





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2008-VII



INNOVAZIONI NELLA DIFESA DELLE COLTURE  
CON MEZZI A BASSO IMPATTO AMBIENTALE

Firenze, 27 novembre 2008



EDIZIONI POLISTAMPA

*Con il contributo di*



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2009  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»  
Anno 2008 - Serie VIII - Vol. 5 (184° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa  
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze  
Tel. 055 737871 (15 linee)  
[info@polistampa.com](mailto:info@polistampa.com) - [www.polistampa.com](http://www.polistampa.com)  
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-0636-9

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

VINCENZO ANTIGNANI, GIULIANO BONANOMI, SHERIDAN L. WOO, FELICE SCALA <i>Strumenti biotecnici</i>	7
GIOVANNI VANNACCI, SABRINA SARROCCO, SUSANNA PECCHIA, MARIAROSARIA VERGARA <i>Innovazioni nella difesa delle colture con mezzi a basso impatto ambientale: malattie da funghi</i>	27
PASQUALE SILDARELLI <i>Esperienze di impiego in pieno campo di piante transgeniche per la resistenza a virus</i>	55
MARIO SOLINAS <i>Il controllo delle infestazioni entomatiche con mezzi chimici</i>	73
AURELIO CIANCIO, SERGIO MOLINARI, TRIFONE D'ADDABBO <i>Innovazioni nella difesa delle colture da nematodi fitoparassiti</i>	85
MAURIZIO VURRO, MASSIMO CRISTOFARO, FRANCESCA CASELLA, ANGELA BOARI, MARIA CHIARA ZONNO <i>Lotta biologica alle piante infestanti</i>	115
MARTA MARI, ANTONIO IPPOLITO <i>Malattie degli ortofrutticoli in postraccolta</i>	145
<i>Considerazioni conclusive</i>	169



VINCENZO ANTIGNANI\*, GIULIANO BONANOMI\*, SHERIDAN L. WOO\*,  
FELICE SCALA\*

## Strumenti biotecnici

### I. INTRODUZIONE

L'agricoltura moderna, basandosi sull'utilizzazione di fertilizzanti e anticrittogamici di sintesi e varietà resistenti, ha fatto sì che gli agricoltori interrompessero il legame tra ammendamenti organici, microflora tellurica e fertilità del suolo. La conseguenza di tali azioni è stato un progressivo depauperamento del contenuto in sostanza organica dei suoli e, quindi, della loro fertilità biologica, con la diffusione di patogeni difficili da contenere. Inoltre, l'impiego reiterato di strumenti invasivi quali i fumiganti ha indotto un ulteriore impoverimento della biodiversità della microflora che, in diversi casi, ha portato all'abbandono dei suoli e all'adozione della coltivazione su substrati artificiali. L'uso massiccio di agrofarmaci ha determinato anche altri gravi problemi riguardanti l'ambiente e la salute dell'uomo e degli animali. Tra questi ricordiamo l'inquinamento dei suoli e delle falde acquifere, l'accumulo di residui nelle derrate alimentari e la generazione di organismi resistenti ai principi attivi.

Sulla base di queste constatazioni, è evidente che l'individuazione di strategie di lotta innovative alle malattie delle piante che siano al tempo stesso efficaci, economiche, a basso impatto ambientale e di facile applicazione, è l'obiettivo fondamentale dell'agricoltura del futuro. Ciò è tanto più necessario ove si consideri che a livello europeo è in atto una revisione dei principi attivi di sintesi molti dei quali, per la loro pericolosità, sono già stati esclusi dall'uso e molti lo saranno nei prossimi anni. D'altronde, basti pensare al caso del

\* *Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia vegetale, Università di Napoli Federico II*

bromuro di metile e alle difficoltà che si hanno nel trovare adeguate soluzioni alternative al suo impiego come fumigante.

La complessità e la variabilità delle problematiche fitopatologiche impongono l'ottimizzazione continua delle tecniche adottate e uno studio sempre più dettagliato dei fenomeni patologici, al fine di mettere a punto valide alternative agli attuali metodi di lotta alle malattie delle piante. Lo sviluppo delle biotecnologie, nell'accezione più ampia di questo termine, ha permesso di individuare numerosi strumenti con grandi potenzialità applicative. Appare sempre più chiaro, comunque, che per avere successo nella lotta contro le malattie è necessario attuare approcci basati sulla gestione complessiva delle colture e non soltanto sull'uso di mezzi di difesa diretti. In questa ottica, per esempio, la rivalutazione della fertilità biologica è un elemento fondamentale non solo per migliorare la qualità dei prodotti agricoli, ma anche per la loro protezione. Così pure, altri strumenti quali la diagnostica fitopatologica e la modellistica previsionale sono di primaria importanza per ottenere produzioni di qualità e senza rischi per la salute e per l'ambiente.

In questo lavoro saranno discussi gli aspetti innovativi relativi ad alcuni strumenti biotecnici utili per la lotta ai patogeni. In particolare, saranno analizzati i risultati della ricerca più recente relativi all'applicazione di microrganismi utili, sostanze naturali, induttori di resistenza e matrici organiche complesse.

## 2. MICRORGANISMI MULTIFUNZIONALI E CONSORZI MICROBIOLOGICI

Le moderne tecniche di indagine hanno permesso di individuare e identificare una lunga lista di microrganismi definiti "benefici" (Lorito et al., 2006). I microrganismi benefici possono favorire lo sviluppo delle piante attraverso la promozione della crescita (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Smith e Goodman, 1999), l'induzione di resistenza (van Loon et al., 1998), oppure attraverso l'antagonismo diretto contro i patogeni (Fravel, 1988). Numerosi microrganismi benefici sono stati studiati in maniera dettagliata e per essi è disponibile una descrizione precisa dei meccanismi attraverso i quali esplicano la loro attività quali l'antagonismo, la competizione, la predazione e l'attivazione anticipata delle reazioni di difesa della pianta (Duffy et al., 2003; Haas e Keel, 2003; Morris e Monier, 2003; Harman et al., 2004; Bent e Mackay, 2007).

Tra i microbi maggiormente studiati vi sono agrobatteri, attinomiceti, bacilli, pseudomonadi e funghi dei generi *Ampelomyces*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Glomus* (fungo micorrizico) e *Trichoderma*. Alcuni di questi sono disponibili



in commercio come bioagrofarmaci e vengono utilizzati per la lotta contro differenti patogeni. I bioagrofarmaci presentano diversi vantaggi rispetto ai tradizionali prodotti chimici di sintesi: sono più specifici verso l'organismo bersaglio, sono efficaci anche a basse concentrazioni e presentano bassi livelli di ecotossicità. Tuttavia, nonostante questi vantaggi e il gran numero di formulati oggi disponibili, gli agrofarmaci a base di microrganismi riescono ad affermarsi come prodotti di largo consumo solo nell'agricoltura biologica. La difficoltà nell'ottenimento di packaging con una "shelf life" commercialmente significativa e la variabilità dei risultati ottenuti in differenti condizioni colturali, sono due fattori fortemente limitanti la diffusione di questi prodotti. A tale proposito, sono state condotte numerose sperimentazioni finalizzate a ottimizzare i prodotti già presenti sul mercato. Attualmente lo scenario commerciale è costituito da una miriade di formulati con campi d'applicazione piuttosto circoscritti, in relazione alla coltura e alle condizioni di coltivazione (Lorito et al., 2006). Per superare i limiti sopra citati, una delle tendenze attuali è quella di selezionare ceppi microbici con caratteristiche di multifunzionalità, ovvero capaci di proteggere le piante attraverso differenti meccanismi d'azione. Questi microbi dovrebbero distinguersi per la capacità di operare in differenti condizioni ambientali e contro un'ampia gamma di fitopatogeni. Particolarmente interessanti sono quei microbi che fungono sia da promotori della crescita, che da agenti di lotta biologica. Tra le specie studiate, le pseudomonadi fluorescenti sono quelle che sembrano garantire le prestazioni migliori. La multifunzionalità di tali batteri risiede nella loro capacità di agire sulle piante producendo ormoni e sostanze ad azione ormone-simile, sui patogeni come agenti di lotta biologica e sull'ambiente influenzando il ciclo dei nutrienti (Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Compant et al., 2005; Upadhyay e Srivastava, 2008).

Anche i microrganismi che instaurano simbiosi mutualistiche con le piante possono essere utilizzati per la loro protezione. Tra questi i più noti e studiati sono sicuramente i funghi micorrizici. Tali microrganismi instaurano una stretta associazione con le piante e rendono possibile, grazie alla loro capacità di formare una sottile ed estesa rete di ife nel suolo, un assorbimento efficiente dell'acqua e degli elementi nutritivi come fosforo e azoto (Smith e Read, 1997). Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che le micorrize possono proteggere le piante da patogeni tellurici e fogliari (Graham, 2001). L'applicazione di inoculi micorrizici è già una realtà commerciale, ma negli ultimi anni è cresciuto l'interesse anche nei riguardi delle endosimbiosi batteriche e, in particolare, di quelle degli attinomiceti. Gli attinomiceti sono noti come produttori di antibiotici e di sostanze capaci di stimolare l'allungamen-

to cellulare, la crescita di radici avventizie e la formazione di calli di cicatrizzazione (Igarashi et al., 2004). In alcuni esperimenti questi microbi hanno evidenziato la capacità di contenere alcune patologie come il mal del piede del grano (Franco et al., 2003) e la fusariosi del banano (Cao et al., 2005). Gli attinomiceti, rispetto ad altre categorie di simbionti, come le micorrize, hanno il vantaggio di essere coltivabili, il che semplifica enormemente il lavoro di manipolazione e di selezione delle specie da utilizzare. Lo sviluppo di tecniche per la produzione di piante e sementi infettate da endosimbionti sarebbe di sicuro interesse, oltre che per gli agricoltori, per le numerose aziende vivaistiche coinvolte nella produzione di sementi certificate. Queste realtà produttive infatti, a fronte di investimenti ridotti (acquisto di fermentatori e attrezzature di base per le colture microbiche) potrebbero fornire prodotti molto richiesti.

In forte crescita appare anche l'interesse per lo sviluppo e l'applicazione di bioagrofarmaci contenenti più microbi benefici, prodotti presentati in commercio con la dicitura di "consorzi microbiologici". Su questi formulati attualmente non esistono studi approfonditi riguardanti i meccanismi d'azione alla base della loro efficacia. Uno degli aspetti su cui sarà necessario indagare è quello della compatibilità ecologica e fisiologica tra le differenti specie che compongono il consorzio. Ad oggi è disponibile una limitata bibliografia al riguardo che, tra l'altro, prende in esame comunità microbiche molto semplici (Gaur et al., 2004). Anche nella ricerca applicata all'agricoltura va sviluppata, quindi, quella che in altri settori (medico, alimentare, *environmental-remediation*) viene definita "ingegneria dei consorzi microbiologici" (Brenner et al., 2008). Questa branca della ricerca studia la possibilità di creare combinazioni microbiche ideali e stabili nell'espressione di determinate funzioni ecologiche, anche in condizioni ambientali variabili (Burmolle et al., 2006). Il principio cardine su cui si basa l'idea di consorzio microbiologico è che la presenza di un'elevata biodiversità microbica e metabolica garantisce una maggiore affidabilità in condizioni ambientali mutevoli. La maggiore resistenza e resilienza alle perturbazioni ambientali è determinata dalla complementarità funzionale, fenomeno importante soprattutto nello svolgere processi complessi come la degradazione di composti recalcitranti. Al riguardo, di particolare attualità sono gli studi volti a identificare consorzi microbici in grado di degradare in maniera efficiente molecole inquinanti come gli idrocarburi e i policlorobifenili (Abraham et al., 2002; Jaques et al., 2008). Inoltre, in specifiche condizioni agricole è stato dimostrato che l'azione dei Plant Growth Promoting Rhizobacteria viene maggiormente stimolata quando questi microbi sono presenti in consorzio. Recenti studi correlano questo

fenomeno a una maggiore disponibilità di nutrienti (soprattutto fosforo) e allo stimolo diretto della crescita dovuto alla produzione di acido indolacetico (Pandey e Maheshwari, 2007). Alla base della vita nel consorzio c'è la capacità dei microbi di comunicare attraverso semiochimici specifici (*quorum sensing*). Lo studio e la comprensione dei meccanismi su cui si basa la comunicazione microbica è un punto di partenza per la costruzione di un consorzio microbiologico efficace. Pertanto, i consorzi microbici, grazie alla capacità di svolgere funzioni complesse, precluse alle monoculture, potrebbero divenire uno strumento centrale anche per la lotta alle malattie delle piante.

### 3. NOVITÀ NELL'USO DELLE SOSTANZE NATURALI E DEGLI INDUTTORI DI RESISTENZA

Le piante sono coinvolte in una moltitudine di interazioni parassitarie e mutualistiche con i microrganismi e altre piante superiori (Gray e Smith, 2005). In particolare, le piante devono affrontare una grande varietà di nemici naturali come virus, batteri, funghi e insetti. Nonostante ciò, soltanto una piccola quota di patogeni riesce a indurre malattie grazie alla presenza nelle piante di un formidabile arsenale difensivo. Le difese dei vegetali includono: il rafforzamento meccanico delle pareti cellulari (Develey-Rivière e Galiana, 2007), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Apel e Hirt, 2004) e la produzione di molecole con attività antimicrobica (Smith, 1996; Morrissey e Osbourn, 1999; Hammerschmidt, 1999; Wittstock e Gershenzon, 2002). La produzione di molecole chimiche è una delle strategie chiave evolute delle piante per gestire questa diversità d'interazioni e in particolar modo, per combattere i patogeni. Difatti, le piante superiori producono un'enorme varietà di composti chimici, tradizionalmente chiamati metaboliti secondari o prodotti naturali (Field et al., 2006; Hartmann, 2008).

Negli ultimi decenni, migliaia di metaboliti secondari con attività antimicrobica sono stati isolati, identificati e caratterizzati (Dixon, 2001). Tra questi composti rientrano molecole organiche come terpeni, saponine, fenoli e fenilpropanoidi, stilbeni, alcaloidi, glucosinolati, indoli e, come unico composto inorganico, lo zolfo elementare (Cooper et al., 1996). Comunemente, i metaboliti secondari con attività antimicrobica sono classificati come costitutivi, se già presenti nei tessuti vegetali (fitoanticipine) o inducibili, se prodotti a seguito dell'attacco dei patogeni (fitoalessine). I glucosinolati, le saponine e i glicocaloidi sono le più comuni fitoanticipine. Ad esempio, le cellule epidermiche di numerose specie d'avena accumulano la saponina avenacina

A-1 a una concentrazione tale da inibire il patogeno tellurico *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Osbourn et al., 1994). Le fitoalessine, fra cui le più comuni hanno la struttura degli stilbeni, polichetidi, sesquiterpeni e flavoni, sono invece composti a basso peso molecolare caratterizzate da attività antimicrobica con un ampio spettro d'azione. Gli isoflavoni pisatina, maackiaina e kievitone sono tra le fitoalessine più note e meglio caratterizzate (Zhang e Smith, 1983; VanEtten et al., 1989). Sebbene l'attività antimicrobica di numerosi metaboliti secondari sia stata dimostrata attraverso studi in vitro, solo in alcuni casi è stato dimostrato con chiarezza il loro ruolo nella resistenza delle piante (Morrissey e Osbourn, 1999).

Durante un evento patologico si osserva una differente regolazione nel metabolismo capace di attivare risposte di autodifesa nella pianta, anche a distanza dal punto di infezione (resistenza sistemica acquisita o SAR). Negli anni '90 è stato dimostrato che i meccanismi di resistenza inducibili in realtà possono essere attivati anche da microbi non patogeni, quali i Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In questo caso si parla di resistenza sistemica indotta (ISR). I principali fattori molecolari capaci di attivare la ISR nelle piante sono i lipopolisaccaridi batterici, i siderofori e l'acido salicilico. Lo status di ISR di fatto non condiziona in maniera evidente la normale fisiologia del vegetale, piuttosto intensifica e rende più rapida la sua risposta agli eventuali attacchi da parte dei patogeni. Tra i microbi particolarmente attivi nell'indurre la ISR vi sono le pseudomonadi fluorescenti, note anche per le loro capacità antagonistiche. Altri importanti induttori di resistenza sono i prodotti della parziale degradazione della parete cellulare dei vegetali. Queste molecole, definite oligogalatturonidi, in quanto oligomeri dell'acido galatturonico, inducono nelle piante meccanismi di difesa biochimica attraverso la produzione di acidi organici volatili, la produzione di specie reattive dell'ossigeno, l'accumulo di inibitori delle proteasi dei patogeni e la sintesi di etilene (De Lorenzo et al., 2001). In recenti studi è stata dimostrata l'effettiva efficacia dei trattamenti a base di oligogalatturonidi nel controllo di numerose patologie dovute soprattutto a funghi e virus (Klarzynski et al., 2001; He et al., 2006). Gli oligogalatturonidi, così come i lipopolisaccaridi derivanti dalla lisi di cellule batteriche, potrebbero essere utilizzati per realizzare una nuova classe di induttori di resistenza, da affiancare ai prodotti già presenti sul mercato.

La disponibilità di una vastissima gamma di prodotti naturali con attività antimicrobica suggerisce la possibilità di applicare tali molecole per la difesa delle piante. In realtà, l'applicazione al settore produttivo è stata molto scarsa. La difficoltà di individuare molecole con una potente attività antimicrobica anche a bassa concentrazione e gli elevati costi per l'estrazione a

livello industriale sono solo alcuni dei fattori limitanti. Per superare questi problemi, è stata proposta la possibilità di utilizzare estratti vegetali non purificati. Comunque, sebbene tali estratti siano spesso risultati efficaci a livello sperimentale (Bajpai et al., 2008; Tegegne et al., 2008), le applicazioni sono rese difficoltose dalla necessità di reperire materiali omogenei da cui ottenere prodotti standardizzati. Un esempio applicativo è quello della propoli che dal punto di vista chimico è una miscela di differenti sostanze spesso molto diverse tra di loro, comprendenti sostanze ceroso-resinose, composti chetonici (cristina, tetrocrisina, acacetina, apigenina, betuletolo, galangina, ramnocitrina, isalpinina, ermanina, kaempferolo, 3,5-diidrossi-7,4-dimetossiflavone) e flavonoidi (quercetina, ramnetina, isoramnetina, ramnazina, quercetina-3,7-dimetiletere). La propoli viene utilizzata in maniera estensiva nella medicina etnica per curare affezioni di vario genere dovute a batteri (sia gram positivi, sia gram negativi), funghi e lieviti (Quiroga et al., 2006). Da qualche anno si sta indagando sulla possibilità di applicare la propoli nel campo agricolo come prodotto per il controllo dei microbi fitopatogeni. Recenti studi mostrano che tale sostanza parzialmente purificata riduce in maniera significativa lo sviluppo di funghi (Ozino et al., 1996; Drago et al., 2007) e batteri fitopatogeni (Basin et al., 2005; Mohammadzadeh et al., 2006). Gli studi di campo condotti con rigore scientifico sono invece pochi, ma forniscono indicazioni sull'efficacia del prodotto nel contenere i danni da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* e *Xanthomonas vesicatoria* (Varvaro et al., 2002). Un altro aspetto interessante riguarda l'attività contro ceppi batterici multiresistenti agli antibiotici. Ciò assume una certa rilevanza in medicina, ma sicuramente è di rilievo anche nel settore agricolo, dove spesso si registrano casi di tolleranza, se non di resistenza, dei microbi fitopatogeni ai presidi fitosanitari correntemente in uso. I meccanismi attraverso i quali la propoli agisce non sono ancora chiari, ma appare evidente l'esistenza di una sinergia tra meccanismi biochimici e fisici.

Un'altra molecola naturale con ottime prospettive applicative è il chitosano, polimero della  $\delta$ -glucosamina. Il chitosano può anche essere ottenuto dalla deacetilazione alcalina della chitina, polimero molto comune in natura in quanto presente nei crostacei, negli insetti e in molti funghi (Hadwiger, 1999). Numerosi studi hanno dimostrato che l'applicazione esogena di chitosano permette di controllare diverse fitopatie causate da funghi e batteri (Bautista-Banos et al., 2006), tanto che sono oggi disponibili diversi formulati commerciali (Sharathchandra et al., 2004). Non essendo tossico per gli organismi superiori risulta un prodotto a basso impatto ambientale (Kumar, 2000). Il chitosano possiede attività antibiotica contro numerosi microrgani-

smi batterici (Liu et al., 2004; Tikhonov et al., 2006) e fungini (Park et al., 2002; Palma-Guerrero et al., 2007) e, oltre a non essere tossico per le piante, è in grado di aumentare la resistenza di semi (Lafontaine e Benhamou, 1996), frutti (Benhamou, 2004) e foglie (Trotel-Aziz et al., 2006). Questa molecola è stata utilizzata con successo anche per il controllo di malattie del post-raccolta (Liu et al., 2007). Sulla base di queste sue proprietà, il chitosano potrebbe divenire un prodotto di largo impiego per la protezione delle piante.

Uno dei sistemi per migliorare l'efficacia dei composti naturali è quello di abbinarli a microrganismi antagonisti. Ad esempio, è stato dimostrato che l'uso combinato di Plant Growth Promoting Rhizobacteria (*Bacillus cereus*) con induttori di resistenza ne aumenta l'efficacia nel contenere *Phytophthora* e *Pythium* (van Loon et al., 1998). Altri studi evidenziano che, in specifici patosistemi, l'efficacia degli induttori di resistenza è evidente solo in presenza di batteri antagonisti (Postma et al., 2005) mentre la combinazione di enzimi con spore di *Trichoderma* incrementa l'attività di biocontrollo del formulato (Lanzuise et al., 2007). Nonostante in letteratura siano riportati molti studi che attestano la validità di tali miscele (Dezhong, 2000; Hamanaka et al., 2006), sono necessari ulteriori studi per ottimizzarne l'efficacia.

