

STEFANO CIVOLANI

Lotta ai fitofagi

Un approccio farmacologico e biotecnologico
Prospettive e sfide

Indice

- p. 9 Capitolo 1
Insetti fitofagi
- 13 Capitolo 2
Sistema nervoso e sostanze neurotossiche
- 2.1. Le cellule del sistema nervoso degli insetti, 13
 - 2.2. Struttura del sistema nervoso degli insetti, 15
 - 2.3. Funzionamento del sistema nervoso e i bersagli nella lotta ai fitofagi, 17
 - 2.4. Canali ionici voltaggio dipendenti, 19
 - 2.5. Canali ionici a potenziale transiente, 30
 - 2.6. Canali ionici intracellulari, 33
 - 2.7. Canali ionici ligando dipendenti, 38
 - 2.8. Enzima acetil colinesterasi, 50
- 53 Capitolo 3
Sistema nervoso e manipolazione del comportamento
- 3.1. I sensilli e i sensi negli insetti, 53
 - 3.2. La scelta della pianta ospite, 60
 - 3.3. La manipolazione dei segnali: i repellenti, 62
 - 3.4. La manipolazione dei segnali: i sinomoni, 67
 - 3.5. La manipolazione dei segnali: i feromoni, 69
 - 3.6. L'approccio push-pull, 74
 - 3.7. La manipolazione dei segnali: le microvibrazioni, 78
- 81 Capitolo 4
Sistema digerente e sostanze di difesa delle piante
- 4.1. Apparato boccale, 81
 - 4.2. Il canale alimentare o intestino, 84
 - 4.3. I nutrienti e le sostanze di difesa della pianta, 95

- 4.4. Meccanismi d'adattamento, 106
- 4.5. Le piante resistenti ai fitofagi, 109
- p. 115 Capitolo 5
 - Sistema digerente e microrganismi*
 - 5.1. Trasmissione di microrganismi fitopatogeni, 115
 - 5.2. I microrganismi simbiotici, 123
 - 5.3. La lotta con i microrganismi simbiotici, 127
 - 5.4. I batteri entomopatogeni, 129
 - 5.5. Piante transgeniche esprimenti la tossina Cry, 137
 - 5.6. Virus entomopatogeni, 139
 - 5.7. I baculovirus ricombinanti, 144
 - 5.8. Le barriere dell'insetto e i vettori delle biotossine, 151
- 159 Capitolo 6
 - Sistema digerente e il silenziamento genico da RNAi*
 - 6.1. Il silenziamento genico mediante interferenza da RNA, 159
 - 6.2. L'applicazione dell'RNAi nella lotta ai fitofagi, 166
 - 6.3. Nanoparticelle e nanomateriali come veicoli per migliorare l'approccio RNAi, 184
- 189 Capitolo 7
 - Sistema respiratorio e respirazione cellulare*
 - 7.1. Sistema respiratorio degli insetti, 189
 - 7.2. La respirazione cellulare, 189
- 195 Capitolo 8
 - Sistema escretore*
 - 8.1. Struttura e funzioni del sistema escretore, 195
 - 8.2. La lotta ai fitofagi attraverso l'alterazione dell'escrezione, 201
- 203 Capitolo 9
 - Sistema di secrezione*
 - 9.1. Ghiandole dei feromoni sessuali, 203
 - 9.2. Ghiandole dei feromoni di aggregazione e dispersione, 205
 - 9.3. Ghiandole salivari e secrezioni orali, 206
- 221 Capitolo 10
 - Sistema endocrino e neuroendocrino*
 - 10.1. Crescita e sviluppo, 221
 - 10.2. La lotta ai fitofagi attraverso l'alterazione della crescita e sviluppo, 235
 - 10.3. Il metabolismo energetico, 241

