabditis* infettivo è sufficiente per avviare lo sviluppo del nematode e la proliferazione all'interno dell'ospite.

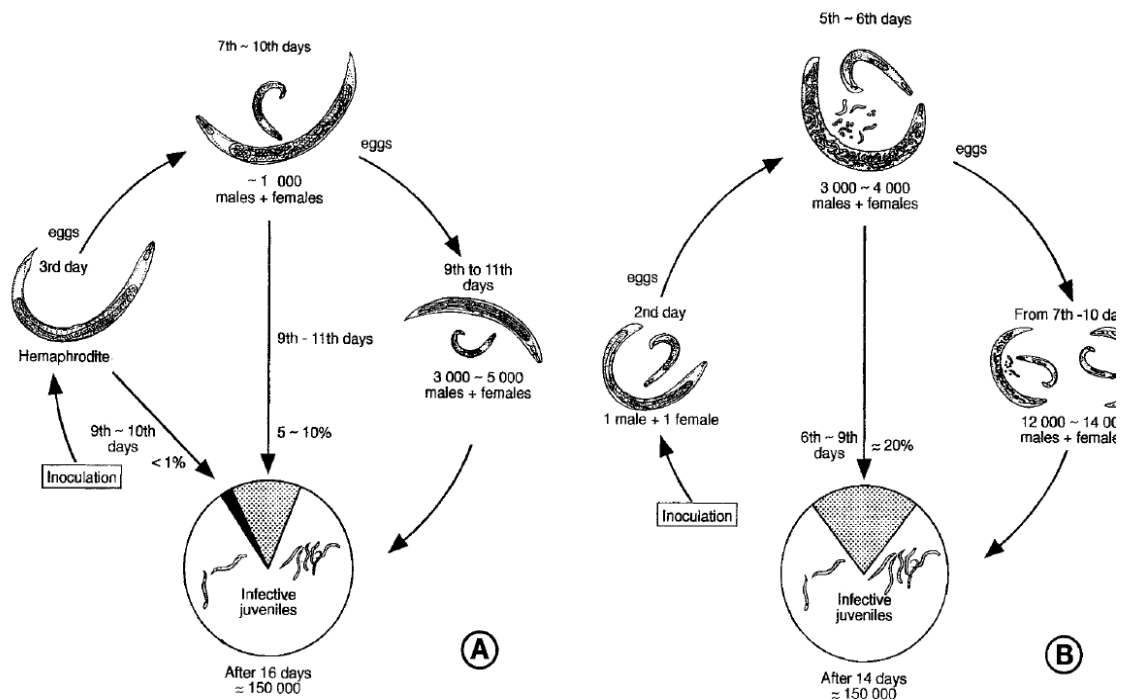


Fig 2.7 - Ciclo di vita di **A:** *Heterorhabditis bacteriophora* e **B:** *Steinernema carpocapsae* in una larva di *Galleria mellonella* (Burnell *et al.*, 2000).

2.3.4. *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*

Le specie appartenenti ai generi *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* sono batteri Gram- appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

Questi batteri vivono in associazione con nematodi della famiglia *Heterorabditidae* e *Steinernematidae* rispettivamente (Forst *et al.*, 1997), in simbiosi all'interno degli intestini dei giovani nematodi entomopatogeni (Ffrench-Constant *et al.*, 2006) e raramente isolati in assenza del nematode ospite.

Tutti i membri del genere *Photorhabdus* sono stati identificati per la loro relazione mutualistica con nematodi della famiglia delle Heterorabditidae, mentre le specie di *Xenorhabdus* sono mutualisti di nematodi della famiglia Steinernematidae.

Il genere *Photorhabdus* include le specie *P.luminescens*, *P.temperata* e *P.asymbiotica* (Fischer- Le Saux *et al.*, 1999). Quest'ultima è stata isolata da ferite umane sulla quale non è stata riscontrata la presenza di nematodi vettori. Esistono diverse sottospecie. Ad esempio *P.luminescens* include le sottospecie *luminescens*, *akhurshi* e *laumondii*. *P.temperata* la sottospecie *temperata*.

Analogamente, il genere *Xenorhabdus* includeva le specie *X.beddingii*, *X.bovienii*, *X.japonicus*, *X.nematophilus* e *X.poinarii*. Successivamente, da una collezione di Steinermatidae, sono state isolate 15 nuove specie, identificate sulla base della sequenza del 16S rRNA e dalla caratterizzazione fenotipica e molecolare. Si tratta di *X. budapestensis*, *X. ehlersii*, *X. innexi*, *X. szentirmaii*, *X. indica*, *X. cabanillasii*, *X. doucetiae*, *X. griffiniae*, *X. hominickii*, *X. koppenhoeferi*, *X. kozodoii*, *X. mauleonii*, *X. miraniensis*, *X. romanii*, e *X. stockiae* (Lengyel *et al.*, 2005; Taillez *et al.*, 2006).

2.3.5. Differenze di fase tra *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*

All'interno della differenza tra i due generi di batteri, si trova la luminescenza di *Photorhabdus* spp. e la non luminescenza di *Xenorhabdus* spp.

Entrambi i generi batterici producono cellule diverse note come forme primarie (fase I) e forme secondarie (fase II) (Saenz, 1998 e 1999; Forst & Clarke, 2002).

La forma primaria è naturalmente associata con le larve infettive, mentre la secondaria sorge spontaneamente quando le colture batteriche si trovano nello stato stazionario di crescita nella cultura in vitro.

La fase primaria è ideale per lo sviluppo del nematode, probabilmente perché questo fornisce una buona fonte di nutrimento producendo un vasto assortimento di antibiotici che evitano l'instaurarsi di altri microrganismi (Akhurst, 1980).

La forma secondaria di *Xenorhabdus* può passare alla forma primaria, ma questo fenomeno non è stato invece dimostrato per *Photorhabdus* spp.

Le due forme batteriche presentano differenze. Per esempio, la primaria produce antibiotici, assorbe alcuni coloranti e sviluppa grandi inclusioni intracellulari composte da cristalli di proteina, mentre la secondaria produce saltuariamente o non produce antibiotici, non assorbe coloranti e produce in maniera inefficiente inclusioni intracellulari. La forma primaria è quella che possiede la capacità di sopportare la propagazione del nematode in vitro (Lysenko & Weiser, 1974; Aguilera *et al.*, 1993; Aguilera & Smart, 1993; Boemare, 2002; Martens *et al.*, 2003).

Molte specie di *Xenorhabdus* producono metaboliti secondari con proprietà antimicrobica, antibiotici con basso peso molecolare, enzimi extracellulari quali proteasi, lipasi, fosfolipasi coinvolte nella decomposizione dei tessuti degli insetti

ospiti e capaci di fornire nutrienti utili sia per il nematode sia per i batteri simbiotici (Forst *et al.*, 1996).

La maggior parte delle specie di *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* producono più di un gruppo di metaboliti secondari bioattivi, maggiormente diversificati in specie di *Xenorhabdus* rispetto alle specie di *Photorhabdus*. Anche se la ragione non è ancora chiara, questi metaboliti non solo possiedono strutture chimiche diverse, ma esprimono anche una vasta gamma di bioattività di interesse medico e agricolo, come attività antibiotica, antimicotica, insetticida, nematocida, e antivirale (Shishinova *et al.*, 1997).

2.3.6. I complessi proteici (Tc)

I batteri simbiotici *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* rappresentano fonti potenziali di nuovi geni che codificano per tossine insetticide che potrebbero essere utilizzate in piante come alternativa ai geni del *B. thuringiensis* (Liu *et al.*, 2003).

L'analisi della sequenza genica di *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* mostrano che questi organismi contengono una complessa famiglia di tossine (Tc). Le Tc's sono tossine insetticide ad alto peso molecolare, multisubunità, prodotte sia da batteri Gram negativi che Gram positivi (Waterfield *et al.*, 2001).

I geni che codificano queste tossine, sono stati descritti nei batteri (*Photorhabdus* e *Xenorhabdus*), che come già detto, co-esistono con nematodi entomopatogeni. I complessi di tossina sono composti da tre diverse classi di componenti proteiche, che, secondo Ffrench-Constant *et al.* (2006 e 2007), possono essere classificati in classe A, B e C sulla base della similarità di sequenza e sulla dimensione.

Le proteine di classe A sono molto grandi, con una massa molecolare di circa 280 kDa. Le proteine di Classe B presentano una massa molecolare di circa 170 kDa, e le proteine di classe C di circa 110 kDa. Da studi precedenti, è stato dimostrato che le proteine di classe A ospitano gli effetti citotossici delle tossine Tc, mentre le proteine di classe B e C modulano e migliorano la tossicità delle proteine di classe A (Guo *et al.*, 1999).

Tuttavia, recentemente, è stato chiarito il meccanismo molecolare del complesso Tc di *P. luminescens*, che consiste della proteina TcdA1 della classe A, la proteina TcdB2 della classe B, e la proteina TccC3 o TccC5 della classe C (Lang *et*

al., 2010). Questi studi hanno rivelato che le proteine di classe C ospitano l'attività biologica.

È stato dimostrato che TccC3 e TccC5 sono ADP-ribosiltransferasi, prendendo di mira il citoscheletro di actina mediante trasformazione di actina e di Rho GTPasi rispettivamente (Lang *et al.*, 2010). Inoltre, questi studi hanno suggerito che proteina TcdA1 di *P. luminescens* è probabilmente coinvolta nella captazione della componente enzimatica nelle cellule bersaglio (Lang *et al.*, 2011). È stato dimostrato che la proteina Tca è in grado di inserirsi nell'epitelio intestinale dell'insetto in un modo simile alla δ -endotossina del *B. thuringiensis* (Blackburn *et al.*, 1998).

È stata analizzata la struttura e la composizione stechiometrica di un complesso di tossina da *X. nematophilus* che è in gran parte legato al complesso Tc di *P. luminescens*, scoprendo che il nativo complesso di tossina di *Xenorhabdus* è composto da tre proteine (XptA2, XptB1, e XptC1) che rappresentano la classe A, B, e C. Utilizzando i singoli componenti proteici ricombinanti e purificati di *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* hanno dimostrato che un complesso di tossina completamente attivo richiede la presenza di tutti e tre le classi A, B, C e che le proteine della classe B e C di *Photorhabdus* (TcdB2 e TccC3) possono sostituire la classe B e C di *Xenorhabdus* per formare un complesso di tossina ibrido e attivo che possiede una maggiore attività insetticida rispetto al complesso tossina nativa.

Complessi proteici Tc analoghi, e contenenti anche chitinasi, sono stati identificati e caratterizzati in altri batteri come *Yersinia entomophaga* (Hurst *et al.*, 2011).

2.3.7. Il genere *Serratia*

Le *Serratia* spp sono germi bastoncellari, Gram negativi, riuniti nel genere *Serratia*, famiglia delle *Enterobacteriaceae*, ordine *Enterobacteriales*, classe *Gamma Proteobacteria*, phylum *Proteobacteria*.

Tra le specie appartenenti a questo genere si ricordano *S. entomophila* (Grimont *et al.*, 1988), *S. ficaria* (Grimont *et al.*, 1981), *S. fonticola* (Gavini *et al.*, 1979), *S. glossinae* (Geiger *et al.*, 2010), *S. grimes*, *S. liquefaciens* (Bascomb *et al.* 1971), *S. marcescens* subsp. *marcescens* (Bizio *et al.* 1823), *S. marcescens* subsp. *sakuensis* (Ajithkumar *et al.* 2003), *S. marinorubra* (Grimon *et al.*, 1977), *S. plymuthica* (Breed *et al.*, 1948), *S. odorifera* (Grimont *et al.*, 1978), *S. proteamaculans* (Grimont *et*

al.,1978), *S.quinivorans* (Grimont *et al.* ,1983), *S. rubidaea* (Stapp 1940), *S. simbiotica* (Moran *et al.*,2005), *S. ureilytica* (Bhadra *et al.*,2005).

Le *Serratia* spp. presentano colonie di 1-3 mm di diametro, circolari ed opache. Alcune specie producono un pigmento chiamato Prodigiosina, o 2-metil-3amil-6 methoxyprodigiosene (Williams & Quadri, 1980).

La produzione del pigmento è variabile e non tutti i ceppi lo producono, ma è influenzata dalle condizioni culturali (30°C) e dalla composizione del *medium*.

Le specie di *Serratia* sono state isolate da piante ,vertebrati ed invertebrati, con numerose specie associate agli insetti (Grimont *et al.*, 1979; Chung *et al.*, 2013) ed ai nematodi (Rae *et al.*, 2008; Abebe *et al.*, 2011).

Recentemente, batteri del genere *Serratia* sono risultati reciprocamente connessi con nematodi entomopatogeni di recente scoperta quali *Oscheius carolinensis*, *O. chongmingensis* e *O. rugaoensis* (Liu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).La relazione tra i nemotodi entomopatogeni del genere *Oscheius* e il genere batterico *Serratia* presenta molte analogie con i rapporti che gli Steinernatidae e gli Heterorhabditis hanno con i loro batteri simbiotici, *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, rispettivamente.

Le specie di *Serratia* associate alle specie di *Oscheius*, secernono vari metaboliti alcuni dei quali possiedono la capacità di uccidere gli insetti ospiti e inibire la crescita di specie batteriche e fungine concorrenti, come ben noto per gli entomopatogeni *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (Whang *et al.*, 2011). Alcune specie di *Serratia* come *S. liquefaciens* sono state trovate associate con *Steinernema* spp o *Heterorhabditis* spp, conservati per diversi anni in condizioni di laboratorio (Boemare *et al.*, 1997), così come *S. proteomaculans* e *S.marcescens* (Gouge & Sndyer 2006).

La specie tipo del genere è *Serratia marcescens* (Bizio, 1823) batterio cosmopolita ampiamente isolato dal suolo, acqua, piante e insetti, con caratteristiche patogene o saprofite (Ovcharenko *et al.*, 2010), in grado di infettare ospiti quali *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777).

Serratia entomophila contiene il plasmide pADAP esprime i geni *sepA*, *sepB* e *sepC*, geni simili ai geni Tc descritti in *P. luminescens* e i geni *xpt* identificati in *X.nematophila*.

S. entomophila e *S. proteomaculans* sono responsabili in Nuova Zelanda della “malattia dell’ambra” in *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae), malattia

che causa un'infezione cronica negli intestini delle larve. Dopo ingestione di cellule batteriche patogene, le larve cessano di alimentarsi dopo 2-5 giorni, anche se la morte avviene solo dopo 1-3 mesi dall'infezione iniziale (Jackson *et al.*, 1993).

2.4. Biosaggi di laboratorio con batteri entomopatogeni

I biosaggi con batteri entomopatogeni che agiscono per ingestione sono normalmente attuati mediante test di tossicità in cui gli insetti vengono alimentati con diete in cui sono stati previamente incorporati i prodotti batterici. Importanti parametri per i biosaggi sono la qualità degli insetti, le preparazioni e quantificazioni dei prodotti batterici ed il sistema di somministrazione della dieta trattata.

Gli insetti impiegati, normalmente derivano dall'allevamento in laboratorio, in quanto in tali condizioni di solito presentano caratteristiche standardizzate e sono disponibili tutto l'anno.

Un altro aspetto importante riguarda la preparazione, quantificazione e standardizzazione del materiale da saggiare che nel caso dei batteri è rappresentato ad esempio da cellule, spore, frazioni solubili, inclusioni proteiche di varia origine. In passato, diversi sforzi sono stati compiuti per quantificare le miscele di spore e cristalli di *B. thuringiensis* (Burgerjon, 1959). La conta delle spore, ampiamente utilizzata in precedenza, in seguito alle acquisizioni sulle tossine insetticide, è stata sostituita dal potere insetticida. Nel 1966 dopo il "Colloquium of Insect Pathology and Microbial Control at Wageningen (The Netherlands)", la formulazione E-61 del Institute Pasteur (Parigi, Francia) è stata adottata come standard al quale venne attribuita una potenza di 1000 Unità Internazionali (IU)/mg. Più tardi, nel 1971, venne sostituita dal nuovo standard HD-1-S-1971, al quale fu assegnata una potenza di 18000 IU/mg e nel 1980 dallo standard HD-1-S-80 con una potenza di 16000 IU/mg. Diverse procedure standardizzate di biosaggio sono inoltre state proposte durante gli anni (Dulmage *et al.*, 1971). Nel caso di *B. thuringiensis* var. *israelensis* la potenza dei preparati veniva espressa in Unità Tossiche Internazionali (ITU) in comparazione con il ceppo standard IPS 83. Allo stato attuale, diversi formulati commerciali riportano sia il numero di spore-cristalli per unità di volume che la relativa potenza espressa in Unità Internazionali. Tuttavia, in seguito alle conoscenze sui reali fattori di tossicità, oggi si fa riferimento alle concentrazioni proteiche letali (es. CL_{50}) delle delta-endotossine.

Benché i formulati a base di *B. thuringiensis* siano fondamentalmente basati su miscele di spore e cristalli, i biosaggi di laboratorio vengono eseguiti utilizzando diversi tipi di preparati batterici includendo le stesse miscele di spore e cristalli, le spore, i cristalli e varie soluzioni contenenti tossine batteriche. Per i biosaggi si può utilizzare sia il cibo naturale degli insetti che una dieta artificiale. L'uso di una dieta artificiale oltre ad essere più semplice, consente di utilizzare del materiale standardizzato e disponibile in ogni momento dell'anno. Esiste una notevole varietà di tipi di biosaggio, in funzione delle diverse informazioni che si vogliono ottenere su un determinato ceppo batterico od una sua frazione (Navon, 2000).

“Dose-response” è il più comune tipo di biosaggio impiegato nei casi in cui la mortalità è registrata dopo un breve periodo di tempo. Nei casi invece, in cui la mortalità si registra dopo un maggiore periodo di tempo (es. qualche giorno) si fa riferimento al test “time-response”.

Gli effetti sub-letali sugli insetti sono di solito determinati mediante esposizione continua degli insetti a basse concentrazioni di tossine nelle diete o tramite l'esposizione per un limitato periodo di tempo. I vari parametri studiati con questo tipo di biosaggi sono i tempi di sviluppo larvale e pupale, la percentuale di impupamento, il peso pupale, il tasso di emergenza degli adulti, fecondità e fertilità, longevità. Possono inoltre essere considerati gli effetti sulle generazioni successive.

2.5 Altri entomopatogeni: funghi e virus.

2.5.1. I funghi entomopatogeni

I funghi entomopatogeni sono particolarmente interessanti per la loro attività naturale di controllo nei confronti di artropodi dannosi in ambiente agrario e forestale, e per la possibilità di essere impiegati in programmi di lotta biologica.

In particolare, i funghi Deuteromiceti sono da tempo noti per il loro potenziale nei confronti di mosche in condizioni di laboratorio e di campo (Vega *et al.*, 2012). I generi più importanti di funghi entomopatogeni sono rappresentati da *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Coelomyces*.

I primi due sono costituiti da funghi imperfetti, vale a dire che non sono noti i corpi fruttiferi principali. Sono relativamente specifici come entomopatogeni, e

pertanto si raccomanda di usarli in *habitat* estremamente limitati con particolari caratteristiche ecologiche.

Le *Entomophthoraceae*, altamente specifiche per quanto riguarda l'ospite, sono responsabili delle epidemie autunnali delle mosche domestiche (*Entomophthora muscae*) e delle larve di nottuidi quali *Panolis flammea* (Denis & Schiffermuller, 1775), *Agrotis segetum* (Denis & Schiffermuller, 1775).

I conidi di *Entomophthora* sono molto delicati e le condizioni di coltivazione su substrati artificiali sono spesso difficili. La commercializzazione è ostacolata dal fatto che, essendo patogeni obbligati, hanno notevoli esigenze ecologiche.

I *Coelomyces* sono funghi che vivono in acqua e aggrediscono pressoché solo le larve dei nematodi (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*).

Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith sono stati riconosciuti come alcuni degli entomopatogeni più importanti di ditteri (Steinkraus *et al.*, 1990; Kuramoto e Shimaku, 1992; Samson *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1995).

I funghi, oltre ad essere efficaci anche in stadi di vita più avanzati, hanno la possibilità di agire per contatto, aderendo alla superficie esterna del corpo dell'insetto in forma di spore microscopiche. Infatti le loro ife possono penetrare attraverso lo scheletro chitinoso degli insetti adulti attraverso un'azione combinata meccanica e enzimatica. Successivamente diffonde nel corpo dell'insetto per poi fuoriuscire con i propri forpi fruttiferi e conidi aeriferi responsabili della diffusione del patogeno nell'ambiente circostante. La morte dell'insetto può sopraggiungere dopo qualche giorno, con un tempo variabile a seconda del tipo di fungo e del numero di spore infettanti.

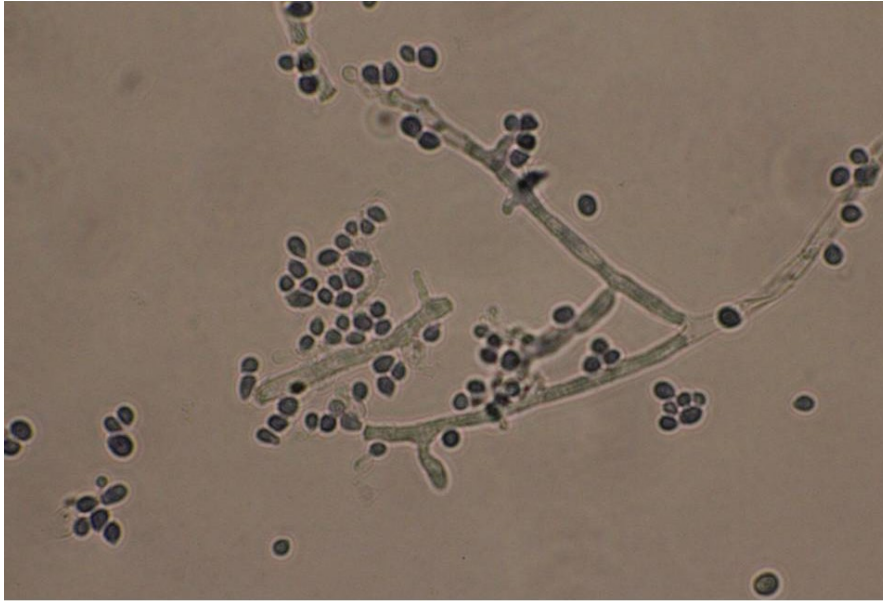


Fig. 2.8 - Conidi e conidiofori di *Beauveria bassiana*

2.5.2. Virus entomopatogeni

Un gran numero di virus si offrono come potenziali agenti di controllo di insetti (Payne, 1982). Tuttavia quelli con maggior potenziale microbico sono i *Baculiviridae* [NPV] e i *Granulovirus* [GV] (Granados & Federici, 1986; Hunter-Fujita *et al.*, 1998).