Un ulteriore approccio volto a sfruttare l'attività antimicrobica dei metaboliti secondari è basato sull'aumento della resistenza dei vegetali. Tale obiettivo è stato ottenuto con successo trasformando le piante in modo da intensificare la produzione di composti antimicrobici o addirittura produrne di nuovi (Dixon et al., 1996; Dixon, 2001). Ad esempio, Hipskind e Paiva (2000) hanno ottenuto piante di *Medicago sativa* capaci di produrre in maniera costitutiva il resveratrolo, una fitoalessina della vite, determinando resistenza al fungo *Phoma medicaginis*. Risultati simili sono stati ottenuti attraverso la sovra-espressione del gene codificante per la isoflavone O-metiltransferasi che determina un più rapido e intenso accumulo dell'isoflavone medicarpina (He e Dixon, 2000). Studi futuri dovranno affrontare la sfida di inserire un elevato numero di geni, coordinati fra loro, in maniera tale da indurre resistenza a più patogeni contemporaneamente (Dixon, 2001). Quest'ultima strategia permetterebbe di ridurre il rischio dell'insorgenza di ceppi patogeni resistenti alle neo-tossine prodotte dalle piante. Un aspetto specifico di tale biotecnica è che, a dispetto dei notevoli sforzi della ricerca, le restrizioni legislative presenti in molti Paesi ne limitano sia la sperimentazione in pieno campo, che le conseguenti applicazioni.

Nuove possibilità applicative di sostanze naturali sono offerte dagli studi sul quorum sensing (QS). Il QS è un meccanismo che permette ai batteri di coordinare alcune funzioni metaboliche attraverso la capacità di monitorare la propria densità di popolazione. Questo meccanismo è basato su molecole

segnale (Holden et al., 1999; Chen et al., 2002), principalmente gli acilomoserino-lattoni nei batteri gram negativi (Zhang e Dong, 2004; Williams, 2007). Nei batteri patogeni il QS controlla numerosi fattori di virulenza quali il trasferimento dei plasmidi Ti negli agrobatteri, la motilità, la produzione di enzimi extracellulari, antibiotici e tossine e la capacità di formare biofilm (van Bodman et al., 2003). Conseguentemente, gli studi si sono concentrati nella ricerca di molecole capaci di interferire con il meccanismo del QS al fine di controllare batteri patogeni oltre che per altre applicazioni finalizzate a limitare la formazione di biofilm sui potenziali siti di infezione. Studi recenti indicano che anche le piante sono in grado di produrre metaboliti interferenti col QS, sebbene tali molecole non siano state ancora identificate (Teplitski et al., 2000; Gao et al., 2003). L'unico caso conosciuto è quello dell'alga marina *Delisea pulchra* che produce furanoni alogenati (Manefield et al., 1999) in grado di prevenire la formazione di biofilm batterici sulla propria superficie fogliare (Givskov et al., 1996).

#### 4. MATRICI ORGANICHE COMPLESSE

L'applicazione di matrici organiche complesse come compost, residui colturali e scarti di lavorazione di industrie agro-alimentari è stato proposto, in molti casi con successo (Scheuerell et al., 2005; Termorshuizen et al., 2007; Bonanomi et al., 2007), per il controllo dei patogeni tellurici. Numerosi studi hanno dimostrato che l'ammendamento è in grado di controllare patogeni quali *Rhizoctonia solani* (Tuitert et al., 1998; Diab et al., 2003), *G. graminis* f. sp. *tritici* (Tilston et al., 2002), *Macrophomina phaseolina* (Lodha, 1995), *Thielaviopsis basicola* (Papavizas, 1968), *Verticillium dahliae* (Lazarovits et al., 1999; López-Escudero et al., 2007) oltre che diverse specie di *Fusarium* (Szczech, 1999; Ros et al., 2005), *Phytophthora* (Szczech e Smolińska, 2001), *Pythium* (McKellar e Nelson, 2003; Veeken et al., 2005), *Sclerotinia* (Boulter et al., 2002) e *Sclerotium* (Coventry et al., 2005).

Differenti meccanismi, spesso complementari fra loro, determinano le capacità soppressive delle matrici organiche. Fra questi, il principale meccanismo d'azione è indubbiamente l'incremento dell'attività microbica complessiva (Pérez-Piqueres et al., 2006) e/o di particolari gruppi di microrganismi con attività antagoniste verso i patogeni (Hoitink e Boehm, 1999). In particolare, è stato dimostrato il ruolo centrale dell'ammendamento con sostanza organica nel sostenere l'attività di microbi antagonisti che, in assenza di una sufficiente disponibilità di substrati organici, non sono in grado di esplicare la

propria attività di biocontrollo (Boehm et al., 1997). In quest'ottica, una strategia possibile per la lotta alle malattie è quella di applicare materiali organici in grado di stimolare selettivamente i microbi del suolo, con effetti positivi verso gli organismi benefici e negativi verso i patogeni.

L'efficacia dell'ammendamento organico può essere determinata dal rilascio di composti fungitossici: in tal caso gli ammendanti organici sono indicati come biofumiganti. Tra i biofumiganti più noti abbiamo i residui vegetali di specie appartenenti alla famiglia delle Brassicacee (Lazzeri e Manici, 2001) o i residui organici a elevato contenuto proteico con un basso rapporto C/N, usualmente inferiore a 10 (Tenuta e Lazarovits, 2002). Nel primo caso, l'azione fungitossica è esplicata da particolari molecole organiche derivanti dai glucosinolati. Questi composti, in seguito alla lacerazione dei tessuti vegetali in presenza dell'enzima mirosinasi, sono idrolizzati a formare composti fungitossici quali isotiocianati, nitrili, tiocianati, ecc. (Sarwar et al., 1998). Nel secondo caso, le molecole attive contro i patogeni tellurici derivano dalla degradazione dei composti proteici che, quando presenti in elevata quantità e in suoli a pH alto, determinano l'accumulo di ammoniaca per brevi periodi. Tali ammendanti sono risultati particolarmente efficaci nel controllo di *T. basicola* (Candole e Rothrock, 1997) e, soprattutto, di *V. dahliae* (Tenuta e Lazarovits, 2004), fungo difficile da lottare anche con i più moderni fungicidi. Un'ulteriore meccanismo di azione delle matrici organiche è l'induzione di resistenza nelle piante (Zhang et al., 1996). In tal caso, l'attività è determinata sia da molecole presenti nella sostanza organica tal quale che da molecole prodotte dalla microflora ivi presente.

L'applicazione di ammendanti organici ha riportato numerosi successi, anche nel mondo produttivo, soprattutto in Olanda (Tuitert et al., 1998) e negli Stati Uniti (Scheuerell et al., 2005). Una delle applicazioni di maggiore interesse è relativa al comparto vivaistico. In tali sistemi produttivi il substrato di coltivazione elettivo è la torba per l'omogeneità delle sue caratteristiche fisico-chimiche, oltre che per l'elevata capacità di ritenzione idrica. Sfortunatamente però, la torba solo raramente ha un'attività soppressiva (Hoitink e Boehm, 1999; Bonanomi et al., 2007) e, di conseguenza, per il controllo della maggior parte dei patogeni è richiesto l'impiego massiccio di agrofarmaci. La limitata soppressività della torba rispetto ai compost è imputabile alla ridotta quantità di composti carboniosi che sostengono l'attività dei batteri antagonisti (Boehm et al., 1997). L'opportunità di indurre condizioni di soppressività nella torba, mantenendone però le caratteristiche positive, ha stimolato notevolmente la ricerca negli ultimi anni. Gli studi hanno individuato due principali strategie: a) l'aggiunta di aliquote, anche molto ri-



dotte (fino all'1% in volume), di compost soppressivi alla torba (van Os e van Ginkel, 2001) e b) l'applicazione combinata di organismi antagonisti e compost ad azione sinergica (Whipps, 1997; Krause et al., 2001; Trillas et al., 2006). Un'altra applicazione è quella dei cosiddetti *compost tea* (Scheuerell e Mahafee, 2002), i quali consistono in un estratto acquoso diluito (concentrazione variabile tra l'1 e il 10%) dei compost. Tali materiali sono applicati, attraverso le comuni tecniche di aspersione, all'apparato epigeo per la lotta ai patogeni fogliari. Notevoli successi nell'applicazione di compost tea sono stati raggiunti soprattutto negli Stati Uniti, mentre sono praticamente assenti gli studi sia scientifici, sia applicativi in Italia. L'efficacia dei compost tea spesso si è dimostrata paragonabile a quella degli agro farmaci di sintesi (Scheuerell e Mahafee, 2002). Buoni risultati sono stati conseguiti nella lotta a *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* (Cronin et al., 1996), *Plasmopara viticola* (Ketterer, 1990) e numerose specie di oidio quali *Erysiphe* spp., *Uncinula necator* e *Sphaerotheca fuliginea* (Budde e Weltzien, 1988; Scheuerell, 2003).

Nonostante la mole di ricerca e i promettenti risultati ottenuti anche in condizioni di campo e in sistemi produttivi reali, rilevanti sono state le difficoltà nell'applicazione delle matrici organiche nei sistemi produttivi agricoli su larga scala (Whipps, 1997; Bonanomi et al., 2007). La limitata diffusione di tali mezzi tecnici è imputabile sostanzialmente all'elevata variabilità dei risultati ottenuti e alla sostanziale incapacità di predirne l'efficacia in relazione alle variabili ambientali e di tecnica colturale. Ciò ha determinato disaffezione e in molti casi sfiducia degli agricoltori nei confronti di questi strumenti produttivi che, sebbene dotati di grandi potenzialità, devono essere ancora compresi per essere correttamente gestiti. Ad esempio, l'ammendamento con residui colturali tal quali è reso problematico sia dalla fitotossicità che spesso caratterizza i residui vegetali (Bonanomi et al., 2006), sia dal loro potenziale ruolo come fonte di inoculo per funghi e batteri fitopatogeni. Il compostaggio dei residui permette però di superare entrambi questi problemi. Tale processo determina sia la perdita della fitotossicità durante la decomposizione (Zucconi et al., 1981), sia l'eradicazione dei patogeni durante la fase termofila del compostaggio (Noble e Roberts, 2004). Una volta compostati, i residui colturali possono essere riapplicati sui suoli apportando esclusivamente benefici per la fertilità dei terreni. È importante rilevare che con il continuo incremento dei costi dei fertilizzanti di sintesi aumenta anche la competitività commerciale delle matrici organiche, soprattutto considerando la possibilità congiunta di ridurre i patogeni tellurici e migliorare la fertilità dei suoli.

Per numerose combinazioni di sostanza organica e patogeni (torba-*Pythium*, compost-*Pythium*, residui ad alto contenuto di azoto-*V. dahliae*, com-

post-*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) sono stati compresi i meccanismi attraverso i quali si realizza la soppressività (Boehm et al., 1997; McKellar e Nelson, 2003; Borrero et al., 2004; Tenuta e Lazarovits, 2004). In ogni modo, fino a quando le capacità soppressive dei differenti tipi di sostanza organica non saranno identificabili con tecniche di analisi semplici e poco costose, gli agricoltori saranno portati a preferire gli agro farmaci di sintesi agli ammendanti organici. Conseguentemente, l'attività di ricerca futura si dovrà concentrare nello studio di parametri e indici utili all'identificazione degli ammendanti organici con maggiori capacità soppressive.

#### RIASSUNTO

Il principale obiettivo dell'agricoltura moderna è quello di garantire elevati livelli produttivi operando nella salvaguardia della salute umana e dell'ambiente. In questo contesto, la ricerca scientifica svolge il fondamentale ruolo di proporre tecnologie innovative caratterizzate da una elevata efficacia nel controllo dei patogeni e da un ridotto impatto ambientale. Tra gli approcci alternativi a quelli tradizionali, basati soprattutto sull'uso di bioagrofarmaci, particolarmente promettenti appaiono l'applicazione di microbi benefici (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, micorrize e antagonisti) combinati in consorzi microbici multifunzionali, di sostanze naturali capaci di indurre resistenza nella pianta o con azione antibiotica (es. chitosano, propoli) e di ammendanti organici con capacità soppressive. Ulteriori studi sono comunque necessari affinché questi strumenti di lotta innovativi possano essere utilizzati nella pratica. Solo chiarendo completamente i meccanismi d'azione e individuando i parametri che sono alla base della loro attività antimicrobica, sarà possibile arrivare alla formulazione di prodotti commerciali efficaci per la difesa delle colture allevate nelle più diverse condizioni ambientali.

#### ABSTRACT

The increasing public interest toward environment protection and human health prompted the research of agronomic strategies with low requirements of pesticides, herbicides and fertilizers. In this context, the search for alternative control methods with high efficiency, low cost and limited environmental impact is an urgent requirement for an eco-sustainable agriculture. The combination of beneficial microbes (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, mycorrhizae and antagonists) in multifunctional consortia, the application of natural compounds capable to induce plant resistance or with antibiotic effects (e.g. chitosan, propolis), and the use of suppressive organic amendments are among the most promising strategies. More studies, however, are needed for these innovative tools to be practically applied. In particular, they require the individuation of reliable parameters that may allow the prediction of their effectiveness in different environmental conditions.

## REFERENZE

- ABRAHAM W.R., NOGALES B., GOLYSHIN P.N., PIEPER D.H., TIMMIS K.N. (2002): *Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments*, «Current Opinion in Microbiology», 5, pp. 246-253.
- APEL K., HIRT H. (2004): *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction*, «Annual Review of Plant Biology», 55, pp. 373-399.
- AZCÓN-AGUILAR C., BAREA J.M. (1997): *Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved*, «Mycorrhiza», 6, pp. 457-464.
- BAJPAI V.K., SHUKLA S., KANG S.C. (2008): *Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of Silene armeria L.*, «Bioresource Technology», 99, pp. 8903-8908.
- BASIM E., BASIM H., OZCAN M. (2006): *Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens*, «Journal of Food Engineering», 77, pp. 992-996.
- BAUTISTA-BANOS S., HERNANDEZ-LAUZARDO A.N., VELAZQUEZ-DEL VALLE M.G., HERNANDEZ LOPEZ M., BARKA E.A., BOSQUEZ-MOLINA E., WILSON C.L. (2006): *Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities*, «Crop Protection», 25, pp. 108-118.
- BENHAMOU N. (2004): *Potential of the mycoparasite, Verticillium lecanii, to protect citrus fruit against Penicillium digitatum, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan*, «Phytopathology», 94, pp. 693-705.
- BENT A.F., MACKAY D. (2007): *Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions*, «Annual Review of Phytopathology», 45, pp. 399-436.
- BLOEMBERG G.V., LUGTENBERG B.J. (2001): *Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria*, «Current Opinion in Plant Biology», 4, pp. 343-350.
- BOEHM M.J., WU T., STONE A.G., KRAAKMAN B., IANNOTTI D.A., WILSON G.E., MADDEN L.V., HOITINK H.A. (1997): *Cross-polarized magic-angle spinning <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained biological control of Pythium Root Rot*, «Applied Environmental Microbiology», 63, pp. 162-168.
- BONANOMI G., SICUREZZA M.G., CAPORASO S., ESPOSITO A., MAZZOLENI S. (2006): *Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials*, «New Phytologist», 169, pp. 571-578.
- BONANOMI G., ANTIGNANI V., PANE C., SCALA F. (2007): *Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments*, «Journal of Plant Pathology», 89 pp. 311-340.
- BORRERO C., TRILLAS M.I., ORDOVÁS J., TELLO J.C., AVILÉS M. (2004): *Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of tomato in plant growth media*, «Phytopathology», 94, pp. 1094-1101.
- BOULTER J.I., BOLAND G.J., TREVORS J.T. (2002): *Evaluation of composts for suppression of dollar spot (Sclerotinia homoeocarpa) of turfgrass*, «Plant Disease», 86, pp. 405-410.
- BRENNER K., YOU L., ARNOLD F.H. (2008): *Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology*, «Trends in Biotechnology», 26, pp. 483-489.
- BUDDER K., WELTZIER H.C. (1988): *Untersuchungen zur wirkung von Kompostextrakten und kompostsubstraten im pathosystem getreide-echter mehitau (Erysiphe graminis)*, «Mitteilungen der Biologischer Bundesanst», 245, p. 366.
- BURMOLLE M., WEBB J.S., RAO D., HANSEN L.H., SØRENSEN S.J., KJELLEBERG S. (2006):

- Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms*, «Applied Environmental Microbiology», 72, pp. 3916-3923.
- CANDOLE B.L., ROTHROCK C.S. (1997): *Characterization of the suppressiveness of hairy vetch-amended soils to Thielaviopsis basicola*, «Phytopathology», 87, pp. 197-202.
- CAO L., QIU Z., YOU J., TAN H., ZHOU S. (2005): *Isolation and characterization of endophytic actinomycetes antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots*, «FEMS microbiology letters», 247, pp. 147-152.
- CHEN X., SCHAUDER S., POTIER N., VAN DROSSELAER A., PELCZER I., BASSLER B.L., HUGHSON F.M. (2002): *Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron*, «Nature», 415, pp. 545-549.
- COMPANT S., DUFFY B., NOWAK J., CLEMENT C., BARKAL E.A. (2005): *Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects*, «Applied Environmental Microbiology», 71, pp. 4951-4959.
- COOPER R.M., RESENDE M.L.V., FLOOD J., ROWAN M.G., BEALE M.H., POTTER U. (1996): *Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of Theobroma cacao*, «Nature», 379, pp. 159-162.
- COVENTRY E., NOBLE R., MEAD A., WHIPPS J.M. (2005): *Suppression of Allium white rot (Sclerotium cepivorum) in different soils using vegetable wastes*, «European Journal of Plant Pathology», 111, pp. 101-112.
- CRONIN M.J., YOHALEM D.S., HARRIS R.F., ANDREWS J.H. (1996): *Putative mechanism and dynamics of inhibition of the apple scab pathogen Venturia inaequalis by compost extracts*, «Soil Biology & Biochemistry», 28, pp. 1241-1249.
- DEVELEY-RIVIÈRE M., GALIANA E. (2007): *Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom*, «New Phytologist», 175, pp. 405-416.
- DEZHONG S. (2000): *Beneficial microorganisms and metabolites derived from agriculture wastes in improving plant health and protection*, «Journal of Crop Production», 3, pp. 349-366.
- DIAB H., HU S., BENSON D.M. (2003): *Suppression of Rhizoctonia solani on impatiens by enhanced microbial activity in composted swine waste amended potting mixes*, «Phytopathology», 93, pp. 1115-1123.
- DIXON R.A., LAMB C.J., MASOUD S., SEWALT V.J.H., PAIVA N.L. (1996): *Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review*, «Gene», 179, pp. 61-71.
- DIXON R.A. (2001): *Natural products and plant disease resistance*, «Nature», 411, pp. 843-847.
- DRAGO L., DE VECCHI E., NICOLA L., GISMONDO M.R. (2007): *In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis)*, «Journal of Applied Microbiology», 103, pp. 1914-1921.
- DUFFY B., SCHOUTEN A., RAAIJMAKERS J.M. (2003): *Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism*, «Annual Review of Phytopathology», 41, pp. 501-538.
- FIELD B., JORDÁN F., OSBOURN A. (2006): *First encounters-deployment of defence-related natural products by plants*, «New Phytologist», 172, pp. 193-207.
- FRANCO C.A., MICHELSEN C.P.A., PERCY N.A., CONN V.A., LISTIANA E.A., MOLL S.A., LORIA R.B., COOMBS J.A. (2007): *Actinobacterial endophytes for improved crop performance*, «Australasian Plant Pathology», 36, pp. 524-531.

- FRAVEL D.R. (1988): *Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases*, «Annual Review of Phytopathology», 26, pp. 75-91.
- GAO M., TEPLITSKI M., ROBINSON J.B., BAUER W.D. (2003): *Production of substances by Medicago truncatula that affect bacterial quorum sensing*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16, pp. 827-834.
- GAUR R., SHANI N., JOHRI K.B.N., ROSSI P., ARAGNO M. (2004): *Diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads do not influence AM fungi in wheat rhizosphere*, «Current Science», 86, pp. 453-457.
- GIVSKOV M., NYS R.D., MANEFIELD M., GRAM L., MAXIMILIEN R., EBERL L., MOLIN S., STEINBERG P.D., KYELLEBERG S. (1996): *Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling*, «Journal of Bacteriology», 178, pp. 6618-6622.
- GRAHAM J.H. (2001): *What do root pathogens see in mycorrhizas?*, «New Phytologist», 149, pp. 357-359.
- GRAY E.J., SMITH D.L. (2005): *Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes*, «Soil Biology & Biochemistry», 37, pp. 395-412.
- HAAS D., KEEL C. (2003): *Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease*, «Annual Review of Phytopathology», 41, pp. 117-153.
- HADWIGER L.A. (1999): *Host-parasite interactions: elicitation of defense responses in plants with chitosan, in Chitin and Chitinases*, Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 185-200.
- HAMANAKA Y., TOYOTA K., HAYASHY-IKEDA K.P. (2006): *Screening of fungal strains responsible for strong fungistasis against Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in a coffee compost-amended soil*, «Soil Science and Plant Nutrition», 52, pp. 133-134.
- HAMMERSCHMIDT R. (1999): *Phytoalexins: what have we learned after 60 years?*, «Annual Review of Phytopathology», 37, pp. 285-306.
- HARMAN E., HOWELL R., VITERBO A., CHET I., LORITO M. (2004): *Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts*, «Nature Reviews», 2, pp. 43-56.
- HARTMANN T. (2008): *The lost of origin of chemical ecology in the late 19th century*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 105, pp. 4541-4546.
- HE P.Q., TIAN L., CHEN K.S., HAO L.H., LI G.Y. (2006): *Induction of volatile organic compounds of Lycopersicon esculentum Mill. and its resistance to Botrytis cinerea Pers. by burdock oligosaccharide*, «Journal of Integrative Plant Biology», pp. 48, 550-557.
- HE X.Z., DIXON R.A. (2000): *Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances the biosynthesis of 48-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa*, «Plant Cell», 12, pp. 1689-1702.
- HIPSKIND J.D., PAIVA N.L. (2000): *Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to Phoma medicaginis*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 13, pp. 551-562.
- HOITINK H.A.J., BOEHM M.J. (1999): *Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon*, «Annual Review of Phytopathology», 37, pp. 427-446.
- HOLDEN M.T.G., CHHABRA S.R., DE NYS R., STEAD P., BAINTON N.J., HILL P.J., MANEFIELD M., KUMAR N., LABATTE M., ENGLAND D., RICE S., GIVSKOV M., SALMOND G.P.C., STEWART G.S.A.B., BYCROFT B.W., KJELLEBERG S., WILLIAMS P. (1999): *Quorum-sensing cross-talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from Pseudomonas aeruginosa and other gram-negative bacteria*, «Molecular Microbiology», 33, pp. 1254-1266.