- 10.4. Alimentazione e diuresi, 242
- 10.5. Accoppiamento e riproduzione, 246
- 10.6. Amine biogeniche, 249
- 10.7. Neuropeptidi, amine biogeniche e bursicone come potenziali bersagli di agenti di lotta ai fitofagi, 254

p. 259 Capitolo 11

Sistema circolatorio e immunitario

- 11.1. Il sistema circolatorio, 259
- 11.2. Sistema immunitario, 259
- 11.3. L'immunità di tipo cellulare, 260
- 11.4. L'immunità di tipo umorale, 263
- 11.5. Risposta immunitaria verso i virus, 270
- 11.6. L'elusione dal sistema immunitario dei parassitoidi, 271
- 11.7. L'elusione dal sistema immunitario degli entomopatogeni, 280

289 Capitolo 12

Sistema riproduttore

- 12.1. Il sistema riproduttore, 289
- 12.2. La lotta ai fitofagi attraverso la riduzione della fertilità, 295

303 Capitolo 13

La lotta ai fitofagi

- 13.1. L'evoluzione della lotta ai fitofagi, 303
- 13.2. La ricerca e lo sviluppo di nuovi insetticidi, 304
- 13.3. L'individuazione di nuovi bersagli nell'era post genomica, 317
- 13.4. Le nanotecnologie nella lotta ai fitofagi, 320

Capitolo 1

Insetti fitofagi

La classe degli insetti con oltre un milione di specie descritte, rappresenta il più grande tra i raggruppamenti di animali che popolano il nostro pianeta. La diversità che contraddistingue le differenti specie ha conferito agli insetti, da oltre 300 milioni di anni, un ruolo di primo piano nella colonizzazione della Terra, essendo presenti in qualsiasi ambiente in cui vi sia sostanza organica. Circa la metà delle specie di insetti si ciba di piante e per questo vengono definite specie fitofaghe e solamente una esigua parte di loro, circa il 5%, vive a spese di piante coltivate dall'uomo. In natura l'equilibrio tra gli insetti fitofagi e le piante è stato raggiunto in milioni di anni di coevoluzione attraverso il fenomeno del reciproco adattamento. Questo equilibrio tuttavia è stato profondamente modificato dall'addomesticamento delle piante stesse da parte dell'uomo e dalle comuni pratiche agricole. Soprattutto negli ultimi 100 anni le tecniche di coltivazione hanno dovuto evolversi per soddisfare il crescente aumento della popolazione mondiale. Di conseguenza, antiche tecniche di coltivazione sono state abbandonate e sostituite con tecniche meno sostenibili, capaci di mutare profondamente le condizioni di sviluppo delle piante, con conseguenti e imprevisi gravi attacchi di insetti fitofagi. Particolarmente drammatici sono gli effetti generati dall'abbandono delle rotazioni colturali, dall'aumento della densità di impianto, dal cambiamento delle tecniche di irrigazione, dalla concimazione intensiva, dalla meccanizzazione, dalla coltivazione in ambiente protetto, e soprattutto dall'impiego di materiale genetico uniforme. Tutto ciò è stato necessario e lo sarà ancora di più in futuro visto il trend dell'aumento della popolazione mondiale, che in base ad una stima raggiungerà nel 2050 i nove miliardi di persone. L'incremento annuo delle produzioni di mais, grano, riso e soia dovrebbe quindi crescere parallelamente alla