Dei numerosi virus che colpiscono gli artropodi, solo i membri della famiglia *Baculoviridae* trovano applicazione come insetticidi biologici. Più di 400 specie di insetti, soprattutto Lepidotteri e Imenotteri, sono stati segnalati come ospiti di *Baculovirus* (Granados & Federici, 1986; Tanada e Hess 1991; Tanada & Kaya 1993). Magnoler, negli anni '60-'70, fu il pioniere in Italia, nell'impiego di *Baculovirus*, tutelando efficacemente e a costi molto bassi alcune sugherete sarde con larve di *L. dispar* e *M. neustria* infettate da virus e raccolte in natura. Seguì Cavalcaselle sperimentando un NPV proveniente dal Canada contro *Neodiprion sertifer* Geoff. dimostrandone la possibilità di trasmissione alle successive generazioni (Triggiani, 2009).

Il genere *Baculovirus* è suddiviso in tre sottogruppi: A, B e C. Alla prima suddivisione appartengono i virus della Poliedrosi Nucleare (NPV), al sottogruppo B i virus della Granulosi (GV) e al sottogruppo C, i virus privi di Corpi di Occlusione (NOBV).

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

La struttura del virione, di forma bastoncellare e dotato di una membrana lipoproteica esterna, è comune a tutti i membri della famiglia. Nella maggior parte dei *Baculovirus*, i virioni sono inglobati in una matrice proteica di struttura cristallina (corpo d'occlusione), in maniera individuale (GV) oppure in numero anche elevato (NPV). Il corpo d'occlusione ha la funzione di proteggere i virioni, che sono estremamente sensibili alla luce ultravioletta.

Gli NPV sono stati sinora isolati da circa 500 specie di insetti (Lepidotteri ed Imenotteri), i GV sembrano essere associati esclusivamente ai Lepidotteri, mentre i NOBV sono risultati attivi contro alcune specie di Coleotteri Scarabeidi.

Questi virus, agiscono solo per via perorale, cioè per ingestione, permettendo ai corpi occlusivi di giungere nell'ambiente alcalino dell'intestino dell'ospite che grazie alle proteasi alcaline contenute nei succhi digerenti, si dissolvono liberando le particelle virali nel mezzo. In questo modo, i virioni contaminano le cellule epiteliali riproducendosi a loro spese, per poi penetrare nell'emocele estendendo l'infezione a tutti gli altri tessuti. Gli insetti colpiti manifestano inizialmente una diminuzione dell'attività trofica e motoria per poi risultare particolarmente soggetti a patologie di origine batterica e micotica. Infine, le larve colpite smettono di alimentarsi per poi morire nel giro di 3-5 giorni.

3. Insetti target

Insetti di interesse agrario

3.1. *Ceratitis capitata*



Fig. 3.1 Adulto di *Ceratitis capitata* (Femmina)

3.1.1. Posizione tassonomica, morfologia e identificazione

La Mosca mediterranea della frutta (*Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824) è un insetto fitofago dell'ordine dei Ditteri Brachiceri (Sezione Cyclorrhapha Schizophora, sottosezione Acalyptratae, famiglia Tephritidae). La sua larva si sviluppa come carpofago e polifago all'interno della polpa di molti frutti. È una delle avversità economicamente più rilevanti a carico della frutta estiva prodotta in ambiente mediterraneo. Il genere comprende 79 specie secondo Wiedemann (78 secondo Mackleay, 1829) e si suddivide in 6 sottogeneri: *Acropteromma* (una specie), *Ceratalaspis* (34 specie), *Ceratitis* (8 specie), *Hoplolophomyia* (una specie), *Pardalaspis* (10 specie), *Pterandrus* (24 specie).

La mosca mediterranea della frutta è un insetto caratterizzato da una metamorfosi completa con quattro distinti stadi: uovo, larva, pupa e adulto.

L'adulto di *C. capitata* ha dimensioni variabili dai 4 ai 6 mm. Il capo è ipognato, emisferico, diviso in regioni da solchi e suture e provvisto di occhi voluminosi di colore verde. In due solchi si trovano le antenne tipicamente aristate,

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

che sono più brevi del capo e leggermente pelose. Sul capo del maschio sono presenti due lunghe setole ingrossate all'apice a forma di spatola grigio-brunastre. Da queste spatolette sono derivate sia il nome generico che quello specifico (da *kera*= corno in greco e *capitato*= a testa grossa, in latino). Hanno forse un ruolo nella comunicazione sonora o visiva (Stoffolano & Mazzini, 1988).

L'apparato boccale è lambente succhiante, simile a quello dei ditteri muscidi. Il torace presenta un protorace poco evidente, un mesotorace molto sviluppato su cui si articolano le ali e un metatorace ridotto su cui sono presenti i bilancieri. Le zampe non presentano aspetti particolari o tipici mentre le ali, membranose, presentano caratteristiche macchie di colore giallo ocraceo.

L'addome è tipicamente tondeggiante e termina a punta, è costituito da dieci segmenti (uriti) riuniti in pre-addome e post-addome, quest'ultimo comprendente le strutture riproduttive. Si distingue per una colorazione giallo aranciata con barrature trasversali grigio argenteo. Nel maschio troviamo cinque segmenti distinti, al nono, chiamato ipandrio, si collega l'organo copulatore formato a sua volta da due parti.

Nella femmina il VII, l'VIII e il IX urite vanno a formare l'ovopositore di sostituzione (derivante dall'allungamento telescopico degli ultimi uriti). Il VII segmento si chiama oviscapo e rappresenta la parte non retrattile dell'ovopositore. L'ottavo urite è un tubo membranoso, chiamato membrana di inversione, che connette l'oviscapo all'aculeo. L'urite terminale (chiamato aculeo) è molto sclerificato e quando si trova a riposo non è esterno ma introflesso nell'oviscapo.

L'uovo si presenta di forma più o meno allungata e di colore biancastro, le estremità possono essere entrambe affusolate oppure una arrotondata e una appuntita

La larva assume lunghezze variabili (7-9 mm), ma le dimensioni possono variare notevolmente in funzione della disponibilità alimentare. Dal punto di vista strettamente morfologico si definisce apoda, microcefala, conica, allungata con l'estremità anteriore affusolata e quella posteriore tronca. Nella parte anteriore del capo (maschera facciale), sono presenti delle strutture sensoriali e l'apparato boccale, costituito a sua volta dall'apertura orale, dagli uncini boccali e da formazioni membranose dette lobi, che hanno la funzione di convogliare il cibo all'interno della cavità orale. Le larve sono anfipneustiche, gli spiracoli anteriori sono collocati sul primo segmento toracico, mentre quelli posteriori, che presentano tre aperture ciascuno, si trovano sull'ultimo urite addominale.



Fig. 3.2 - Larve di *Ceratitidis capitata*

La pupa è racchiusa all'interno di un pupario di colore rosso mattone, subcilindrico con le due estremità arrotondate e con evidenti linee trasversali di segmentazione, lungo 4-5 mm. In alcuni ceppi vi sono differenze nella colorazione tra i due sessi.

3.1.2. Biologia

Il tefritide è ampiamente diffuso nell'Africa subsahariana, dove forse si è originato, in tutto il Bacino del Mediterraneo (comprese la Francia e gli Stati Balcanici fino all'Ungheria), nel Vicino Oriente, Arabia, nel Centro e Sud America, nell'Australia occidentale e nelle Hawaii. In Europa fu segnalato per la prima volta in Spagna nel 1842. In Italia, pur esistendo da tempi probabilmente remoti, è stato segnalato per la prima volta nel 1863 (Fimiani, 1989).

L'analisi genetica ha evidenziato una maggiore variabilità delle popolazioni africane rispetto a quelle europee, confermando l'ipotesi che l'area originaria della specie sia l'Africa e che l'Europa sia solo un'area marginale di diffusione (Gaspari *et al.*, 1991).

La femmina depone le uova preferibilmente su frutti ad alto tenore in zuccheri, a basso grado di acidità e con polpa tenera. Esiste perciò una scala di preferenza che orienta le infestazioni con il procedere della stagione.

Ad esempio, nell'Italia meridionale, in piena estate, gli attacchi s'indirizzano preferibilmente sul pesco, sull'albicocco, sul fico e sulle varietà precoci di pero, mentre in genere è evitato il susino. Nella tarda estate gli attacchi si estendono anche ad altre varietà di pero, al melo, talvolta al susino e all'uva, ma soprattutto al fico d'India e alle varietà precoci di kaki. In autunno gli attacchi proseguono sul fico d'India e sul kaki per passare infine agli agrumi, in particolare il clementine e gli aranci precoci del gruppo Navel (*Naveline*). All'atto dell'ovideposizione, la femmina incurva l'addome, estroflette l'ovopositore e penetra l'epicarpo del frutto, lasciando più uova nella cavità. In genere vengono deposte 4-6 uova per puntura, fino ad un massimo di una decina. Una femmina può praticare anche diverse punture sullo stesso frutto, perciò si possono deporre anche diverse decine di uova in un solo frutto. Nel corso della sua vita una femmina può deporre da poche centinaia fino ad un migliaio di uova, pertanto può attaccare centinaia di frutti.

Le larve si sviluppano all'interno della polpa provocandone il disfacimento. A maturità fuoriescono dal frutto, si lasciano cadere e s'impupano nel terreno. Contrariamente alla mosca dell'olivo, lo stadio di pupa si svolge sempre fuori dal frutto attaccato. La durata del ciclo di sviluppo, dalla deposizione dell'uovo allo farfallamento dipende dalla temperatura e varia da un minimo di 2 settimane (a 29 °C in laboratorio), ad un massimo di 3 mesi (10-12 °C). In condizioni ordinarie, la durata di una generazione estiva è dell'ordine di 20-30 giorni. Sotto i 9 °C l'attività biologica si arresta completamente. Nelle regioni a inverno mite la specie sverna soprattutto allo stadio di pupa nel terreno, ad alcuni centimetri di profondità. Nelle zone agrumicole sverna anche come adulto o come larva negli agrumi. Temperature inferiori ai 2 °C per una settimana provocano la morte delle pupe. Nelle regioni tropicali le generazioni si susseguono ininterrottamente per tutto l'anno.

3.1.3. Dannosità e controllo

Il Dittero vive a spese di svariate specie da frutto comprendenti agrumi, albicocco, pesco, susino, kiwi, kaki, melo, pero, fico, fico d'india, nespolo.

Le larve si sviluppano nella polpa dei frutti causandone il disfacimento.

Nelle arance, le uova e le giovani larve vengono devitalizzate dagli oli essenziali fuoriusciti dalle ghiandole oleifere lesionate dall'ovopositore, ma intorno alla punture compare una macchia marcescente che poi finisce per estendersi alla

restante parte della buccia, coinvolgendo più tardi anche la polpa. Maggiormente suscettibili sono mandarini, clementine, arance precoci “Navelina” e “Tarocco nocellare”.

In Italia le infestazioni sono frequenti nelle regioni meridionali e centrali, in quelle settentrionali sono più saltuarie e avvengono in genere in settembre-prima metà di ottobre. In queste zone le infestazioni interessano le pesche settembrine, le pere, le mele “Golden delicious” e, soprattutto, il Kaki.

La difesa dei fruttiferi nei confronti della *Ceratitis* si è sempre rivelata problematica.

La lotta chimica richiede l'impiego di principi attivi ad azione citotropica, in grado di penetrare nel frutto e svolgere la loro azione preventiva o curativa nei confronti delle larve neonate. Di nessuna utilità è il trattamento larvicida nei confronti delle larve che hanno già intrapreso lo sviluppo in quanto il danno si è ormai già verificato.

Una valida alternativa è rappresentata dalla lotta adulticida mediante l'impiego di esche proteiche avvelenate. Effettuato su grandi superfici ha sempre offerto risultati migliori dei trattamenti larvicidi. In questo caso s'interviene con irrorazioni localizzate (ad esempio a filari alternati su parte della chioma) di prodotti a base di proteine idrolizzate ed un insetticida (es. estere fosforico o piretroide). Gli adulti sono attirati dall'attrattivo alimentare e vengono uccisi prima della riproduzione. La lotta con le esche si rivela efficace se condotta su grandi superfici e molto precocemente, alla comparsa dei primi adulti. Infatti, almeno in linea teorica, il contenimento delle ovideposizioni della prima generazione permette di mantenere basso il livello delle infestazioni.

Tra i mezzi di controllo biotecnici, vanno menzionati la tecnica del maschio sterile ed il *mass trapping*. La tecnica del maschio sterile o lotta autocida o SIT (*Sterile Insect Technique*) consiste nella liberazione di un numero elevato di maschi allevati in cattività e sterilizzati con raggi gamma, ma lasciati attivi nella loro competitività con i maschi naturali (definiti *selvatici* o *selvaggi*). Una femmina si accoppia in genere una sola volta, perciò l'elevato numero di maschi sterili riduce nel complesso la fecondità della popolazione e, quindi, il potenziale riproduttivo. Affinché la competizione sia efficace, è necessario mantenere un opportuno rapporto numerico fra maschi sterili e maschi selvatici. La tecnica è stata impiegata con successo in

sperimentazioni in ambiente confinato soprattutto se attuata sulle prime generazioni, quando il potenziale biologico della specie è ancora basso per la ridotta densità di popolazione. Naturalmente il contenimento della popolazione nelle prime generazioni ha un effetto preventivo impedendo la pullulazione nelle generazioni successive.

Il *mass trapping* si pratica con la dislocazione di un elevato numero di trappole (es. una per pianta), innescate con attrattivi chimici. Fra gli esempi di trappole, si possono citare le tavolette di legno imbevute di una soluzione di deltametrina oppure tavolette di plexiglas trasparenti cosparse di collante (vischio entomologico). In generale il *mass trapping* non permette da solo un controllo efficace delle popolazioni di questo insetto, se non in condizioni particolarmente favorevoli. Va comunque considerato come un componente importante nei programmi di contenimento integrato,

L'uso delle trappole è largamente impiegato per il monitoraggio della densità di popolazione, fondamentale per la determinazione delle soglie di intervento con i mezzi chimici. Fra le trappole impiegate a questo scopo, le tavolette in plastica trasparenti e bianche, cosparse di colla ed innescate con attrattivi alimentari o sessuali. Alcuni invece sconsigliano le trappole cromotropiche, che essendo poco selettive attirano anche insetti utili.

Fra gli attrattivi impiegabili per la *Ceratitis*, i paraferormoni, ossia principi attivi sintetici che svolgono un'azione di attrazione nei confronti dei maschi. Largamente usato è il t-butil-2-metil-4-clorocicloesancarbossilato (nome commerciale Trimedlure). Fra gli attrattivi alimentari, le esche proteiche, ossia proteine idrolizzate che attirano anche le femmine, ed i sali ammoniacali. Spesso, per aumentare l'efficacia, gli attrattivi alimentari vanno impiegati in combinazione tra loro (esche proteiche con sali ammoniacali) oppure con il ferormone sessuale.

La maggiore efficacia nel controllo di questa specie, in relazione anche alla riduzione dell'impatto ambientale, consiste nell'integrazione dei diversi metodi di contenimento, seguendo i principi del Integrated Pest Management (IPM).

Importanti anche l'adozione di misure di profilassi tese a impedire la diffusione dei focolai d'infestazione come la costituzione di barriere commerciali, impiegata da alcuni paesi (es. Giappone, Corea del Nord) con embarghi che impediscono l'importazione di frutta proveniente da Paesi che non applicano un efficace controllo.

Negli Stati Uniti è stata adottata in passato nei confronti del clementine spagnolo dopo l'eradicazione della mosca in California.

Fino ad ora, l'impiego di metodi di lotta biologica non hanno offerto reali prospettive di successo. Pur avendo diversi antagonisti naturali, il potenziale biologico di questa specie è assai alto e solo in contesti particolari gli ausiliari possono esercitare un'efficace azione di controllo

Nel bacino del mediterraneo non esiste un vero e proprio antagonista ausiliario che possa svolgere un ruolo significativo nella lotta biologica. Contribuiscono al contenimento delle popolazioni alcuni microrganismi e alcuni predatori occasionali. Fra i parassitoidi è stata segnalata l'azione di *Opius concolor* (Hymenoptera Braconidae) e di *Pachyneuron vindemmiae* (Hymenoptera Pteromalidae) nel Nord Africa e in Medio Oriente. La prima specie è stata peraltro impiegata in programmi di lotta biologica.

Insetti di interesse medico-veterinario

3.2. *Musca domestica*

La Mosca domestica (*Musca domestica* Linneo, 1758) è un insetto dell'ordine dei Diptera, appartenente alla famiglia delle Muscidae, comprendente più di 60 specie.

Originario dell' Asia centrale questo insetto infestante si riscontra in tutti i continenti abitati, in tutti i climi da tropicale a temperato, e in una grande varietà di ambienti che vanno da rurale a urbano.

Questa specie si trova sempre in associazione con gli esseri umani e le loro attività, presente in ambienti di vario tipo, come aziende zootecniche, discariche, industrie, magazzini di stoccaggio e abitazioni, o cmq ovunque ci siano sostanze organiche in decomposizione, alimentandosi principalmente di carboidrati che forniscono alle femmine le proteine necessarie alla deposizione delle uova.

3.2.1. Ciclo biologico e morfologia

La *M.domestica* è un insetto olometabolo, compie una metamorfosi completa in 4 stadi: uovo, larva, pupa e adulto. L'intero ciclo biologico delle mosche ha una durata che può variare da 8-10 a 45-50 giorni e la metamorfosi dipende principalmente dalla temperatura (quella ideale è di 25°-30°C).

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

Si riproduce molto velocemente e utilizza vari substrati: feci, cadaveri e altri materiali organici in decomposizione; E' vettore di numerosi agenti patogeni responsabili di malattie dell'uomo e degli animali come tifo, colera, salmonellosi, tubercolosi, infezioni degli occhi e vermi endoparassiti (specialmente nelle regioni più povere e con scarso livello di igiene).

Infatti essa trae nutrimento da sudore, sangue e vari fluidi corporei e contemporaneamente trasporta microrganismi provenienti da substrati putrescenti.

Le uova sono di colore bianco-lucido, di forma cilindrica e lunghe circa 1,2 mm, vengono deposte vicino, in modo da costruire dei gruppi o ammassi nella sostanza prescelta, in numero di 75-150 uova in un periodo di 3- 4 giorni.

Il numero di uova prodotte è una funzione della dimensione femminile che, in sé, è principalmente un risultato di nutrizione larvale. Produzione massima di uova avviene a temperature intermedie, da 25 a 30 ° C.

Dato che una femmina può ripetere l'operazione, a distanza di tempo, 5 o 6 volte nel corso della sua vita, la fecondità della singola femmina può oscillare fra le 600-900 uova. Le larve appena schiuse, iniziano immediatamente l'alimentazione sviluppandosi nel materiale in cui è stato deposto l'uovo. Variano dai 3-9 mm di lunghezza, di colore bianco-crema, si sviluppano in tre età e inizialmente non possiedono stigmi anteriori, hanno una forma cilindrica che tende ad assottigliarsi verso la testa. Quest'ultima contiene una coppia di ganci scuri. Gli spiracoli posteriori sono leggermente sollevati e le aperture spiraculari sono fessure sinuose che sono completamente circondate da un bordo nero ovale. Le larve mature proseguono la crescita impupandosi.

Lo stadio di pupa, lungo circa 8 millimetri, varia di colore dal giallo, rosso, marrone, al nero con l'età della pupa. La forma della pupa è molto diversa dalla larva, essendo bruscamente arrotondata ad entrambe le estremità. Le pupe completano il loro sviluppo da due a sei giorni a 32 a 37 ° C, ma richiedono da 17 a 27 giorni a circa 14 ° C. La mosca emergente fuoriesce dal bozzolo attraverso la rottura della capsula pupale.

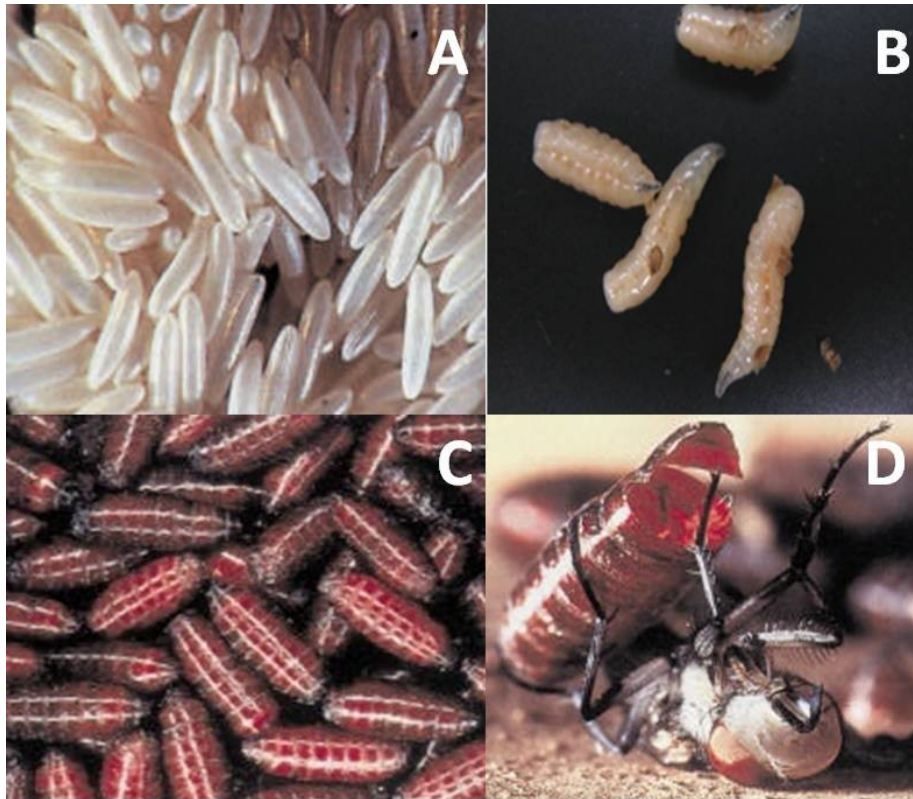


Fig. 3.3 - A: uova di *M.domestica*; **B:** Larva di *M.domestica*; **C:** Puppe di *M.domestica*; **D:** adulto in fase di sfarfallamento.

L'adulto si presenta con l'addome di colore grigio, il torace è dello stesso colore con quattro strisce nere ben distinte; ha un apparato boccale succhiatore non pungente, provvisto di labello. La caratteristica del loro apparato boccale e il continuo peregrinare alla ricerca di substrato organico sul quale posarsi per deporre le uova o per nutrirsi, rendono questo insetto il veicolo principale della diffusione del tifo, peste, lebbra, colera e altre pericolose epidemie.