- IGARASHI Y., YOSHIDA R., MIURA S., FURUMAI T. (2004): *Plant growth promoting activity of secondary metabolites of endophytic actinomycetes*, «The abstract of 18th International Conference on Plant Growth Substances», p. 59.
- JACQUES R.J.S., OKEKE B.C., BENTO F.M., TEIXEIRA A.S., PERALBA M.C.R., CAMARGO F.A.O. (2008): *Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil*, «Bioresource Technology», pp. 99, 2637-2643.
- KETTERER N. (1990): *Studies on the effect of a compost extraction on the leaf infections of potatoes and tomatoes by Phytophthora infestans as well as on the infection of grape vines by Plasmopara viticola, Pseudopeziza tracheiphila and Uncinula necator*, PhD Thesis, Bonn, Germany.
- KLARZYNSKI O., DESCAMPS V., PLESSE B., YVIN J.C., KLOAREG B., FRITIG B. (2003): *Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16, pp. 115-122.
- KRAUSE S.M., MADDEN L.V., HOITINK H.A.J. (2001): *Effect of potting mix microbial carrying capacity on biological control of Rhizoctonia damping off of radish and Rhizoctonia crown and root rot of poinsettia*, «Phytopathology», 91, pp. 1116-1123.
- KUMAR M.N.V.R. (2000): *A review of chitin and chitosan applications*, «Reactive and Functional Polymers», 46, pp. 1-27.
- LAFontaine P.J., BENHAMOU N. (1996): *Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, «Biocontrol Science and Technology», 6, pp. 111-124.
- LANZUISE S., RUOCCO M., WOO S., ALOJ V., TURRA D., VINALE F., MARRA F., LORITO M. (2007): *Optimization of an industrial fermentation process for the production of novel Trichoderma-based formulations*, «Journal of Plant Pathology», 89, p. S42.
- LAZAROVITS G., CONN K.L., POTTER J.W. (1999): *Reduction of potato scab, Verticillium wilt, and nematodes by soy meal and meat and bone meal in two Ontario potato fields*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 21, pp. 345-353.
- LAZZERI L., MANICI L.M. (2001): *Allelopathic effect of glucosinolate-containing plant green manure on Pythium sp. and total fungal population in soil*, «Hort Science», 36, pp. 1283-1289.
- LIU H., DU Y., WANG X., SUN L. (2004): *Chitosan kills bacteria through cell membrane damage*, «International Journal of Food Microbiology», 95, pp. 145-155.
- LIU J., TIAN S., MENG X., XUA Y. (2007): *Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit*, «Postharvest Biology and Technology», 44, pp. 300-306.
- LODHA S. (1995): *Soil solarization, summer irrigation and amendments for the control of Fusarium oxysporum f. sp. cumini and Macrophomina phaseolina in arid soils*, «Crop protection», 14, pp. 215-219.
- LÓPEZ-ESCUDERO F.J., MWANZA C., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2007): *Reduction of Verticillium dahliae microsclerotia viability in soil by dried plant residues*, «Crop Protection», 26, pp. 127-133.
- LORITO M., WOO S., IACCARINO M., SCALA F. (2006): *Microrganismi antagonisti*, In *Microrganismi benefici per le piante*, IDELSON-GNOCCHI, pp. 146-175.
- MANEFIELD M., DE NYS R., KUMAR N., READ R., GIVSKOV M., STEINBERG P., KJELLEBERG S. (1999): *Evidence that halogenated furanones from Delisea pulchra inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein*, «Microbiology», 145, pp. 283-291.

- McKELLAR M.E., NELSON E.B. (2003): *Compost-induced suppression of Pythium damping-off is mediated by fatty-acidmetabolizing seed-colonizing microbial communities*, «Applied and Environmental Microbiology», 69, pp. 452-460.
- MOHAMMADZADEH S., SHARIATPANAH M., HAMED M., AHMADKHANIHA R., SAMADI N., OSTAD S.N. (2007): *Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis*, «Food Chemistry», 103, pp. 1097-1103.
- MORRIS C.E., MONIER J.M. (2003): *The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 41, 429-453.
- MORRISEY J.P., OSBOURN A.E. (1999): *Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis*, «Microbiology and Molecular Biology Reviews», 63, pp. 708-724.
- NOBLE R., ROBERTS S.J. (2004): *Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: a review*, «Plant Pathology», 53, pp. 548-568.
- OSBOURN A.E., CLARKE B.R., LUNNESS P., SCOTT P.R., DANIELS M.J. (1994): *An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by Gaeumannomyces graminis var. tritici*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 45, pp. 457-467.
- OZINO O.I., MERLETTO F., FERRO P. (1996): *The action of propolis on certain microorganisms isolated from various mediums*, «Apiacta», 31, pp. 97-102.
- PALMA-GUERRERO J., JANSSON H.B., SALINAS J., LOPEZ-LLORCA L.V. (2008): *Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi*, «Journal of Applied Microbiology», 104, pp. 541-553.
- PANDEY P., MAHESHWARI D.K. (2007): *Two-species microbial consortium for growth promotion of Cajanus cajan*, «Current Science», 92, pp. 1137-1142.
- PAPAVIZAS G.C. (1968): *Survival of root-infecting fungi in soil. IV. Effect of amendments on bean root rot caused by Thielaviopsis basicola and on inoculum density of the causal organism*, «Phytopathology», 58, pp. 421-428.
- PARK R.D., JO K.J., JO Y.Y., JIN Y.L., KIM K.Y., SHIM J.H. KIM, Y.W. (2002): *Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens*, «Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology», 12, pp. 84-88.
- PÉREZ-PIQUERES A., EDEL-HERMANN V., ALABOUVETTE C., STEINBERG C. (2006): *Response of soil microbial communities to compost amendments*, «Soil Biology & Biochemistry», 38, pp. 460-470.
- POSTMA, J., WIEGERS, G.L., STEVENS, L., (2005): *Lysobacter enzymogenes in combinatie met chitosan bestrijdt Pythium aphanidermatum*, «Gewasbescherming», 36, p. 268.
- QUIROGA E.N., SAMPIETRO D.A., SOBERO J.R., SPARIGLIA M.A., VATTUONE M.A. (2006): *Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles*, «Journal of Applied Microbiology», 101, pp. 103-110.
- ROS M., HERNANDEZ M.T., GARCIA C., BERNAL A., PASCUAL J.A. (2005): *Biopesticide effect of green compost against Fusarium wilt on melon plants*, «Journal of Applied Microbiology», 98, pp. 845-854.
- SARWAR M., KIRKEGAARD J.A., WONG P.T.W., DESMARCHELIER J.M. (1998): *Biofumigation potential of brassicas III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens*, «Plant and Soil», 201, pp. 103-112.
- SCHEUERELL S., MAHAFFEE W. (2002): *Compost tea: principles and prospect for plant disease control*, «Compost Science and Utilization», 10, pp. 313-338.
- SCHEUERELL S. (2003): *Understanding how compost tea can control disease*, «BioCycle», 44, pp. 20-25.
- SCHEUERELL S.J., SULLIVAN D.M., MAHAFFEE W.F. (2005): *Suppression of seedling damping-off caused by Pythium ultimum, P. irregulare, and Rhizoctonia solani in container*

- media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources*, «Phytopathology», 95, pp. 306-315.
- SHARATHCHANDRA R.G., NIRANJAN RAJ S., SHETTY N.P., AMRUTHESH K.N., SHEKAR SHETTY H. (2004): *A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet*, «Crop Protection», 23, pp. 881-888.
- SMITH C.J. (1996): *Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system*, «New Phytologist», 132, pp. 1-45.
- SMITH K.P., GOODMAN R.M. (1999): *Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes*, «Annual Review of Phytopathology», 37, pp. 473-491.
- SMITH S.E., READ D.J. (1997): *Mycorrhizal symbiosis. Second Edition*, Academic Press, London.
- SZCZECHE M. (1999): *Suppressiveness of vermicompost against Fusarium wilt of tomato*, «Journal of Phytopathology», 147, pp. 155-161.
- SZCZECHE M., SMOLIŃSKA U. (2001): *Comparison of suppressiveness of vermicomposts produced from animal manures and sewage sludge against Phytophthora nicotianae Breda de Haan var. nicotianae*, «Journal of Phytopathology», 149, pp. 77-82.
- TEGEGNE G., PRETORIUS G.C., SWART W.J. (2008): *Antifungal properties of Agapanthus africanus L. extracts against plant pathogens*, «Crop Protection», 27, pp. 1052-1060.
- TENUTA M., LAZAROVITS G. (2002): *Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of Verticillium dahliae*, «Phytopathology», 92, pp. 255-264.
- TENUTA M., LAZAROVITS G. (2004): *Soil properties associated with the variable effectiveness of meat and bone meal to kill microsclerotia of Verticillium dahliae*, «Applied Soil Ecology», 25, pp. 219-236.
- TEPLITSKI M., ROBINSON J.B., BAUER W.D. (2000): *Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 13, pp. 637-648.
- TERMORSHUIZEN A.J., VAN RIJN E., VAN DER GAAG D.J., ALABOUVETTE C., CHEN Y., LAGERLÖF J., MALANDRAKIS A.A., PAPLOMATAS E.J., RÄMERT B., RYCKEBOER J., STEINBERG C., ZMORA-NAHUM S. (2007): *Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response*, «Soil Biology & Biochemistry», 38, pp. 2461-2477.
- TIKHONOV V.E., STEPNOVA E.A., BABAK V.G., YAMSKOV I.A., PALMA-GUERRERO J., JANSOHN H.B., LOPEZ-LLORCA L.V., SALINAS J., GERASIMENKO D.V., AVDIENKO I.D., VARLAMOV V.P. (2006): *Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec- 2-enyl)succinoyl/-derivatives*, «Carbohydrate Polymers», 64, pp. 66-72.
- TILSTON E.L., PITT D., GROENHOF A.C. (2002): *Composted recycled organic matter suppresses soil-borne diseases of field crops*, «New Phytologist», 154, pp. 731-740.
- TRILLAS M.I., CASANOVA E., COTXARRERA L., ORDOVÁS J., BORRERO C., AVILÉS M. (2006): *Composts from agricultural waste and the Trichoderma asperellum strain T-34 suppress Rhizoctonia solani in cucumber seedlings*, «Biological Control», 39, pp. 32-38.
- TROTEL-AZIZ P., COUDERCHET M., VERNET G., AZIZ A. (2006): *Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of Botrytis cinerea*, «European Journal of Plant Pathology», 114, pp. 405-413.
- TUITERT G., SZCZACH M., BOLLEN G.J. (1998): *Suppression of Rhizoctonia solani in potting mixtures amended with compost made from organic household waste*, «Phytopathology», 88, pp. 764-773.



- UPADHYAY A., SRIVASTAVA S. (2008): *Characterization of a new isolate of Pseudomonas fluorescens strain Psd as a potential biocontrol agent*, «Letters in Applied Microbiology», 47, pp. 98-105.
- VAN LOON L.C., BAKKER P.A.H.M., PIETERSE C.M.J. (1998): *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 453-483.
- VAN OS G.J., VAN GINKEL J.H. (2001): *Suppression of Pythium root rot in bulbous Iris in relation to biomass and activity of the soil microflora*, «Soil Biology & Biochemistry», 33, pp. 1447-1454.
- VAN ETTEN H.D., MATTHEWS D.E., MATTHEWS P.S. (1989): *Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications*, «Annual Review of Phytopathology», 27, pp. 143-164.
- VARVARO L., ANTONELLI M., BALESTRA G.M., FABÍ A., SCERMINO D., VUONO G. (2002): *Investigations on the bactericidal activity of some natural products*, International Congress "Biological products": which guarantees for the consumers.
- VEEKEN A.H.M., BLOK W.J., CURCI F., COENEN G.C.M., TEMORSHUIZEN A.J., HAMELERS H.V.M., (2005): *Improving quality of composted biowaste to enhance disease suppressiveness of compost-amended, peat based potting mixes*, «Soil Biology & Biochemistry», 37, pp. 2131-2140.
- VON BODMAN S.B., BAUER W.D., COPLIN D.L. (2003): *Quorum-sensing in plant pathogenic bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 41, 455-482.
- WHIPPS J.M. (1997): *Development in the biological control of soil-borne plant pathogens*, «Advances in Botanical Research», 26, pp. 1-84.
- WITTSTOCK U., GERSHENZON J. (2002): *Constitutive plant toxins and their role in defence against herbivores and pathogens*, «Current Opinion in Plant Biology», 5, pp. 1-8.
- ZHANG L., DONG Y. (2004): *Quorum sensing and signal interference: diverse implications*, «Molecular Microbiology», 53, pp. 1563-1571.
- ZHANG W., DICK W.A., HOITINK H.A.J. (1996): *Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to Pythium root rot and anthracnose*, «Phytopathology», 86, pp. 1066-1070.
- ZHANG Y., SMITH D.A. (1983): *Concurrent metabolism of the phytoalexins phaseollin, Kievitone and phaseollinisoflavan by Fusarium solani f.sp. phaseoli*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 23, pp. 89-100.
- ZUCCONI F., FORTE M., MONACO A., DE BERTOLDI M. (1981): *Evaluating toxicity of immature compost*, «Biocycle», 22, pp. 54-57.



GIOVANNI VANNACCI\*, SABRINA SARROCCO\*, SUSANNA PECCHIA\*,  
MARIAROSARIA VERGARA\*

## Innovazioni nella difesa delle colture con mezzi a basso impatto ambientale: malattie da funghi

### INTRODUZIONE

Le malattie fungine rappresentano uno dei principali fattori limitanti le produzioni agrarie. Il delicato equilibrio che si deve stabilire tra la necessità di ottenere produzioni di qualità derivanti da pratiche agricole sostenibili, ma che siano, al contempo, remunerative per i produttori e a costi accessibili per i consumatori, non consente, al momento attuale, di rinunciare completamente al supporto della chimica di sintesi. Impone, tuttavia, la ricerca e la sperimentazione di strategie e di strumenti innovativi o alternativi che vadano ad arricchire il limitato arsenale a disposizione degli agricoltori per difendere quelle colture da cui tutti noi dipendiamo per il nostro sostentamento. Ben vengano, quindi, anche nuovi principi attivi di sintesi, se a più basso impatto ambientale e tossicità.

Di seguito passeremo in rassegna strumenti tecnici già disponibili per l'agricoltore, senza per questo pretendere che sia una rassegna esaustiva, e strumenti, quali gli OGM, la cui disponibilità non sarà immediata ma la cui importanza non può essere sottaciuta. L'inclusione di questo o quel prodotto o tecnica, non implica automaticamente un giudizio acriticamente positivo; in diversi casi le ricerche e la sperimentazione in campo hanno fornito risultati contrastanti, e, quindi, per alcuni prodotti o tecniche ricordati saranno necessari approfondimenti e aggiustamenti, prima di poterli considerare come pienamente affidabili.

\* *Dipartimento di Coltivazione e difesa delle specie legnose "G. Scaramuzzi", Università degli Studi di Pisa*

## OGM

La resistenza delle piante alle malattie è un efficace meccanismo di difesa naturale dai patogeni, infatti la malattia risulta essere l'eccezione, e non la regola, in natura.

L'ingegneria genetica ha aperto nuove vie per la difesa delle piante. Il sequenziamento di genomi completi e lo sviluppo recente della genomica funzionale hanno contribuito alla comprensione dei meccanismi, sia costitutivi che indotti, utilizzati dall'ospite vegetale in seguito all'attacco del patogeno. Le informazioni sull'espressione genica rendono più facilmente realizzabile la manipolazione genetica e forniscono nuove opportunità per introdurre transgeni derivanti da sistemi diversi nelle piante coltivate. Inoltre, i dati di proteomica e di metabolomica rappresentano un valido strumento per l'analisi di funzioni geniche anche in sistemi biologici non ancora sequenziati (Collinge et al., 2008a).

Tuttavia lo sviluppo di strategie molecolari applicate alla difesa delle piante da malattie fungine risulta notevolmente più lento di quello per la resistenza agli erbicidi o agli insetti, già introdotta in molte piante transgeniche. Ciò è dovuto a vari fattori, tra cui la resistenza solo parziale spesso riscontrata nei confronti di patogeni fungini, la complessità del sistema biologico e la molteplicità dei meccanismi coinvolti nell'interazione (Collinge et al., 2008b). Per questi motivi la produzione di piante transgeniche resistenti ai funghi rappresenta uno scopo importante, ma più laborioso, da raggiungere; infatti, varietà geneticamente modificate resistenti ai funghi non sono ancora presenti sul mercato, nonostante la quantità delle informazioni scientifiche disponibili e degli sforzi impiegati nella manipolazione genetica di molte piante coltivate.

Vari approcci mirati alla produzione di piante transgeniche resistenti ai funghi patogeni sono già stati applicati con successo in laboratorio: quello più diretto consiste nell'introduzione di geni, derivati da piante o da microrganismi, codificanti per metaboliti secondari antifungini, che implicano l'interferenza diretta o indiretta con i meccanismi di patogenesi o il disturbo della fisiologia del patogeno. Nell'ambito di questa strategia sono stati utilizzati geni coinvolti nella degradazione della parete cellulare dei funghi (es. chitinasi o glucanasi) o nella detossificazione di metaboliti tossici rilasciati dal patogeno o ancora nel potenziamento delle risposte di difesa nella pianta geneticamente modificata (es. fitoalessine, inibitori di proteine o sostanze tossiche). Una strategia alternativa riguarda la regolazione dei meccanismi di difesa dell'ospite, sfruttando processi di riconoscimento del patogeno o vie di trasduzione del segnale associate all'infezione. In questo caso la modificazio-

ne genetica è attuata a carico di geni di resistenza (geni R) o di trasduzione del segnale di riconoscimento che consentono un'identificazione precoce del patogeno innescando la reazione ipersensibile (HR), oppure una produzione aumentata e rapida di segnali, come acido salicilico o jasmonico, che attivano un'efficace risposta sistemica (SAR) (Collinge et al., 2008b).

Numerosi esempi di strategie transgeniche che risultano in aumentata resistenza alle malattie fungine sono riportati in letteratura. Il riso è stato trasformato per resistenza a *Rhizoctonia solani* con geni codificanti per proteine di difesa (chitinasi e taumatina), derivati da varietà di riso resistente (Kaplana et al., 2008). Piante di cotone transgenico sono state ottenute per trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* con un gene che codifica per un peptide sintetico antimicrobico (Rajasekaran et al., 2007). Un gene isolato da melo selvatico, omologo a geni di resistenza del pomodoro a *Cladosporium fulvum*, è stato introdotto in una varietà coltivata di melo che è risultata resistente a *Venturia inaequalis* (Belfanti et al., 2004). Piante di soia e di girasole geneticamente modificate, in seguito a inserimento di un gene per l'ossalato ossidasi di grano, risultano resistenti a *Sclerotinia sclerotiorum* (l'ossalato è un importante fattore di patogenicità di *S. sclerotiorum*) (per la soia Donaldson et al., 2001; per il girasole Hu et al., 2003). Tabacco trasformato con transgeni che codificano per chitinasi e glucanasi, rispettivamente derivati da riso e medica, mostra un'aumentata capacità di difesa contro attacchi fungini (Zhu et al., 1994). Due esempi di trasformazione con un gene coinvolto nella sintesi di fitoalessine, derivato da vite, riguardano l'orzo e il grano transgenici, che esprimono stilbene sintasi per la sintesi di resveratrolo e mostrano aumentata resistenza a *Botrytis cinerea* (Leckband e Lorz, 1998), a *Puccinia recondita* e a *Septoria nodorum* (Serebriakova et al., 2005).

Particolare importanza riveste per l'Europa in generale e l'Italia in particolare la difesa della vite, data l'importanza della coltura e la gravità delle potenziali malattie (oidio e peronospora in particolare). Una recente indagine europea rivela quanto sia importante il controllo delle malattie fungine della vite, dato l'enorme impatto, da un punto di vista ambientale ed economico, in termini di utilizzo di fungicidi: mentre le vigne coprono solo il 5% dei terreni coltivati, la coltivazione della vite è responsabile del 70% dei fungicidi adoperati in Europa (Travis, 2008). Esistono circa 70 prove in campo con viti geneticamente modificate tra USA, Canada, Australia ed Europa, e alcune di queste riguardano resistenza a funghi patogeni (Grando M.S., <http://www.futuragra.it/>). Ma anche in questo caso il problema più importante non sembra essere quello tecnico, ma la probabile non accettazione da parte del consumatore, e dei produttori, specialmente in un settore, quale quello del

vino, dove l'immagine è di fondamentale importanza ai fini della formazione del prezzo del prodotto finale.