sopracitata crescita della popolazione per poter soddisfare l'incremento di popolazione (stimato del 2,4% all'anno), ma tale valore è attualmente molto più basso (circa la metà). Di conseguenza vi è la necessità di proteggere sempre più le produzioni agricole con nuove tecnologie che tengano in considerazione oltre alle rese produttive anche gli aspetti ecologici e di sostenibilità ambientale e la continua perdita di attività degli insetticidi utilizzati. Attualmente si ritiene che circa il 40% della produzione agricola mondiale sia annualmente persa prima della raccolta a causa di insetti, acari, nematodi, crittogame e malerbe. Questa percentuale aumenta di un ulteriore 10% durante la conservazione, in particolare quella dei cereali. La perdita dovuta agli insetti (e acari) in pre-raccolta varia dal 15% al 18% ed è causata per la maggior parte dalle larve dei lepidotteri, anche se vi sono altri importanti ordini che generano danni come i coleotteri, gli emitteri, i ditteri, gli ortotteri, gli imenotteri e i tisannotteri. Tuttavia le perdite stimate sarebbero ben maggiori (dal 20 al 50%) in assenza di una corretta difesa. Fra queste sono rappresentative sia quelle ricordate dall'antichità come le invasioni delle cavallette fino alle più recenti invasioni avvenute nel 1800 fra cui la dorifora della patata, *Leptinotarsa decemlineata* e la fillossera della vite, *Viteus vitifoliae* che hanno influito in modo spesso decisivo sullo sviluppo delle attività umane, determinando profondi cambiamenti nelle tecniche agricole e anche sconvolgimenti negli assetti economici e sociali. Anche recentemente, l'introduzione in Italia di fitofagi esotici come il fillominatore del pomodoro, *Tuta absoluta*, il moscerino dei piccoli frutti, *Drosophila suzukii*, la Cimice asiatica, *Halyomorpha halys* e altri "alieni" hanno creato seri problemi alle coltivazioni. Nei diversi ordini di insetti fitofagi (nove su trenta) vi è una gamma continua di specie che si cibano solamente su un'unica specie vegetale ed altre che invece si alimentano su un grande numero di specie vegetali appartenenti anche a gruppi sistematici lontani. È quindi usuale raggruppare gli insetti fitofagi in categorie in funzione della loro molteplicità di piante ospiti utilizzate come fonte di cibo, ma nello stesso tempo è importante sottolineare che non esistono dei veri e propri confini per separare questi gruppi. Per i fitofagi le categorie più comunemente utilizzate sono: i monofagi, gli oligofagi e i polifagi mentre nel mondo anglosassone è più comune suddividere i fitofagi in generalisti (polifagi) e specialisti (oligofagi e monofagi). Gli insetti monofagi in senso stretto sono quelli che si cibano solamente di una specie vegetale, ma il termine viene spesso esteso a insetti che si alimentano su specie dello stesso

genere. Il termine oligofagi è utilizzato in riferimento a quei fitofagi che si alimentano solitamente su piante appartenenti a differenti generi ma di una stessa famiglia. Tuttavia alcune specie oligofaghe possono alimentarsi su svariate specie di piante appartenenti a diversi gruppi sistematici ma con alcune caratteristiche specifiche in comune. Per esempio la larva della rapaiola, *Pieris rapae* si alimenta principalmente su specie della famiglia delle Brassicaceae, ma anche sul crescione (*Nasturtium* spp.) appartenente alla lontana famiglia delle Tropaeolaceae. Queste differenti specie vegetali sono caratterizzate dal possedere in comune composti come i glucosinolati. Gli insetti polifagi si alimentano su molteplici specie appartenenti a diverse famiglie di piante senza che vi siano caratteristiche comuni che governino la scelta alimentare dell'insetto. Gli insetti polifagi non hanno la stessa preferenza verso le piante che incontrano: una specie polifaga per eccellenza come la cavalletta del deserto, *Schistocerca gregaria*, si alimenta diversamente su 400 specie di piante. Ciò che governa il livello di accettazione o rigetto dell'ospite degli insetti polifagi è infatti il semplice bilancio fra gli input fagostimolanti e quelli fagodeterrenti che vengono identificati nelle diverse specie di piante. Negli insetti polifagi la possibile fagostimolazione da parte di una pianta non ospite viene limitata dalla componente deterrente della pianta stessa. Anche nelle specie più specialiste come quelle oligofaghe e monofaghe (che rappresentano la maggioranza fra gli insetti fitofagi) la scelta della pianta ospite implica il bilancio fra gli input dei fagodeterrenti e l'input dei fagostimolanti, ma in questi però, alcuni specifici segnali chimici hanno un ruolo fondamentale nel determinare la scelta (cfr. par. 3.2). Sebbene esempi di specie di insetti monofagi, oligofagi, polifagi sono presenti in tutti i maggiori gruppi di insetti fitofagi, essi non sono uniformemente distribuiti attraverso i differenti ordini. L'ordine degli ortotteri, e più precisamente il gruppo delle cavallette, si discosta dagli altri ordini di insetti per la scarsa specializzazione verso le piante ospiti. Circa il 60% delle specie di cavallette studiate sono polifaghe e il rimanente è oligofago. In tutti gli altri ordini di insetti fitofagi il range di piante mangiate da singole specie di insetto è di solito molto più limitato e il 70% o più delle specie è oligofago o monofago. La specializzazione non avviene solamente verso alcuni gruppi sistematici di piante ma anche verso alcune parti della stessa specie vegetale soprattutto per insetti di piccole dimensioni e poco mobili mentre contrariamente insetti di grandi dimensioni e dotati di buona mobilità come le cavallette o le nottue del