Gli individui adulti sono di taglia media 6-7 mm, con la femmina di solito più grande del maschio, distinguibile dal maschio per l'ampio spazio tra gli occhi. Presentano un corpo suddiviso in tre parti: il capo, il torace e l'addome.

Il capo presenta due grandi occhi composti e l'apparato boccale provvisto di una proboscide con un rostro basale, l'haustellum e un labello terminale (una struttura allargata che presenta due lobi), utili per raschiare il cibo e dirigere i fluidi verso la cavità boccale.

Nel torace sono situate le ali, i bilancieri e le zampe; L'addome è suddiviso in vari segmenti che terminano con delle strutture di supporto per gli organi genitali.

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
 Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
 Università degli Studi di Sassari.

I maschi presentano un edeago parzialmente racchiuso in una tasca genitale, le femmine genitali esterni che formano un ovopositore tubulare.



Fig. 3.4 - Adulto di *Musca domestica*.

Di solito gli adulti vivono da 15 a 25 giorni, ma possono vivere fino a due mesi, senza cibo però sopravvivono solo circa 2-3 giorni. La longevità è esaltata dalla disponibilità di alimento adatto, in particolare lo zucchero.

L'accoppiamento è completato in pochi minuti e la deposizione delle uova inizia da quattro a venti giorni dopo l'accoppiamento.

3.2.2. Dannosità e controllo

Il controllo di *M.domestica* è di vitale importanza per la salute umana in molte aree del mondo.

I danni più importanti relative a questo insetto riguardano il fastidio ed il danno indiretto prodotto dalla potenziale trasmissione di agenti patogeni (virus, batteri, funghi, protozoi, nematodi) associati a questa mosca.

Gli organismi patogeni vengono prelevati dalle mosche, da rifiuti, delle acque reflue e da altre fonti di sporcizia, e poi trasferiti sul loro apparato boccale, attraverso il loro vomito, feci, e parti esterne del loro corpo contaminate, risultando di grande pericolosità parti del per l'alimentazione umana e animale. Di particolare interesse è il movimento delle mosche da animali o feci umane al cibo che sarà mangiato crudo dagli esseri umani.

Tra i patogeni comunemente trasmessi da *M.domestica* si riscontrano la Salmonella, Shigella, Campylobacter, Escherichia, Enterococcus, Chlamydia, e molte altre specie che causano la malattia.

Queste mosche sono più comunemente legate alle epidemie di diarrea e shigellosi, ma sono anche implicate nella trasmissione di intossicazioni alimentari, febbre tifoide, dissenteria,.

Le strategie di controllo per gli adulti comprendono l'uso di trappole che contengono insetticidi esca come zuccheri, feromoni sessuali e varie formulazioni chimiche; Si stanno sviluppando anche bioinsetticidi che sfruttano l'utilizzo di entomopatogeni, di parassiti naturali, di estratti vegetali e di insetti predatori e forniscono strategie alternative all'uso di sostanze chimiche dannose per l'ambiente.

Tra i metodi di contenimento ancor oggi la lotta chimica è di gran lunga il più usato ma la sua efficacia è spesso ridotta a causa dell'insorgenza di fenomeni di resistenza ai principi attivi impiegati.

Le strategie di lotta contro le mosche negli allevamenti devono quindi basarsi principalmente su tecniche di prevenzione, limitando l'impiego di formulati chimici.

Prevenire significa rendere le condizioni ambientali "difficili" per le mosche, mediante una corretta gestione delle deiezioni animali, controllando il livello di umidità del substrato organico, e mediante un'accurata pulizia dei locali poiché anche il mangime, uova rotte, ristagni d'acqua, ecc. possono fornire un ottimo substrato di sviluppo. La prevenzione è importante in quanto, popolazioni non troppo numerose sono sicuramente più facili da contenere, e ancora per evitare di intervenire con provvedimenti urgenti quando il problema è già esploso, nonché ridurre l'inquinamento ambientale e le intossicazioni dovute a prodotti utilizzati per la disinfestazione.

Insetti di interesse forestale

3.3. *Lymantria dispar*

È un insetto dell'ordine dei Lepidoptera (Linneo, 1758), appartenente alla famiglia dei Lymantriidae.

L'areale di diffusione della *L.dispar* si estende dal Nord Africa (Stati Mediterranei) all'Europa occidentale, centrale e meridionale e verso est attraverso la

Russia fino al Giappone. A nord l'areale raggiunge la Svezia centrale e la Finlandia meridionale. La *L. dispar* è stata introdotta dalla Francia nel nord-est degli USA nel 1869 dove a causa della mancanza di nemici naturali, si è liberamente diffusa negli Stati Uniti orientali.

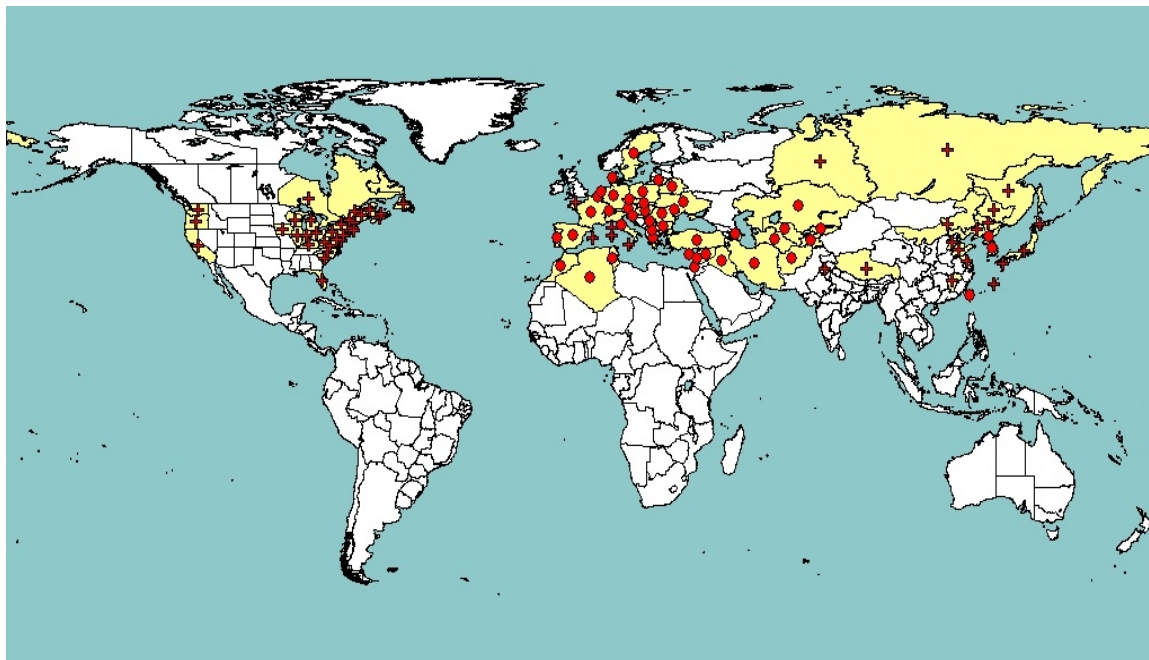


Fig.3.5 - Diffusione mondiale di *L. dispar* (EPPO,2014).

In Sardegna è una delle specie dell'entomofauna fitofaga e rappresenta uno dei principali agenti dannosi del nostro patrimonio boschivo.

Colpisce in particolare le quercete a sughera (*Quercus suber*), a leccio (*Q. ilex*) ed a roverella (*Q. pubescens*) attraverso un'azione defogliante che può causare una notevole riduzione della biomassa fotosintetica delle piante colpite, con conseguente deperimento o addirittura la morte se in concomitanza con altri fattori ecologici sfavorevoli.

L'impatto ambientale determinato dalla massiccia presenza di questo lepidottero risulta di notevole importanza ed ingente è il conseguente danno economico legato alla produzione del sughero stesso, ampiamente sfruttata nella nostra regione.

Le osservazioni effettuate nell'arco di diversi decenni hanno dimostrato che le popolazioni di *L. dispar* sono soggette a fluttuazioni che, da uno stato di latenza, ne portano la densità a superare ciclicamente il livello critico, causando quindi ingenti danni al patrimonio boschivo (Luciano & Prota,1982).

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*
Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo:"Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

Per determinare in che fase della gradazione (aumento del numero di insetti) si trova la popolazione, le aree a rischio di infestazione devono essere tenute sotto controllo.

3.3.1. Morfologia

Lo stadio da adulto è caratterizzato da un dimorfismo sessuale. La femmina si presenta di colore bianco, con ali anteriori biancastre che presentano striature nere trasversali, con un addome ricco di uova e ricoperto di peli fulvi che non le permette di volare e che la rende più grande del maschio, che invece si presenta di color castano-grigiastro, con addome sottile e ali anteriori con fasce scure molto più evidenti.

Le uova si presentano di colore grigio-giallastre, ricoperte di peli che la femmina distacca dall'addome durante l'ovideposizione, di forma ovoidale, sono lunghe mediamente 30 mm.

Le larve neonate sono nere e presentano speciali setole dilatate, chiamate aerostatiche, importanti per la loro dispersione per mezzo del vento. Le larve mature risultano pelose, di colore grigiastro con 6 tubercoli per segmento presentanti setole. I tubercoli dorsali risultano blu nei primi 5 segmenti, verso il capo, e rossastri verso la parte posteriore del corpo; a maturità possono raggiungere i 70-80 mm di lunghezza, in particolare quelle che danno origine a femmine.

Le crisalidi, di colore bruno, sono collegate al substrato scelto dalla larva per impuparsi da una rete sericea piuttosto resistente. La lunghezza oscilla dai 20 ai 40 mm a seconda del sesso, in quanto quelle dei maschi risultano essere più piccole.

3.3.2. Ciclo biologico

L. dispar è specie monovoltina, vale a dire con una sola generazione all'anno, il ciclo biologico incomincia con l'ovoposizione che segue allo sfarfallamento degli adulti tra la fine di Giugno e la prima metà di Luglio, anche se possono continuare a sfarfallare fino agli inizi di Settembre. Questa variabilità è in parte da attribuirsi a quella delle condizioni climatiche generali in anni successivi e, a parità di quota, al diverso microclima nelle varie stazioni considerate. In questa fase le femmine adulte depongono, sui tronchi degli alberi o altri substrati, ovature contenenti da un centinaio a più di un migliaio di uova ricoperte da una peluria corporea bruna che servirà da protezione.

La *L. dispar* sverna nelle ooteche sotto forma di piccole larve completamente sviluppate che fuoriescono in Primavera, contemporaneamente all'emissione delle foglie. Queste rimangono gregarie per 2- 3 giorni sulla ovatura vuota per poi migrare sulla chioma dell'albero dove si appendono tramite dei filamenti sericei iniziando a cibarsi delle foglie: se il vento è abbastanza forte i filamenti si rompono e le larve vengono trasportate sugli alberi vicini.

Questo, rappresenta la modalità naturale di diffusione più importante per questa specie e dato che le femmine adulte non volano, possono essere ritrovate in tutti gli strati della foresta, sul suolo e nelle aree vicino al bosco.

Lo sviluppo dei bruchi prosegue attraverso una serie di stadi larvali (5 o 6 per i maschi e 6 o 7 per le femmine) intervallati da mute in cui l'esoscheletro viene sostituito da uno più grande. Tra maggio e l'inizio di luglio le larve giungono a maturità e consumano una quantità maggiore di fogliame rispetto ai primi stadi: è appunto nel mese di Giugno che si verifica la maggior parte della defogliazione.

Lo sviluppo larvale dura da 6 a 12 settimane, da Aprile fino alla fine di Giugno. A maturità le larve si ancorano, spesso in gruppi, nelle screpolature della corteccia del fusto, a livello della chioma, sui rametti e sulle foglie, oppure nelle porzioni basali a livello del suolo, per poi impuparsi.

L'impupamento dura da 2 a 3 settimane, mentre lo sfarfallamento dura, a seconda delle condizioni meteorologiche, da Luglio alla fine di Settembre. Dopo lo sfarfallamento i maschi volano secondo traiettorie casuali finché percepiscono la presenza di feromone, dopodiché proseguono il proprio volo per localizzare la femmina e cominciare la fase dell'accoppiamento.

L'accoppiamento avviene di norma nello stesso giorno dello sfarfallamento. I maschi sono in grado di accoppiarsi più volte. Dopo alcune ore le femmine depongono le uova in una unica ovatura (soprattutto di notte) coprendole e conferendo all'ovatura conferisce all'ovatura un aspetto spugnoso.

Il numero di uova deposte, che può variare tra 100 e 1.000, dipende dall'offerta di cibo e dalla fase di infestazione e il maggior numero di uova viene deposto nel primo giorno. L'ovideposizione dura circa una settimana, dopo di che la femmina muore.

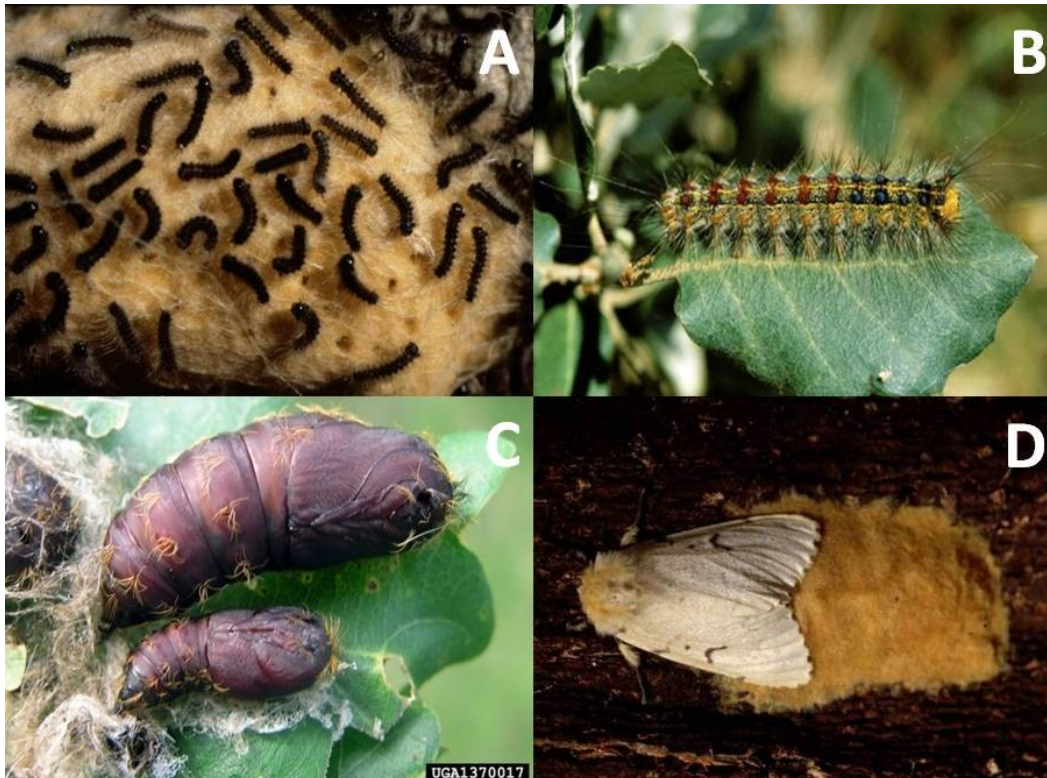


Fig. 3.6 - **A:** Larve di *L.dispar* di I età, **B:** Larva matura di *L.dispar* **C:** Pupario di *L.dispar*, **D:** Femmina di *L.dispar*.

3.3.3. Dannosità e controllo

Le larve di *L. dispar* sono estremamente polifaghe attaccando un vasto numero di specie molto diverse, soprattutto latifoglie, preferendone alcune che permettono un più veloce sviluppo manifestando un'elevata fecondità delle femmine.

La quercia è la specie più frequentemente colpita, ma ripiega anche sulle conifere in caso di mancanza di cibo, in quanto in queste non riesce a prosperare.

È un insetto innocuo per l'uomo, anche se nelle persone sensibili esiste un certo rischio di irritazione della pelle dovuta alle setole delle larve ed in caso di una pullulazione le larve possono diventare un disturbo per case e giardini situati nei pressi di un bosco, dove, con l'esplosione della popolazione, questi si possono diffondere in massa su muri, pilastri e fusti di alberi alla ricerca di cibo, defogliando colture e piante ornamentali.

La *L. dispar* ha un elevato numero di nemici naturali, molti dei quali contribuiscono alla fine di una pullulazione. Durante il periodo di latenza sono in grado di agire permettendo che le popolazioni di *Lymantria* non si moltiplichino liberamente.

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

La lotta a questo Lepidottero può essere affrontata sia mediante l'impiego di insetticidi (solo in situazioni particolari e dopo un'attenta scelta del principio attivo), sia attraverso mezzi biotecnici, come per esempio i feromoni ma, soprattutto con la lotta microbiologica basata sull'utilizzo del *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Come già detto, il *B. thuringiensis* è un batterio sporigeno che vive nel terreno, che attraverso l'ingestione da parte dell'insetto sporula nell'intestino dell'ospite liberando le tossine in grado di danneggiare il tratto digerente delle larve, portandole alla morte.

Parassitoidi quali Tachinidi e Braconidi sono importanti parassitoidi della *L. dispar*. Ad esempio il Tachinide *Parasetigena silvestris* (Robineau-Desvoidy, 1863) reagisce molto velocemente all'aumento della popolazione della specie ospite, il che si evidenzia con un elevato grado di parassitizzazione delle larve. Le larve di queste mosche si sviluppano all'interno dell'animale ospite. Le larve e gli adulti dei coleotteri Carabidi rappresentano i più importanti predatori delle larve e delle pupe di *L. dispar*.

Soprattutto il *Calosoma sycophanta* (Linneo, 1758), una specie di coleottero che si trova con estrema difficoltà nella fase di latenza della *Lymantria*, reagisce molto velocemente a una abbondante offerta di cibo con una forte proliferazione.

3.4. *Malacosoma neustria*

La *M. neustria* (Linneo, 1758) è un insetto dell'ordine dei Lepidoptera, famiglia Lasiocampidae (Harris, 1941).

È diffusa in Europa ed in Asia. In Italia è presente in tutte le regioni, attaccando numerose latifoglie forestali e diverse piante da frutto e nel caso di forti infestazioni, più frequenti in Sud Italia ed in Sardegna, si segnalano defogliazioni anche totali.

In Sardegna la *M. neustria* attacca principalmente le sugherete, dove in popolazioni miste con la *L. dispar* determinano defogliazioni anche totali. Sono dei divoratori di foglie insaziabili e nella loro alimentazione poco selettivi, sono in grado infatti, di attaccare il leccio, la roverella, la sughera e la maggior parte degli alberi da frutto (ciliegio, pero, melo).

3.4.1. Morfologia

Gli adulti presentano un'apertura alare di circa 3-4 cm. Le ali anteriori, di colore nocciola rosato sono caratterizzate da un gallone più scuro che ha suggerito il nome volgare di *Bombice gallonato*. I maschi, più piccoli delle femmine sono identificabili per le antenne bi-pettinate.

Le uova vengono deposte sulle piante ospiti in caratteristiche ovature monostratificate prive di protezione e costituenti dei manicotti biancastri intorno ai rametti di uno o due anni, contenenti ciascuno da 50 a 400 uova.

Il bruco, lungo circa 5 cm, presenta il capo azzurro ed il corpo ricoperto da peli, ma non urticanti, percorso da linee parallele longitudinali blu, rosso mattone, bianco, nero e giallo. Queste formano nidi sericei, entro cui si rifugiano nelle ore notturne per poi, dopo la terza muta, separarsi e diffondere sulle fronde per continuare l'azione trofica ai danni dell'apparato fogliare.

3.4.2. Ciclo biologico

Gli adulti compaiono in Giugno-Luglio, deponendo le uova in manicotti attorno ai rametti. Durante il giorno rimangono immobili sui tronchi e sui rami per attivarsi durante la notte.

Le 100-400 uova così deposte da ogni femmina trascorrono l'inverno e agli inizi della primavera nascono le larve, che fino alla terza muta presentano un comportamento gregario vivendo entro nidi formati da tela sericea biancastra.

A seguito della terza muta si diffondono nelle piante ospiti fino al raggiungimento della maturità, impupandosi tra le screpolature dei rami e del tronco e tra le foglie danneggiate.

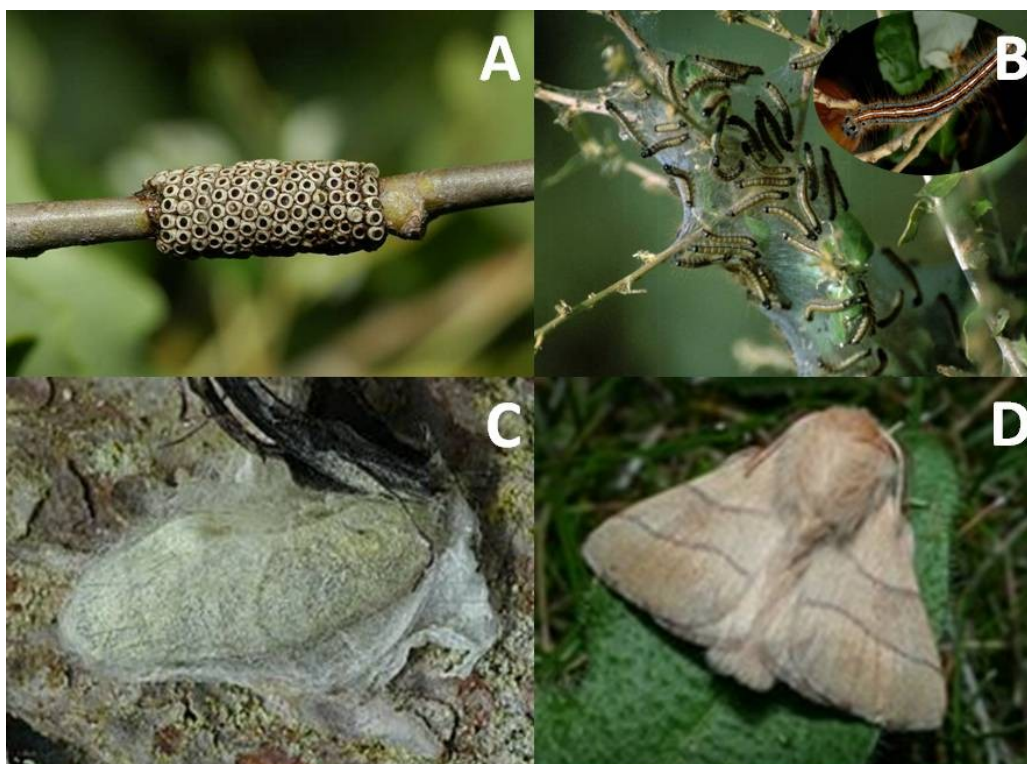


Fig. 3.7 - A: ovatura di *M.neustria*, **B:** Larve mature di *M.neustria*, **C:** Pupario di *M.neustria*, **D:** Adulto di *M.neustria*.