Infine, un risvolto rilevante delle infezioni fungine riguarda la produzione di micotossine (sostanze altamente tossiche per animali e uomo) da parte di alcuni patogeni delle colture: ad esempio cereali attaccati da *Fusarium* producono granella contenente alcuni tipi di micotossine (es. fumonisine, tricoteceni e zearalenone) mentre piante attaccate da *Aspergillus* possono contenere aflatossine. La presenza dei funghi micotossigeni, e quindi di micotossine, si può riscontrare sia in campo sulla pianta sia in una qualunque delle successive fasi di conservazione e trasformazione dei prodotti vegetali; per questo è molto importante difendere già in campo le piante di interesse agronomico da questo tipo di funghi, allo scopo di prevenire la contaminazione da micotossine delle derrate. Le strategie biotecnologiche applicate alla protezione di colture di cereali sono state riportate in numerosi casi: ad esempio, per il controllo di *Fusarium* un gene di *Arabidopsis*, che regola l'attivazione di SAR, è stato inserito con successo in grano (Makandar et al., 2006) e l'introduzione in mais di un gene che codifica per un enzima che degrada lo zearalenone, ha permesso una significativa riduzione della contaminazione da questa micotossina nelle piante transgeniche (Igawa et al., 2007).

Le sperimentazioni autorizzate in campo sono poche, ad es. è stato sviluppato da Syngenta un grano GM resistente a *Fusarium*, contenente un transgene in grado di detossificare le micotossine di *Fusarium*, che potrebbe essere immesso sul mercato nel 2010; la sperimentazione della coltura è stata consentita in Germania dal 2003 (Notification Number: B/DE/02/143, richiesto dalla Germania, compagnia Syngenta Seeds GmbH, nel 2002). L'università di Zurigo ha ottenuto l'autorizzazione dall'Ufficio federale dell'ambiente per la sperimentazione in campo dal 2008 al 2010 di piante transgeniche di grano con un'accresciuta resistenza all'oidio. Pianta di grano GM resistente a *Fusarium* sono state ottenute anche in Spagna, dove sono state rilasciate in campo, per sperimentazione, dal 2004 (Notification Number: B/ES/04/08-CON, richiesta da Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

In Italia, è stato ottenuto un limone transgenico, varietà locale Femminello siracusano, ingegnerizzato con il gene chitinasi *Chit42* isolato da *Trichoderma harzianum*, per la resistenza verso patogeni fungini. La resistenza è stata valutata nei confronti di *Phoma tracheiphila*, agente del mal secco (sperimentazione programmata dal 2005 al 2015) (Notification Number: B/IT/04/03, richiesta dell'Italia, Università di Catania, Facoltà di Agraria, Dip. OrtoFloroArboricoltura e Tecnologie Agroalimentari, Gentile et al., 2002;

La Malfa et al., 2007). Non è il caso di entrare nel merito del problema della sicurezza d'uso e dei rischi ambientali connessi con l'uso di piante GM. In altre sedi l'argomento è stato trattato, e bistrattato, ma forse varrebbe la pena di considerare anche queste, con le dovute precauzioni, tra le possibili alternative miranti alla riduzione del danno, questo certo, conseguente un eccessivo impiego della chimica per la difesa delle colture.

#### BIOFITOFARMACI

L'impiego di agrofarmaci a base microbiologica è ancora nella sua infanzia.

Nonostante la grande massa di ricerche sull'argomento, ben pochi prodotti sono arrivati sul mercato. Alla base esistono motivazioni tecniche ed economiche. Lo sviluppo di un biofitofarmaco prevede, semplificando, quattro fasi distinte: l'isolamento, la selezione, la produzione della biomassa e la formulazione. A queste seguono il confezionamento e la distribuzione, che, seppur non facenti parte dello sviluppo, nondimeno giocano un ruolo molto importante nel garantire il successo a un prodotto. Isolamento e selezione sono di norma portati avanti da ricercatori che operano con fondi pubblici, essendo le due fasi a maggior rischio, e non sempre i ricercatori selezionano tenendo presenti le successive fasi di sviluppo né i problemi di mercato. Una volta individuato un microrganismo di interesse, dovrebbero subentrare aziende private con la messa a punto di metodi proprietari di fermentazione e formulazione. Ma il coinvolgimento di aziende dipende sostanzialmente da considerazioni di tipo economico. Purtroppo, in questo settore esiste una contraddizione non risolta. I principi attivi dei biofitofarmaci sono microrganismi e, come tali, usualmente ben adattati a specifiche nicchie ecologiche. Questo è un tratto che li rende particolarmente interessanti da un punto di vista dell'impatto ambientale, di fatto riducendolo, ma ne limita l'uso alle stesse specifiche nicchie. Quello che appare essere un vantaggio ecologico, si sostanzia in una più o meno marcata riduzione del mercato potenziale, e questo dovrebbe favorire la nascita di piccole aziende biotech deputate alla produzione e commercializzazione di limitate quantità di numerosi prodotti, specifici per ben definiti ambienti e colture. Ma gli elevati costi della registrazione mettono fuori mercato le piccole aziende, che non hanno grossi capitali da investire o, anche avendoli, non possono permettersi di attendere anni, quelli necessari alla registrazione, prima di poter generare guadagni con la commercializzazione del prodotto registrato. Le grandi aziende, per contro, non sono interessate a piccole fette di mercato e la conseguenza è un ridot-

PRINCIPIO ATTIVO	
Ampelomyces quisqualis	<i>Trichoderma harzianum</i> ICC 012
Bacillus subtilis	<i>Trichoderma viride</i> ICC 080
Coniothyrium minitans	Pseudomonas chlororaphis
Trichoderma harzianum	Streptomyces griseoviridis

Tab. 1 *Elenco dei principi attivi antifungini di tipo microbiologico registrati in Italia*

to numero di agrofarmaci di origine microbiologica sul mercato, salvo poi trovare in commercio prodotti commercializzati come ammendanti o simili, di cui, a parole, sono declamate proprietà miracolose ma che, nei fatti, sono privi di qualunque tipo di controllo e garanzia. Di fondamentale importanza appare, quindi, la riduzione dei costi di registrazione e la semplificazione dell'iter burocratico se si vuole che questi strumenti, ritenuti, in generale, a basso impatto ambientale e di scarsi o nulli rischi per la salute umana, trovino adeguata diffusione nella pratica agricola.

La ricerca, in particolare negli ultimi anni, si è particolarmente orientato verso lo studio dei meccanismi d'azione dell'antagonismo, anche grazie ai grandi sviluppi della biologia molecolare. Ricerche di grande interesse scientifico e che hanno aperto anche nuove possibilità di lotta attraverso l'impiego di geni e prodotti genici derivati dagli antagonisti, ma gli effetti erratici di questi strumenti tecnici persistono, e sono anche la conseguenza dei limitati studi condotti su altri aspetti, meno paganti in termini di risonanza scientifica e "impact factor", quali quelli relativi alle condizioni che consentono agli antagonisti di manifestare appieno le loro potenzialità in condizione di normale impiego agricolo. Ricerche di campo, quindi, sulla cui base si possono definire, ad esempio, tipo di inoculo da produrre, modi, tempi e quantità di prodotto da impiegare o interazioni tra antagonista e specie/cultivar degli ospiti da difendere.

Anche da un punto di vista normativo, la situazione europea è alquanto complicata, con una procedura di registrazione farragिनosa che prevede diversi step e il coinvolgimento di tutti gli stati membri, senza che al richiedente siano garantiti tempi certi per l'accoglimento, o il rigetto, della sua richiesta. Basti pensare che nei paesi extra europei, tutta la procedura deve terminare, salvo errori o carenze nella documentazione, entro 18 (USA), 16 (Canada) o 12 (Australia) mesi. I limiti della normativa europea riflettono la struttura politica dell'Unione, che deve mediare tra la necessità di un'amministrazione centralizzata e le autonomie dei singoli stati. La conseguenza è che negli USA 38 microrganismi sono inclusi nella lista dei principi attivi utilizzabili in agricoltura, mentre in Italia sono solamente 8 (Annexe 1 della Direttiva 91/414 EEC) (tab. 1).



I principi attivi (microrganismi) di biofitofarmaci attualmente registrati e commercializzati in Italia sono funghi filamentosi e batteri che, attraverso differenti meccanismi d'azione, permettono la lotta a diversi funghi fitopatogeni, sia colonizzatori delle parti aeree che di origine tellurica. Ad esempio, per la lotta all'oidio, è possibile utilizzare il fungo iperparassita *Ampelomyces quisqualis*, principio attivo di un prodotto impiegato con successo nella lotta agli agenti del mal bianco appartenenti alla famiglia delle *Erysiphaceae*. In letteratura sono segnalate più di 64 specie di oidi suscettibili all'azione dell'antagonista che sono in grado di colpire più di 256 specie vegetali. L'antagonista è in grado di infettare l'ospite fungino e differenziare i propri corpi fruttiferi (picnidi) all'interno delle ife, dei conidiofori e dei periteci cleistotecioidi dell'oidio del quale, grazie a questo parassitismo, riduce la crescita e causa la morte.

Il micoparassitismo è un meccanismo d'azione che viene utilizzato da un altro fungo principio attivo di un biofitofarmaco: *Conyothirium minitans*. Si tratta di un fungo non patogeno di origine tellurica, che mostra una notevole capacità di parassitizzare, inibendone la germinazione e quindi causandone la morte, gli sclerozi differenziati da diverse specie di *Sclerotinia*, come *S. sclerotiorum* e *S. minor*. Questi patogeni di origine tellurica, capaci di attaccare e provocare ingenti danni su numerose specie vegetali di interesse agrario, danno luogo a malattie a interesse semplice la cui gravità dipende all'inoculo iniziale: in questo caso, molto vantaggiosa è la possibilità di utilizzare un trattamento che riduca l'inoculo iniziale del patogeno, rappresentato appunto dalla quantità di sclerozi presenti nel terreno. L'impiego di *C. minitans* è una strategia di tipo preventivo e non curativo, quindi il trattamento del terreno deve essere effettuato prima della messa a dimora della pianta coltivata in modo da ridurre la presenza del patogeno nel terreno.

Sempre nell'ambito di biofitofarmaci a base di funghi filamentosi, quelli il cui principio attivo è costituito da spore di *Trichoderma harzianum*, rappresentano un ottimo strumento nella lotta ai patogeni fungini. In particolare, l'isolato T22 di *T. harzianum*, prodotto della fusione dei protoplasti di due isolati diversi, ciascuno con caratteristiche particolari e vantaggiose, si è dimostrato in grado di contenere lo sviluppo delle malattie causate da diversi patogeni di origine tellurica grazie a diverse caratteristiche che vanno dalla rizosfera competenza, alla competizione per la sfermosfera in condizione di ferro carenza, fino alla capacità di indurre resistenza nelle piante trattate. In aggiunta, il microrganismo è in grado di stimolare la crescita e la produttività delle piante cresciute nei terreni trattati con il biofitofarmaco, il che conferisce un valore aggiunto al prodotto che può essere utilizzato anche come

biofertilizzante. Anche per questo microrganismo l'azione è preventiva e non curativa.

Di particolare interesse appaiono i biofitofarmaci il cui principio attivo è costituito da più di un microrganismo: è il caso di un prodotto registrato anche in Italia contenente due funghi appartenenti al genere *Trichoderma* e più specificatamente l'isolato ICC 012 di *T. harzianum* e ICC 080 di *T. viride*. Grazie alle attività micoparassitarie, di competizione per i nutrienti e lo spazio e la produzione di sostanze ad attività antibiotica, questi due isolati agiscono sinergicamente e possono essere impiegati nella lotta preventiva a diversi funghi patogeni di origine tellurica quali *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Thielaviopsis basicola*, *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. su numerose specie ornamentali, floricole e orticole.

Passando a principi attivi di origine batterica, di particolare interesse, soprattutto perché impiegato ormai da lungo tempo, è *Bacillus subtilis*, un batterio gram-positivo comunemente presente nel suolo, particolarmente abbondante nella rizosfera delle piante. L'azione antagonistica si esplica, oltre che attraverso la competizione per le fonti nutritive e per lo spazio, anche mediante produzione di eso-enzimi e di sostanze di natura antibiotica, quali surfattina, bacilisina, subtilina e iturina. Il microrganismo è attivo nei confronti di numerosi patogeni sia fungini, tra cui *Botrytis cinerea* e *Venturia inaequalis*, che batterici come *Erwinia amylovora*. Poiché è noto che i batteri fitopatogeni sono di difficile contenimento in quanto solo gli antibiotici, il cui utilizzo non è consentito, sembrano dare risultati soddisfacenti, questo prodotto rappresenta un valido strumento nella lotta a batteri fitopatogeni di grande pericolosità come, ad esempio, l'agente causale del colpo di fuoco.

Un altro batterio molto interessante come principio attivo di un prodotto distribuito in Italia è *Streptomyces griseoviridis*. Questo microrganismo ha la capacità di colonizzare l'apparato radicale delle piante ospiti manifestando un'azione preventiva contro i patogeni tellurici. Il batterio svolge la sua attività antagonistica attraverso meccanismi di competizione per il territorio e mediante fenomeni di iperparassitismo. Il prodotto contenente *S. griseoviridis* è utilizzato anche come biofertilizzante poiché, durante il processo di colonizzazione della rizosfera, rilascia metaboliti promotori della crescita favorendo lo sviluppo dell'apparato radicale della pianta ospite. I fitopatogeni bersaglio sono stati individuati in *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Verticillium dahliae*, *Pyrenochaeta lycopersici* e *Phytophthora capsici*.

Da un punto di vista tecnico, il limite più grave dei biofitofarmaci è la loro affidabilità. Il principio attivo di questi farmaci è un organismo vivente, e in

quanto tale ha ben specifiche esigenze in termini di umidità e temperatura e la componente ultravioletta della luce ne riduce, in tempi brevi, la vitalità. Ha, inoltre, una shelf life limitata e fortemente dipendente dalle condizioni di conservazione. Per poter manifestare le proprie capacità, deve essere messo in grado di svilupparsi, e quindi si trova anche a competere con gli altri organismi che occupano la stessa nicchia. Tutto ciò comporta una certa erraticità negli effetti sortiti, spesso anche come conseguenza della scarsa attenzione con cui sono impiegati questi prodotti, scarsa attenzione derivata dall'utilizzo di questi mezzi biotecnici con schemi mentali adattati all'uso di sostanze chimiche. Anche i diversi tipi di patogeno, e di malattie, non sono parimenti suscettibili all'attività dei biofitofarmaci; patogeni la cui fase esterna all'ospite è relativamente breve e limitata alla produzione delle strutture di evasione, come peronosspore o ruggini, difficilmente saranno limitati nello sviluppo o nella riproduzione da microrganismi antagonisti, a meno che questi non agiscano come induttori di resistenza. Anche patogeni che causano sintomi sulle parti vendibili e non soggette a trasformazione (ad es. frutti o verdura) sono bersagli particolarmente difficili da combattere in quanto il danno non è direttamente proporzionale all'incidenza della malattia ma, piuttosto, alla sua diffusione. Ridurre il numero di lesioni su una singola mela non porta benefici, in quanto anche una singola lesione deprezza sensibilmente il frutto.

Le aspettative generate dall'impiego di questa categoria di agrofarmaci sono tuttavia molto ampie, per questo motivo a livello europeo sono in corso iniziative che tendono alla semplificazione delle procedure e alla riduzione dei costi della registrazione, che al momento rappresentano il maggiore ostacolo alla loro diffusione (cfr. <http://www.rebeca-net.de/>).

#### BIOFUMIGANTI

Il controllo di alcuni patogeni del terreno (funghi, nematodi) attraverso sistemi alternativi a basso impatto ambientale ha assunto, in questi ultimi tempi, una grande importanza, non solo in agricoltura biologica, ma anche in quella convenzionale in seguito all'interruzione dell'uso del Bromuro di Metile per la sterilizzazione dei terreni agrari a partire dal 2005.

È noto, infatti, che nel mondo vegetale sono presenti vari sistemi naturali di difesa che in alcuni casi rappresentano dei veri sistemi chimici in grado di produrre composti a elevata attività biologica. Fra questi, il sistema glucosinolati-mirosinasi (Bones e Rossiter, 1996; Rask et al., 2000), tipico della famiglia delle *Brassicaceae*, delle *Capparidaceae* e di altre 10 famiglie

minori delle Dicotiledoni, ha mostrato fin dai primi anni del secolo alcune interessanti caratteristiche biologiche. I glucosinolati sono una classe di circa 120 diversi glicosidi caratterizzati da un gruppo funzionale comune e da una catena laterale che può essere di natura alifatica, aromatica o eteroaromatica. Tali composti, in presenza di acqua e dell'enzima endogeno mirosinasi, sono rapidamente idrolizzati con formazione di b-D-glucosio, ione idrogeno-solfato e una serie di prodotti di idrolisi che, in funzione delle condizioni in cui avviene la reazione, possono essere isotiocianati, nitrili o tiocianati. Enzima (mirosinasi) e substrato (glucosinolati), nella cellula sana, sono compartimentalizzati in zone diverse e solo dove si verificano lesioni cellulari causate da fattori abiotici e/o biotici, entrano in contatto con produzione, *in situ*, dei corrispondenti prodotti di idrolisi che svolgono un'azione di prevenzione e/o di controllo, e comunque di difesa, da alcuni agenti patogeni. I prodotti di idrolisi sono composti solforati caratterizzati da una discreta volatilità e da un'elevata attività biologica nei confronti di batteri, funghi, nematodi, insetti e come inibitori di germinazione (Brown e Morra, 1997; Rosa e Rodrigues, 1999). L'elevata volatilità, se da un lato fa sì che tali molecole siano poco persistenti nel terreno, dall'altro consente loro un'estrema mobilità, e quindi la possibilità di raggiungere agevolmente l'organismo bersaglio. Queste caratteristiche suggeriscono alcune interessanti prospettive applicative per il loro impiego come molecole naturali ad azione fumigante (biofumigazione).

Il termine biofumigazione è stato coniato per meglio definire il controllo di organismi patogeni di origine tellurica da parte degli isotiocianati che sono liberati dall'idrolisi dei glucosinolati contenuti in molte *Brassicaceae* (Kirkegaard e Matthiessen, 2004). Le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti d'idrolisi, la loro attività biologica e la presenza di buone quantità di glucosinolati e mirosinasi in tutti gli organi delle *Brassicaceae*, hanno suggerito la possibilità di indurre la produzione nel terreno di tali composti attraverso la coltivazione e il sovescio di piante caratterizzate da un elevato contenuto in glucosinolati a elevata attività biocida per il controllo di *Sclerotinia* spp., *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., nematodi, elateridi e perfino erbe infestanti.

Dal 2004, inoltre, è disponibile anche una nuova tecnologia di biofumigazione attraverso l'uso di formulati secchi pellettizzati in cui i glucosinolati si trovano in concentrazioni anche 10 volte superiori a quelle normalmente presenti nelle parti verdi delle piante (Lazzeri et al., 2004).

Fra le *Brassicaceae*, le piante più utilizzate sono diverse specie di *Brassica* (*B. oleracea*, *B. napus*, *B. campestris*, *B. kaber*, *B. alba*, *B. nigra*, *B. juncea*), *Raphanus sativus* e *Eruca sativa*. *Brassica juncea*, tuttavia, è quella più utilizzata

e negli ultimi anni un intenso lavoro di miglioramento genetico ha portato alla selezione di piante con un elevato contenuto in glucosinolati e dotate di un'ottima rusticità e adattabilità alle diverse condizioni di coltivazione (Lazzeri, 2004; Gies, 2004).

Tali molecole di origine vegetale possono essere considerate eco-sostenibili, poiché esse sono completamente rinnovabili, biodegradabili, non presentano alcun impatto negativo sul bilancio globale di CO<sub>2</sub> e inoltre sono classificate come ipotossiche nei confronti dell'uomo.

Numerosi sono gli studi che hanno messo in evidenza l'attività biofumigante di diverse *Brassicaceae* nei confronti di diversi patogeni tellurici (Matthiessen e Kirkegaard, 2006). In Italia essa è stata applicata su fragola, patata, lattuga, riso, carota, pomodoro e vite. Negli Stati Uniti è stato stimato che nel 2004 oltre 15.000 ettari sono stati trattati con biofumiganti e sono note anche prime esperienze dell'applicazione di tale tecnica in altri paesi d'Europa (Olanda, Inghilterra, Francia, Finlandia, Svezia, Danimarca), in Africa (Marocco, Kenia) in Giappone e in Israele.

Tuttavia, se in alcuni esperimenti l'attività di difesa è risultata soddisfacente, in altri essa è risultata scarsa o piuttosto variabile anche con lo stesso patogeno. In molti casi le scarse informazioni sugli approcci usati nel valutare il ruolo degli isotiocianati sui risultati ottenuti hanno evidenziato la necessità di approfondire alcuni aspetti chiave della tecnica al fine di una sua migliore utilizzazione per la difesa delle colture. Alcuni gruppi di ricerca in Australia, Italia e Stati Uniti hanno quindi adottato un approccio sistematico al problema indagando, ad esempio, il profilo dei glucosinolati nelle diverse *Brassicaceae*, gli effetti di tali composti sulla crescita della pianta e sull'ambiente, l'attività biologica dei vari isotiocianati. Tali studi hanno consentito di ottimizzare le potenzialità biofumiganti delle varie *Brassicaceae* integrando tale approccio anche con altre strategie quali la solarizzazione o l'uso di biofitofarmaci (Kirkegaard e Matthiessen, 2004).

Il livello di controllo della malattia può essere migliorato selezionando le varietà di *Brassica* con un elevato contenuto di isotiocianati che risultino particolarmente attivi nei confronti di specifici patogeni e che siano maggiormente persistenti nel terreno. Inoltre, l'affinamento di alcune pratiche agronomiche quali la polverizzazione del materiale vegetale, la bagnatura e/o l'interramento del materiale al fine di aumentare il rilascio degli isotiocianati riducendone la perdita, o anche la definizione dei quantitativi ottimali da utilizzare per unità di volume di terreno, possono contribuire a migliorare le "rese fitoiatriche" di tale strategia.