genere *Spodoptera* si cibano di foglie, fiori e steli fino a distruggere completamente la pianta. La specializzazione su particolari parti di piante è frequente fra le forme larvali di insetti olometaboli (ditteri, coleotteri e lepidotteri) e specialmente di quelli che formano mine fra i tessuti della pianta. In aggiunta alla specializzazione verso specifiche parti di piante alcuni insetti si alimentano solo da specifici tessuti. Per esempio le larve minatrici dei lepidotteri dei generi *Phyllocnistis*, *Leucoptera*, *Litocolletis* completano il loro sviluppo fra le due epidermidi della foglia. Una specializzazione ancora più spinta è presente in quei fitofagi con apparato boccale pungente succhiatore appartenenti all'ordine degli emitteri (cfr. par. 4.1), che grazie alla forte modificazione delle diverse parti dell'apparato boccale sono in grado di penetrare il tessuto fogliare e cibarsi nei tessuti interni della pianta.

I fitofagi come tutti gli insetti hanno sistemi anatomo-fisiologici di vitale importanza la cui comprensione è fondamentale per sviluppare nuovi mezzi di lotta per la protezione delle coltivazioni da parte dell'uomo. Fra questi abbiamo un sistema nervoso (capitoli 2 e 3), un sistema digerente (capitoli 4, 5 e 6), un sistema respiratorio (capitolo 7), un sistema escretore (capitolo 8), un sistema secretore (capitolo 9) un sistema endocrino e neuroendocrino (capitolo 10), un sistema circolatorio ed immunitario (capitolo 11), e un sistema riproduttore (capitolo 12). Alcuni di questi sistemi rappresentano dei bersagli o "target" già utilizzati da tempo mentre altri potrebbero diventare nuovi potenziali bersagli. Contrariamente, molti di questi possiedono delle barriere che vanificano l'attività di potenziali mezzi di lotta. Alcuni di questi sistemi verranno descritti in dettaglio anche a livello molecolare, alla luce dei progressi che le biotecnologie possono apportare nella lotta ai fitofagi.

Capitolo 2

Sistema nervoso e sostanze neurotossiche

2.1. Le cellule del sistema nervoso degli insetti

L'elemento di base del sistema nervoso negli insetti, come nei vertebrati è la cellula nervosa o neurone a cui sono associate altre strutture quali le cellule del Glia e altre cellule accessorie.

2.1.1. *Neuroni*

I neuroni negli insetti possono essere distinti in tre tipologie (figura 2.1): neuroni sensoriali, presenti in strutture chiamate sensilli, sono bipolari e afferenti, ossia trasmettono gli impulsi dalla periferia ai gangli (ammassi di cellule nervose); neuroni motori, associati al sistema muscolare, sono unipolari, hanno il corpo cellulare localizzato nella parte più esterna dei gangli o cortex e sono efferenti, ossia trasmettono gli impulsi dai gangli alla periferia; neuroni associativi, detti anche interneuroni, hanno i corpi cellulari localizzati nella parte esterna dei gangli, sono multipolari per la presenza di una vasta ramificazione di dendriti localizzati nella parte centrale dei gangli o neuropilo e assolvono alla funzione associativa della rete neurale. Il sistema nervoso degli insetti come quello tegumentale, conserva almeno in parte l'organizzazione di tipo metamerico nonostante vi sia una tendenza evolutiva alla centralizzazione delle funzioni neurali. Questa centralizzazione si manifesta con la fusione dei gangli in grosse masse cerebrali (figura 2.2).