3.4.3. Dannosità e controllo

I danni provocati da questa specie possono portare alla completa defogliazione di intere aree forestali.

La *M.neustria* non è dannosa per la salute umana ed un eventuale uso di prodotti chimici deve essere valutato con estrema cautela, in quanto potrebbe interferire negativamente sugli equilibri biologici esistenti, distruggendo non solo i Lepidotteri ma anche buona parte dell'entomofauna forestale.

La lotta biologica, microbiologica e biotecnica, si è rivelata utile nel risolvere il problema. I diversi metodi includono il rilascio dei nemici naturali (ad esempio parassitoidi), l'uso di insetticidi ad ampio spettro (Wieber *et al.*, 1995): (Berry *et al.*, 1993), come il diflubenzuron, e l'applicazione di microrganismi entomopatogeni quali funghi (Pilarska *et al.*, 2006) e batteri (Glare & O'Callaghan, 2000).

Attualmente, è consentito l'uso di alcuni formulati a base del batterio *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, che consente di effettuare una selezione mirata, risultando poco nocivo per gli insetti utili.

Insetti di interesse merceologico

3.5. *Galleria mellonella*

La *G.mellonella* (Linneo,1758), meglio conosciuta come tarma della cera o camola del miele, si trova negli alveari ad altitudine non troppo elevata e appartiene all'ordine Lepidoptera, famiglia delle Pyralidae.

Le sue larve si nutrono dei favi, distruggendoli e contribuendo alla trasmissione di malattie infettive quali la peste americana, dannosa in genere, solo per gli alveari nei quali le famiglie stanno morendo.

La *G. mellonella* è un insetto olometabolo compiendo una metamorfosi completa in 4 stadi: uovo, larva, pupa e adulto. L'intero ciclo si compie, a seconda delle condizioni, in un periodo variabile dalle sei settimane ai sei mesi, con la capacità di sopravvivere in tutte e tre le forme anche al freddo invernale. Essa predilige temperature elevate (29°-36°C). Le uova sono di colore giallo-biancastro ed hanno forma quasi sferica, sono strettamente incollate le une alle altre in modo da formare così una placca e deposte preferibilmente in fenditure molto strette.

Le larve sono provviste di zampe toraciche e di cinque paia di pseudozampe. L'adulto non assume cibo e le sue parti boccali risultano atrofizzate. Ha una lunghezza di circa 1,5 cm, è di colore grigio, ha ali ripiegate lungo il corpo e in primavera, quando la temperatura mite permette la schiusa dei bozzoli, segue l'accoppiamento e la deposizione delle uova. Le ali nel maschio sono in genere di colore bruno scuro o castano scuro. Le larve appena nate, cercano immediatamente un favo con cui nutrirsi scavando delle gallerie, crescendo sino a raddoppiare il proprio peso in dieci giorni. Si nutrono di impurità della cera, feci e bozzoli delle api fino alla fine dello stadio di sviluppo, quando filano un resistente bozzolo all'interno del quale si compierà la muta in pupa.

Riguardo ai metodi di lotta l'apicoltura tradizionale ne conosce diversi, ognuno in grado di contrastare più o meno efficacemente la diffusione delle larve; il pericolo tuttavia è quello di contaminare la cera dei favi, destinati a contenere miele, con prodotti nocivi. La soluzione ottimale è mantenere i favi ad una temperatura tanto bassa da impedire la schiusa delle uova, ma questo è possibile solo immagazzinandoli in un grande frigorifero (camera fredda) dai costi molto elevati. Un altro metodo di

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

lotta prevede l'utilizzo del *B.thuringensis*, in particolare il ceppo B401, in grado di danneggiare le pareti intestinali della larva provocandone la morte.



Fig.3.8 - Larve e adulto di *G. mellonella*

4. Obiettivi della ricerca

L'obiettivo principale di questa ricerca è stato quello di isolare e di valutare il potenziale insetticida di nuovi batteri entomopatogeni in comparazione con batteri già noti. In particolare sono stati reperiti nuovi isolati batterici provenienti da recenti collezioni della sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia del Dipartimento di Agraria (Università degli Studi di Sassari) e della società di ricerca Bioecopest Srl (Spin Off sostenuto dell'Università degli Studi di Sassari), in aggiunta a quelli ottenuti con nuovi isolamenti condotti durante questo studio. Nuovi ceppi batterici sono stati isolati da insetti infettati con nematodi entomopatogeni. Successivamente, gli isolati batterici sono stati saggiati per verificare l'azione insetticida nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario. Specifiche osservazioni e approfondimenti hanno riguardato gli isolati che sono risultati maggiormente efficaci.

Al tal fine il lavoro si è articolato in tre linee di attività principali.

- 1) Isolamento e identificazione di batteri isolati da larve di *G. mellonella* infettate con nuovi isolati di nematodi entomopatogeni principalmente appartenenti ai generi *Steinernema* e *Heterorhabditis*.
- 2) Allevamento degli insetti
- 3) Bioasaggi di laboratorio su insetti target (*C. capitata*, *M. domestica*, *L. dispar*, *M. neustria*) per valutare i livelli di tossicità per ingestione o per iniezione di preparati batterici appartenenti a collezioni pre-esistenti, ai batteri isolati da larve di *G. mellonella* infettate da nematodi, ed a ceppi di riferimento relativi a batteri entomopatogeni come *B. thuringiensis*, *B. laterosporus* e simbionti di nematodi come *X. nematophila*, *P. luminescens*.

MATERIALI E METODI

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

5. Allevamento degli insetti

5.1. Origine e provenienza degli insetti di interesse forestale: *L. dispar* e *M. neustria*.

Le larve di *M. neustria* di I e II età e le ovature di *L. dispar*, impiegate nei biosaggi di laboratorio sono state raccolte nel mese di Maggio 2014 presso l'agro di Chiaramonti.

Comune: Chiaramonti (SS)

Latitudine: 40.705243°

Longitudine: 8.796224

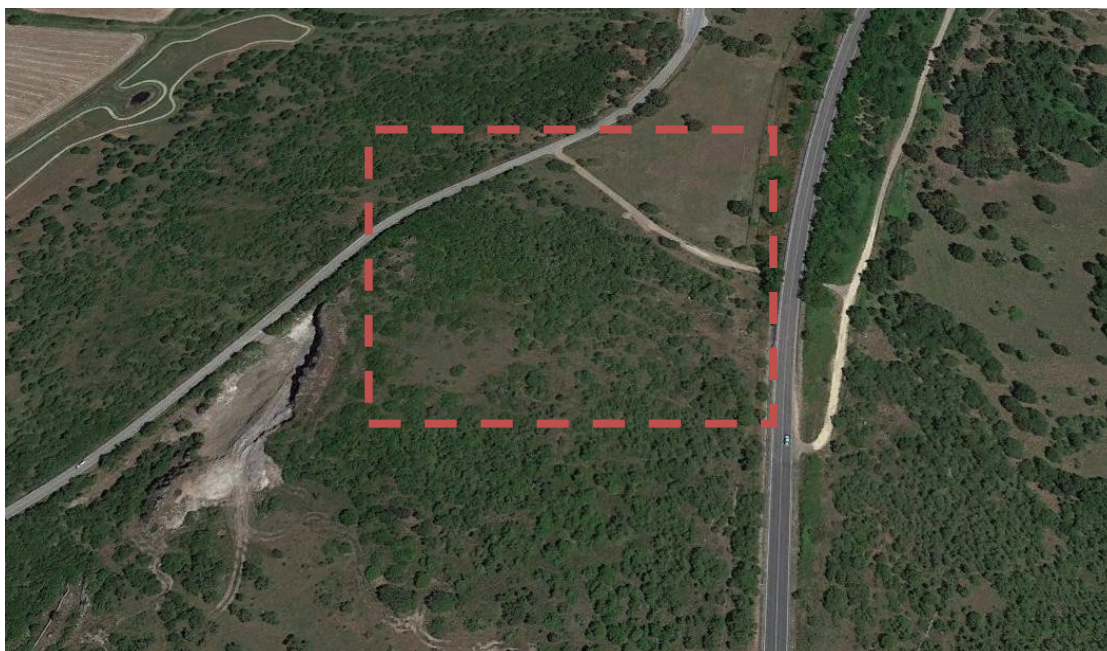


Fig. 5.1 - Zona di campionamento delle larve

Le ovature di *L. dispar* sono state portate in laboratorio per il loro mantenimento finalizzato alla produzione di larve con caratteristiche standard da utilizzare nei biosaggi.

Prima della schiusa, le uova sono state pulite per strofinamento per mezzo di fogli di carta bibula, sterilizzate in superficie mediante immersione in 40-50 ml di una soluzione di Tween 80 (poliossimetilene sorbitano monooleato) e ipoclorito di Na al 10% in acqua distillata per 5 minuti, e successivo lavaggio per 3 volte con acqua

distillata seguito da asciugatura sotto una cappa di aspirazione per 30 minuti (Broderick *et al.*, 2000).

La dieta artificiale (Diet-Gypsy, Southland production inc) per l'alimentazione delle larve è stata preparata mediante sterilizzazione in 1 litro di acqua distillata a 121°C per 15 minuti. A ciclo concluso, la dieta è stata versata in piastre petri e raffreddata sotto cappa fino alla solidificazione. Gruppi di 20-30 uova sono state poste in capsule petri, e quindi allevate in una gabbia di legno (40x25x30) provvista di una ventola (12V) ed un timer per controllare il fotoperiodo di 14:10 (luce:buio) a 25±1°C.

A seguito della schiusa, le larve sono state alimentate con piccoli quadrati della dieta artificiale, sostituita ogni 48 ore. Le larve venivano così mantenute fino al loro utilizzo nei biosaggi.



Fig. 5.2 - Allevamento larve di *L. dispar*

Nel caso di *M. neustria*, le larve di I e II età venivano raccolte in campo e portate in laboratorio dove venivano mantenute su foglie di quercia fino al loro uso nelle prove di laboratorio.

5.2. Origine e provenienza degli insetti di interesse agrario e medico-veterinario:

***C. capitata* e *M. domestica*.**

L'allevamento di *C. capitata* e di *M. domestica* è stato realizzato partendo da una colonia presente nel Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia Vegetale ed Entomologia, dell'Università di Sassari.

Questa attività si svolgeva all'interno di una stanza climatizzata con 25±1 °C e un fotoperiodo di 14:10 h (luce:buio).

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

In tali condizioni la schiusura delle uova di *C. capitata* avveniva mediamente in 24-48 ore, mentre lo sviluppo larvale e pupale si completavano in 7-8 e 5-6 giorni, rispettivamente. Gli adulti di *C. capitata* venivano mantenuti in gabbie di plastica (30 x 60 x 10 cm), la cui superficie laterale era ricoperta con una garza a maglie di taglia opportuna per consentire alle femmine di inserire l'ovopositore e deporre le uova all'esterno, che potevano così essere raccolte in una sottostante vaschetta piena di acqua (Fig. 5.3). L'alimento solido per gli adulti, costituito da una miscela di saccarosio e lievito di birra idrolizzato (3:1), veniva reso disponibile *ad libitum* all'interno delle gabbie, assicurando il nutrimento alla popolazione adulta per tutto il periodo di ovideposizione delle femmine.

L'acqua, veniva fornita mediante una cordicella di cotone che attraversando tutta la gabbia nella parte superiore si manteneva sempre umida pescando l'acqua da un barattolo esterno alla gabbia. Le uova raccolte (1 ml) venivano seminate in un substrato di sviluppo larvale (1 kg), contenuto all'interno di un vassoio (30 x 20 cm), e costituito da zucchero (16.2%), torula (8%), acido citrico (0.6%), acido benzoico (0.5%), crusca (24.7%) ed acqua (50%). Le larve completavano il loro sviluppo su questo substrato per poi impuparsi. Le pupe recuperate venivano utilizzate per l'allestimento di una nuova gabbia di adulti e consentire l'avvio di un nuovo ciclo.

Gli adulti di *M. domestica* venivano mantenuti in gabbie di plexiglass (30 x 30 x 30 cm), le cui superfici laterali erano ricoperte da una garza a maglie di taglia opportuna per favorire il ricambio di ossigeno. (Fig. 5.4). L'alimento per gli adulti, reso disponibile all'interno delle gabbie era costituito da zucchero e latte in polvere in rapporto 1:1. La raccolta delle uova avveniva attraverso un piccolo contenitore di plastica (7,5 x 6,0) in cui veniva inserito il substrato di ovideposizione, composto da batuffoli di carta imbevuti con acqua e 1 g di latte in polvere. Le uova raccolte (0.5 ml), venivano seminate in un substrato di crescita contenente crusca (240 g), latte in polvere (7.5 g), acido benzoico (2 g) e acqua (450 ml). Questa dieta era contenuta in cilindri di plastica (15x20 cm) (Ruiu *et al.*, 2006), coperto da tulle per favorire la ventilazione e quindi, sistemato al buio per favorire loro sviluppo giovanile. La schiusa delle uova di *M. domestica* avveniva in 24 ore, mentre lo sviluppo larvale e pupale in 3-4 e 5-7 giorni, rispettivamente.

Anche in questo caso le larve completavano il loro sviluppo su questo substrato per poi impuparsi. Le pupe recuperate venivano utilizzate per l'allestimento di una nuova gabbia di adulti e consentire l'avvio di un nuovo ciclo.

Lo scopo principale per cui entrambe queste colonie di mosche sono state allevate era quello di produrre larve ed adulti con caratteristiche standard da utilizzare nei biosaggi.



Fig. 5.3 - Gabbia allevamento adulti di *C. capitata*



Fig. 5.4 - Gabbia allevamento adulti di *M. domestica*

6. Origine e preparazione dei batteri entomopatogeni

6.1. Batteri entomopatogeni impiegati nei biosaggi

Le specie ed i ceppi batterici impiegati in questo studio comprendono ceppi batterici di riferimento o simbiotici di nematodi depositati in collezioni ufficiali come ATCC e NCIMB, ceppi di batteri entomopatogeni che costituiscono il principio attivo di formulazioni commerciali, nuovi isolati batterici sporigeni estratti dal suolo in Sardegna e resi disponibili dalle collezioni della società di ricerca Biocepest Srl (Spin Off dell'Università degli Studi di Sassari). A questi si aggiungono i ceppi isolati durante il presente studio da larve di *G. mellonella* sottoposte ad infezione con nematodi entomopatogeni (vedi paragrafo 6.2).

La Tabella 6.1 riporta l'elenco del primo gruppo di batteri impiegati nello studio, indicando la sigla di identificazione e la loro provenienza. Fra questi, i ceppi di nuovo isolamento che erano stati precedentemente identificati e che fanno parte delle collezioni di Biocepest. La Fig. 6.1, invece, mostra un esempio riferito al ceppo B0029 di *Bacillus firmus* evidenziando la morfologia delle colonie e delle cellule batteriche, oltre ai riferimenti della sua identificazione mediante analisi della sequenza del gene 16S rRNA.

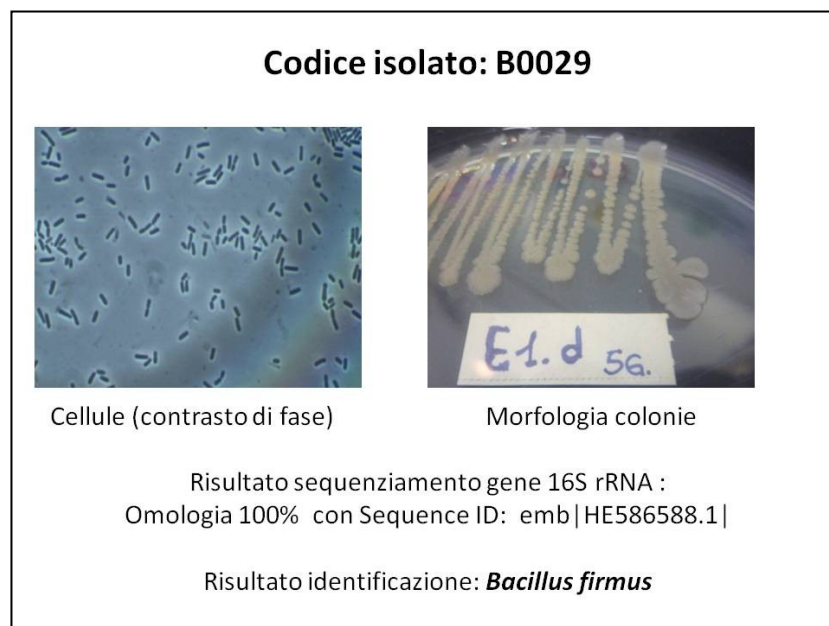


Fig. 6.1 - Morfologia colonie e cellule vegetative di *Bacillus firmus* ceppo B0029 e dati relativi all'identificazione genetica (16S rRNA)

Tabella 6.1 – Gruppo di batteri entomopatogeni impiegati nei biosaggi su mosche

Sigla ceppo*	Batterio	Provenienza
HD1	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	Commerciale
HD567	<i>Bacillus thuringiensis isdraelensis</i>	Commerciale
TT01	<i>Photorhabdus luminescens</i>	ATCC
F1	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	ATCC
BOD	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Probiotico
UNISS18	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	NCIMB
A1	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	ATCC
A5	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	ATCC
B0007	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Bioecopest
B0112	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Bioecopest
B0029	<i>Bacillus firmus</i>	Bioecopest
B0096	<i>Paenibacillus tundrae</i>	Bioecopest
B0040	<i>Bacillus psychrodurans</i>	Bioecopest
B0042	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bioecopest
B0081	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bioecopest
B0288	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bioecopest
B0010	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Bioecopest
B0059	<i>Bacillus frigoritolerans</i>	Bioecopest
B0077	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Bioecopest
B0454	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Bioecopest
B0084	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bioecopest
B0076	<i>Bacillus subtilis</i>	Bioecopest
B0302	<i>Bacillus subtilis</i>	Bioecopest
B0097	<i>Bacillus aquimaris</i>	Bioecopest
B0026	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	Bioecopest
B0100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bioecopest
B0034	<i>Bacillus megaterium</i>	Bioecopest
B0041	<i>Bacillus megaterium;</i>	Bioecopest
B0072	<i>Bacillus megaterium</i>	Bioecopest
B0019	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	Bioecopest

*sigle di riferimento dei ceppi batterici impiegati nello studio, depositati presso collezioni ufficiali (ATCC, NCIMB) o messi a disposizione da Bioecopest Srl (Spin off, Università degli Studi di Sassari).

6.2. Isolamento di batteri da larve di *G. mellonella* infettate con EPNs

6.2.1. Origine e provenienza dei nematodi entomopatogeni

I nematodi entomopatogeni da cui sono stati isolati i ceppi batterici provengono da diverse zone dell'Italia e dell'Algeria e appartengono ad una collezione del Prof. Tarasco dell'Università degli Studi di Bari costituita in seguito all'isolamento di campioni da diversi *habitat* tra cui, terreni incolti, frutteti, zone costiere, sotto alberi di Pino, di latifoglie, pascoli, a bordo dei fiumi, paludi e lagune. In particolare, gli studi effettuati da Tarasco *et al.* (2014) sono stati condotti soprattutto durante la stagione umida, da Novembre a Giugno, in 9 regioni italiane (Puglia, Basilicata, Calabria, Campania, Emilia Romagna, Molise, Sardegna, Sicilia con le isole Eolie, Pantelleria e Toscana) e sono stati raccolti 2039 campioni provenienti da 580 siti nel corso di un periodo di 20 anni.

La presenza di EPNs in Algeria è stata valutata nel corso di un periodo di 2 anni, dal 2007 al 2008. I campioni sono stati raccolti in 253 differenti siti da 12 regioni dell'Algeria: Algeri, Blida, Bouira, Djelfa, Ghardaia, Jijel, Oran, Skikda, Tamanrasset, Tlemcen, Tipaza e Tizi-ouzou (Tarasco *et al.*, 2009).

Tutti i nematodi raccolti sono stati sottoposti ad analisi morfologiche e molecolari. Per quanto riguarda i campioni raccolti nelle varie regioni Italiane, un totale di 133 su 2039 campioni sono risultati EPNs (Tarasco *et al.*, 2014). L'identificazione dei nematodi raccolti si è basata su analisi morfologiche e molecolari. In particolare, è stato eseguito il sequenziamento del locus ITS1 rDNA al fine di confrontare la sequenza di interesse con quelle disponibili sui database NCBI utilizzando la funzione BLAST. Sulla base delle analisi morfologiche e molecolari i 133 nematodi entomopatogeni isolati sono stati identificati in 12 specie (Tarasco *et al.*, 2014). Le analisi tassonomiche e molecolari hanno identificato i nematodi algerini come appartenenti alle specie *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) e *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976), (Tarasco *et al.*, 2009).

Gli EPNs utilizzati nei biosaggi di laboratorio per infettare larve di *G. mellonella* da cui sono stati isolati i batteri predominanti associati all'infezione, sono indicati in Tabella 6.2.

Tabella 6.2 - Nematodi impiegati nei biosaggi e loro provenienza

Sigla*	Nematode	Provenienza
ALG2	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
ALG3	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
ALG5	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
ALG10	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
ALG12	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Algeria
ALG13	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
ALG15	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
ALG18	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
ALG27	<i>Steinernema feltiae</i>	Algeria
AR1	<i>Steinernema affine</i>	Italia
CAST1	<i>Steinernema affine</i>	Italia
CAST5	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
C3	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Italia
C31	<i>Steinernema arenarium</i>	Italia
CHIA4	<i>Steinernema sp. MY7</i>	Italia
CL2	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
CO1	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
CZ19	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
FF1	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
FO1	<i>Steinernema affine</i>	Italia
G16	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
LA3	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Italia
LE1	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
FI1	<i>Steinernema affine</i>	Italia
LU1	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Italia
MF1	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
MR4	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Italia
MSA4	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
MS6	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Italia
OT2	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
OT10	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
OT15	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
OT9	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
Q1	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
RC8	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia
SAR6	<i>Steinernema ichnusae</i>	Italia
TA14	<i>Steinernema apuliae</i>	Italia
TG4	<i>Steinernema feltiae</i>	Italia

*sigle di riferimento della collezione di Prof. E. Tarasco (Università di Bari)

L'isolamento dei nematodi ha previsto di intrappolarli nei vari siti di raccolta utilizzando come insetti esca, larve di *G. mellonella* all'ultimo stadio. In ciascuno di questi siti, sono stati raccolti circa 2 kg di suolo, raggruppati in 3-4 subcampioni, ad una profondità di 10-20 cm su un'area di 50 m². I campioni di suolo sono stati quindi portati in laboratorio e le larve di *G. mellonella* infettate secondo la "baiting technique" (Tarasco *et al.*, 1997). La "baiting technique" con larve di *G. mellonella* è la tecnica più comunemente utilizzata per recuperare gli stadi infettivi di nematodi entomopatogeni dal suolo (Bedding & Akhurst 1975).