Il grande interesse suscitato dalla biofumigazione risiede essenzialmente nel

fatto che essa è considerata una tecnica eco-compatibile e a basso impatto ambientale. Per tale motivo recentemente sono stati condotti studi per valutare eventuali effetti indesiderati dei glucosinolati e degli isotiocianati nei confronti sia della micoflora del terreno residente o introdotta che degli organismi non-target (Gimsing e Kirkegaard, 2006). Recenti studi hanno evidenziato una minore sensibilità di alcune specie di *Trichoderma* ai volatili tossici rilasciati da semi sfarinati di *Brassica carinata*, rispetto ad alcuni patogeni tellurici, resta tuttavia ancora da chiarire se gli agenti di biocontrollo possono essere utilmente impiegati assieme al trattamento biofumigante per un controllo integrato delle malattie (Dandurand et al., 2000; Galletti et al., 2008).

Ricerche per lo sviluppo della tecnica di biofumigazione sono indirizzate allo studio dei geni coinvolti nella biosintesi dei glucosinolati che potranno consentire in futuro di costituire piante ingegnerizzate con un livello di tali composti più elevato rispetto a quello ottenibile mediante il miglioramento genetico classico (Halkier e Du, 1997; Mithen, 2001).

#### ESTRATTI E ALTRE SOSTANZE NATURALI

Appare sempre più evidente che prodotti di origine vegetale hanno enormi potenzialità di applicazione nella moderna agricoltura. Le piante, infatti, possono fornire un'alternativa ai prodotti di sintesi attualmente utilizzati nel controllo dei funghi fitopatogeni, poiché costituiscono una fonte molto ricca di molecole chimiche bioattive quali alcaloidi, tannini, chinoni, cumarine, composti fenolici e fitoalessine (Kim et al., 2003; 2005; Daoubi et al., 2005; Kagale et al., 2005). Inoltre, estratti vegetali e oli essenziali sono facilmente reperibili in natura, risultano attivi nei confronti di un certo numero di specie bersaglio, sono biodegradabili, non tossici e/o fitotossici e impiegabili in programmi di lotta integrata. Alla luce di tutto questo è facile, quindi, intuire le potenzialità di sviluppo di questa nuova e più sicura classe di agenti per la difesa delle piante. Negli ultimi anni numerosi lavori sono stati incentrati sulla possibilità di impiego di estratti e oli vegetali nella lotta a diversi fitopatogeni fungini, sia *in vitro*, attraverso la valutazione dell'inibizione della crescita miceliare e della germinazione delle spore, che *in vivo*, attraverso esperimenti in serra e in campo volti al contenimento delle malattie. Solo per citare alcuni esempi, estratti di foglie di *Eucalyptus citriodora* e di *Ageratum conyzoides* sono risultati molto efficaci, *in vitro*, nell'inibire la crescita miceliare e la germinazione delle spore di *Didymella bryoniae* (Fiori et al., 2000). Estratti di fiori, fusto e foglie di diverse piante tra cui *Euphorbia macroclada*, sono risultati

essere efficaci nei confronti di *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium italicum*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. *in vitro* (Al-Mughrabi, 2003) mentre estratti vegetali di *Allium* e *Capsicum* selezionati dopo uno screening di estratti vegetali provenienti da 345 piante, così come gli oli essenziali ricavati da *Cymbopogon martini* e *Thymus zygis* selezionati su 49 oli essenziali di differenti origini, hanno mostrato la migliore attività antifungina inibendo la germinazione delle spore di *Botrytis cinerea* in piastre multi pozzetto (Wilson et al., 1997).

Nel 2005, Stephan et al. hanno valutato l'effetto di diversi estratti vegetali per il controllo di *Phytophthora infestans* su patate: estratti di *Rheum rhubarbarum* e *Solidago canadensis* si sono dimostrati in grado di ridurre lo sviluppo dei sintomi dovuti alla presenza del patogeno su piante allevate in serra. Per quanto riguarda i meccanismi d'azione coinvolti nell'attività di contenimento della malattia, nel caso di *R. rhubarbarum* è stata ipotizzata un'attività fungicida, mentre per *S. canadensis* è stato ipotizzato il coinvolgimento del meccanismo di induzione di resistenza nella pianta ospite.

Nel 2007, un estratto di *Astragalus canadensis* ha fornito interessanti risultati nella lotta in campo a *Verticillium dahliae* su patate sia attraverso un'azione fungicida che mediante induzione di resistenza (Uppal et al., 2007). Infine, in un lavoro recentemente pubblicato da Sankarasubramanian et al. (2008), estratti di foglie di *Nerium oleander* e *Pithecolobium dulce* ed estratti di neem sono stati testati contro *Bipolaris oryza* in serra laddove l'estratto di neem è risultato essere in grado di ridurre significativamente l'incidenza della malattia su piante di riso.

In aggiunta agli oli essenziali e agli estratti vegetali, alcuni prodotti di origine naturale sono utilizzati nella lotta biologica ai patogeni delle piante e, in taluni casi, hanno dato risultati promettenti. Tra questi possiamo ricordare il latte e il siero del latte nella difesa contro alcuni funghi fitopatogeni tra cui *Phytophthora infestans* su patata (Jordan et al., 1992) e *Sphaerotheca fuliginea* su zucca, e tali attività sembrano esplicarsi attraverso un'azione fungicida diretta o l'induzione di resistenza nella pianta ospite (Bettiol, 1999), o *Erysiphe (Uncinula) necator* su vite (Crisp et al., 2006). Esistono numerose spiegazioni riguardanti l'azione antifungina del latte che includono l'attività esercitata da parte degli acidi grassi in esso contenuti, la produzione di radicali liberi a seguito di esposizione ai raggi UV, che possono interferire con il funzionamento della membrana cellulare del fungo, o l'alterazione del bilancio osmotico, dovuto alla presenza di sali e altre sostanze. Alcuni componenti del latte come la lattoferrina, già utilizzati come agenti antimicrobici in medicina umana e per la conservazione degli alimenti, si è ipotizzato essere

coinvolti nell'alterazione del bilancio osmotico di *E. necator* e, quindi, nella rottura dei conidi a seguito di un aumento della pressione interna (Crisp et al., 2006).

Tra i composti alternativi impiegati nella lotta ai patogeni meritano, infine, un accenno i fosfonati, esteri dell'acido fosfonico, conosciuti per la loro capacità di ridurre l'incidenza di *Phytophthora* sp. su patate in serra e in pieno campo (Cook e Little, 2001), *Pythium* sp. su cetriolo, sia in ambiente controllato che in campo mediante trattamento del terreno e del seme (Abbasi e Lazarovitis, 2005; 2006a) o *Plasmodiophora brassicae* su cavolo (Abbasi e Lazarovitis, 2006b). I fosfonati sono rapidamente assorbiti e traslocati all'interno della pianta sia nel floema che nello xilema. Possono persistere nei tessuti vegetali anche per lunghi periodi e agiscono con un complesso meccanismo d'azione che va dalla tossicità diretta nei confronti del patogeno all'azione indiretta attraverso l'attivazione delle risposte di difesa della pianta.

## INDUTTORI DI RESISTENZA

### *Induttori di origine biotica*

Diverse sostanze di origine biotica mostrano attività come elicitatori delle reazioni di difesa delle piante, come nel caso dell'olio di neem, di estratti di alghe come la laminarina e oli essenziali quali geraniolo o mentolo. Alcuni di questi prodotti sono tradizionalmente utilizzati in alcuni Paesi, soprattutto asiatici, come accade per l'olio di neem, mentre altri sono utilizzati da meno tempo come la laminarina, di recente immessa nel mercato europeo.

#### Laminarina

La 1,3-glucan-laminarina derivante dall'alga bruna *Laminaria digitata* è nota da alcuni anni per la sua capacità di elicitare una varietà di reazioni di difesa in diverse specie vegetali quali ad esempio il tabacco (Klarzynski et al., 2000), tra le reazioni di difesa indotte dalla laminarina si può ricordare l'accumulo di PR proteins ad attività antimicrobica (Fritig et al., 1998). In un lavoro del 2003 condotto da Aziz et al. questo composto si è dimostrato essere un efficiente elicitore delle risposte di difesa in cellule e piante di vite e ha ridotto lo sviluppo di *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* in piante infette. Nel 2008 Trouvelot et al. hanno osservato induzione di resistenza in *V. vinifera* cv. *Marselan* nei confronti di *P. viticola* in serra da parte della laminarina sulfatata (PS3).



### Chitosano

Un altro composto di origine naturale, il chitosano o chitina deacetilata ottenuta dal guscio di crostacei, è noto per la sua attività antifungina. La sua capacità di inibire la crescita dei funghi è stata documentata sia attraverso studi *in vitro* che *in vivo* ed è noto che questa attività è direttamente correlata alla concentrazione di chitosano. Si ritiene che la natura policationica di questo composto sia la chiave delle proprietà antifungine e che la lunghezza della catena del polimero aumenti tale attività (Hirano e Nagao, 1989). Una spiegazione aggiuntiva risiede nella capacità di questo composto di inibire la produzione di alcuni enzimi fungini (El Gauth et al., 1992) o di indurre cambiamenti morfologici e strutturali all'interno della cellula fungina (Benhamou, 1996; El Ghaouth *et al.*, 1999; Ait Barka *et al.*, 2004). Oltre ad agire direttamente sui funghi patogeni, le possibilità di impiego del chitosano in lotta biologica sono dovute alla capacità di questo composto di indurre risposte di difesa nelle piante trattate come, ad esempio, nei confronti di *F. oxysporum* in piante suscettibili di pomodoro (Benhamou et al., 1998, Bautista Baños et al., 2006).

Nel 2008 questo composto è stato testato direttamente nei confronti di *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* e su tabacco come induttore di resistenza. I risultati ottenuti hanno mostrato che l'azione di inibizione del patogeno e di protezione della pianta dipende dal grado di acetilazione e di degradazione del composto (Falcon et al., 2008.)

### Lipopolisaccaridi

Alcuni composti di origine batterica come i lipopolisaccaridi e le arpine si sono dimostrati in grado di indurre resistenza sistemica acquisita (SAR) in piante. I lipopolisaccaridi (LPS), componenti fondamentali della superficie cellulare dei batteri Gram-negativi, oltre a svolgere diversi ruoli nel processo patogenetico di alcuni batteri fitopatogeni, possono essere riconosciuti dalla pianta come induttori delle risposte di difesa. Ad esempio, LPS estratti da un isolato endofita di *Burkholderia cepacia* hanno mostrato un'azione protettiva su tabacco nei confronti di *Phytophthora nicotianae*, grazie alla biosintesi di PR-proteins (Coventry e Dubery, 2001; Gerber *et al.*, 2004).

### Arpine

Le arpine, proteine acide ricche in glicina, sensibili alle proteasi, termostabili, prodotte da batteri fitopatogeni Gram-negativi sono in grado, quando applicate alle piante, di promuoverne la crescita e indurre resistenza a patogeni e insetti (Dong et al., 1999; Kim e Beer, 2000; Wei e Beer, 1996). Studi

condotti su *Arabidopsis* e tabacco le cui foglie erano state trattate con arpine hanno mostrato reazioni ipersensibili, sintesi di PR proteins e sviluppo di resistenza (Peng et al., 2003). L'espressione di un gene codificante per un'arpina (hfr1) derivato da *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* è in grado di conferire resistenza non specifica in riso nei confronti di *Magnaporthe grisea* (Min et al., 2008).

#### Acido arachidonico

Tra i composti di natura biotica, anche l'acido arachidonico (AA) ha mostrato un'attività come elicitore delle reazioni di difesa in piante di patate in cui si è dimostrato in grado di indurre fattori di resistenza localizzata come necrosi e sintesi di fitolaessine. L'acido arachidonico è, anche, in grado di indurre resistenza sistemica a lungo termine in piante di patate e pomodoro contro funghi fitopatogeni e nematodi (Zinov'eva et al., 1997). Il trattamento di foglie di patata con AA ha permesso di indurre SAR nei confronti di *P. infestans* o *Alternaria solani* (Cohen et al., 1991; Coquoz et al., 1995). L'applicazione di AA può portare, inoltre, a un accumulo di Acido Salicilico che rimane limitato alle parti trattate (Coquoz et al., 1995).

#### Acido jasmonico

L'acido jasmonico (JA) e i suoi esteri metilati (Me-JA) sono comuni regolatori di diverse funzioni fisiologiche delle piante (Hamberg e Gardner, 1992; Semblender e Parthier, 1993). Gli jasmonati sono i prodotti dell'ossidazione enzimatica dell'acido linoleico. La reazione è catalizzata, nelle piante superiori, dalle lipossigenasi (Vick e Zimmerman, 1987). Studi condotti sul ruolo fisiologico, sui meccanismi d'azione, sulla biosintesi e sulle trasformazioni metaboliche degli jasmonati hanno mostrato che l'acido jasmonico e i suoi esteri metilati sono componenti delle reazioni biochimiche associate alla resistenza e sono in grado di indurre la biosintesi di specifiche proteine e di polipeptidi che forniscono protezione alle piante contro stress e fattori patogenici. Gli jasmonati sono risultati efficaci nell'indurre resistenza a *Verticillium dahliae* su cotone e in *Arabidopsis* verso diversi patogeni tra cui *Botrytis cinerea* (Howe e Schilmiller, 2002; Weber, 2002; Farmer et al., 2003; Thomma et al., 2001, Pená-Cortés, et al., 2005) e su patata verso *Phytophthora infestans* (Irinskaya, et al., 2000).

#### Oligogalatturonidi

Alcuni enzimi di origine fungina, le endopoligalatturonasi, hanno mostrato la capacità di attivare le risposte di difesa in diverse piante di interesse agrario.

Queste reazioni includono la produzione di specie attive dell'ossigeno, l'attivazione di proteine chinasi, l'accumulo di prodotti di trascrizione di geni per la difesa e la produzione di fitoalessine.

La maggior parte di queste reazioni di difesa è attivata in risposta a oligogalatturonidi (OGA), prodotti di degradazione dei poligalatturonati in conseguenza dell'attività delle endopoligalatturonasi, con un grado di polimerizzazione da 9 a 20 (De Lorenzo et al., 1994). Questi OGA attivi corrispondono a una parte dei prodotti rilasciati dall'attività delle endopoligalatturonasi sulla parete cellulare. Alcuni patogeni come *Botrytis cinerea* sono capaci di degradare la parete cellulare vegetale mediante produzione e rilascio di endopoligalatturonasi (Staples e Mayer 1995) e attivare gli elicitori delle risposte di difesa (Derckel et al. 1999; Poinsett et al., 2003). Recentemente, oligogalatturonidi si sono dimostrati in grado di indurre resistenza a *Botrytis cinerea* in piante di *Arabidopsis*, indipendentemente da segnali mediati da acido jasmonico, acido salicilico ed etilene (Ferrari et al., 2007).

### Acido salicilico

Composti di natura fenolica, come molti derivati dell'acido benzoico, si accumulano nelle piante durante la fase di infezione. Questi composti si originano grazie all'attivazione di un enzima chiave, la fenilalanina- ammonio liasi (PAL) che porta alla formazione di derivati a partire dalla fenilalanina. Tra i derivati dell'acido benzoico, l'acido salicilico (SA) svolge un ruolo fondamentale nella resistenza delle piante, in modo particolare durante la resistenza sistemica acquisita (SAR). È stato dimostrato che i livelli di SA aumentano molto in piante di tabacco e cetriolo dopo l'infezione da parte di patogeni (Malamy et al., 1990; Rasmussen et al., 1991) e questo incremento è correlato con la SAR (Metraux et al., 1990). Inoltre, piante transgeniche di tabacco e di *Arabidopsis* non capaci di accumulare SA, non sono in grado di sviluppare SAR e mostrano un'aumentata suscettibilità all'infezione. Sebbene non sia stata dimostrata una diretta attività antifungina del SA (Okuno et al., 1991), in alcuni lavori è stato osservato un alterato sviluppo fungino in presenza di SA. L'acido salicilico influenza la vitalità delle spore di *Saccharomyces cerevisiae* (Romano e Suzzi, 1985), riduce la germinazione dei conidi e lo sviluppo delle ife di *Sphaerotheca fuliginea* (Conti et al., 1996) e inibisce la differenziazione e la crescita in *Sclerotium rolfii* e *Sclerotinia minor* (Georgiou et al., 2000). Nel 2004, su *Platanus x acerifolia* è stata valutata la capacità del SA di indurre resistenza alla *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. Pretrattamenti con il composto hanno determinato una riduzione della gravità della malattia e della crescita del fungo (Pilotti et al., 2004).

*Induttori di origine abiotica*

## Acido 2,6 dicloroisonicotinico,

Sulla base dell'ormai noto sistema di induzione di resistenza descritto da Kuc nel 1982, alcuni composti di origine abiotica sono stati studiati e utilizzati per la loro capacità di indurre un effetto SAR nelle piante. Oltre ai fosfati, già impiegati in agricoltura biologica e attivi nei confronti dell'antracnosi e dell'oidio del cetriolo e della peronospora della lattuga o l'acido acetilsalicilico (purtroppo non utilizzabile a causa della sua elevata fitotossicità), possiamo ricordare l'acido 2,6 dicloroisonicotinico (INA). L'INA è in grado di indurre lo stesso spettro di resistenza e gli stessi cambiamenti biochimici già descritti per l'induzione della SAR da parte di agenti biotici sia su cetriolo che su tabacco (Metraux et al., 1991; Kessmann et al., 1994; Oostendorp et al., 2001), ha un'attività pienamente sistemica e non richiede SA per l'attivazione della risposta SAR (Metraux et al., 1991).

## Acido B-aminobutirrico,

Un altro composto di natura chimica, l'acido B-aminobutirrico (BABA), un aminoacido non proteico, si è dimostrato in grado di agire come induttore abiotico di resistenza in numerose specie vegetali, sebbene non sia mai stato dimostrato un effetto antimicrobico diretto *in vitro*. Il BABA è stato descritto come capace di attivare le risposte di difesa nella pianta, coinvolgendo anche le PR-proteins. L'azione è stata documentata su piante di pomodoro e patata verso *Phytophthora infestans* (Cohen et al., 1991; Cohen, 1994a; Cohen e Gisi, 1994; Cohen et al., 1994), di tabacco verso *Peronospora tabacina* (Cohen, 1994b), di peperone verso *Phytophthora capsici* (Lee et al., 2000), di lattuga e cavolfiore verso l'oidio (Pajot et al., 2001; Silue et al., 2002) e di vite verso *Plasmopara viticola* (Hamiduzzaman et al., 2005). È stato ipotizzato che il BABA possa deteriorare le cellule della pianta ospite penetrate dal patogeno, bloccando, in tal modo, la traslocazione dei nutrienti negli austeri (Steiner e Schönbeck, 1997). Il BABA si è visto, inoltre, interferire con la deposizione di callosio, importante meccanismo di difesa contro patogeni fungini come *Hyaloperonospora parasitica* (Flors et al., 2006).

## Acibenzolar-s-metyl,

Sempre nell'ambito della possibilità di impiego di prodotti di origine abiotica per l'induzione della resistenza nelle piante verso patogeni vegetali, sono a disposizione alcuni lavori che valutano la possibilità di utilizzo di un altro composto, l'acibenzolar-s-methyl (ASM) su specie di interesse agrario. Dann

et al. (1998) hanno osservato una riduzione nella severità della muffa bianca dovuta all'attacco di *Sclerotinia sclerotiorum* su soia così come Meyer et al. (2006) sempre su soia ma verso *Rhizoctonia solani*. L'induzione di resistenza a seguito dell'applicazione dell'ASM sulle piante ospiti è possibile mediante la promozione dell'espressione di geni che codificano la sintesi di PR-proteins (Yamaguchi, 1998; Hammerschmidt e Smith-Becker, 2000; Venâncio et al., 1999). Nel 2007 l'ASM è stato testato, in campo, su diverse cultivars di pomodoro in cui si è dimostrato capace di indurre resistenza (Herman et al., 2007).

### Benzotiadiazolo

Infine l'acido benzo-(1,2,3)-tiadiazolo-7-carboico-*S*-metil estere (BTH), un composto chimico di sintesi di tipo benzotiadiazolo, è stato applicato come spray fogliare su pomodoro e valutato per la sua potenziale capacità di conferire un aumento nella resistenza a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Nelle piante non trattate il patogeno è in grado di colonizzare abbondantemente i tessuti vascolari, laddove nelle piante trattate con BTH si può osservare una riduzione dell'estensione della colonizzazione. In particolare, la crescita del patogeno appare ridotta e l'ingresso nei tessuti vascolari è alterato dalla formazione di parete arricchita di callosio che si oppone all'ingresso del patogeno (Benhamou e Bélanger, 1998). Nel 2002 gli stessi autori hanno applicato il BTH su foglie di cetriolo dove il composto si è dimostrato in grado di indurre resistenza verso *Pythium ultimum*, in modo particolare in piante suscettibili che reagiscono molto rapidamente mediante accumulo di composti fenolici in corrispondenza dei siti di penetrazione. Il prodotto commerciale Bion<sup>®</sup>, il cui principio attivo è il BTH, è stato anche saggiato su grano per valutare la capacità di indurre resistenza a *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Il prodotto ha favorito l'accumulo di fenilalanina ammonio-lisi (PAL) correlata con un accumulo di sostanze fenoliche che concorrono a bloccare lo sviluppo del patogeno nella pianta (Stadnik e Buchenauer, 2001). Trattamenti in campo con BTH su vite possono indurre meccanismi di resistenza nei confronti di *Botrytis cinerea* (Iriti et al., 2005) e, aspetto molto interessante, aumentarne il contenuto nutraceutico (Fumagalli et al., 2006).