2.1.2. *Cellule del Glia*

Queste cellule sono presenti in gran numero nel sistema nervoso centrale (figura 2.3) e hanno il compito di fornire nutrimento ai neuroni. Inoltre, ripie-

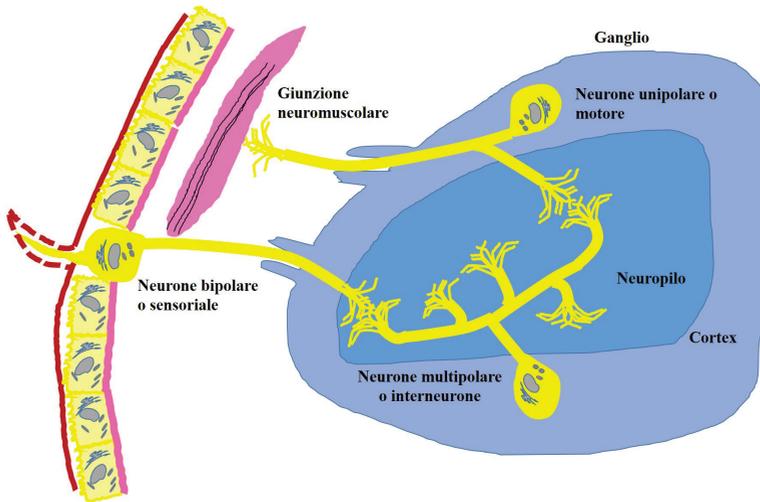


Figura 2.1. Schema delle tre tipologie di neuroni e loro localizzazione.

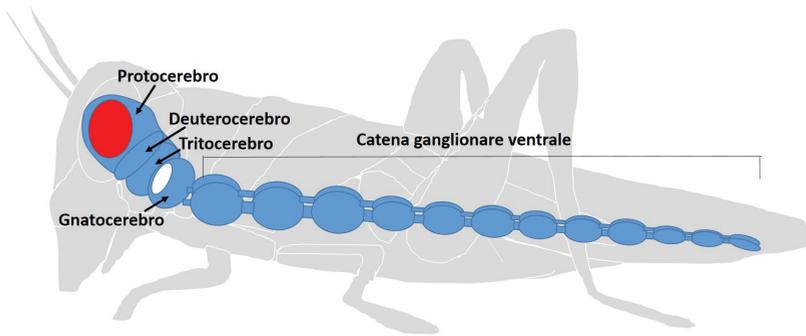


Figura 2.2. Schema di Sistema nervoso centrale di ortottero. Vista laterale.

gandosi avvolgono ogni singolo neurone lasciando libere solamente le porzioni terminali dove sono presenti le sinapsi. Le cellule del Glia più esterne vanno a formare una guaina detta perinerio, che produce verso l'esterno sostanze amorphe formando un'ulteriore sottile lamina detta lamella neurale. Questa lamella ha il compito di avvolgere e isolare il sistema nervoso dagli altri organi formando una barriera selettiva al passaggio di alcune sostanze spesso tossiche.

2.2. Struttura del sistema nervoso degli insetti

Negli insetti si può distinguere un sistema nervoso centrale, uno periferico e uno viscerale.

2.2.1. Sistema nervoso centrale

Ha una tipica organizzazione metamERICA: è costituito da una doppia catena ganglionare, originariamente con una coppia di gangli ad ogni segmento (figure 2.2 e 2.3). Le fibre nervose trasversali che collegano i gangli sono dette commissure mentre quelle longitudinali sono dette connesure. Commissure e connesure scompaiono con l'eventuale fusione dei gangli. Nel capo vi è la fusione delle prime sei coppie di gangli in due masse cerebrali distinte, dette rispettivamente cervello e gnatocerebro. Il cervello, detto anche cervello deriva dalla fusione dei gangli dei primi tre segmenti cefalici e si posiziona dorsalmente rispetto all'intestino anteriore. Il gnatocerebro detto anche ganglio subesofageo deriva dalla fusione dei gangli dei successivi tre segmenti cefalici, ed è posizionato sotto l'intestino anteriore. Il cervello è suddiviso a sua volta in tre parti che, in ordine antero-posteriore, sono il protocerebro, il deutocerebro ed il tritocerebro. Ad essi è affidata l'innervazione rispettivamente degli occhi composti, degli ocelli, delle antenne e del labbro superiore. Dal tritocerebro parte inoltre il sistema nervoso viscerale che innerva l'intestino anteriore. Il gnatocerebro innerva invece le diverse appendici dell'apparato boccale. Da esso continua la doppia catena gangliare, detta catena gangliare ventrale che decorre ventralmente nel torace e nell'addome.