A seguito dell'infezione, i campioni sono stati incubati a 25°C per 7-10 giorni ed è poi stata monitorata la mortalità larvale. Dalle larve infettate, sono state raccolte le forme infettive (IJs) dei nematodi, utilizzate per infettare nuove larve di *G. mellonella*.

6.2.2. Isolamento dei batteri da larve di *G. mellonella* infette

Larve di *G. mellonella* infettate con diversi ceppi di nematodi entomopatogeni come precedentemente descritto sono state sottoposte ad un lavaggio in EtOH al 70% finalizzato alla sterilizzazione superficiale seguito da 3 lavaggi in acqua sterile. La successiva manipolazione delle larve avveniva in condizioni di asepsi utilizzando pinzette. Si praticava quindi un taglio con bisturi nell'addome di ciascuna larva infetta in modo da poter prelevare un'aliquota dell'emocele che veniva prontamente piastrata in apposito terreno di coltura agarizzato. Le piastre di LB (Luria-Bertani) Agar venivano mantenute in incubazione a 30°C per 24-48 ore.



Fig. 6.2 - Larve di *G. mellonella* prima (sinistra) e dopo (destra) l'isolamento

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

Si è provveduto, in base alla necessità, a inoculi e re-isolamenti successivi fino all'ottenimento di colonie pure. A ciascun isolato batterico veniva assegnata una sigla, corrispondente a quella del nematode utilizzato per l'infezione di *G. mellonella*. Quando da un singolo inoculo venivano isolate due o più colonie morfologicamente distinte, venivano entrambe isolate in purezza e a ciascuna veniva assegnata una sigla di identificazione uguale a quella del nematode di riferimento seguita da un numero romano.

Le colonie batteriche in uso venivano mantenute a 4°C e periodicamente venivano rinfrescate attraverso l'inoculo in nuove piastre contenenti LB agar. Contemporaneamente è stata allestita una collezione permanente in glicerolo (30%) di oltre 80 isolati batterici stoccata a -80°C. A tale scopo colture batteriche pure venivano mantenute in agitazione a 30°C overnight in tubi Falcon da 15 ml contenenti 5 ml di LB liquido. Successivamente, da ciascun tubo venivano prelevati 700 µl della coltura ai quali venivano aggiunti, in condizioni di sterilità, 300 µl di glicerolo al 30%.

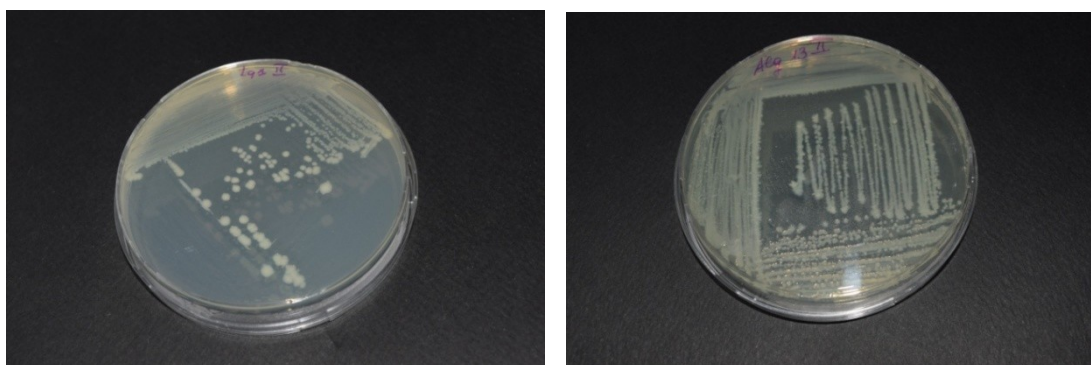


Fig. 6.3 - Esempio di piastre con colonie batteriche pure di nuovo isolamento

6.2.3. Identificazione dei batteri isolati

L'identificazione specifica di alcuni isolati batterici è stata condotta mediante osservazioni morfologiche preliminari e successive analisi genetiche.

A tale scopo, i microrganismi sono stati montati su vetrini permanenti osservati con obiettivo ad immersione ad un ingrandimento 1000 X. Per l'identificazione genetica degli isolati si è preceduto all'estrazione del DNA da colture batteriche overnight in LB. Le cellule vegetative raccolte per centrifugazione ad una concentrazione media di 10^9 cellule/ml venivano trattate mediante DNeasy Blood &

Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del manuale per l'estrazione del DNA genomico. Quest'ultimo è stato poi impiegato come template in reazioni PCR finalizzate all'amplificazione del gene 16S rRNA. Queste sono state condotte utilizzando un termociclatore Veriti™ (Applied Biosystems) in un volume totale di 25 µl containing 1x reaction buffer (contenente 2.0 mM Mg²⁺); circa 100 ng DNA; 0.3 µM di ciascun primer (forward e reverse); 0.3 µM di ciascun dNTPs; e 0.5 U di KAPA HiFi HotStart DNA polymerase (KAPABIOSYSTEMS, Boston, USA).

La procedura includeva un ciclo di denaturazione di 5 minuti a 95°C, 30 cicli che comprendevano denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento a 50°C per 45 secondi, estensione 72°C per 1 minuto ed un ciclo di estensione finale a 72°C per 5 minuti. Per l'amplificazione del gene 16S rRNA sono stati utilizzati di routine i primers generici fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Forward) e rP2 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (Reverse) (Weisburg *et al.*, 1991).

I prodotti della PCR venivano di routine analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (0,5%) con buffer TBE, utilizzando SYBR® Safe DNA stain (Life Technologies Europe BV, Bleiswijk, The Netherlands) per la visualizzazione. Le bande di interesse (con peso molecolare variabile a seconda dello isolato batterico) sono state tagliate dal gel mediante bisturi ed il DNA veniva estratto utilizzando il kit di estrazione QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Gli ampliconi così purificati venivano spediti al servizio di sequenziamento di BMR Genomics (Padova, Italy) e le sequenze ottenute come output venivano analizzate mediante NCBI Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Veniva così definito il livello di omologia con specie batteriche note.

6.3. Preparazione delle colture microbiche

La preparazione delle colture dei batteri precedentemente indicati ha rappresentato un'attività di *routine* finalizzata a produrre il materiale da saggiare in condizioni standardizzate. Nel caso dei batteri sporigeni le colture sono state condotte fino alla completa sporulazione, e nel caso dei batteri che producono inclusioni parasporali (i.e. *B. thuringiensis*) veniva verificata al presenza delle stesse mediante microscopia ottica.

A tal fine, gli isolati batterici sono stati coltivati in beute contenenti 200 ml di LB, e tenuti in agitazione a 180 rpm e 30°C mediamente per 48-72 ore. In seguito le colture venivano centrifugate (SL 16R *Centrifuge*, Thermo Scientific) in tubi Falcon da 50 ml a 10000 rpm per 15 min a 4°C, ottenendo una frazione di supernatante e una di pellet, entrambi stoccati a -20° C fino all'impiego nei biosaggi. Le sospensioni cellulari venivano impiegate ad una concentrazione standard di circa 10⁹ cellule o spore/ml. L'impiego del supernatante nei biosaggi mirava a mettere in evidenza l'eventuale presenza di proteine insetticide idrosolubili e/o metaboliti vari, mentre l'impiego della sospensione di cellule o spore mirava ad evidenziare una azione diretta del microrganismo vitale o delle sue tossine contenute in inclusioni citoplasmatiche.

7. Biosaggi (metodiche)

7.1. Biosaggi dose-risposta su adulti e larve di mosche

Nella conduzione dei biosaggi, considerando che l'azione dei batteri entomopatogeni si esplica per ingestione, gli insetti venivano esposti ad appropriate diete artificiali trattate con i diversi prodotti da saggiare.

Nel caso dei batteri isolati da larve di *G. mellonella* infettate con nematodi, oltre ai biosaggi per ingestione, sono stati condotti biosaggi per iniezione.

7.1.1. Biosaggi per ingestione su adulti di *M. domestica* e di *C. capitata*

Gruppi di 10 adulti neosfarfallati venivano mantenuti in bicchieri di plastica trasparenti, coperti nella parte superiore da tulle bianco e mantenuti a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Ciascun gruppo veniva replicato 3-4 volte per ciascun isolato da saggiare e per il controllo.

La modalità di somministrazione della sospensione batterica saggiata ad una concentrazione di 10^9 spore/ml prevedeva una delle seguenti metodiche (candito o soluzione zuccherina). In tutti i casi la mortalità degli adulti veniva rilevata giornalmente per almeno 7 giorni.

Metodica 1. La sospensione batterica da saggiare veniva mescolata ad un eccesso di saccarosio (circa 3-4 g) per ottenere un candito che veniva sistemato sul fondo del bicchiere in modo che gli adulti potessero nutrirsene giornalmente. Analogamente, il supernatante della coltura batterica veniva mescolato *tal quale* con il saccarosio. L'acqua veniva fornita attraverso del cotone idrofilo imbevuto, inserito all'interno del bicchiere esterno su un supporto plastico. Le mosche utilizzate come controllo negativo venivano alimentate solo con saccarosio e acqua.

Metodica 2. La sospensione batterica da saggiare veniva mescolata (1:1) con una soluzione di saccarosio al 60%, e somministrata giornalmente mediante tubi capillari (7,5 μl /mosca/giorno) o alternativamente, rilasciando con pipetta alcune gocce (*ad libitum*) della stessa sospensione zuccherina. Nel controllo negativo, le mosche venivano alimentate con una soluzione di saccarosio al 30%.



Fig.7.1 - Biosaggi su adulti di *Musca domestica*

7.1.2. Biosaggi per ingestione su larve di *M. domestica* e di *C. capitata*

Gruppi di 10 larve di I età, venivano mantenute in Piastre Petri (diametro 3,5 cm), all'interno di una cella climatica ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 50% RH).

In ciascuna piastra le larve venivano alimentate con 2 g della dieta artificiale incorporata con la sospensione batterica da saggiare (10^9 spore/g di dieta) o il rispettivo supernatante (*tal quale*), in comparazione con una tesi di controllo alimentata con dieta artificiale non trattata.

Le larve venivano ispezionate giornalmente al fine di rilevare la mortalità nei successivi 7 giorni, ed allevate fino all'impupamento e lo sfarfallamento degli adulti. Anche per le larve, gli esperimenti sono stati predisposti in 3-4 repliche, e nel caso i cui veniva rilevato un effetto tossico, venivano ripetuti. In alcuni casi, è stato rilevato anche il peso pupale.



Fig. 7.2 - Contenitori di plastica con microtubi capillari utilizzati per alimentare gli adulti di mosche



Fig. 7.3 - Dettaglio della gabbia con adulto che si alimenta dal tubo capillare

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

7.2. Biosaggi preliminari per iniezione su larve di *Galleria mellonella*

È stato effettuato un biosaggio su larve di *G. mellonella* iniettando in esse alcuni ceppi batteri, per verificare se la metodica potesse essere replicata in larga scala, e se poteva quindi essere ripetuta in larve di *L. dispar*.

Le larve sono state sottoposte a lavaggio con NaClO, asciugate, e mediante l'uso di piccole siringhe da insulina, 5 µl di sospensione batterica è stata iniettata nell'addome della larva. Le larve venivano poste in piastre Petri e sistemate in cella climatica a 25±1°C e 50% rH. Ogni prova è stata replicata tre volte ed in ogni piastra petri venivano sistemate 10 larve, affiancando due tesi di controllo, una in cui alle larve veniva iniettata solo acqua distillata ed una in cui le larve venivano solo punte. In un primo momento è stata osservata una mortalità molto elevata, con la maggior parte delle larve, morte dopo poche ore dall'iniezione. Questo ha fatto supporre che le quantità di batterio e acqua somministrate fossero troppo elevate; per cui si è ridotta la quantità di sospensione batterica a 1 µl e osservata la mortalità. Poiché si è trattato di un biosaggio di prova, le mortalità non sono riportate nella sezione risultati.

7.3. Biosaggi per iniezione su larve di *L. dispar*

Una volta effettuato il biosaggio su larve di *G. mellonella*, lo stesso procedimento è stato utilizzato per le larve di *L. dispar* saggiando in particolare alcuni dei batteri isolati in precedenza da larve di *Galleria* infettate con i nematodi entomopatogeni. Le larve sono state sottoposte a lavaggio con NaClO, asciugate, e mediante l'uso di piccole siringhe da insulina, 1 µl di sospensione batterica è stata iniettata a livello dell'addome in zona ventrale. La prova è stata effettuata su tre repliche per ciascun isolato batterico sistemando gruppi di 10 larve in piastre petri mantenute a 25±1°C e 50% RH.

Le larve sono state poi alimentate giornalmente con foglie di susino (*Prunus domestica* L.) e albicocco (*Prunus armeniaca* L.) somministrate fresche *ad libitum*, valutandone giornalmente la mortalità.

Il controllo negativo ha previsto l'iniezione con acqua sterile, mentre il controllo positivo, l'iniezione con il batterio *B. thuringiensis kurstaki* ceppo HD1, già noto come detto in precedenza, per essere attivo su larve di *L. dispar*. Inoltre, le foglie utilizzate per l'alimentazione delle larve venivano pesate all'inizio della prova, giornalmente se durante le 24 ore l'alimento veniva esaurito e, al termine della prova,

per determinare la quantità di foglia ingerita. Alla conclusione della prova sono stati pesati i cacherelli per determinare la relazione tra quest'ultimi e la quantità di foglia ingerita.

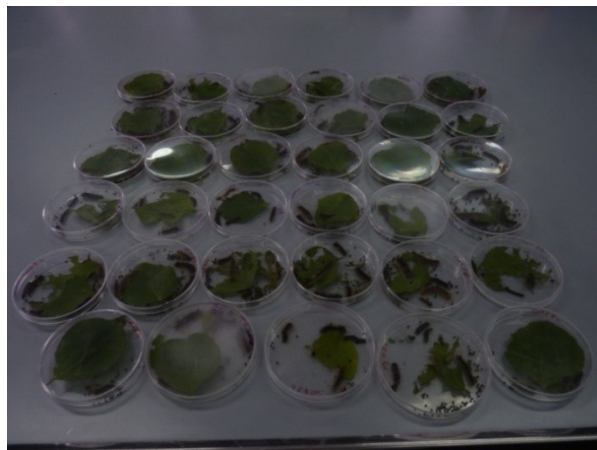


Fig.7.4 - Larve di *L.dispar* iniettate con la sospensione batterica e mantenute su materiale vegetale

7.4. Biosaggi per ingestione su larve di *M. neustria*

Alcuni dei batteri isolati da larve di *G. mellonella* infettate con EPNs, sono stati inoltre impiegati per effettuare biosaggi per ingestione su larve di *M. neustria*, utilizzando foglie di *Malus domestica* L per la loro alimentazione. Le larve sono state sistemate in bicchieri di plastica coperti da del tulle bianco e la sospensione batterica di 300 μ l è stata distribuita sulla superficie delle foglie per permettere la loro ingestione da parte delle larve.

Anche in questo caso la prova è stata effettuata su tre repliche, sistemando in ciascun bicchiere 10 larve, affiancando un controllo negativo dove le larve venivano alimentate con foglie non trattate. È stata quindi valutata giornalmente la mortalità. Anche in questo caso le foglie trattate venivano inizialmente pesate, per poi determinare per differenza la quantità di alimento ingerito.



Fig. 7.5 - Larve di *M. neustria* durante i biosaggi per ingestione

7.5. Analisi statistica

I dati ottenuti nei diversi biosaggi sono stati elaborati ed analizzati mediante Statgraphics Plus (Manugistics) o il software R. I dati di mortalità, variazione del peso pupale e percentuale di sfarfallamento, causati dalle diverse sospensioni batteriche sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) ad una via seguita da test LSD per la separazione delle medie dei trattati dal controllo o analizzati mediante il "Test di Dunnet".

Nelle tabelle esposte nella sezione risultati, i dati sono invece presentati come medie corrette mediante la formula di Abbott (Abbott, 1925).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

8. Biosaggi (risultati)

8.1. Biosaggi su adulti e larve di *M. domestica* con ceppi di *B. laterosporus*

La maggior parte dei ceppi del batterio *B. laterosporus* testati ha determinato la morte di adulti e larve *M. domestica* (Tabella 8.1).

Le medie di mortalità riferite ai trattamenti sugli adulti hanno mostrato differenze statisticamente significative con l'impiego del pellet contenente spore batteriche ($F=63,40$; $df=6$; $p\text{-value} < 0,001$). Risultati significativamente differenti dal controllo sono stati osservati per i ceppi BOD, B0007, UNISS18 e A1, con valori medi di mortalità rispettivamente del 100%, 93,3%, 73,3% e 33,3%. La mortalità dei supernatanti delle diverse colture è risultata non significativa ($F=1,98$, $df=6$, $p\text{-value} = 0,115$), ad eccezione del ceppo B0007, che ha mostrato differenze rispetto al controllo con un valore di mortalità del 13,3%. Anche la frazione pellet testata sulle larve ha mostrato differenze statisticamente significative in mortalità tra i trattamenti ($F=175,72$; $df: 6$; $p\text{-value} < 0,001$). I trattamenti che hanno mostrato i valori più alti sono stati A1, BOD, B0007, UNISS18, con mortalità del 100%, e *Bti* con 92,3%.

Tabella 8.1 - Mortalità corretta (Abbott, 1925) su adulti e larve di *M. domestica*

Ceppo	Media \pm SEM		
	Spore (adulti) ⁽¹⁾	Supernatante (adulti) ⁽²⁾	Spore (larve) ⁽³⁾
A1	33,3 \pm 13,3*	5,7 \pm 5,7	100,0 \pm 0,0*
A5	3,3 \pm 3,3	3,3 \pm 3,3	5,1 \pm 2,6
BOD	100,0 \pm 0,0*	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0*
B0007	93,3 \pm 3,3*	13,3 \pm 6,7*	100,0 \pm 0,0*
UNISS18	73,3 \pm 12,0*	0,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0*
<i>Bti</i>	0,0 \pm 0,0	10,0 \pm 5,8	92,3 \pm 3,8*
Controllo	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	13,3 \pm 3,1

⁽¹⁾ ANOVA (df: 6; $F=63,40$; $p\text{-value} < 0,001$) seguito da test LSD. I valori con l'asterisco hanno mostrato differenze statisticamente significative in **mortalità**

⁽²⁾ ANOVA (df: 6; $F= 1,98$; $p\text{-value} < 0,115$) seguito da test LSD. I valori con l'asterisco hanno mostrato differenze statisticamente significative in **mortalità**

⁽³⁾ ANOVA (df: 6; $F= 175,72$; $p\text{-value} < 0,001$) seguito da test LSD. I valori con l'asterisco hanno mostrato differenze statisticamente significative in **mortalità**

8.2. Biosaggi su adulti di *M. domestica* con i batteri isolati da larve di *G. mellonella* infette

Nei biosaggi effettuati per ingestione attraverso l'incorporazione nella dieta di 77 diversi ceppi batterici isolati da larve di *G. mellonella* infettate con nematodi entomopatogeni, gli adulti di *M. domestica* esposti per 7 giorni alla dieta trattata, hanno mostrato differenze nei livelli di mortalità statisticamente significative tra isolati batterici e rispetto ai controlli non trattati.

La frazione pellet è quella risultata maggiormente attiva (Tabella 8.2), con i ceppi Algerini (ALG13II, ALG18II) ed i ceppi Italiani (AR1I, AR1II, CAST5II, LE1I, RC8II, SAR6I, SAR6II) che hanno mostrato una differenza significativa rispetto al controllo non trattato; anche se i valori di mortalità risultano essere molto bassi, oscillando dal 13,3% al 33,3%. Il ceppo TT01 di *P. luminescens*, non ha mostrato nessuna differenza significativa di mortalità rispetto al non trattato, mentre il ceppo F1 di *X. nematophila*, un valore di mortalità del 13,3%, molto basso, ma significativo rispetto al controllo, così come il ceppo UNISS18 di *B. laterosporus* che ha mostrato un valore di mortalità superiore all'80%. La mortalità dei supernatanti delle diverse colture è risultata non significativa, ad eccezione dei ceppi ALG18II E MS6I, che hanno mostrato differenze rispetto al controllo con valori di mortalità rispettivamente del 20% e 23,3%.

8.3. Biosaggi su adulti di *C. capitata* con i batteri isolati da larve di *G. mellonella* infette

I biosaggi condotti con i 77 isolati batterici testati su adulti di *C. capitata*, anche in questo caso, dopo 7 giorni di esposizione al trattamento, hanno messo in evidenza differenze di mortalità statisticamente significative tra gli isolati (Tabella 8.3).

In questo caso, il supernatante ha mostrato dei valori interessanti di mortalità rispetto al controllo non trattato, con i ceppi ALG13, FF1I E FI1, rispettivamente del 43,3%, e 30%, supponendo la presenza di metaboliti idrosolubili con proprietà tossica.

La frazione pellet non ha mostrato valori di tossicità significativi, in quanto nessuno dei ceppi saggiati, rispetto al controllo. Anche i ceppi di riferimento (*B. laterosporus* UNISS18, *P. luminescens* TT01 e *X. nematophila* F1), non hanno mostrato nessun grado di tossicità, sia quando è stata testata la frazione pellet sia la frazione supernatante.