I meccanismi di base attraverso cui le piante reagiscono dopo l'elicitazione dei meccanismi di difesa da parte dei prodotti naturali sono gli stessi attivati da parte di alcuni microrganismi, sia patogeni che antagonisti, questi ultimi impiegati come agenti di lotta biologica. L'efficacia di questi prodotti naturali dipende dagli stessi fattori e dalle medesime condizioni che regolano l'effica-

cia degli antagonisti che utilizzano l'induzione di resistenza come meccanismo d'azione: specie e cultivar delle piante ospiti, stadio fisiologico della pianta, pressione dell'inoculo del patogeno e condizioni climatiche, solo per citarne alcuni. Si deve, comunque, osservare che anche l'impiego di induttori di resistenza offre, spesso, risultati erratici. D'altra parte le piante, in natura, sono di continuo "sfidate" da organismi diversi ed entrano continuamente in contatto con sostanze di origine biotica o abiotica, in altre parole molti dei meccanismi che sono indotti dall'applicazione di induttori di resistenza possono essere già attivati, e questo introduce un rumore di fondo che confonde gli effetti che si vogliono ottenere e valutare mediante l'impiego deliberato di induttori.

La qualità che rende particolarmente appetibili questi prodotti naturali è che, in alcuni Paesi, non sono considerati prodotti per la protezione delle piante bensì "rafforzatori" delle piante, sfuggendo in tal modo alle regolamentazioni da applicare ai prodotti impiegabili per la protezione delle colture. Secondo le Regolamentazioni Europee, se si intendesse utilizzare questi prodotti nella protezione delle piante, si dovrebbero considerare prodotti per la difesa e sarebbe necessario soddisfare le stesse procedure di registrazione previste per i prodotti a base di molecole di sintesi (Direttiva 91/414). Un problema a parte si genera per estratti vegetali costituiti da un'associazione di numerose molecole differenti come nel caso degli estratti di neem in cui possono essere presenti fino a 50 molecole differenti. L'azadiractina, che è uno dei maggiori costituenti, è stato prolungatamente studiato e potrebbe essere impiegato da solo. Tuttavia gli operatori che seguono programmi di agricoltura biologica hanno la tendenza a preferire l'utilizzo degli estratti naturali da pianta la cui composizione varia in funzione dell'origine della pianta stessa e del processo di estrazione (Alabouvette et al., 2006).

Questa breve rassegna dei mezzi tecnici innovativi disponibili, già oggi o in un prossimo futuro, per la protezione delle colture, mostra come la scelta che deve operare chi si occupa di difesa da funghi patogeni è, oggi, molto più complessa di quanto non fosse ancora pochi anni fa, per la diversificazione in atto nella tipologia degli strumenti dovuta sia all'accresciuta sensibilità ambientalista degli operatori, ma anche per oggettivi limiti imposti dalle normative vigenti.

L'innovazione, tuttavia, non può limitarsi agli strumenti diretti di difesa, ma deve coinvolgere anche altri importanti settori quali la diagnostica fitopatologica, la messa a punto di sistemi più precisi di applicazione dei fitofarmaci, la definizione di modelli previsionali e di sistemi di supporto alle decisioni.

La difesa di una coltura non è più delegabile all'impiego di un particolare prodotto, ma deve essere la conseguenza di scelte oculate di gestione della coltura stessa, in tutti i suoi aspetti.

#### RIASSUNTO

La scelta che deve operare chi si occupa di difesa da funghi patogeni è, oggi, molto più complessa di quanto non fosse ancora pochi anni fa, per la diversificazione in atto nella tipologia degli strumenti dovuta sia all'accresciuta sensibilità ambientalista degli operatori, ma anche per oggettivi limiti imposti dalle normative vigenti.

Nel lavoro sono passati brevemente in rassegna strumenti tecnici per la difesa delle colture già disponibili per l'agricoltore, senza per questo pretendere che sia una rassegna esaustiva, e strumenti, quali gli OGM, la cui disponibilità non sarà immediata ma la cui importanza non può essere sottaciuta. L'inclusione di questo o quel prodotto o tecnica, non implica automaticamente un giudizio acriticamente positivo; in diversi casi le ricerche e la sperimentazione in campo hanno fornito risultati contrastanti, e, quindi, per alcuni prodotti o tecniche ricordati saranno necessari approfondimenti e aggiustamenti, prima di poterli considerare come pienamente affidabili. Oltre agli OGM, vengono trattati gli agrofarmaci i cui principi attivi sono costituiti da microrganismi viventi, i biofumiganti, gli estratti e altre sostanze naturali e gli induttori di resistenza di origine biotica o abiotica.

#### ABSTRACT

Crop protection today can rely on a very different array of tools as a consequence of both a different perception of the environmental impact of pesticides by farmers and agroindustries, and restraints posed by laws. This short review discusses some of the tools available, or that will be available in the near future such as the GMO. The inclusion of some of them does not imply their uncritical endorsement as the analysis of available literature reveals contrasting results, so they will require further in depth studies to become fully reliable. This concise survey includes GMO, biopesticides, biofumigants, natural substances, including plant extracts, and plant resistance inducers, both of biotic and abiotic origin.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABBASI P.A., LAZAROVITIS G. (2005): *Effects of AG3 phosphonate formulations on incidence and severity of Pythium damping-off of cucumber seedlings under growth room, microplot and field conditions*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 27, pp. 420-429.
- ABBASI P.A., LAZAROVITIS G. (2006a): *Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses Pythium damping-off of cucumber seedlings*, «Plant Disease», 90, pp. 459-464.

- ABBASI P.A., LAZAROVITIS G. (2006b): *Effect of soil application of AG3 phosphonate on the severity of clubrot of bok choy and cabbage caused by Plasmodiophora brassicae*, «Plant Disease», 90, pp. 1517-1522.
- AIT BARKA E., EULLAFFROY P., CLÉMENT C., VERNET G. (2004): *Chitosan improves development, and protects Vitis vinifera L. against Botrytis cinerea*, «Plant Cell Reports», 22, pp. 608-614.
- ALABOUVETTE C., OLIVAIN C., STEINBERG C. (2006): *Biological control of plant disease: the European situation*, «European Journal of Plant Pathology», 114, pp. 329-341.
- AL-MUGHRABI, K.I. (2003): *Antimicrobial activity of extracts from leaf, stem and flowers of Euphorbia macroclada against pathogenic fungi*, «Phytopathologia Mediterranea», 42, pp. 245-250.
- AZIZ A., POINSSOT B., DAIRE X., ADRIAN M., BÉZIER A., LAMBERT B., JOUBERT J., PUGIN A. (2003): *Laminarin elicits defence responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16 (12) pp. 1118-1128.
- BAUTISTA-BAÑOS S., HERNANDEZ-LAUZARDO A.N., VELAZQUEZ-DEL VALLE M.G., HERNANDEZ-LOPEZ M., AIT BARKA E., BOSQUEZ-MOLINA E., WILSON C.L. (2006): *Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities*, «Crop Protection», 25, pp. 108-118.
- BELFANTI E., SILFVERBERG-DILWORTH E., TARTARINI S., PATOCCHI A., BARBIERI M., ZHU J., VINATZER B.A., GIANFRANCESCHI L., GESSLER C., SANSAVINI S. (2004): *The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety*, «Proceedings of National Academic of Sciences», 101, pp. 886-890.
- BENHAMOU N. (1996): *Elicitor-induced plant defence pathways*, «Trends in Plant Science», 1, pp. 233-240.
- BENHAMOU N., BÉLANGER R.R. (1998): *Benzothiadiazole-mediated induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in tomato*, «Plant Physiology», 118(4), pp. 1203-1212.
- BENHAMOU N., BÉLANGER R.R. (2002): *Induction of systemic resistance to Pythium damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response*, «Plant Journal», 14 (1), pp. 13-21.
- BENHAMOU N., KLOEPPER J.W., TUZUN S. (1998): *Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response*, «Planta», 204, pp. 153-168.
- BETTIOL W. (1999): *Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) in greenhouse conditions*, «Crop Protection», 18, pp. 489-492.
- BONES A.M., ROSSITER J.T. (1996): *The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry*, «Physiologia Plantarum», 97, pp. 194-208.
- BROWN P.D., MORRA M.J. (1997): *Control of soilborne plants pests using glucosinolate-containing plants*, «Advances in Agronomy», 61, pp. 167-231.
- COHEN Y. (1994a): *Local and systemic control of Phytophthora infestans in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acids*, «Phytopathology», 84, pp. 55-59.
- COHEN Y. (1994b): *3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against Peronospora tabacina*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 44, pp. 273-288.
- COHEN Y., GISI U. (1994): *Systemic translocation of 14C-DL-3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against Phytophthora infestans*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 45, pp. 441-456.



- COHEN Y., GISI U., MOSINGER E. (1991): *Systemic resistance of potato plants against Phytophthora infestans induced by unsaturated fatty acids*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 38, pp. 255-273.
- COHEN Y., NIDERMAN T., MOËSINGER E., FLUHR R. (1994):  *$\beta$ -aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (Lycopersicon esculentum L.) plants and resistance to late blight infection caused by Phytophthora infestans*, «Plant Physiology», 104, pp. 59-66.
- COLLINGE D.B., LUND O.S., THORDAL-CHRISTENSEN H. (2008b): *What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants?*, «European Journal of Plant Pathology», 121, pp. 217-231.
- COLLINGE D.B., JENSEN M.K., LYGKJAER M.F., RUNG, J. (2008a): *How can we exploit genomic approaches for understanding the nature of plant defences? Barley as a case study*, «European Journal of Plant Pathology», 121, pp. 257-266.
- CONTI G.G., PIANEZZOLA A., ARNOLDI A., VIOLINI G., MAFFI D. (1996): *Possible involvement of salicylic acid in systemic acquired resistance of Cucumis sativus against Sphaerotheca fuliginea*, «European Journal of Plant Pathology», 102, pp. 537-544.
- COOK L.R., LITTLE G. (2001): *The effect of foliar application of phosphonate formulations on the susceptibility of potato tubers to late blight*, «Pest Management Sciences», 58, pp. 17-25.
- COQUOZ J.L., BUCHALA A.J., MEUWLY PH., METRAUX, J.P. (1995): *Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to Phytophthora infestans and Alternaria solani*, «Phytopathology», 85, pp. 1219-122.
- COVENTRY H.S., DUBERY I.A. (2001): *Lipopolysaccharides from Burkholderia cepacia contribute to an enhanced defence capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in Nicotiana tabacum*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 58, pp. 149-158.
- CRISP P., WICKS T.J., TROUP G., SCOTT, E.S. (2006): *Mode of action of milk and whey in the control of grapevine powdery mildew*, «Australasian Plant Pathology», 35, pp. 487-493.
- DANDURAND L. M., MOSHER R., KNUDSEN G. R. (2000): *Combined effects of Brassica napus seed meal and Trichoderma harzianum on two soilborne plant pathogens*, «Canadian Journal of Microbiology», 46, pp. 1051-1057.
- DANN E., DIERS B., BYRUM J., HAMMERSCHMIDT R. (1998): *Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by Sclerotinia sclerotiorum in field and greenhouse studies*, «European Journal of Plant Pathology», 104, pp. 271-278.
- DE LORENZO G., CERVONE F., BELLINCAMPI D., CAPRARI C., CLARK A. J., DESIDERIO A., DEVOTO A., FORREST R., LECKIE F., NUSS L., SALVI G. (1994): *Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication*, «Biochemical Society Transactions», 22, pp. 394-397.
- DERCKEL J.P., BAILLIEU F., MANTEAU S., AUDRAN J. C., HAYE B., LAMBERT B., LEGENDRE L. (1999): *Differential induction of grapevine defences by two strains of Botrytis cinerea*, «Phytopathology», 89, pp. 197-203.
- DONALDSON P.A., ANDERSON T., LANE B.G., DAVIDSON A.L., SIMMONDS D.H. (2001): *Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen Sclerotinia sclerotiorum*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 59, pp. 297-307.

- DONG H., DELANEY T.P., BAUER D.W., BEER S.V. (1999): *Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene*, «Plant Journal», 20, pp. 207-215.
- EL GHAOUTH A., ARUL J., GRENIER J., ASSELIN, A. (1992): *Effect of chitosan and other polyions on chitin deacetylase in Rhizopus stolonifer*, «Experimental Mycology», 16, pp. 173-177.
- EL GHAOUTH A., SMILANICK J.L., BROWN G.E., WISNIEWSKI M., WILSON C.L. (1999): *Application of Candida saitoana and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions*, «Plant Disease», 84, pp. 243-248.
- FALCON A.B., CABRERA J.C., COSTALES D., RAMFREZ M.A., CABRERA G., TOLEDO V., MARTINEZ-TELLEZ M.A. (2008): *The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against Phytophthora parasitica nicotianae*, «World Journal of Microbiology and Biotechnology», 24 (1), pp. 103-112.
- FARMER E., ALMERAS E., KRISHNAMURTHY V. (2003): *Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory*, «Current Opinion of Plant Biology», 6, pp. 372-378.
- FIORI A.C.G., SCHAWN-ESTRADA K.R.F., STANGARLIN J.R., VIDA J.B., SCAPIM C.A., CRUZ M.E.S., PASCHOLOTI S.F. (2000): *Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against Didymella bryoniae*, «Journal of Phytopathology», 148, pp. 483-487.
- FRITIG B., HEITZ T., LEGRAND M. (1998): *Antimicrobial proteins in induced plant defence*, «Current Opinion in Immunology», 10, pp. 16-22.
- GALLETI S., SALA E., LEONI O., BURZI P.L., CERATO C. (2008): *Trichoderma spp. Tolerance to Brassica carinata seed meal for a combine use in biofumigation*, «Biological Control», 45, pp. 319-327.
- GENTILE A., DENG Z.N., LA MALFA S., DOMINA F., TRIBULATO E., LORITO M., POLIZZI G. (2002): *Analisi dell'espressione del gene per l'endochitinasi di Trichoderma harzianum nel limone (Citrus limon (L.) Burm. F.)*, «Atti VI Giornate scientifiche SOI», Spoleto 23-25 ottobre 2002.
- GEORGIU G.C., TAIRIS N., SOTIROPOULOU A. (2000): *Hydroxyl radical scavengers inhibit lateral-type sclerotial differentiation and growth in Sclerotinia sclerotiorum and Rhizoctonia solani*, «Mycological Research», 104, pp. 1191-1196.
- GERBER I.B., ZEIDLER D., DURNER J., DUBERY J.A. (2004): *Early perception responses of Nicotiana tabacum cells in response to lipopolysaccharides from Burkholderia cepacia*, «Planta», 218, pp. 647-657.
- GIES D. (2004): *Commercial use of mustards for green manure and biofumigation in the United States*, «Agroindustria», 3, pp. 403-405.
- GIMSING A. L., KIRKEGAARD J. A. (2006): *Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants*, «Soil Biology & Biochemistry», 38 (8), pp. 2255-2264.
- HALKIER B. A., DU L. (1997): *The biosynthesis of glucosinolates*, «Trends in Plant Science», 2, pp. 425-431.
- HAMBERG M., GARDNER H.W. (1992): *Oxylipin pathway to jasmonate: biochemistry and biological significance*, «Biochimica Biophysica Acta», 1165 (1), pp. 1-18.
- Hamiduzzaman M.M.D., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus G.M., Mauch-Mani B. (2005):  *$\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling*, «Molecular Plant Microbe Interactions», 18 (8), pp. 819-829.

- HAMMERSCHMIDT R., SMITH-BECKER J.A. (2000): *The role of salicylic acid in disease resistance*, in *Induced plant defence against pathogens and herbivores - Biochemistry, Ecology and Agriculture*, a cura di A.A. Agrawal, S. Tuzun, E. Bent, APS Press, St. Paul, pp. 37-53.
- HIRANO A., NAGAO N., (1989): *Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens*, «Agricultural and Biological Chemistry», 11, pp. 3065-3066.
- HOWE G.A., SCHILLMILLER, A.L. (2002): *Oxylipin metabolism in response to stress*, «Current Opinion in Plant Biology», 5, pp. 230-236.
- HU X., BIDNEY D.L., YALPANI N., DUVICK J.P., CRASTA O., FOLKERTS O., LU G. (2003): *Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defence responses in sunflower*, «Plant Physiology», 133 (1), pp. 170-181.
- IGAWA T., TAKAHASHI-ANDO N., OCHIAI N., OHSATO S., SHIMIZU T., KUDO T., YAMAGUCHI I., KIMURA M. (2007): *Reduced contamination by the Fusarium mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene*, «Applied Environmental Microbiology», 73(5), pp. 1622-1629.
- IRINSKAYA L.I., CHALENKO G.I., PEREKHOD E.A., GERASIMOVA N.G. OZERETSKOVSKAYA O.L. (2000): *Effect of methyl jasmonate on arachidonic acid-induced resistance of potato to late blight*, «Applied Biochemistry Microbiology», 36 (2), pp. 181-186.
- JORDAN C.M., WAKEMAN R.J., DEVAY J.E. (1992): *Toxicity of free riboflavin and methionine-riboflavin solutions to Phytophthora infestans and the reduction of potato late blight disease*, «Canadian Journal of Microbiology», 38, pp. 1108-1111.
- KAGALE S., MARIMUTHU T., THAYUMANAVAN B., NANDAKUMAR R., SAMIYAPPAN R. (2005): *Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of Datura metel against Rhizoctonia solani and Xanthomonas oryzae pv oryzae*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 65, pp. 91-100.
- KALPANA K., MARUTHASALAM S., RAJESH T., POOVANNAN K., KUMAR K.K., KOKILADEVI E., RAJA J.A.J., SUDHAKAR D., VELAZHAHAN R., SAMIYAPPAN R., BALASUBRAMANIAN P. (2008): *Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins*, «Plant Science», 170, pp. 203-215.
- KESSMANN H., STAUB T., HOFMANN C., MAETZKE T., HERZOG J., WARD E., UKNES S. AND RYALS J. (1994): *Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals*, «Annual Review of Plant Pathology», 32, pp. 439-459.
- KIM J.F., AND BEER S.V. (2000): *Hrp genes and harpins of Erwinia amylovora: a decade of discovery*, in *Fire Blight and its Causative Agent, Erwinia amylovora*, a cura di J.L. Vanneste, CAB International, Wallingford, UK, pp. 141-162.
- KIM, M.K., CHOI, G.J., LEE, H.S. (2003): *Fungicidal property of Curcuma longa L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in greenhouse*, «Journal of Agricultural Food Chemistry», 53, pp. 6035-6039.
- KIM, H.G., JEON, J.H., KIM M.K., LEE, H.S. (2005): *Pharmacological effects of asaronaldehyde isolated from Acorus gramineus rhizome*, «Food Science and Biotechnology», 14 (5), pp. 685-688.
- KIRKEGAARD J.A., MATTHIESEN, J.N. (2004): *Developing and refining the biofumigation concept*, «Agroindustria», 3, pp. 233-239.
- KLARZYNSKI O., PLESSE B., JOUBERT J.M., YVIN J.C., KOPP M., KLOAREG B., FRITIG B. (2000): *Linear -1,3-glucans are elicitors of defence responses in tobacco*, «Plant Physiology», 124, pp. 1027-1037.
- KU'c J (1982): *Induced immunity to plant diseases*, «Bioscience», 32, pp. 854-860.