2.2.2. Sistema nervoso viscerale

Questo sistema mantiene una propria autonomia da quello centrale, pur essendovi connesso. Ad esso competono le funzioni neurovegetative, attraverso l'innervazione di organi interni. È composto da tre distinti sistemi: il simpatico dorsale, il caudale, il ventrale. Il simpatico dorsale, detto anche stomatogastrico, è un sistema impari, connesso al tritocerebro, che innerva l'intestino anteriore. In ordine antero-posteriore è composto dal ganglio frontale, dal ganglio ipocerebrale e da uno o due gangli stomacali, connessi

fra loro da un nervo ricorrente. Il sistema si localizza nella parte dorsale dello stomodeo, con i primi due gangli ubicati nella regione cefalica, rispettivamente davanti e sotto il cervello. Il simpatico ventrale ha un'organizzazione prettamente metamERICA: parte dallo gnato-cerebro e dalla catena gangliare ventrale e innerva le trachee e gli stigmi. Il simpatico caudale, infine, parte dall'ultimo ganglio della catena ventrale e innerva il proctodeo e gli organi genitali.

2.2.3. Sistema nervoso periferico

Comprende i neuroni sensoriali e le differenziazioni periferiche dei neuroni motori presenti nella periferia del corpo essendo connessi con il tegumento, muscoli ed organi di senso. I neuroni sensoriali, a differenza di quelli motori che hanno il proprio corpo cellulare nei gangli, hanno il corpo cellulare sotto-tegumentale e sono connessi tramite un lungo neurite al ganglio corrispondente (cfr. capitolo 3).

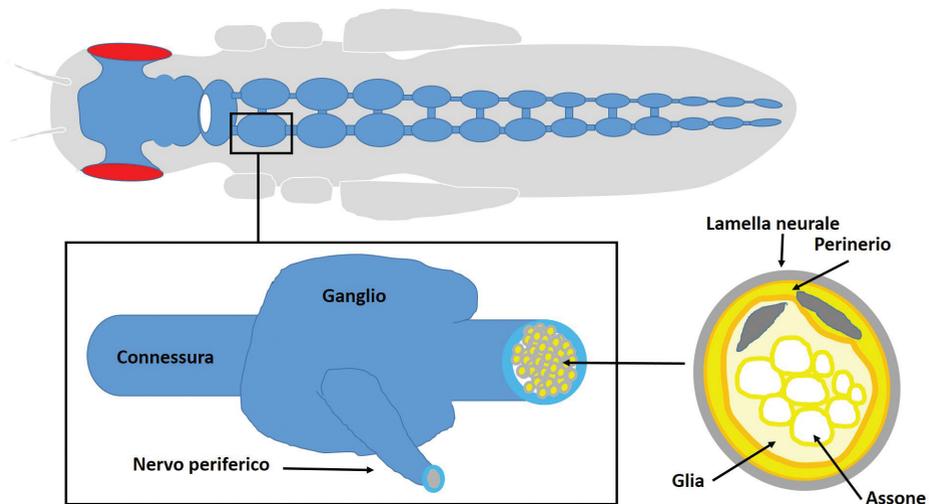


Figura 2.3. Schema di Sistema nervoso centrale di ortottero. Vista dorsale. Dettaglio di connessura al cui interno sono presenti i nervi a loro volta composti di fasci di alcuni assoni avvolti dalla lamella neurale e perinerio.