Tabella 8.2 - Mortalità corretta (Abbott,1925) di adulti di *M. domestica* (Pellet e supernatante) dopo esposizione a diete trattate con diversi isolati batterici

Mortalità 7 giorni (Media ± SEM)											
Ceppo	Supernatante	Pellet	Ceppo	Supernatante	Pellet	Ceppo	Supernatante	Pellet	Ceppo	Supernatante	Pellet
ALG2I	3,3±3,3	3,3±3,3	C3II	0,0±0,0	3,3±3,3	MSA4I	4,6±2,3	3,3±3,3	MSA4I	4,6±2,3	3,3±3,3
ALG2II	0,0±0,0	3,3±3,3	CHIA4I	3,3±3,3	0,0±0,0	MSA4II	2,3±2,3	0,0±0,0	MSA4II	2,3±2,3	0,0±0,0
ALG3I	10,0±10,0	0,0±0,0	CHIA4II	0,0±0,0	3,3±3,3	MS6I	23,3 ±18,6***	0,0±0,0	MS6I	23,3 ±18,6***	0,0±0,0
ALG3II	0,0±0,0	0,0±0,0	CL2I	0,0±0,0	0,0±0,0	MS6II	6,7±3,3	0,0±0,0	MS6II	6,7±3,3	0,0±0,0
ALG5I	3,3±3,3	0,0±0,0	CL2II	3,3±3,3	0,0±0,0	OT2I	0,0±0,0	3,3±3,3	OT2I	0,0±0,0	3,3±3,3
ALG5II	3,3±3,3	0,0±0,0	CO1I	0,0±0,0	0,0±0,0	OT2II	3,3±3,3	3,3±3,3	OT2II	3,3±3,3	3,3±3,3
ALG10I	0,0±0,0	0,0±0,0	CO3II	3,3±3,3	0,0±0,0	OT10I	10,0±5,8	0,0±0,0	OT10I	10,0±5,8	0,0±0,0
ALG10II	0,0±0,0	0,0±0,0	CZ19I	5,8±5,8	0,0±0,0	OT10II	10,0±0,0	0,0±0,0	OT10II	10,0±0,0	0,0±0,0
ALG12I	0,0±0,0	3,3±3,3	CZ19II	2,3±2,3	0,0±0,0	OT15I	0,0±0,0	13,3±3,3*	OT15I	0,0±0,0	13,3±3,3*
ALG12II	0,0±0,0	6,7±3,3	FF1I	0,0±0,0	0,0±0,0	OT15II	0,0±0,0	0,0±0,0	OT15II	0,0±0,0	0,0±0,0
ALG13I	13,3±13,3	0,0±0,0	FF3II	3,3±3,3	0,0±0,0	OT9I	0,0±0,0	0,0±0,0	OT9I	0,0±0,0	0,0±0,0
ALG13II	16,7±8,8**	10,0±2,9	FO1	13,3±3,3	3,3±3,3	OT9II	0,0±0,0	0,0±0,0	OT9II	0,0±0,0	0,0±0,0
ALG15I	6,7±3,3	0,0±0,0	G16I	0,0±0,0	0,0±0,0	Q1I	0,0±0,0	0,0±0,0	Q1I	0,0±0,0	0,0±0,0
ALG15II	0,0±0,0	6,7±6,7	G16II	10,0±5,8	0,0±0,0	Q3II	3,3±3,3	3,3±3,3	Q3II	3,3±3,3	3,3±3,3
ALG18I	0,0±0,0	6,7±3,3	LA3I	3,3±3,3	0,0±0,0	Q13II	3,3±3,3	3,3±3,3	Q13II	3,3±3,3	3,3±3,3
ALG18II	20,0±5,8***	13,3±8,8*	LA3II	0,0±0,0	3,3±3,3	RC8I	3,3±3,3	0,0±0,0	RC8I	3,3±3,3	0,0±0,0
ALG27I	13,3±6,7	6,7±6,7	LE1I	10,0±5,8	33,3±8,8***	RC8II	0,0±0,0	13,3±6,7*	RC8II	0,0±0,0	13,3±6,7*
ALG27II	0,0±0,0	6,7±3,3	LE1II	3,3±3,3	0,0±0,0	SAR6I	3,3±3,3	23,3±3,3***	SAR6I	3,3±3,3	23,3±3,3***
AR1I	2,3±2,3	16,7±8,8***	F1I	5,8±5,8	0,0±0,0	SAR6II	0,0±0,0	26,7±3,3***	SAR6II	0,0±0,0	26,7±3,3***
AR1II	0,0±0,0	20,0±11,5***	F13II	2,3±2,3	0,0±0,0	TA14I	0,0±0,0	3,3±3,3	TA14I	0,0±0,0	3,3±3,3
CAST1I	0,0±0,0	3,3±3,3	F13III	2,3±2,3	3,3±3,3	TA14II	0,0±0,0	3,3±3,3	TA14II	0,0±0,0	3,3±3,3
CAST1II	0,0±0,0	10,0±5,8	LU1I	0,0±0,0	3,3±3,3	TG4I	3,3±3,3	3,3±3,3	TG4I	3,3±3,3	3,3±3,3
CAST1III	0,0±0,0	6,7±3,3	LU1II	6,7±3,3	0,0±0,0	TG4II	3,3±3,3	3,3±3,3	TG4II	3,3±3,3	3,3±3,3
CAST5I	0,0±0,0	13,3±3,3*	MF1I	6,7±3,3	6,7±3,3	<i>P.lumin</i>	2,3±2,3	10,0±5,8	<i>P.lumin</i>	2,3±2,3	10,0±5,8
CAST5II	0,0±0,0	3,3±3,3	MF1II	3,3±3,3	3,3±3,3	<i>X.nem</i>	2,3±2,3	13,3±3,3*	<i>X.nem</i>	2,3±2,3	13,3±3,3*
C3I	3,3±3,3	0,0±0,0	MR4I	0,0±0,0	0,0±0,0	UNISS18	0,0±0,0	83,3±3,3***	UNISS18	0,0±0,0	83,3±3,3***
C3II	0,0±0,0	0,0±0,0	MR4II	0,0±0,0	3,3±3,3						
C3III	3,3±3,3	0,0±0,0									

*Indica la differenza statisticamente significativa rispetto alla media del controllo (“Dunnet’s test”)

(****p*-value<0,001,***p*-value <0,01,**p*-value<0,05)

Tabella 8.3- Mortalità corretta (Abbott,1925) di adulti di *C.capitata* (Pellet e supernatante) dopo esposizione a diete trattate con diversi isolati batterici

Mortalità 7 giorni (Media ± SEM)											
Ceppo	Supernatante	Pellet	Ceppo	Supernatante	Pellet	Ceppo	Supernatante	Pellet	Ceppo	Supernatante	Pellet
ALG2I	0,0±0,0	0,0±0,0	C3II	3,3±3,3	0,0±0,0	MSA4I	6,7±3,3	10,0±5,8			
ALG2II	0,0±0,0	3,3±3,3	CHIA4I	0,0±0,0	3,3±3,3	MSA4II	13,3±6,7	16,7±3,3			
ALG3I	10,0±0,0	13,3±3,3	CHIA4II	6,7±6,7	3,3±3,3	MS6I	6,7±6,7	0,0±0,0			
ALG3II	16,7±3,3	3,3±3,3	CL2I	20,0±20,0	3,3±3,3	MS6II	0,0±0,0	0,0±0,0			
ALG5I	0,0±0,0	3,3±3,3	CL2II	0,0±0,0	3,3±3,3	OT2I	0,0±0,0	10,0±10,0			
ALG5II	10,0±10,0	0,0±0,0	CO1I	0,0±0,0	3,3±3,3	OT2II	3,3±3,3	6,7±6,7			
ALG10I	0,0±0,0	6,7±6,7	CO1II	0,0±0,0	3,3±3,3	OT10I	3,3±3,3	0,0±0,0			
ALG10II	6,7±3,3	0,0±0,0	CZ19I	3,3±3,3	3,3±3,3	OT10II	10,0±0,0	0,0±0,0			
ALG12I	3,3±3,3	0,0±0,0	CZ19II	6,7±3,3	6,7±6,7	OT15I	3,3±3,3	0,0±0,0			
ALG12II	3,3±3,3	3,3±3,3	FF1I	30,0±30,0***	0,0±0,0	OT15II	0,0±0,0	16,7±3,3			
ALG13I	43,3±17,6***	0,0±0,0	FF3II	3,3±3,3	0,0±0,0	OT9I	0,0±0,0	3,3±3,3			
ALG13II	0,0±0,0	6,7±6,7	FO1	0,0±0,0	3,3±3,3	OT9II	0,0±0,0	0,0±0,0			
ALG15I	6,7±6,7	0,0±0,0	G16I	0,0±0,0	6,7±3,3	Q1I	3,3±3,3	3,3±3,3			
ALG15II	6,7±3,3	0,0±0,0	G16II	6,7±6,7	0,0±0,0	Q1II	0,0±0,0	3,3±3,3			
ALG18I	3,3±3,3	3,3±3,3	LA3I	3,3±3,3	10,0±5,8	Q1III	3,3±3,3	3,3±3,3			
ALG18II	0,0±0,0	10,0±0,0	LA3II	3,3±3,3	0,0±0,0	RC8I	3,3±3,3	16,7±6,7			
ALG27I	3,3±3,3	0,0±0,0	LE1I	0,0±0,0	10,0±5,8	RC8II	3,3±3,3	13,3±13,3			
ALG27II	3,3±3,3	3,3±3,3	LE1II	0,0±0,0	3,3±3,3	SAR6I	3,3±3,3	3,3±3,3			
AR1I	13,3±8,8	10,0±5,8	FI1I	30,0±11,5***	0,0±0,0	SAR6II	10,0±5,8	13,3±3,3			
AR1II	13,3±6,7	16,7±6,7	FI1II	6,7±6,7	6,7±3,3	TA14I	0,0±0,0	6,7±6,7			
CAST1I	3,3±3,3	13,3±13,3	FI1III	16,7±8,8	13,3±6,7	TA14II	3,3±3,3	0,0±0,0			
CAST1II	13,3±3,3	3,3±3,3	LU1I	0,0±0,0	3,3±3,3	TG4I	0,0±0,0	6,7±3,3			
CAST1III	6,7±3,3	10,0±0,0	LU1II	3,3±3,3	3,3±3,3	TG4II	0,0±0,0	10,0±10,0			
CAST5I	0,0±0,0	6,7±3,3	MF1I	3,3±3,3	6,7±6,7	<i>P.lumin</i>	6,7±6,7	0,0±0,0			
CAST5II	0,0±0,0	3,3±3,3	MF1II	0,0±0,0	6,7±3,3	<i>X.nem</i>	3,3±3,3	0,0±0,0			
C3I	6,7±3,3	3,3±3,3	MR4I	0,0±0,0	6,7±6,7	UNISS18	3,3±3,3	3,3±3,3			
C3II	6,7±3,3	3,3±3,3	MR4II	3,3±3,3	0,0±0,0						
C3III	6,7±3,3	10,0±5,8									

*Indica la differenza statisticamente significativa rispetto alla media del controllo

("Dunnet's test")

(****p-value*<0,001,***p-value*<0,01,**p-value*<0,05)

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario,forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",

Indirizzo:"Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",

Università degli Studi di Sassari.

8.4. Biosaggi su larve di *M. domestica* con i batteri isolati da larve di *G. mellonella* infette

Nel caso dei batteri isolati da larve di *G. mellonella* infettate con nematodi entomopatogeni, i biosaggi condotti sullo stadio larvale di *M. domestica* e di *C. capitata* hanno incluso la sola frazione cellulare (pellet), escludendo quindi il supernatante, in quanto non mostrava una tossicità significativa nelle precedenti prove su adulti.

La Tabella 8.4 mostra diversi isolati batterici con alti livelli di tossicità, come i ceppi ALG18I, CAST1I, CAST1II, CAST5I, CAST5II, C3I, CO1II, MR4II, che sono risultati statisticamente significativi rispetto al controllo non trattato con una mortalità pari al 100%. Tutti gli altri (AR1I, C3II, CHIA4I, CHIA4II, FI1III, MSA4I, MS6II), hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa con valori di mortalità massima del 96.7% in MSA4I, e minima del 40% in C3II

Anche i ceppi di riferimento, hanno mostrato un livello di tossicità elevato con mortalità del 100% per quanto riguarda *B. laterosporus* UNISS18, come atteso, ed una mortalità del 33,3% con *P. luminescen* TT01.

Sono stati inoltre presi in considerazione altri parametri quali peso pupale e % di sfarfallamento.

In Tabella 8.5 si evince come alcuni isolati batterici (ALG10I, CHIA4I, CHIA4II, FI1I, OT10I, SAR6I e *P. luminescens* TT01) presentino un valore medio del peso pupale statisticamente significativo rispetto al controllo non trattato, e come sia presente in alcuni ceppi, un decremento del peso pupale, espresso in percentuale.

Il “test di Dunnet” eseguito sulle percentuali di sfarfallamento ha evidenziato come in alcuni casi, i biosaggi eseguiti attraverso l’ingestione della dieta artificiale con l’incorporazione degli isolati batterici, abbiano mostrato dei valori statisticamente significativi, sempre rispetto al controllo non trattato.

Tabella 8.4 - Mortalità larve di *M.domestica* corretta con la formula di Abbott (1925).

Mortalità (Media ± SEM)					
Strain	Pellet	Strain	Pellet	Strain	Pellet
ALG2I	0.0±0.0	C31I	16.7±8.8	MSA4II	6.7±3.3
ALG2II	3.3±3.3	C31II	10.0±5.8	MS6I	6.7±3.3
ALG5I	10.0±5.8	CHIA4I	73.3±3.3***	MS6II	26.7±8.8
ALG5II	10.0±5.8	CHIA4II	76.7±6.7***	OT2I	13.3±3.3
ALG10I	23.3±6.7	CL2I	23.3±3.3	OT2II	3.3±3.3
ALG10II	30.0±10.0	CL2II	10.0±10.0	OT10I	3.3±3.3
ALG12I	6.7±3.3	CO1I	20.0±15.3	OT10II	0.0±0.0
ALG12II	6.7±6.7	CO1II	100.0±0.0***	OT15I	13.3±3.3
ALG13I	13.3±6.7	CZ19I	23.3±12.0	OT15II	30.0±10.0
ALG13II	23.3±3.3	CZ19II	10.0±5.8	OT9I	6.7±3.3
ALG15I	0.0±0.0	F1I	3.3±3.3	OT9II	3.3±3.3
ALG15II	13.3±3.3	F1II	20.0±5.8	Q1I	10.0±5.8
ALG18I	100.0±0.0***	FO1	6.7±6.7	Q1II	16.7±6.7
ALG18II	13.3±3.3	LE1I	6.7±6.7	Q1III	33.3±12.0
ALG27I	0.0±0.0	FI1I	33.3±12.0	RC8I	83.3±3.3***
ALG27II	6.7±3.3	FI1II	0.0±0.0	RC8II	63.3±12.0***
AR1I	40.0±5.8**	FI1III	43.3±14.5***	SAR6I	26.6±8.8
AR1II	16.7±8.8	LU1I	10.0±0.0	SAR6II	3.3±3.3
CAST1I	100.0±0.0***	LU1II	23.3±13.3	TA14I	16.7±8.8
CAST1II	100.0±0.0***	MF1I	0.0±0.0	TA14II	13.3±3.3
CAST5I	100.0±0.0***	MF1II	0.0±0.0	TG4I	23.3±14.5
CAST5II	100.0±0.0***	MR4I	3.3±3.3	TG4II	3.3±3.3
C3I	100.0±0.0***	MR4II	100.0±0.0***	<i>P.luminescens</i>	33.3±3.3
C3II	40.0±11.5**	MSA4I	96.7±3.3***	Uniss18	100.0±0.0***

*Indica la differenza statisticamente significativa rispetto alla media del controllo (“Dunnet’s test”) (***)*p-value*<0,001,**) *p-value* <0,01,*) *p-value*<0,05)

Tabella 8.5 - Pesì pupali e % di sfarfallamento di larve di *M.domestica*

Media ± SEM											
Strain	Decremento peso pupale(%)	% sfarfallamento	Strain	Decremento peso pupale(%)	% sfarfallamento	Strain	Decremento peso pupale(%)	% sfarfallamento	Strain	Decremento peso pupale(%)	% sfarfallamento
ALG2I	-	72,0±0,0	CHIA4II	37,4***	0,0±0,0***	MS6II	-	56,7±6,7			
ALG2II	-	72,0±12,0	CL2I	89,9	61,9±8,2**	OT2I	4,8	82,1±3,6			
ALG5I	-	80,0±10,0	CL2II	9,3	88,9±6,9	OT2II	-	100±0,0			
ALG5II	11,2	60,0±8,7**	CO1I	-	89,4±10,6	OT10I	26*	82,1±3,6			
ALG10I	30,8***	97,0±1,5	CO3II	-	0,0±0,0	OT10II	-	86,9±7,2			
ALG10II	-	87,9±6,1	CZ19I	4,2	33,3±4,8***	OT15I	3,8	50,0±12,5**			
ALG12I	2,8	85,7±6,2	CZ19II	7,4	95,2±4,8	OT15II	-	87,9±6,1			
ALG12II	16,6	78,3±13,0	F1I	10,8	71,4±14,3	OT9I	-	90,5±4,8			
ALG13I	-	100,0±0,0	F3II	-	79,5±11,1	OT9II	-	75,0±16,4			
ALG13II	11,6	50,0±7,2***	FO1	-	89,3±8,7	Q1I	34,3	75,0±19,1			
ALG15I	5,3	85,7±6,2	LE1I	16,1	70,8±4,2	Q1II	-	66,7±8,3			
ALG15II	8,3	85,7±6,2	F1II	22,4***	52,4±20,8***	Q1III	19,9	20,8±4,2***			
ALG18II	0,0	83,3±11,0	F13II	-	66,7±12,6*	RC8I	39,0	4,8±0,0			
ALG27I	-	66,7±20,8	F13III	13,3	57,1±24,7**	RC8II	41,1	25,0±12,5**			
ALG27II	-	75,0±12,5	LU1I	-	65,2±7,5	SAR6I	28,1*	4,2±4,2**			
AR1I	17,5	12,5±7,2***	LU3II	4,6	56,5±11,5*	SAR6II	20,1	87,5±7,2			
AR3II	15,3	58,3±8,3***	MF1I	1,7	85,5±7,2	TA14I	27,1	28,0±14,4**			
C3II	4,9	0,0±0,0	MF3II	6,9	100,0±0,0	TA14II	-	73,3±15,9			
C31I	-	87,3±12,7	MR4I	-	81,2±10,1	TG4I	2,8	68,3±20,5			
C31II	10,5	84,1±7,9	MSA4II	-	91,7±8,3	TG4II	-	96,7±3,3			
CHIA4I	33,2**	0,0±0,0***	MS6I	-	63,3±3,3	P.LUMIN	83,9***	20,8±4,2***			

*Indica la differenza statisticamente significativa rispetto alla media del controllo

(Dunnet's test)

(****p*-value<0,001,***p*-value <0,01,**p*-value<0,05)

% indica il decremento del peso pupale rispetto alla media del controllo

I pesi pupali e le % di sfarfallamento sono state calcolate sulle repliche dei trattamenti che hanno mostrato valori di mortalità larvale inferiori al 100%.

Barbara VIRDIS - *Isolamento e valutazione degli effetti di microrganismi entomopatogeni nei confronti di insetti di interesse agrario, forestale e medico-veterinario.*

Tesi di dottorato in "Scienze e Biotecnologie dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari",
Indirizzo: "Monitoraggio e controllo degli ecosistemi forestali in ambiente mediterraneo",
Università degli Studi di Sassari.

8.5. Biosaggi su larve di *C.capitata* con i batteri isolati da larve di *G. mellonella* infette

La Tabella 8.6 mostra come “il test di Dunnett” abbia messo in evidenza l’elevata tossicità di un singolo isolato batterico (ALG18II), mostrando un valore di mortalità pari al 40%, rispetto al controllo non trattato.

L’attività del ceppo TT01 di *P. luminescens*, impiegato come ceppo di riferimento, è risultata statisticamente significativa, con un grado di mortalità del 63,3%, quindi superiore al valore del 33,3% riscontrato in larve di *M.domestica*.

I pesi pupali, non presentano una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo.

La percentuale di sfarfallamento, ha mostrato invece delle differenze statisticamente significative rispetto al controllo per diversi isolati batterici (CAST1I, CAST5I, LE1I, RC8I, e *P. luminescens*), anche se risultano essere superiori al 30%.

Tabella 8.6 - Mortalità larve di *Ceratitis capitata* corretta con la formula di Abbott

Media±SEM			
Strain	Mortalità (%)	Decremento peso pupale (%)	Sfarfallamento(%)
ALG18I	16.7±8.8	20,5	65,2±15,1
ALG18II	40.0±20.0*	23,9	56,5±11,5
AR1I	6.7±6.7	17,3	69,6±15,7
AR1II	0,0±0,0	9,3	60,9±11,5
CAST1I	20.0±5.8	7,1	43,5±11,5*
CAST5I	20.0±5.8	2,9	30,4±11,5**
CO1II	10.0±5.8	21,9	65,2±7,5
FO1	13.3±8.8	7,5	92,8±7,2
LU1II	3.3±3.3	13,8	72,5±14,3
LE1I	16.7±8.8	8,3	47,8±4,3*
FI1III	13.3±6.7	1,5	91,3±0,0
OT15I	13.3±6.7	5,3	85,5±10,5
OT15II	0,0±0,0	8,1	89,9±6,3
RC8I	13.3±13.3	17,2	39,1±15,1**
SAR6I	10.0±0,0	17,4	85,5±10,5
SAR6II	6.7±6.7	12,8	85,5±10,5
<i>P.luminescens</i>	63.3±3.3*	16,5	39,1±13,0**

*Indica la differenza statisticamente significativa rispetto alla media del controllo

(“Dunnet’s test) (***)*p-value*<0,001,**) *p-value* <0,01,*) *p-value*<0,05)

% indica il decremento del peso pupale rispetto alla media del controllo

8.6. Biosaggi su adulti di *M.domestica* con diversi batteri entomopatogeni

La Tabella 8.7 riassume i risultati dei biosaggi con batteri entomopatogeni condotti sugli adulti di *M. domestica*. Come atteso è stata osservata una certa variabilità.