- LA MALFA S., DOMINA F., DISTEFANO G., TOSCANO V., VITALE A. (2007): *Cloni transgenici di limone: una nuova via per ottenere la resistenza al mal secco*, «Rivista di Frutticoltura e Orticoltura», 2007 (1).
- LAZZERI L. (2004): *A way for optimizing potential for an integrate management of soil-borne pests and diseases*, First international symposium: *Biofumigation: a possible alternative to methyl bromide?*, 31 March-1 April 2004, Firenze, Italy.
- LAZZERI L., LEONI O., BERNARDI R., MALAGUTI L., CINTI, S. (2004): *Plants, techniques and products for optimising biofumigation in the full field*, «Agroindustria», 3, pp. 281-287.
- LECKBAND G., LORZ, H. (1998): *Transformation and expression of a stilbene synthase gene of Vitis vinifera L. in barley and wheat for increased fungal resistance*, «Theoretical and Applied Genetics», 96, pp. 1004-1012.
- LEE K.Y., HONG J.K., SANWALD S.H., HWANG B.K. (2000): *Histological and ultrastructural comparisons of compatible, incompatible and DL-b-amino-n-butyric acid-induced resistance responses of pepper stems to Phytophthora capsici*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 57, pp. 269-280.
- MAKANDAR R., ESSIG J.S., SCHAPAUGH M.A., TRICK H.N., SHAH J. (2006): *Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 19, pp. 123-129.
- MALAMY J., CARR J.P., KLESSIG D.F., RASKIN I. (1990): *Salicylic acid – a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to tobacco mosaic virus infection*, «Science», 250, pp. 1001-1004.
- MATTHIEN J.N., KIRKEGAARD J.A. (2006): *Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management*, «Critical Reviews in Plant Sciences», 25 (3), pp. 235-265.
- METRAUX J.P., AHL-GOY P., STAUB T., SPEICH J., STEINEMANN A., RYALS J., WARD E. (1991): *Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens*, in *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, a cura di H. Hennecke, D.P.S. Verma, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Vol. 1, pp. 432-439.
- METRAUX J.P., SIGNER H., RYALS J., WARD E., WYSS-BENZ M., GAUDIN J., RASCHDORF K., SCHMID E., BLUM W., INVERARDI B. (1990): *Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber*, «Science», 250, pp. 1004-1006.
- MEYER M.C., BUENO C.B., DE SOUZA N.L., YORINORI J.T. (2006): *Effect of doses of fungicides and plant resistance activators on the control of Rhizoctonia foliar blight of soybean, and on Rhizoctonia solani AG1-IA in vitro development*, «Crop Protection», 25, pp. 848-854.
- MITHEN R. F. (2001): *Glucosinolates and their degradation products*, «Advances in Botanical Research», 35, pp. 213-262.
- OKUNO T., NAKAYAMA M., OKAJIMA N., FURASAWA I. (1991): *Systemic resistance to downy mildew and appearance of acid soluble proteins in cucumber leaves treated with biotic and abiotic inducers*, «Annals Phytopathological Society Japan», 57, pp. 203-211.
- OOSTENDORP M., KUNZ W., DIETRICH B. STAUB T. (2001): *4 Induced disease resistance in plants by chemicals*, «European Journal of Plant Pathology», 107, pp. 19-28.
- PAJOT E., LE CORRE D., SILUE D. (2001): *Phytogard and DL-beta-amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (Bremia lactucae) in lettuce (Lactuca sativa L.)*, «European Journal of Plant Pathology», 107, pp. 861-869.
- PENÁ-CORTEÉS H., BARRIOS P., DORTA F., POLANCO V., SANCHEZ C., SANCHEZ E., RAMIREZ

- I. (2005): *Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening*, «Journal of Plant Growth Regulation», 23, pp. 246-260.
- PENG J.L., DONG H.S., DONG H.P., DELANEY T.P., BONASERA J.M., BEER S.V. (2003): *Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the NDR1 and EDS1 gene*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 62, pp. 317-326.
- POINSSOT B., VANDELLE E., BENTÉJAC M., ADRIAN M., LEVIS C., BRYGOO Y., GARIN J., SICILIA F., COUTOS-THÉVENOT P., PUGIN P. (2003): *The endopolygalacturonase 1 from Botrytis cinerea activates grapevine defence reactions unrelated to its enzymatic activity*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16 (6), pp. 553-564.
- RAJASEKARAN K., CARY J.W., JAYNES J.M., CLEVELAND T.E. (2007): *Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (Gossypium hirsutum L.) plants*, «Plant Biotechnology Journal», 3, pp. 545-554.
- RASK L., ANDREASSON E., EKBOM B., ERIKSSON S., PONTOPPIDAN B., MEIJER, J. (2000): *Myrosinase: gene family evolution and herbivore defence in Brassicaceae*, «Plant Molecular Biology», 42, pp. 93-113.
- RASMUSSEN J.B., HAMMERSCHMIDT R., ZOOK, M.N. (1991): *Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with Pseudomonas syringae pv syringae*, «Plant Physiology», 97, pp. 1342-1347.
- ROMANO P., SUZZI, G. (1985): *Sensitivity of Saccharomyces cerevisiae vegetative cells and spores to antimicrobial compounds*, «Journal of Applied Bacteriology», 59, pp. 299-302.
- ROSA E.A.S., RODRIGUES P.M.F. (1999): *Towards a more sustainable agricultural system: The effect of glucosinolates on the control soilborne diseases*, «Journal of Horticultural Science and Biotechnology», 74, pp. 667-674.
- SANKARASUBRAMANIAN H., SARAVANAKUMAR D., RADJACOMMARE R., EBENEZAR E.G., SEETHARAM K. (2008): *Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease rice*, «Biocontrol», 53, pp. 555-567.
- SEMBDNER G., PARTHIER B. (1993): *The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates*, «Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology», 44, pp. 569-589.
- SEREBRIAKOVA L., OLDACH K.H., LÖRZ H. (2005): *Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity*, «Journal of Plant Physiology», 162, pp. 985-1002.
- SILUE D., PAJOT E., COHEN Y. (2002): *Induction of resistance to downy mildew (Peronospora parasitica) in cauliflower by DL-beta-amino-n-butanoic acid (BABA)*, «Plant Pathology», 51, pp. 97-102.
- STADNIK M.J., BUCHENAUER H. (2001): *Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of Blumeria graminis f. sp. tritici is associated with both benzothiadiazole-induced and quantitative resistance of wheat*, «Journal of Phytopathology», 147(10), pp. 615-622.
- STEINER U., SCHÖNBECK F. (1997): *Induced resistance*, in *Resistance of crop plants against fungi*, a cura di H. Hartleb, R. Heitefuss, H.H. Hopp, Gustav Fischer, Jena, Germany, pp. 272-297.
- STEPHAN D., SCHMITT A., MARTINS CARVALHO S., SEDDON B., KOCH E. (2005): *Evaluation of biocontrol preparations and plant extracts for the control of Phytophthora infestans on potato leaves*, «European Journal of Plant Pathology», 112, pp. 235-246.
- THOMMA B.P., PENNINGCKX I.A., BROEKAERT W.F., CAMMUE B.P. (2001): *The complexity of disease signalling in Arabidopsis*, «Current Opinion in Immunology», 13, pp. 63-68.

- TRAVIS J. (2008): *Uncorking the grape genome*, «Science», 320, pp. 475-477.
- UPPAL A.K., EL HADRAMI A., ADAM L.R., TENUTA M., DAAFY F. (2007): *Biological control of potato Verticillium wilt under controller and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts*, «Biological Control», 44, pp. 90-100.
- VENÂNCIO W.S., ZAGONEL J., FURTADO E.L., SOUZA N.L. (1999): *Novos fungicidas. I-produtos naturais e derivados sintéticos: estrobirulinas e fenilpirroles*, «Revisão Anual de Patologia de Plantas», 7, pp. 103-155.
- VICK B.A., ZIMMERMAN D.C. (1987): *The lipoxygenase pathway*, in *The metabolism, structure and function of plant lipids*, a cura di P.K. Stumpf, J.B. Mudd, Plenum, New York, pp. 383-390.
- WEBER H. (2002): *Fatty acid-derived signals in plants*, «Trends in Plant Science», 7, pp. 217-224.
- WEI Z.M., BEER S.V. (1996): *Harpin from Erwinia amylovora induces plant disease resistance*, «Acta Horticulturae», 411, pp. 223-225.
- WILSON C.L., SOLAR J.M., EL GHAOUTH A., WISNIEWSKI M.E. (1997): *Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against Botrytis cinerea*, «Plant Disease», 81(2), pp. 204-210.
- YAMAGUCHI I. (1998): *Activators of systemic acquired resistance*, In *Fungicidal Activity: Chemical and Biological Approaches to Plant Protection*, a cura di D. Hutson, J. Miyamoto, Wiley, Chichester, pp. 193-219.
- ZHU Q., MAHER E. A., MASOUD S., DIXON R.A., LAMB C.J. (1994): *Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco*, «Bio-Technology», 12, pp. 807-812.
- ZINOV'eva S.V., VASYUKOVA N.I., II'INSKAYA L.I., UDALOVA ZH.V., OZERETSKOVSKAYA O.L. (1997): *Immunization of tomato plants against root-knot nematode Meloidogyne incognita with biogenic elicitors*, «Applied Biochemistry and Microbiology», 33(3), pp. 329-333.

## Esperienze di impiego in pieno campo di piante transgeniche per la resistenza a virus

### INTRODUZIONE

Le malattie da virus hanno un rilevante impatto agronomico sulle colture. Il loro controllo si attua attraverso l'individuazione e introduzione di geni di resistenza mediante programmi di miglioramento genetico classico o biotecnologico, l'impiego di strategie preventive basate sull'utilizzo di materiale di propagazione virus esente e l'eliminazione di vettori di virus dalle colture agrarie. A fronte di considerevoli progressi nella gestione preventiva delle malattie virali attraverso lo sviluppo di protocolli di certificazione e sempre più sensibili strumenti diagnostici, le fonti di resistenza naturale ai virus e le conoscenze sulla funzione dei geni correlati, sono ancora limitate se non assenti per numerose specie (Maule et al., 2007; Palukaitis e Carr, 2008). A ciò si aggiunge che molte specie agrarie hanno lunghi periodi vegetativi e talvolta genomi poliploidi scarsamente conosciuti a livello genetico. Allo stato attuale, tra i genomi sequenziati si annoverano solo cinque specie, *Arabidopsis thaliana*, riso, pioppo, vite e papaya, sebbene nel corso dei prossimi anni queste conoscenze si arricchiranno di una notevole mole di informazioni.

Su un fronte parallelo, l'enorme quantità di dati sulla genomica dei patogeni virali, ha consentito l'introduzione di fenotipi di resistenza utilizzando metodiche di trasformazione genetica, fondate sulla strategia indotta da geni del patogeno (PDR: Pathogen derived resistance; Sanford e Johnston, 1985). Questo approccio si sviluppa attraverso l'espressione di proteine del virus, per esempio proteine di movimento (MP: movement protein) o strutturali (CP: coat pro-

\* Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione di Bari e Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari

tein) che interferiscono con il ciclo replicativo virale (Beachy, 1999), oppure la sintesi di acido ribonucleico sempre di origine virale, che induce fenomeni di silenziamento genico specifici per il genoma del virus (RNA mediated resistance o RNA silencing; Baulcombe, 2004; Lindbo e Dougherty, 2005). I vantaggi dell'adozione della PDR nell'induzione di resistenza a virus risiedono: (i) nella possibilità di inserimento di transgeni in cultivar di pregio senza alterarne il fenotipo; (ii) nella possibilità di utilizzare lo stesso transgene per l'induzione di resistenza in specie correlate tutte suscettibili allo stesso virus; (iii) nell'introduzione di geni in specie a propagazione vegetativa, difficilmente modificabili con tecniche di miglioramento genetico classico.

Sono state documentate sperimentazioni di piante resistenti a malattie da virus appartenenti a numerose specie, limitatamente a condizioni controllate di laboratorio, mentre pochi studi riportano di prove condotte in pieno campo, e un numero ancor più limitato di piante è stato ammesso alla coltivazione e commercializzazione (Fuchs e Gonsalves, 2007). Il presente lavoro si riferirà solo a queste ultime esperienze, dalle quali si può delineare un quadro realistico dei rischi e dell'impatto derivanti dall'impiego di questi strumenti biotecnologici in agricoltura. Le informazioni raccolte, derivanti da osservazioni svoltesi per un periodo superiore al decennio, permettono di trarre conclusioni relativamente all'entità del rischio reale rispetto a quello percepito, e forniscono nuovi dati che possono essere di aiuto al legislatore e informazione per l'opinione pubblica.

#### COLTURE IN PRODUZIONE COMMERCIALE NEGLI STATI UNITI D'AMERICA

##### *Papaya resistente a Papaya Ringspot virus*

È questo il meglio documentato esempio di resistenza transgenica a virus che ha avuto un'efficace applicazione nelle isole Hawai (Gonsalves D., 1998) dove la pianta è ammessa alla coltivazione commerciale, e in altri paesi del continente asiatico, in cui sono state condotte prove di campo (Gonsalves et al. 2007; Sriwatanapongse et al., 2007). In queste ultime regioni a clima tropicale, la papaya ha un ruolo importante nella dieta per il suo alto contenuto in vitamina C e pro vitamina A, ambedue facilitanti l'assunzione di ferro (Duxbury, 2003).

Negli anni '90 l'industria della papaya (*Carica papaya*) nelle isole Hawai, subì considerevoli riduzioni di produzione a causa di epidemie del virus della maculatura anulare della papaya, *Papaya ringspot virus* (PRSV; Gonsalves et



al., 2007). Questo potyvirus, identificato in queste stesse isole (Jensen, 1949), è trasmesso in modalità non-persistente da diverse specie di afidi e, come tale, le sue infezioni assumono un andamento epidemico. PRSV è considerato tra i più dannosi agenti di malattia per le coltivazioni di papaya poiché le sue infezioni compromettono la capacità fotosintetica della pianta, inducendone un progressivo declino che può condurla alla morte, e rendendo i frutti non commerciabili (Gonsalves, 1998).

I tentativi di identificazione di geni di resistenza o tolleranza al virus in papaya sono stati infruttuosi (Gonsalves et al., 2006) e, nel passato, sono state condotte diverse esperienze di pre-immunizzazione (*cross protection*) mediante infezione con ceppi attenuati (*mild*) di PRSV (Gonsalves, 1998). Nessuna di queste strategie si è rivelata efficace nel controllo delle epidemie da PRSV.

Piante di papaya resistenti al virus (SunUp e Rainbow) furono ottenute mediante trasformazione genetica con il gene del capsido virale (CP: coat protein) di PRSV. Le piante furono poi ammesse alla coltivazione commerciale nelle Hawaii nel 1998, dopo studi e prove di campo e in condizioni controllate, durati 13 anni (1985-1998). I semi della papaya transgenica, distribuiti nel 1998 agli agricoltori di queste isole secondo un principio di estrazione a sorte, determinarono una pronta ripresa delle produzioni nei successivi quattro anni, arrecando beneficio anche alle colture tradizionali che si avvantaggiarono dell'abbattimento delle fonti di inoculo di PRSV determinato dalle piante transgeniche resistenti. Si assistette inoltre, all'arresto di fenomeni di deforestazione, causati, durante gli anni di elevata epidemia, dalla ricerca di nuove aree non contaminate dal virus. Il transgene adoperato in incroci classici, ha portato allo sviluppo di un'altra varietà, Laie Gold, che, insieme a SunUp e Rainbow, è attualmente coltivata in queste isole (Gonsalves et al., 2007).

Il successo di quest'approccio richiamò l'interesse di ricercatori della Thailandia, Taiwan, Vietnam, Filippine e Malesia, paesi nei quali furono sviluppate piante transgeniche utilizzando sequenze della CP di isolati locali e sono state condotte o sono in corso prove di campo (Bau H.J. et al., 2004). Le sperimentazioni in atto in Thailandia, documentate in un recente lavoro da Sarah Nell-Davidson (2008) sono state interrotte per l'avversione dell'opinione pubblica alla tecnologia.

Sebbene la resistenza a PRSV della papaya transgenica Rainbow non sia risultata efficace verso isolati virali provenienti da Thailandia, Australia e Brasile (Tennant et al., 1994), a tutt'oggi non sono stati descritti casi di superamento del fenotipo resistente nelle isole Hawaii. In queste isole le colture transgeniche coesistono con quelle convenzionali grazie allo sviluppo di filiere produttive

differenziali e tracciabili, che consentono la commercializzazione dei frutti in paesi che non permettono l'introduzione del prodotto transgenico.

*Zucca resistente a Zucchini yellow mosaic, Watermelon mosaic virus e Cucumber mosaic virus*

Zucche transgeniche (ZW-20) resistenti a *Zucchini yellow mosaic* (ZYMV) e *Watermelon mosaic virus* (WMV), sono state ammesse alla coltivazione commerciale nel 1995. Ad esse seguì la linea CZW-3 (Acord, 1996) che presenta, in aggiunta, resistenza anche a *Cucumber mosaic virus* (CMV). Per ambedue le varietà transgeniche il fenotipo resistente si manifesta attraverso l'espressione delle proteine del capsido virale del virus (Tricoli et al., 1995).

I due potyvirus ZYMV e WMV e il cucumovirus CMV, sono trasmessi in natura da diverse specie di afidi in maniera non circolativa e non persistente. Il controllo delle loro infezioni si fonda su pratiche colturali quali il trapianto differito rispetto ai tempi di volo degli afidi, l'uso di pacciamature repellenti e ripetute applicazioni di miscele di oli minerali e insetticidi. Si calcola che nello stato americano della Georgia il controllo delle popolazioni di afidi su zucca richieda almeno dieci applicazioni di insetticida (Gianessi et al., 2002). Una strategia efficace per il contenimento di queste malattie risiederebbe unicamente nell'uso di piante resistenti, ottenute mediante tecniche tradizionali di miglioramento genetico, ma che non hanno fornito adeguati livelli di protezione.

Dati recenti (Shankula, 2006, Johnson et al., 2008) dimostrano che l'adozione di queste varietà transgeniche ha permesso agli agricoltori degli Stati Uniti, di ottenere un beneficio netto di 22 milioni di dollari nel 2005, determinando maggiori rese di prodotto commercializzabile e un minor numero di interventi con insetticidi (M. Fuchs, comunicazione personale). A riprova dei vantaggi ottenuti, si calcola che nel 2006, la percentuale di adozione di zucca transgenica ammonta al 12% della superficie coltivata negli Stati Uniti seguendo una tendenza che si è mantenuta stabile nell'arco di 5 anni (Johnson et al., 2008).

Studi comparativi hanno inoltre dimostrato che, analogamente a quanto si verifica per la papaya resistente a PRSV, l'impiego della linea ZW-20 limita la diffusione secondaria di ZYMV e WMV in pieno campo, poiché le piante infette, inibendo la replicazione e la diffusione sistemica dei due virus, determinano bassi titoli virali peraltro limitati ai tessuti inoculati. Minori titoli virali nei tessuti delle piante transgeniche infette riducono la frequenza

di acquisizione del virus da parte degli afidi e la sua successiva trasmissione in campo, determinando una sostanziale limitazione delle epidemie sia nelle colture transgeniche che in quelle convenzionali.

COLTURE DEREGOLAMENTATE<sup>1</sup> MA NON ANCORA AMMESSE  
ALLA COMMERCIALIZZAZIONE NEGLI STATI UNITI D'AMERICA

### *Susino resistente a Plum Pox Virus*

*Plum pox virus* (PPV) è l'agente eziologico della Sharka o vaiolatura del susino, una delle più devastanti malattie della specie *Prunus* (Cambra et al., 2006), che provoca maggiori danni su albicocco, susino e pesco. Questo potyvirus è trasmesso da afidi in maniera non circolativa e non persistente e per propagazione vegetativa. Sono stati descritti fino a sei gruppi di isolati virali aventi caratteristiche biologiche distintive (Candresse e Cambra, 2006).

A ragione dell'importanza di PPV per l'industria delle drupacee, numerosi studi sono stati condotti e sono tuttora in corso, miranti all'ottenimento di cultivar di *Prunus* resistenti al virus secondo tecniche di miglioramento genetico classico (Badenes et al., 2006).

In Europa è stata sviluppata la prima varietà resistente a PPV mediante trasformazione genetica di *Prunus domestica* con il gene della CP di un isolato di tipo D del virus (Scorza et al., 1994). Gli studi di campo, condotti per un periodo di 7 anni in Spagna, Polonia e Romania, hanno provato che la linea di susino C5 esprime un fenotipo resistente che è basato sul silenziamento genico e sulla produzione di piccoli RNA interferenti (Scorza et al., 2001). La pianta pertanto non sintetizza alcuna proteina transgenica e trascrive bassissimi livelli del corrispondente RNA messaggero.

Gli studi di valutazione del rischio, condotti in campo in diverse regioni europee nell'ambito del Progetto Europeo TRANSVIR (Fuchs et al., 2007), hanno dimostrato che la diversità molecolare di popolazioni di PPV non cambia in piante transgeniche resistenti al virus. Inoltre, il susino transgenico

<sup>1</sup> Secondo la legislazione americana una varietà geneticamente modificata, dopo essere stata coltivata in condizioni controllate per diversi anni, può assumere lo status di "varietà deregolamentata". Questa condizione viene rilasciato dall'USDA (United States Department of Agriculture) dopo l'analisi dei dati ottenuti durante le prove di campo e le osservazioni che possono emergere da un pubblico dibattito. Questa condizione rappresenta il primo passo verso l'eventuale utilizzo commerciale che richiede inoltre l'approvazione da parte dell' FDA (Food and Drug Administration) e dell'EPA (Environmental Protection Agency).

non ha alcun impatto sulla dinamica delle popolazioni di afidi che visitano le piante. La linea C5 "HoneySweet" è stata recentemente deregolamentata negli Stati Uniti (<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=529>.) per essere in futuro resa disponibile ad agricoltori e miglioratori genetici.

#### I RISCHI PER L'AMBIENTE E LA SALUTE UMANA: PERCEZIONE E REALTÀ

Diversi studi, alcuni promossi dalla Unione Europea (TRANSVIR; Fuchs et al., 2007), sono stati condotti in condizioni di campo, per la valutazione del rischio di impiego di piante transgeniche resistenti a virus. In nessuna di queste esperienze, svoltesi nell'arco di due decenni, sono stati descritti eventi dannosi per l'ambiente e/o l'uomo. Si è invece evidenziata la notevole differenza che esiste tra ciò che è percepito come rischio e l'entità reale di tale rischio (Fuchs e Gonsalves, 2007). Pertanto, piuttosto che concentrare le attenzioni sui possibili rischi che le piante transgeniche resistenti a virus possono determinare sull'ambiente e l'uomo, è più importante valutarne le reali conseguenze in esperienze di campo.

#### *Potenziali rischi di impiego di piante transgeniche per la resistenza a virus e loro reali conseguenze*

##### Eteroincapsidazione

La possibilità che un acido nucleico virale si rivesta di una proteina capsidica eterologa (di un altro virus), detta eteroincapsidazione, è un evento noto che si verifica naturalmente in piante con infezioni multiple. In piante transgeniche, la presenza intracellulare e costitutiva di subunità di CP potrebbe dar luogo a particelle virali ibride, con nuove caratteristiche di trasmissibilità da parte di insetti vettori. Potrebbe pertanto accadere che un virus naturalmente non trasmesso da un determinato vettore lo diventerebbe, se il suo acido nucleico si dovesse rivestire di una CP transgenica. Il virus transcapsidante potrebbe così esplorare nuove specie e areali o dar luogo a nuove epidemie. In condizioni di laboratorio l'evento di eteroincapsidazione è stato frequentemente descritto in piante transgeniche infettate (Lecoq et al., 1993; Fuchs e Gonsalves, 2007).

Gli studi di pieno campo hanno dimostrato che un isolato di ZYMV non trasmissibile da afidi, viene trasferito con scarsa efficienza (2%), se introdotto

in colture di piante transgeniche esprimenti la CP di un ceppo trasmissibile di WMV. Al contrario, la diffusione di un isolato trasmissibile dello stesso virus, nelle stesse condizioni e sulle stesse piante transgeniche, risulta in un'efficienza di trasmissione del 99% (Fuchs et al., 1999).

Ulteriori studi condotti su piante di zucca e melone esprimenti la CP di CMV (Fuchs et al., 1998), patate e papaya esprimenti rispettivamente le CP di PLRV (Thomas et al., 1998) e PRSV (Fuchs e Gonsalves, 2007), non hanno mostrato nessuna variazione del livello base di eventi contro cui l'impatto delle piante transgeniche è comparato, suggerendo pertanto che la eteroincapsidazione, laddove avvenga, non induce alterazioni delle proprietà sierologiche, biologiche ed epidemiologiche del virus infettante (Fuchs et al., 1999).