I preparati più attivi sono risultati le colture sporulate di diversi ceppi di *B. laterosporus* e di *Bacillus firmus*, il quale ha superato il 40% di mortalità. Significativa anche l'attività di alcuni isolati di *Bacillus psychrodurans* e di *Paenibacillus tundrae*. Generalmente poco significativa la tossicità dei supernatanti delle diverse colture

Tabella 8.7 - Range di mortalità corretta (Abbott, 1925) di adulti di *M.domestica* esposti ad una dieta trattata con diversi isolati batterici

Strains	Mortalità media corretta (Abbott)
<i>Brevibacillus laterosporus</i> B0112	> 80 %*
<i>Bacillus firmus</i> B0029	> 40 %*
<i>Paenibacillus tundrae</i> B0096; <i>Bacillus psychrodurans</i> B0040	30-40%*
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B0042; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B0081; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B0288; <i>Brevibacterium frigoritolerans</i> B0010; <i>Bacillus frigoritolerans</i> B0059; <i>Brevibacterium frigoritolerans</i> B0077; <i>Streptomyces lavendulae</i> B0454; <i>Bacillus thuringiensis</i> B0084; <i>Bacillus subtilis</i> B0076; <i>Bacillus subtilis</i> B0302; <i>Bacillus aquimaris</i> B0097; <i>Bacillus weihenstephanensis</i> B0026; <i>Bacillus thuringiensis</i> B0100; <i>Bacillus megaterium</i> B0034; <i>Bacillus megaterium</i> B0041; <i>Bacillus megaterium</i> B0072; <i>Paenibacillus xylanilyticus</i> B0019;	<10 %

*Indica una differenza statisticamente significativa rispetto alla media del controllo (ANOVA seguita da test LSD; p -value<0,05)

8.7. Biosaggi su adulti di *C.capitata* con diversi batteri entomopatogeni

La tabella 8.8 mostra come nessuno dei ceppi microbici saggiati sia come coltura sporulata che come supernatante ha prodotto effetti particolarmente significativi, infatti i livelli di mortalità media registrati dopo 5 giorni dall'inizio della prima somministrazione e corretti con la formula di Abbott sono risultati sempre inferiori al 20%.

Tabella 8.8 - Range di mortalità corretta (Abbott, 1925) di adulti di *C.capitata* esposti ad una dieta trattata con diversi isolati batterici.

Strains	Mortalità media corretta (Abbott)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B0288; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B0042; <i>Bacillus frigoritolerans</i> B0059; <i>Paenibacillus xylanilyticus</i> B0019; <i>Bacillus psychrodurans</i> B0040; <i>Paenibacillus tundrae</i> B0096; <i>Bacillus megaterium</i> B0072; <i>Bacillus megaterium</i> B0041; <i>Bacillus thuringiensis</i> B0100; <i>Bacillus subtilis</i> B0076; <i>Bacillus aquimaris</i> B0097; <i>Brevibacterium frigoritolerans</i> B0010; <i>Bacillus firmus</i> B0029.	< 10 %
<i>Bacillus thuringiensis</i> B0084; <i>Brevibacillus laterosporus</i> B0112; <i>Bacillus megaterium</i> B0034; <i>Streptomyces lewendulae</i> B0454; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B0081; <i>Brevibacterium frigoritolerans</i> B0077.	10-20 %*

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative rispetto alla media del controllo (ANOVA; $p\text{-value} > 0,05$)

8.8. Biosaggi per iniezione su larve di *L. dispar* con alcuni ceppi batterici isolati da larve di *G. mellonella* infette

I biosaggi effettuati attraverso l'iniezione dei preparati batterici in larve di *L. dispar* sono stati sottoposti ad una iniziale analisi della varianza per vedere le differenze tra la mortalità dei trattati rispetto al controllo non trattato, seguito da una successiva analisi di varianza sui trattati risultati statisticamente differenti dal controllo.

La Tabella 8.9 mostra come tutti i ceppi batterici abbiano causato mortalità, con il *BtK*, impiegato come ceppo di riferimento, del 100%, come i ceppi LE1I e OT15I.

La mortalità minore è quella del ceppo SAR6I, con un tasso di mortalità pari all'80%.

Tabella 8.9 - Mortalità larve di *L. dispar* (pellet) corretta con la formula di Abbott

Ceppo	Media \pm SEM
<i>P. luminescens</i>	95,0 \pm 2,9ab*
<i>BtK</i>	100,0 \pm 0,0a
ALG5II	92,5 \pm 4,8ab
ALG13II	95,0 \pm 2,9ab
ALG18II	97,5 \pm 2,5a
AR1II	97,5 \pm 2,5a
CAST5II	97,5 \pm 2,5a
LE1I	100,0 \pm 0,0a
LU1I	87,5 \pm 4,8ab
OT15I	100,0 \pm 0,0a
RC8II	97,5 \pm 2,5a
SAR6I	80,0 \pm 4,1c
SAR6II	95,0 \pm 2,9ab
TG4I	92,5 \pm 4,8ab

*lettere diverse nella stessa colonna indicano valori statisticamente differenti (ANOVA, df: 14; F 3,05=; p-value <0,05.seguito da test LSD)

Le larve, durante la prova sono state alimentate *ad libitum*, e alla fine di questa, è stato preso in considerazione, come indice di “quantità di alimento ingerito”, il peso dei cacherelli. La relazione tra questo parametro ed i livelli di mortalità registrati sono messi in evidenza nella Fig. 8.1.

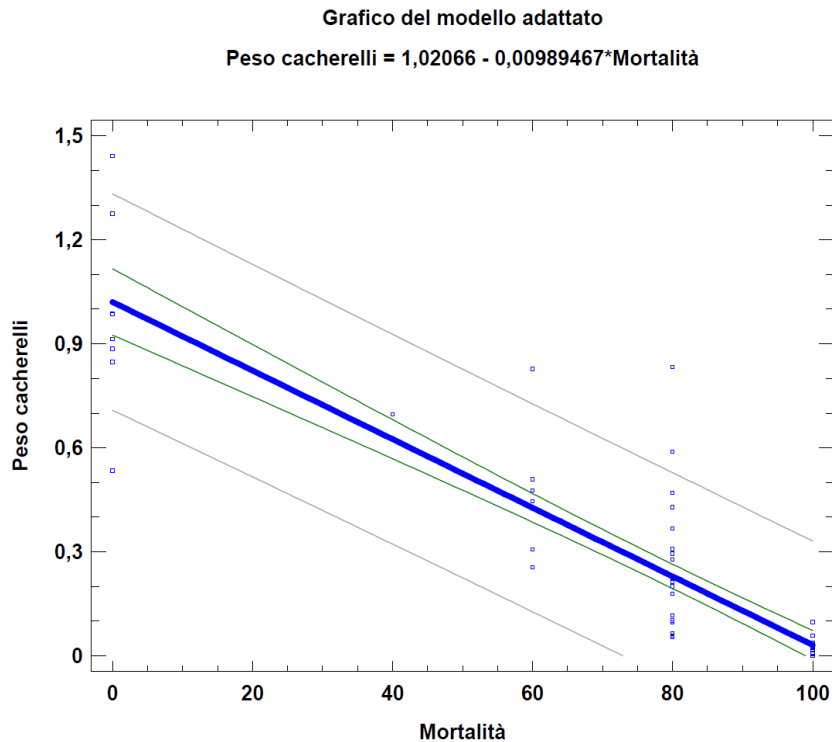


Fig. 8.1 – Relazione tra mortalità larvale e peso dei caccherelli prodotti

8.9. Biosaggi per ingestione su larve di *M.neustria* con alcuni ceppi batterici isolati da larve di *G.mellonella* infette

I dati relativi alla mortalità ottenuti a seguito dell'ingestione delle colture microbiche isolate da nematodi entomopatogeni, sono stati sottoposti ad una iniziale analisi della varianza per vedere le differenze tra la mortalità dei trattati rispetto al controllo non trattato, seguito da una successiva analisi di varianza sui trattati risultati statisticamente differenti dal controllo.

Dalla Tabella 8.10 si può notare come la maggior parte degli isolati presentino una differenza statisticamente significativa rispetto al controllo con una mortalità massima del 96,7% con il ceppo di riferimento *P.luminescens* TT01.

Infatti, proprio quest'ultimo è risultato il più efficace, seguito da *X.nematophila* F1 e *Bt var.kurstaki* HD1 impiegato come controllo positivo, la cui tossicità è già ben nota.

Tra gli isolati batterici OT15I è risultato possedere la maggior attività tossica, con un valore di mortalità statisticamente significativo pari all' 80%.

Tabella 8.10 - Mortalità larve di *M.neustria* corretta con la formula di Abbott

Ceppo	Media \pmSEM
<i>P.luminescens</i> TT01	96,7 \pm 3,3a*
<i>X.nematophila</i> F1	86,7 \pm 8,8ab
<i>Btk</i>	93,3 \pm 6,ab
ALG13II	20,0 \pm 5,8
ALG18II	50,0 \pm 5,8c
AR1I	66,7 \pm 3,3bc
AR1II	70,0 \pm 5,8bc
CAST5II	36,7 \pm 16,7
LE1I	26,7 \pm 12,0
OT15I	80,0 \pm 11,5ab
RC8II	66,7 \pm 12,0bc
SAR6I	26,7 \pm 6,7
SAR6II	26,7 \pm 3,3

*lettere diverse nella stessa colonna indicano valori statisticamente differenti (ANOVA ,df: 7; F 3,52=; p-value <0,001.seguito da test LSD).

8.10. Identificazione di alcuni isolati batterici

La tabella 8.11 riporta i risultati dell'identificazione degli isolati batterici che hanno manifestato efficacia significativa nei confronti degli insetti target e che sono stati isolati da larve di *G. mellonella* infettate con i nematodi entomopatogeni. L'identificazione è stata basata sul confronto della sequenza del genen 16S rRNA con le sequenze note e depositate nel database NCBI. I livelli di omologia riscontrati sono risultati sufficientemente limitati, il che fa presupporre che si tratti di nuove specie.

Tabella 8.11 - Specie batteriche isolate da larve di Galleria infettate con EPNs

SIGLA ISOLATO	Identità (% omologia) *
ALG181	<i>Alcaligenes faecalis</i> (97%)
ALG18II	<i>Serratia sp.</i> (93%)
AR1II	<i>Serratia marcescens</i> (97%)
CAST5I	<i>Serratia marcescens</i> (97%)
CAST5II	<i>Serratia marcescens</i> (97%)
CAST1I	<i>Serratia marcescens</i> (96%)
CAST1II	<i>Alcaligenes faecalis</i> (95%)
CO1II	<i>Pseudomonas protegens</i> (96%)
ALG13I	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99%)
F1I	<i>Alcaligenes sp.</i> (97%)
FI1I	<i>Stenotrophomonas sp.</i> (78%)
CHIA4I	<i>Alcaligenes faecalis</i> (87%)
CHIA4II	<i>Pseudomonas sp.</i> (97%)
MSA4I	<i>Alcaligenes sp.</i> (98%)
LE1I	<i>Alcaligenes sp.</i> (96%)
OT15I	<i>Enterococcus sp.</i> (97%)
RC8II	<i>Serratia marcescens</i> (98%)
SAR6I	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (97%)
F11III	<i>Pseudomonas sp.</i> (97%)

* Identità basata sul confronto della sequenza del gene 16S rRNA con database NCBI

9. Discussione e conclusioni

Il presente studio ha messo in evidenza la entomopatogenicità di diversi isolati batterici di differente origine e provenienza, fornendo informazioni comparative originali e permettendo di allestire una collezione di isolati, suscettibili di ulteriore caratterizzazione e valutazione nei confronti di altri insetti target.

Maggiori livelli di tossicità sono stati evidenziati nei confronti dei lepidotteri, nei biosaggi condotti sia per ingestione che per iniezione. Nel caso delle mosche, invece, si è osservata una grande variabilità degli effetti nell'ambito sia delle diverse specie batteriche che di differenti ceppi nell'ambito della stessa specie. In linea generale, i livelli di tossicità osservati sono stati più rilevanti nel caso della mosca domestica rispetto alla mosca mediterranea della frutta. Inoltre, come atteso, si è rilevata una maggiore suscettibilità da parte delle larve rispetto agli adulti, come noto per gli entomopatogeni (Vega & Kaya, 2012).

Nel caso di *M. domestica*, specifici biosaggi comparativi, hanno mirato a confrontare diversi ceppi di *B. laterosporus*. Le proprietà insetticide di questo batterio sono già state dimostrate nei confronti di ditteri come le zanzare ed i simuli (Favret e Yousten, 1985; Rivers *et al.*, 1991) e solo più recentemente nei confronti della mosca domestica (Ruiu *et al.*, 2007). La tossicità nei confronti di questi insetti è stata associata alla componente cellulare in fase stazionaria, alle spore o a inclusioni citoplasmatiche di natura proteica. È noto che *B. laterosporus*, membro del gruppo *B. brevis*, è iperproduttore di proteine (Udaka & Yamagata, 1993) ed è stato riportato che alcuni ceppi producono proteine tossiche nei confronti di nematodi (Bone *et al.*, 1991) e insetti (Boets *et al.*, 2004).

B. laterosporus è anche noto produrre antibiotici idrosolubili che possono essere isolati dai supernatanti delle colture liquide e che manifestano attività citotossica specifica (Ruiu, 2013). Benchè esistano delle differenze tra ceppi diversi, anche nelle sperimentazioni condotte nel presente lavoro non sono stati osservati effetti associati ai supernatanti delle colture, ma la tossicità di *B. laterosporus* nei confronti di larve e adulti di *M. domestica* è stata specificamente associata alle colture sporulate, rappresentate principalmente da una popolazione di spore. In altri casi, come riportato da Favret e Yousten (1985) per le zanzare la tossicità è stata associata a

cellule vegetative in fase stazionaria. In altri casi l'azione insetticida è legata a tossine prodotte e rilasciate nel mezzo di coltura (Boets *et al.*, 2004). Esiste dunque una certa variabilità tra diversi ceppi. Nel presente lavoro sono stati confrontati differenti ceppi di *B. laterosporus*, tra cui il ceppo UNISS18 già noto per la sua attività nei confronti di ditteri, il ceppo BOD impiegato come probiotico, i ceppi di riferimento A1 e A5 ed altri ceppi di recente isolamento da suoli della Sardegna. I risultati ottenuti, oltre a confermare il diverso potenziale insetticida di ceppi diversi, hanno evidenziato la tipica azione per ingestione che come noto determina un effetto a livello dell'epitelio del mesointestino con degradazioni reminiscenti a quelle causate dalle tossine Cry su insetti suscettibili (Ruiu *et al.*, 2012). Questi aspetti, contribuiscono all'ulteriore conoscenza sul batterio entomopatogeno *B. laterosporus*, il cui interesse sta crescendo di recente in relazione alle sue proprietà insetticide e antimicrobiche a largo spettro (Ruiu, 2013).

Livelli di tossicità significativi nei confronti della mosca domestica sono stati messi in evidenza anche nel caso di altri isolati batterici, sia provenienti da collezioni pre-esistenti che ottenuti con nuovi isolamenti condotti durante questo studio. Sono così emerse alcune specie batteriche con potenzialità nei confronti di questo insetto di interesse medico veterinario. Fra queste le specie *Bacillus firmus*, *Paenibacillus tundrae* e *Bacillus psychrodurans*, i cui effetti nei confronti della mosca domestica erano precedentemente sconosciuti, mentre il loro potenziale come pesticidi era stato messo recentemente in evidenza per altri ceppi. Così ad esempio, il *B. firmus* è attivo nei confronti di nematodi fitopatogeni (Giannakou *et al.*, 2007). Scarsa invece l'attività di ceppi appartenenti ad altre specie batteriche già impiegate nel controllo biologico in agricoltura come *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. thuringiensis*. Per contro, sono stati confermati gli effetti di *Bt var. israelensis* nei confronti delle larve della mosca e la relativa inefficacia contro gli adulti.

Scarsi gli effetti degli stessi isolati batterici nei confronti della mosca mediterranea della frutta.

Fra i ceppi batterici isolati da larve di *G. mellonella* infettate con nematodi entomopatogeni della collezione del Prof. Tarasco dell'Università degli Studi di Bari ed appartenenti ai generi *Steinernema* e *Heterhorhabditis*, solo alcuni hanno manifestato effetti significativi nei confronti di adulti e larve di *M.domestica*, al

contrario di quanto osservato su larve e adulti di *C. capitata*, sui quali è stata messa in evidenza una generale scarsa attività.

Molto significativa, invece, la risposta all'esposizione a questi batteri delle larve dei defogliatori *L. dispar* e *M. neustria*, sulle quali è stata rilevata un'elevata tossicità. Significativa anche la tossicità di *B. thuringiensis* var *kurstaki* e dei ceppi di riferimento di *P. luminescens* e di *X. nematophila*, somministrati sia per ingestione che per iniezione a questi insetti. In precedenza, De Marco Salvadori *et al* (2012) hanno dimostrato la tossicità di *Xenorhabdus* spp e *Photorhabdus* spp isolati da nematodi *Heterorhabditis*, in *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), con valori di mortalità superiori al 90%, a seguito dell'iniezione nell'addome della larva.

P. luminescens e di *X. nematophila* sono risultati solo in qualche caso attivi sulle mosche, e comunque con livelli di tossicità sempre inferiori rispetto ad altri entomopatogeni moschicidi come il *B. laterosporus*. In linea con questa osservazione, tra i batteri isolati dalle larve di *G. mellonella* infettate con i nematodi entomopatogeni non sono stati individuati ceppi appartenenti ai generi *Xenorhabdus* o *Photorhabdus*. Sono invece risultati più attivi i batteri appartenenti ai generi *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Alcaligenes*.

Infatti l'analisi del 16S rRNA mediante amplificazione del relativo gene e successivo sequenziamento, ha rivelato livelli di omologia con le sequenze depositate sul database NCBI variabili tra il 78 ed il 99%, delineando in molti casi che possa trattarsi di nuove specie. Aspetto, quest'ultimo, abbastanza probabile, in relazione all'originalità delle specie di nematodi entomopatogeni utilizzati per le infezioni di *G. mellonella*. È infatti probabile che i batteri isolati da queste ultime, poiché hanno rappresentato le specie preponderanti nell'emocele delle larve setticemiche, possano rappresentare specie simbiotici associate agli stessi nematodi. Non è però possibile escludere che possa anche trattarsi di specie associate al lepidottero e che, in corrispondenza dell'infezione dei nematodi, si siano comportate come specie opportuniste. Ulteriori studi di caratterizzazione dei nematodi, chiariranno la loro effettiva associazione con gli stessi. Independentemente dall'origine di queste specie, ai fini del presente lavoro ne sono stati messi in evidenza gli effetti tossici sugli insetti target. I risultati sono in linea con precedenti studi che hanno evidenziato il loro potenziale insetticida o l'associazione con nematodi. Ad esempio, nel caso di *Serratia*

spp, è già stata riportata l'associazione con i nematodi (Zhang *et al.*,2000; Abebe *et al.*, 2010; Torres *et al.*,2011). Non ultimo, le specie del genere *Serratia* sono capaci di produrre tossine insetticide non ancora ben conosciute (Castagnola *et al.*, 2014). Comune, in *Serratia*, anche la produzione di complessi proteici analoghi a quelli dei batteri dei generi *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*.

Tra le altre specie con attività significativa sugli insetti target anche specie con elevata omologia nei confronti di *Alcaligenes faecalis*, specie recentemente segnalata come simbionte di nematodi entomopatogeni (Park *et al.*, 2011). Anche il genere *Stehotrophomonas* è riportato tra i batteri endofitici di nematodi (Wu *et al.*, 2012), ed è anche segnalato il suo potenziale come insetticida (Sevim *et al.*, 2012).

Nota è anche la proprietà di produrre tossine insetticide da parte di batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*, che spesso colonizzano anche la rizosfera delle piante difendendole così dall'attacco dei parassiti (Péchy-Tarr *et al.*, 2008).

Oltre agli effetti letali (mortalità), in alcuni casi sono stati osservati effetti sub-letali sugli stadi giovanili di mosca domestica, con decremento del peso pupale e della percentuale di sfarfallamento. Anche questo aspetto si allinea a quanto riportato sugli effetti secondari causati da batteri entomopatogeni su questo insetto (Ruiu *et al.*, 2006).

In conclusione, il lavoro condotto con questo progetto di ricerca ha permesso di valutare la patogenicità nei confronti di insetti appartenenti a due diversi ordini (Ditteri e Lepidotteri) di nuovi isolati batterici, includendo sia isolati appartenenti a collezioni recenti che nuovi ceppi appositamente isolati da larve infettate con nematodi entomopatogeni. L'identificazione di questi ultimi isolati ha anche permesso di mettere in evidenza il potenziale di alcune specie nei confronti degli insetti target.

Ulteriori studi sono necessari per una caratterizzazione più approfondita di questi isolati, ed in particolare per metterne in evidenza la produzione delle tossine insetticide responsabili degli effetti osservati. Futuri studi permetteranno anche di testarne gli effetti su altri insetti target ed estendere le osservazioni dalle condizioni di laboratorio a quelle di campo al fine di valutarne l'effettiva utilità nel controllo biologico.

Bibliografia

- Abebe E., Abebe-Akele F., Morrison J. (2011). An insect pathogenic symbiosis between a *caenorhabditis* and *serratia*. *Virulence*, 2: 158-161.
- Aguillera MM., Hodge NC., Stall RE. (1993). Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. *Journal Invertebrate Pathology*, 62: 68-72.
- Aguillera MM., Smart GC. (1993). Development, reproduction and pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in monoxenic culture with different species of bacteria. *Journal Invertebrate Pathology*, 62: 289-294.
- Ajithkumar B., Ajithkumar VP., Iriye R., Doi Y., Sakai T. (2003). Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 253-258.
- Akhurst RJ. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes, Neoaplectana and Heterorhabditis. *Journal Genetic Microbiology*, 121: 303-309.
- Bascomb S., Lapage P., Willcox WR., Curtis MA. (1971). Numerical classification of the tribe Klebsielleae. *Journal of General Microbiology*, 66: 279-295.
- Bauer LS., Pankratz SH. (1992). Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60: 15-25.
- Bedding RA., Akhurst RJ. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21: 109-116.
- Berry RE., Moldenke AF., Miller JC., Wernz JG. (1993). Toxicity of diflubenzuron in larvae of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): effects of host Plant. *Journal of Economic Entomology*, 86: 809-814.
- Bhadra B., Roy P., Chakraborty R. (2005). *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 2155-2158
- Bizio B. (1823). Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. *Biblioteca Italiana o sia Giornale di Letteratura Scienze e Arti* 30: 275-295.

- Blackburn M., Golubeva E., Bowen D., French-Constant RH. (1998). A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*: histopathological effects of Toxin complex A(Tca) on the midgut of *Manduca sexta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3036-3041.
- Boemare N., Givaudan A., Brehelin M., Laumond C. (1997). Symbiosis and pathogenicity of nematode bacterium complexes. *Symbiosis*, 22: 21-45.
- Boemare N. (2002). Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R. (Eds), *Entomopathogenic Nematology*. Cabipublishing, Wallingford, UK, pp. 35-56.
- Boets A., Arnaut G., Van Rie J., Damme N. (2004). United States Patent Class 800279000.
- Bone Leon W., Singer Samuel. (1991). United States Patent No. 5,045,314.
- Boselli M., Curto GM., Tacconi R. (1997). Field efficacy of entomopathogenic nematodes against the sugra-beet weevil *Temnorhinus* (= *Conorrhynchus*) *mendicus* Gyll. (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 7 (2): 231-238.
- Boucias DG., Pendland JC. (1998). *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publisher, Massachusetts, USA.
- Breed RS., Murray EGD., Hitchens AP. (1948). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Broderick NA., Goodman RM., Raffa KF., Handelsman J. (2000). Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental of Entomology*, 29: 101-107.
- Burgerjon A. (1959). Titration et definition d'une unité biologique pour les préparations de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga*, 4: 201-206.
- Burman M. (1982). *Neoaplectana carpocapsae*: Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica*, 28: 62-70.
- Burnell AM., Stock SP. (2000). Heterorhabditis, Steinernema and their bacterial symbionts- lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2 (1): 31-42.
- Castagnola A., Stock SP. (2014). Common virulence factors and tissue targets of entomopathogenic bacterial for biological control of Lepidopteran pests. *Insects* 5 (1): 139-166.

- Chung W., Chen L., Lo W., Kuo P., Tu J., Kuo C. (2013). Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens* WW4. *Genome Announcements*, 1 (2): e00126-13.
- Cordova-Kreylos AL., Fernandez LE., Koivunen M., Yang A., Flor-Weiler L., Marrone P.G. (2014). Isolation and characterization of *Burkholderia rinojensis* sp. nov., a non-Burkholderia cepacia complex soil bacterium with insecticidal and miticidal activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 7669-7678.
- Cossentine JE., Jensen LB., Moyls L. (2002). Fruit bins washed with *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) to control *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Biocontrol Science and technology*, 12 (2): 251-258.
- Deseö KV., Benuzzi M., Cornale R. (1986). Nuove acquisizioni con nematodi entomopatogeni (*Steinernema feltiae* Filip.) nella lotta contro le larve di *Synanthedon myopaeformis* Brkh. (Lepidoptera; Aegeriidae). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1: 83-92.
- De Marco Salvadori J., Schumacher Deferrari M., Ligabue-Braun R., Yamazaki Lau E., Salvadori JR., Carlini CR. (2012). Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological control* 63 (3): 253-263.
- Deseö KV. (1989). I nematodi entomopatogeni nella difesa delle piante. *Informatore Fitopatologico*, 39 (5): 25-30.
- Deseö-Kovács KV., Rovesti L. (1992). Lotta microbiologica contro i fitofagi. Teoria e pratica. Casa editrice Edagricole, collana Edizioni Agricole, Bologna. 266 pp.
- Dulmage HD., Boening OP., Rehnborg CS., Hansen GD. (1971). A proposed standardized bioassays for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. *Journal of Invertebrate Pathology*, 18: 240-245.
- Endo Y., Nishiitsutsuji-Uwo J. (1980). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 90-103.
- EPPO (2014). PQR – EPPO database on quarantine pests (available online). <http://www.eppo.int>.

- Favret EM., Yousten AA. (1985). Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45: 195-203.
- Ffrench-Constant R., Waterfield, N. (2006). An ABC guide to the bacterial toxin complexes. *Advances Applied Microbiology*, 58: 169-183.
- Ffrench-Constant RH., Dowling A., Waterfield NR. (2007). Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon*, 49: 436-451.
- Fimiani P. (1989). Pest status: Mediterranean Europe. In: Robinson AS, Hooper GHS, editors. *World Crop Pests, Fruit Flies: Biology, Natural Enemies and Control*, 3A: 39-50. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Fischer-Le Saux M., Viallard V., Brunel B., Normand P., Boemare N.E. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1645-1656.
- Forst S., Neilson K. (1996). Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews*, 60 (1): 21-43.
- Forst S., Clarke D. (2002). Bacteria nematode symbiosis. In: Gaugler, R. Ed. *Entomopathogenic Nematology*. Cabi Publishing. Wallingford. UK, 57-77.
- Gaspari G., Guglielmino CR., Malacidra AR., Milani R. (1991). Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied.) (medfly). *Heredity*, 67: 347-356.
- Gavini F., Ferragut C., Izard D., Trinel PA., Leclerc H., Lefebvre B., Mossel DAA. (1979). *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29: 92-101.
- Geiger A., Fardeau ML., Falsen E., Ollivier B., Cuny G. (2010). *Serratia glossinae* sp. nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1261-1265.
- Giannakou IO., Anastasiadis IA., Gowen SR., Prophetou-Athanasiadou DA. (2007). Effects of a non-chemical nematicide combined with soil solarization for the

- control of root-knot nematodes. Source of the Document Crop Protection, 26: 1644-1654.
- Glare TR., O'Callaghan M. (2000). *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley & Sons, Ltd., 350 pp.
- Goldberg LJ., 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.
- Gouge DH., Snyder JL. (2006). Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. Journal of Invertebrate Pathology, 91: 147-157.
- Granados RR., Federici, BA. (1986). "The Biology of Baculoviruses," Vols. I and II. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Grimont PAD., Grimont F., Dulong de Rosna HLC., Sneath PHA. (1977). Taxonomy of the genus *Serratia*. Journal of General Microbiology, 98: 39-66.
- Grimont PAD., Grimont F. (1978). The genus *Serratia*. Annual Review of Microbiology, 32: 221-248.
- Grimont PAD., Grimont F., Lysenko O. (1979). Species and biotype identification of *Serratia* strains associated with insects. Current Microbiology, 2: 139-142.
- Grimont PAD., Grimont F., Starr MP. (1981). *Serratia* species isolated from plants. Current Microbiology, 5: 317-322.
- Grimont PAD., Jackson TA., Ageron E., Noonan MJ. (1988). *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. International Journal of Systematic Bacteriology, 38: 1-6.
- Guo L., Fatig RO., Orr GL., Schafer BW., Strickland JA., Sukhapinda K., Woodsworth AT., Petell, JK. (1999). *Photorhabdus luminescens* W-14 Insecticidal Activity Consists of at Least Two Similar but Distinct Proteins: Purification and characterization of toxin A and toxin B. Journal Biological Chemistry, 274: 9836-9842.
- Hansen BM., Hendriksen NB. (2001). Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Applied and Environmental Microbiology, 67: 185-189.

- Hazir S., Kaya HK., Stock SP., Keskin N. (2003). Entomopathogenic Nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27: 181-202.
- Hill CA., Pinnock DE. (1998). Histopathological effect of *Bacillus thuringiensis* on the alimentary canal of the sheep louse, *Bovicola ovis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 9-20.
- Hunter-Fujita FR., Entwistle, PF., Evans HF., Crook NE. (1998). *Insect Viruses and Pest Management*. 620 pp.
- Hurst MRH., Becher SA., Young SD., Nelson TL., Glare TR. (2011). *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 844-849.
- Jackson TA., Huger AM., Glare TR. (1993). Pathology of amber disease in the new Zealand grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 61 (2): 123-130.
- Johnson DE., McGaughey WH. (1996). Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified cry proteins toward Indianmeal moth larvae. *Current Microbiology*, 33: 54-59.
- Knowles BH., Ellar DJ. (1987). Colloid-osmotic is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochemical and Biophysical Acta*, 924: 509-518.
- Krieg A., Huger AM., Langenbruch Schnetter W. (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *Tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 96: 500-508.
- Kuramoto H., Shimaku M. (1992). Pathogenicity of some entomogenous fungi of the adult house fly. *Journal Japanese Applied Entomology and Zoology*, 36: 202-203.
- Lacey LA., Federici BA. (1979). Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 33: 171-182.
- Lacey LA., Unruh TR. (1998). Entomopathogenic nematodes for control of codling moth: effects of nematode species, dosage, temperature and humidity under laboratory and simulated field conditions. *Biological Control*, 13: 190-197.

- Lacey LA., Chauvin RL. (1999). Entomopathogenic nematodes for control of diapausin codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in fruit bins. *Journal of Economic Entomology*, 92 (1): 104-109.
- Lane NJ., Harrison JB., Lee WM. (1989). Changes in microvilli and golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by an insecticidally active bacterial deltaendotoxin. *Journal of Cell Science*, 93: 337-347.
- Lahkim-Tsrer L., Pascar-Gluzman C., Margalit J., Barak Z. (1983). Larvicidal Activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, serovar H14 on *Aedes aegypti*: Histopathological Studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 104-116.
- Lang AE., Schmidt G., Schlosser A., Hey TD., Larrinua IM., Sheets JJ., Mannherz HG., Aktories K. (2010). *Photorhabdus luminescens* Toxins ADP-Ribosylate Actin and RhoA to Force Actin Clustering. *Science*, 327: 1139-1142.
- Lang AE., Schmidt G., Sheets JJ., Aktories K. (2011). Targeting of the actin cytoskeleton by insecticidal toxins from *Photorhabdus luminescens*. *Naunyn Schmiedebergs Archivies Pharmacology*, 383: 227-235.
- Laubach AC. (1916). Studies on aerobic, sporebearing, non pathogenic bacteria. Spore bearing organism in water. *Journal Bacteriology*, 1: 505-512.
- Lengyel K., Lang E., Fodor A., Szállás E., Schumann P., Stackebrandt E. (2005). Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov. and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28 (2): 115-122.
- Lentini A., Luciano P. (1995). *Bacillus thuringiensis* in the management of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) in Sardinian cork-oak forests. *IOBC/WPRS Bulletin* 18: 104-109.
- Li J., Carrol J., Ellar DJ. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353: 815-821.
- Li J., Koni PA., Ellar DJ. (1996). Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin cytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *Journal of Molecular Biology*, 257: 129-152.

- Liu D., Burton S., Glancy T., Li ZS., Hampton R., Meade T., Merlo DJ. (2003). Insect resistance conferred by 283-KDa Photorhabdus luminescens protein TcdA in Arabidopsis thaliana. Nature Biotechnology, 21: 1222-1228.
- Liu Q., Mracek Z., Zhang L., Puza V., Dong L. (2012). Re-description of *Oscheius chongmingensis* (Zhang *et al.*, 2008) (Nematoda: Rhabditidae) and its entomopathogenicity. Nematology, 14: 139-149.
- Luciano P., Prota R. (1982). La dinamica di popolazione di *Lymantria dispar* L. in Sardegna. II. Osservazioni sul parassitismo nel corso della gradazione. Memoria Società entomologica italiana, 60 (1981): 227-234.
- Lysenko O., Weiser J. (1974). Bacteria associated with the nematode *Neoplectana carpocapsae* and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 24: 332-336.
- Maddrel SHP., Lane NJ., Harrison JB., Overton JA., Moreton RB. (1988). The initial stages in the action of an insecticidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the epithelial cells of the Malpighian tubules of the insects, *Rhodnius prolixus*. Journal of Cell Science, 90: 131-144.
- Martens EC., Heungens K., Goodrich BH. (2003). Early colonization events in the mutualistic association between *Steinemema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. Journal of Bacteriology, 185: 3147-3154.
- Martin PAW., Gundersen-Rindal D., Blackburn M., Buyer J. (2007). *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 993-999.
- Mathavan S., Sudha PM., Pechimuthu SM. (1989). Effect of *Bacillus thuringiensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: histopathological and histochemical study. Journal of Invertebrate Pathology, 53: 217-227.
- Matsuyama Yamamoto JK., Miwatani T., Honda T. (1995). Monoclonal antibody developed against a hemolysin of *Bacillus thuringiensis*. Microbiology and Immunology, 39: 619-622.
- McCray A.H. (1917). Spore-forming bacteria in the apiary. Journal of Agriculture Research, 8: 399-420.

- Miyasono M., Inagaki S., Yamamoto M., Ohba M., Ishiguro T., Takeda R., Hayashi Y. (1994). Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xilostella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63: 111-112.
- Mohsen ZH., Ibrahim MAK., Al-Jadoo NS. (1986). Isolation of spore-forming bacilli from mosquitoes in natural breeding habitats in Iraq. *Entomophaga*, 31: 191-196.
- Moran NA., Russell JA., Koga R., Fukatsu T., (2005). "Evolutionary Relationships of Three New Species of Enterobacteriaceae Living as Symbionts of Aphids and Other Insects". *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6): 3302–3310.
- Navon A. (2000). Bioassays of *Bacillus thuringiensis*. *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, Ed. A.Navon & KRS Ascher, CABI publishing, Oxon, UK.
- Oliveira EJ., Rabinovitch L., Monnerat RG., Passos LK., Zahner V. (2004). Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 6657-6664.
- Ovcharenko LP., Voznyuk TM., Zaetz IE., Potopalsky AI., Reva O., Kozyrovska NO. (2010). A mobile genetic element in *Serratia marcescens*, a causative agent of onion disease. *Biopolymers and Cell*, 26 (4): 279-285.
- Park HW., Kim YO., Ha JS., Youn SH., Kim HH., Bilgrami AL., Shin CS. (2011). Effects of associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). *Canadian Journal of Microbiology* 57: 750-758.
- Payne CC. (1982). Insect viruses as control agents. *Parasitology*, 84: 35-77.
- Péchy-Tarr M., Bruck DJ., Maurhofer M., Fischer E., Vogne C., Henkels MD., Donahue KM., Grunder J., Loper JE., Keel C. (2008). Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Microbiology*, 10: 2368-2386.
- Percy J., Fast PG. (1983). *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 86-98.
- Pilarska D., Mcmanus M., Pilarski P., Georgiev G., Mirchev P., Linde A. (2006). Monitoring the establishment and prevalence of the fungal entomopathogen

- Entomophaga maimaiga in two *Lymantria dispar* L. populations in Bulgaria. *Journal of Pest Science*, 79: 63-67.
- Poinar GO Jr., (1986). Entomophagous nematodes. In Franz J. M. (ed.). 95 – 121..
- Quesada-Moraga E., Santiago-Alvarez C. (2001). Histopathological effect of *Bacillus thuringiensis* on the midgut of the Mediterranean locust *Dociostaurus maroccanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 183-186.
- Rae R., Riebesell M., Dinkelacker I. (2008). Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus* nematodes and fitness consequences. *Journal of Experimental Biology*, 12: 1927-1936.
- Rausell C., De Decker N., Garcia-Robles I., Escriche B., Van Kerkhove E., Real MD., Martinez-Ramirez AC. (2000). Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the midgut of the nun moth *Lymantria monacha*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75: 288-291.
- Rivers DB., Vann CN., Zimmack HL., Dean DH. (1991). Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58: 444-447.
- Ruiu L., Delrio G., Ellar DJ., Floris I., Paglietti B., Rubino S., Satta A. (2006). Lethal and sublethal effects of *Brevibacillus laterosporus* on the housefly (*Musca domestica*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 118: 137-144.
- Ruiu L., Floris I., Satta A., Ellar DJ. (2007). Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* strain lacking parasporal crystals against *Musca domestica* and *Aedes aegypti*. *Biological Control*, 43 (1): 136-143.
- Ruiu L., Floris I. (2012). Nuove prospettive di controllo microbiologico degli insetti nocivi. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, LX: 173-176.
- Ruiu, L., Satta A., Floris I. (2013). Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. *Bulletin Insectology*, 66: 181-186.
- Ruiu L. (2013). *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. *Insects*, 4: 476-492.
- Sáenz A. (1998). *Biología y patogenicidad de Steinernema feltlae cepa Villapinzón (Rhabditida:Steinernematidae)*. Memorias seminario Perspectivas sobre Nematodos Fitopatógenos y Eniopatógenos en Colombia. Comité Regional de Cundinamarca de la Sociedad Colombiana de Entomología. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. Junio 12 de 1998.

- Sáenz A. (1999a). *Actualidad y perspectivas de Steinernema feltiae en el altiplano cundiboyasense*. Memorias seminario Nematodos Entomopatógenos. Línea de investigación en nematodos entomopatógenos. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. Septiembre 25: 19-21.
- Sáenz A. (1999b). Evaluación de procedimientos para el aislamiento y almacenamiento del entomonemátodo nativo *Steinernema fehic* (Rhabditida: Steinernematidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 25 (3-4): 209-215.
- Sáenz A. (1999c). *Introducción al estudio de nematodos entomopatógenos. Manual I* Curso nematodos entomopatógenos. Línea de investigación en nematodos entomopatógenos. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. Septiembre 20-25: 120.
- Sáenz A. (1999d). *Los nematodos entomopatógenos: una alternativa del control biológico*. Memorias: Los insectos patrimonio natural y cultural de Colombia. XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Socolen. Santa Fe de Bogotá, DC. 28-30 julio: 82-97.
- Samson PR., Milner RJ., McLennan PD. (1994). Field trials of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Inopus rubriceps* (Diptera: Stratiomyidae) in sugarcane. *Journal of Environmental Entomology*, 23: 749-754.
- Scogliamiglio A., Giandomenico N., Talamè M. (1968). Prove di lotta biologica contro la *Leptinotarsa decemlineata* (Say) con l'impiego del nematode DD-136 Dutky e Houg. 1955. *Boll. Lab. Ent. Agr. Portici*, 191-204.
- Sevim A., Gokce C., Erbas Z., Ozkan F. (2012). Bacteria from *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and their biocontrol potential. *Journal of Basic Microbiology*, 52: 695-704.
- Shishinova M., Budurova L., Gradinarov D. (1997). Contribution to the fauna of the entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) from Bulgaria I. *Biotechnology & biotechnological Equipment*, 1: 45-51.
- Singer S. (1996). The utility of morphological group II *Bacillus*. *Advances in Applied Microbiology*, 42: 219-261.
- Singh GJP., Gill SS. (1985). Myotoxic and neurotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal toxin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 24: 406-414.

- Singh GJP., Schouest LPJ., Gill SS. (1986). Action of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin on the ultrastructure of the House fly larva neuromuscular system in vitro. *Journal of invertebrate Pathology*, 47: 155-166.
- Smirnova TA., Minenkova IB., Orlova MV., Lecadet MM., Azizbekyan RR. (1996). The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. *Research in Microbiology*, 147: 343-350.
- Smith RA., Barry JW. (1998). Environmental persistence of *Bacillus thuringiensis* spores following aerial application. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 263-267.
- Spies AG., Spence KD. (1985). Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. *Tissue and Cell*, 17: 379-394.
- Stapp C. (1940). *Bacterium rubidaeum* nov. spec. *Zentralbl. Bakteriol. Abt.*, 2 (102): 251-260.
- Steinkraus DC., Geden CJ., Rutz DA., Kramer JP. (1990). First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, 27: 309-312.
- Stock SP., Campbell JF., Nadler SA. (2001). Phylogeny of *Steinernema* Tavassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, 87 (4): 877-889.
- Stoffolano JG., Mazzini M. (1988). The sex specific, modified orbital setae, on the head of the male mediterranean fruit-fly, *Ceratitis capitata*. *Wi Redia*, 71 (2): 491-590.
- Tailliez P., Pagès S., Ginibre N., Boemare N. (2006). New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (12): 2805-2818.
- Tanada Y., Hess RT. (1991). Baculoviridae. Granulosis virus. In "Atlas of Invertebrate Viruses" JR. Adams and JR. Bonami, Eds., pp. 227-257. CRC Press, Boca.
- Tarasco E., Triggiani O. (1997). Survey of *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Rhabditida: Nematoda) in Southern Italian soils. *Entomologica*, 31: 117-123.
- Tarasco E., Triggiani O., Sai K., Zamoum M. (2009). Survey of entomophagous nematodes in Algerian soils and their activity at different temperatures. *Frustula Entomologica*, XXXII: 31-42.

- Tarasco E., Clausi M., Rappazzo G., Panzavolta T., Curto G., Sorino R., Oreste M., Longo A., Leone D., Tiberi R., Vinciguerra MT., Triggiani O. (2014). Biodiversity of entomopathogenic nematodes in Italy. *Journal of Helminthology*, pp 1-8.
- Torres-Barragan A., Suazo A., Buhler W., Cardoza Y. (2011). Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. *Biological control*, 59 (2): 123-129.
- Triggiani O. (2009). Strategie di controllo con entomopatogeni. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, pp 99-106.
- Udaka S., Yamagata H. (1993). Protein secretion in *Bacillus brevis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:137-143.
- Unruh TR., Lacey LA. (2001). Control of codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), with *Steinernema carpocapsae*: effects of supplemental wetting and pupation site on infection rate. *Biological Control*, 20: 48-56.
- Vega FE., Kaya HK. (2012). *Insect Pathology*, second ed. Elsevier Inc., 504 pp.
- Waterfield NR., Bowen DJ., Fetherston JD., Perry RD., French-Constant RH. (2001). The tc genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends Microbiology*, 9: 185-191.
- Watson DW., Geden CJ., Long SJ., Rutz DA. (1995). Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biological Control* 5: 405-411.
- Weisburg WG., Barns SM., Pelletier DA., Lane DJ. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Weiser J., Zizka Z. (1994). Effect of *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin on ultrastructure of midgut cells of *Culex siriens*. *Cytobios*, 77: 19-27.
- Whang Y., Fang X., An F., Wang G., Zhang X. (2011). Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. *Microbial Cell Factories*, 10: 98.
- Wieber AM., Webb RE., Ridgway RL., Thorpe KW., Reardon RC., Kolodny-Hirsch DM., Tatman KM. (1995). Effect of seasonal placement of *Cotesia melanoscela* (Hym.: Braconidae) on its potential for effective augmentative release against *Lymantria dispar* (Lep.: Lymantriidae). *Entomophaga*, 40: 281-292.

- Williams RP., Quadri SMH. (1980). The pigment of *Serratia*. 31-79. von Graevenitz, A., and Rubin, S. J. (ed.) The genus *Serratia*. Boca Raton, CRC Press.
- Wu XQ., Yuan WN., Tian XJ., Fan B., Fang X., Ye JR., Ding XL. (2012). Specific and functional diversity of endophytic bacteria from pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* with different virulence. International Journal of Biological Science, 9: 34-44.
- Xiao G., Ying S., Zheng P., Wang ZL., Zhang S., Xie XQ., Shang Y., Leger RJ., Zhao GP., Wang C., Feng MG. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. Sci. Rep. 2: 483 DOI: 10.1038/srep00483.
- Xu D., Cotè JC. (2003). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 695-704.
- Younes MWF., Hashem AG., El-Abassi TS., Abo-Houla AIA. (1996). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* on the adult stage of Mediterranean Fruit Fly *Ceratitidis capitata* (Wied.). Journal of Union Arab Biologists Cairo, 5 (A): 189-203.
- Zhang C-X., Yang S-Y., Xu M-X., Sun J., Liu H., Liu JR., Liu H., Kan F., Sun J., Lai R., Zhang Ky. (2000). *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 1603-1608.
- Zhang KY., Liu XH., Tan J., Wang Y., Qiao L., Yedid G., Dai CS., Qiu RL., Yan XW., Tan HW., Su ZY., Lai R., Gao GF. (2012). *Heterorhabditoides rugaoensis* sp. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel Highly Pathogenic entomopathogenic Nematode Member of Rhabditidae. Journal of Nematology, 44: 348-360.