L'evento di eteroincapsidazione si riassume comunque in un singola generazione virale, poiché il virus transcapsidante (i.e. incapsidatosi con la CP codificata dal transgene), se trasferito in un nuovo ospite in cui è in grado di replicarsi, riprende le sue caratteristiche originarie, che gli derivano dall'RNA virale rimasto inalterato nella sequenza. La possibilità che eventi successivi determinino il trasferimento del virus transcapsidante di pianta in pianta è risultata esistere solo a livello teorico e non avvenire nella realtà.

### Ricombinazione e alterazioni della dinamica delle popolazioni virali

L'espressione costitutiva di un gene virale non avviene in piante non transgeniche. Esiste pertanto il rischio, documentato in diversi studi, condotti in condizioni controllate (Greene e Allison, 1994; Jakab et al., 1997; Fuchs e Gonsalves, 2007), di creazione di molecole chimeriche tra il trascritto transgenico e il genoma di un virus che infetta successivamente la pianta. Il risultante virus ricombinante potrebbe possedere caratteristiche di maggiore aggressività e diffusività nell'ambiente, comportandosi pertanto come un "supervirus", non altrimenti generantesi in natura (Tepfer, 2002).

Una tale visione rispecchia un errato concetto di fissità delle specie virali che, al contrario, fondano sulla ricombinazione gran parte dei loro meccanismi evolutivi (Garcia Arenal et al., 2001). La ricombinazione non è pertanto un fatto nuovo e sconosciuto in natura poiché nelle condizioni di infezione virale mista, comuni nelle piante, RNA eterologhi possono venire frequentemente in contatto. Essa avviene per i virus a RNA, tra una molecola donatrice e una accettrice secondo un meccanismo di "template switching" operato dalla RNA polimerasi RNA dipendente virale che, nel corso della sua attività polimerasica, slitta da una molecola,

l'RNA genomico virale, a un'altra, l'RNA del transgene, incorporando quest'ultimo nella nascente molecola chimerica. L'evento può avvenire tra molecole che hanno o no omologia di sequenza tra loro. In quest'ultimo caso si tratterebbe di una ricombinazione interspecifica che coinvolgerebbe un virus e un transgene non correlato. Studi recenti (Chung et al., 2007) e molteplici esperienze di manipolazione in laboratorio di virus ibridi, contenenti sequenze di altre specie virali, dimostrano chiaramente che questi virus ricombinanti sono selettivamente svantaggiati, oggetto di degradazione da parte del sistema di silenziamento genico cellulare e non competitivi nella replicazione rispetto ai virus parentali.

Altre ricerche hanno mostrato che la ricombinazione tra RNA virali e trascritti transgenici è frequente nelle condizioni di elevata pressione di selezione quali sono quelle che si verificano in serra (Greene e Allison, 1994; Borja et al., 1999). Al contrario in colture di pieno campo, laddove la pressione selettiva è minore, tali eventi non sono stati osservati. In prove di campo di susino transgenico per la CP di PPV (Capote et al., 2008), coltivate per un decennio, e portinnesti di viti transgeniche esprimenti la CP di GFLV (Vigne et al., 2004), non si sono generati virus ricombinanti e neppure si sono avute evidenze di alterazioni della dinamica delle popolazioni virali nei suoi aspetti di diversità molecolare e caratteristiche eco-epidemiologiche. Al contrario, negli studi sulla resistenza a GFLV, si è osservato che la frequenza di ricombinazione e la diversità genetica delle popolazioni di GFLV, sono risultati maggiori nelle piante non transgeniche adoperate come controllo, rispetto a quanto osservato nei portinnesti transgenici (Moury et al., 2006). Gli autori di questo recente studio ipotizzano che le viti transgeniche resistenti a GFLV, impedendo la replicazione di varianti virali potenzialmente più aggressive, determinano una diminuzione della diversità della popolazione virale. Un fatto questo che denota una situazione di campo esattamente opposta al rischio teorico paventato, che attribuirebbe alle piante transgeniche un aumento degli eventi di ricombinazione e della diversità molecolare rispetto al livello di base osservato in eventi naturali. La ricombinazione tra RNA transgenico e virale non ha pertanto determinato effetti ambientali dannosi in prove di pieno campo condotte per virus (CMV, PPV, PRSV, ZYMV e WMV) e specie diverse (papaya, zucca, vite e susino), alcune di esse osservate per periodi maggiori di un decennio.

## Gene flow

Il potenziale impatto che un transgene potrebbe avere sulla dinamica e competitività di popolazioni naturali di piante nelle quali traslochi accidentalmente,

riveste una notevole importanza ecologica. L'evento potrebbe verificarsi tra un transgene virale che venga a essere trasferito da una specie coltivata a una selvatica tassonomicamente correlata e interfertile, conferendo a quest'ultima il fenotipo di resistenza. È importante però sottolineare che, solo in caso di introgressione, che consiste nell'integrazione permanente di un gene in una specie selvatica, si determinerebbe l'insediamento di un transgene nell'ambiente, con un potenziale impatto ecologico dannoso (Stewart et al., 2003).

In esperienze di campo, è stata documentata la dispersione del transgene da zucca (*Cucurbita pepo* ssp. *ovifera* var. *ovifera*) resistente a CMV, ZYMV e WMV (piante CZW-3), alla specie selvatica imparentata *Cucurbita pepo* ssp. *ovifera* var. *texana* (Fuchs et al., 2004a; Fuchs et al., 2004b). Le prove condotte hanno dimostrato che: (i) la frequenza degli eventi di ibridazione aumenta con l'aumentare del rapporto tra piante donatrici del polline e accettrici del transgene e in funzione della sincronia dei tempi di fioritura; (ii) è sufficiente un sola generazione di ibridazione e reincrocio per ottenere ibridi che abbiano ereditato il transgene e mostrino resistenza ai tre virus; (iii) ibridi di *C. texana* che hanno acquisito la resistenza ai tre virus presentano un chiaro vantaggio in situazioni di elevata pressione di inoculo virale. Questi studi pertanto documentano il movimento di un transgene che conferisce resistenza a virus, dalla varietà di zucca commerciale CZW-3 a quella selvatica *C. texana* in condizioni naturali. Si è osservato però che la fitness degli ibridi generatisi è determinata dalla pressione virale cui essi sono sottoposti: se questa è bassa la invasività (*weediness*) di tali ibridi risulta non diversa da quella della specie selvatica. Studi recenti (Quemada et al., 2008) hanno mostrato che la frequenza di alcune infezioni virali (CMV, ZYMV, WMV2, PRSV e altri potyvirus) in popolazioni di zucche selvatiche che crescono in prossimità di colture di zucche transgeniche, è relativamente bassa, indicando perciò che la vicinanza delle colture transgeniche non induce cambiamenti significativi nella dinamica e struttura delle popolazioni selvatiche. La specie selvatica è peraltro soggetta a infezioni da altri virus che contribuiscono a controllarne la popolazione. Gli autori dello studio concludono che, poiché le zucche transgeniche risultano fornire maggior resa e qualità di prodotto per via del fenotipo resistente, e non hanno determinato insorgenza di eventi ecologicamente infausti, la loro coltura continua ad essere ammessa negli Stati Uniti.

C'è infine da ricordare che geni di resistenza ai virus sono stati introdotti in zucca anche attraverso tecniche di miglioramento genetico convenzionale (Munger, 1993). Poiché il rischio di dispersione nell'ambiente (*escape*) di transgeni o geni di piante risulta essere identico, nel caso di tratti monogenici,

analoghe preoccupazioni di *gene flow* potrebbero essere sollevate per queste varietà ottenute con tecniche classiche.

La letteratura documenta un altro esempio di movimento di transgene da barbabietola da zucchero esprimente la CP del virus della rizomania, *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) alla specie selvatica *Beta vulgaris* var. *maritima*, dimostrando, anche in questo caso, una assenza di incremento di invasività in ambienti naturali, in seguito a ibridazione e introgressione del transgene (Bartsch et al., 1996).

### Effetti su organismi non bersaglio

Questo rischio potenziale attiene alla eventualità che l'introduzione in un areale agricolo di una coltura transgenica possa alterare la diversità e dinamica di organismi non bersaglio, quali possono essere insetti vettori di virus, oppure microorganismi del suolo, batteri e funghi. Lavori svolti nel Progetto TRANSVIR (Fuchs et al., 2007; Capote et al., 2008), evidenziano che non si sono rilevate differenze nelle popolazioni di afidi, siano essi viruliferi e non, che hanno visitato piante di susino convenzionali e transgeniche per la resistenza a PPV. Gli studi, condotti in condizioni di campo per un periodo di 8 anni, non hanno mostrato alcun effetto deleterio. Simili ricerche riferite ad attinomiceti raccolti nella rizosfera di piante di papaya transgeniche per la resistenza a PRSV, hanno sortito analoghi risultati (Hsieh e Pan, 2006).

### Tossicità alimentare e allergenicità

Al momento tre colture transgeniche resistenti a virus sono ammesse alla produzione commerciale negli Stati Uniti, papaya, zucca e patata, quest'ultima ritirata dal mercato per motivi diversi dall'impatto sull'ambiente e la salute umana, e derivanti da pressioni esercitate dalla opinione pubblica contraria (Kaniewski e Thomas, 2004).

L'analisi delle proteine transgeniche espresse da queste piante, in tutti i casi descritti CP, mostra che nessuna di esse possiede sufficiente omologia con sequenze di allergeni noti. Inoltre, studi di digestione in succo gastrico simulato, condizioni in cui le proteine allergeniche sono resistenti, mostrano che la CP di PRSV viene degradata in seguito a una esposizione di 5 secondi.

Simili considerazioni possono essere condotte per le altre proteine transgeniche oggetto di questa rassegna, con l'osservazione addizionale che gran-



di quantità di proteine virali sono state ripetutamente e continuamente ingerite dall'uomo con il cibo nel corso del tempo, senza che ciò abbia mai indotto allergie o fenomeni di tossicità alimentare. È certamente prudente valutare gli aspetti di sanità del cibo derivato da piante transgeniche resistenti a virus ma, allo stato delle conoscenze, il rischio che queste possano risultare dannose è molto limitato poiché, almeno per le varietà ammesse alla coltivazione commerciale, queste si sono dimostrate sostanzialmente equivalenti alla corrispondente coltura convenzionale, eccezion fatta per il fenotipo di resistenza.

#### ALTRE PROBLEMATICHE CONNESSE ALL'IMPIEGO DI PIANTE TRANSGENICHE

##### *Coesistenza di colture transgeniche e convenzionali*

Tale rischio rientra nella problematica della dispersione genica o *gene flow* da colture transgeniche a tradizionali, coltivate in prossimità spazio-temporale. Esso viene sollevato soprattutto in relazione alla vicinanza di colture biologiche e agli scambi con paesi che non accettano sui loro mercati la commercializzazione di prodotti transgenici.

Nell'esempio della papaya prodotta nelle isole Hawaii, una sua ragguardevole quota di mercato è rappresentata dalle esportazioni in Giappone, paese che non consente il commercio di prodotti transgenici. L'introduzione di piante transgeniche per la resistenza a PRSV ha chiaramente rischiato di limitarne l'esportazione. Per ovviare a questo limite, si è creata una filiera di produzione (Camp, 2003), sotto il controllo dell'Hawaiian Department of Agriculture (HDOA), che garantisce la fornitura di prodotto non transgenico. Gli agricoltori che aderiscono a questa filiera sottopongono a controlli tutte le loro piante e campioni della loro produzione, per la presenza del gene reporter della beta-glucoronidasi (*gus*), associato al transgene per la resistenza a PRSV. Dopo questi controlli di laboratorio, l'HDOA rilascia una certificazione che consente un immediato sdoganamento in Giappone dei frutti di papaya.

Il rischio di contaminazione del prodotto ottenuto da agricoltura biologica è stato valutato in studi di coesistenza tra papaya transgenica e convenzionale (Manshardt R., 2002). Una prima considerazione, riferita alla natura della parte edibile del frutto della papaya (ma che si estende anche al susino transgenico per la CP di PPV, per esempio), riguarda il fatto che esso ha la stessa costituzione genetica della pianta che lo produce. Ciò significa che la

parte edibile di una papaya non transgenica non viene a essere alterata nella composizione in seguito a impollinazione incrociata, qualunque possa essere la fonte di polline. L'impollinazione incrociata è peraltro limitata per le seguenti ragioni: (i) le varietà di papaya coltivate nelle isole Hawaii sono prevalentemente ermafrodite e autofertili; (ii) studi di movimento del transgene hanno dimostrato che esso avviene in percentuali maggiori in piante con fiori femminili che contornano le piante transgeniche; (iii) una distanza di 400 metri assicura che il polline transgenico non sia in grado di contaminare colture di varietà tradizionali.

La coesistenza di colture transgeniche e convenzionali è pertanto compatibile, a patto che alcuni pregiudizi vengano superati con il consenso delle parti coinvolte. Laddove trattasi di virus ad andamento epidemico, le colture biologiche, e le tradizionali in genere, trarrebbero vantaggio dalla introduzione di piante resistenti. Infatti, tra le motivazioni a supporto della richiesta di deregolamentazione del susino transgenico resistente al virus della Sharka (PPV) negli Stati Uniti (<http://www.agbios.com/dbase.php?action=Submit&evidx=529>), si fa notare che esso abbatterebbe le fonti di inoculo virale con beneficio di tutte le colture, siano esse transgeniche e non. Le esperienze maturate dimostrano infatti l'impossibilità, nel tempo, di controllare la diffusione del virus con tecniche tradizionali di eradicazione e utilizzo di materiale sano che, in altri areali frutticoli, Italia compresa, è divenuto endemico.

### *Integrazione e stabilità del transgene*

Un recente lavoro, originato dallo studio della sequenza del genoma della papaya transgenica "Sun Up" (Ming et al., 2008), ha fatto luce sulle modalità di integrazione e la stabilità del transgene. Questo studio fornisce la prima evidenza, sostanziata a livello molecolare, di integrazione di un transgene senza che abbia subito fenomeni di riarrangiamento, e della sua fissazione stabile nel genoma. L'analisi mostra che il DNA inserito non interrompe nessuna sequenza genica endogena, così che le piante transgeniche risultano funzionalmente simili a quelle non trasformate, eccezion fatta per il transgene che apporta la resistenza a PRSV. Il lavoro fornisce nuove informazioni sulle modalità di integrazione dei transgeni nel genoma di piante, e spinge verso lo sviluppo di tecnologie di trasformazione sempre meno lasciate alla casualità delle tecnologie attuali. Inoltre, l'identificazione di sequenze troncate corrispondenti a regioni provenienti dal plasmide adoperato per la trasformazione (geni *tetA* e *nptII*), integratesi indipendentemente dal transgene, suggerisce

che, sebbene questi eventi di trasferimento di sequenze aberranti siano possibili e già descritti, esistono, sin d'ora, tutti gli strumenti per poterne evidenziare la presenza.

#### L'IMPATTO AMBIENTALE DI PIANTE TRANSGENICHE RESISTENTI A VIRUS: OSSERVAZIONI NELL'ARCO DI DUE DECENNI

Le esperienze descritte dimostrano che il controllo di alcune malattie virali attraverso la PDR e utilizzando la CP virale come transgene, si è rivelato efficace in prove di campo, consentendo agli agricoltori di ricavarne benefici in termini di qualità e quantità di prodotto. Recenti studi sull'impatto che le piante transgeniche hanno avuto sulla agricoltura degli Stati Uniti (Shankula, 2006; Johnson et al., 2008), riportano un incremento di adozione di papaya e zucca resistente a virus, nel 2006, con percentuali rispettivamente del 90% e 13%. Nel caso della papaya le alte percentuali di utilizzo sono spiegate dalla impossibilità di proseguire nella coltura in assenza di piante resistenti.

Gli studi di impatto ambientale, condotti prevalentemente negli Stati Uniti e in Europa, hanno mostrato che esso è ininfluenza nel caso di piante transgeniche per geni della CP virale, se riferito agli aspetti di eteroincapsidazione e ricombinazione (Fuchs e Gonsalves, 2007; Turturo et al., 2008). Limitatamente a questi due generi di rischio, ritenuti privi di conseguenze dannose, alcuni autori suggeriscono di estendere questa valutazione a tutte le piante transgeniche per il gene della CP di un virus (Fuchs e Gonsalves, 2007). Anche ininfluenza risulta essere il rischio di allergicità e tossicità indotto da queste piante. Rischio che peraltro può essere valutato a priori grazie alle aumentate conoscenze in campo bioinformatico e molecolare riguardanti la struttura degli allergeni.

Al contrario nel considerare gli eventi di *gene flow* e le sue possibili conseguenze, deve essere seguito un approccio più cauto, cosiddetto "caso per caso", così come dimostrato nelle sperimentazioni condotte su zucca transgenica.

Tutti questi studi durati ormai quasi 20 anni, provano che, a prescindere dai rischi teorici paventati, le esperienze di campo possono fornire dati realistici sulle conseguenze di utilizzo di queste biotecnologie in agricoltura. Numerosi dati, ottenuti in condizioni di laboratorio, si concentrano sulle interazioni tra pianta ospite e virus, avulsa dall'ambiente in cui la coltura è abitualmente condotta, e traggono conclusioni che vengono arbitrariamente traslate alla realtà di campo. Questa è diversa e soggetta a un maggior numero

di variabili, come dimostrano gli esperimenti disegnati in modo da simulare condizioni di colture commerciali. È infatti sulle conseguenze, piuttosto che sull'eventualità di potenziali rischi che bisogna concentrare gli studi, da condursi in condizioni quanto più possibili realistiche. Un'attività quest'ultima, sempre più difficile da realizzarsi in Europa e nel nostro paese, a causa di avverse condizioni socio-politiche.

Inoltre, per i virus, l'approccio transgenico basato sull'RNA silencing costituisce una rilevante opportunità che sarebbe poco saggio ignorare per una difesa di lungo termine delle colture. Alla luce delle aumentate conoscenze molecolari sull'interazione pianta-virus, un approccio che combini resistenza naturale e transgenica risulterebbe efficace, specifico e duraturo. L'auspicio è che queste informazioni possano essere di supporto al legislatore nell'implementazione di protocolli di regolamentazione, e a governi e opinione pubblica, nel sostenere le ricerche nel settore.

#### RIASSUNTO

Il rilascio nell'ambiente di piante transgeniche per la resistenza ai virus ha posto una serie di interrogativi sui potenziali rischi ecologici e per la salute umana. Fenomeni come la ricombinazione, le alterazioni della dinamica delle popolazioni virali e degli insetti, l'eteroincapsidazione, il flusso genico, l'impatto su organismi non bersaglio e la tossicità alimentare, sono analizzati e discussi nella presente review. L'argomento è trattato in riferimento alle colture ammesse alla commercializzazione o estensivamente saggiate in campo, quali zucca, papaya, susino e vite, per le quali esistono dati risalenti a più di una decade. Queste osservazioni, effettuate in condizioni reali di campo, offrono nuovi spunti per la valutazione dell'impatto ambientale di piante transgeniche per la resistenza a virus, e possono essere di aiuto al legislatore e di informazione per il pubblico.

#### ABSTRACT

The environmental release of transgenic plants for virus resistance raised several potential concerns about risks related to the environment and human health. The present review encompasses recombination, modification of the dynamic of viral and insects populations, heteroencapsidation, gene flow, impact on non target organisms and food safety. Data originated from field-released crops, extensively tested and/or commercialized for more than ten years: squash; papaya, plum and grapevine. These observations, obtained in realistic field conditions, could be useful for regulatory authorities in evaluating the environmental impact, and for the public to scientifically approach transgenic virus resistant plants.

# BIBLIOGRAFIA

- ACORD B.D. (1996): *Availability of determination of nonregulated status for a squash line genetically engineered for virus resistance*, «Federal Register», 61, 33484-85.
- BADENES M.L., MOUSTAFA T.A., MARTINEZ-CALVO J., LLACER G. (2006): *Resistance to sharka trait in a family from selfpollination of 'Lito' apricot cultivar*, «Acta Horticulturae», 701, pp. 381-384.
- BARTSCH D., SCHMIDT M., POHL-ORF M., HAAG C., SCHUPHAN I. (1996): *Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations*, «Molecular Ecology», 5, pp. 199-205.
- BAU H.J., CHENG Y.H., YU T.A., YANG J.S., LIOU P.C., HSIAO C.H., LIN C.Y. e YEH S.H. (2004): *Field Evaluation of Transgenic Papaya Lines Carrying the Coat Protein Gene of Papaya ringspot virus in Taiwan*, «Plant Disease», 88, pp. 594-599.
- BAULCOMBE D. (2004): *RNA silencing in plants*, «Nature», 431, pp. 356-363.
- BEACHY R.N. (1999): *Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation*, «Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.», 354, pp. 659-664.
- BORJA M., RUBIO T., SCHOLTHOF H.B., JACKSON A.O. (1999): *Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene*, «Molecular Plant-Microbe Interaction», 12, pp. 153-162.
- CAMBRA M., CAPOTE N., MYRTA A., LLACER G. (2006): *Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease*, «Bull OEPP/EPPO», 36, pp. 202-204.
- CAMP SG III. (2003): *Identity preservation protocol for non-GMO papayas*, in *Virus Resistant Transgenic Papaya in Hawaii: A Case for Technology Transfer to Lesser Developed Countries*, Proceedings of an OECD/USAID/ARS Conference, Oct. 22-24, Hilo, HI, pp. 95-100.
- CANDRESSE T. e CAMBRA M. (2006): *Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of Plum pox virus strains*, «Bulletin OEPP/EPPO», 36, pp. 239-246.
- CAPOTE N., PEREZ-PANADES J., MONZO C., CARBONELL E., URBANEJA A., SCORZA R., RAVELONANDRO M., CAMBRA M. (2008): *Assessment of the diversity and dynamics of Plum pox virus and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions*, «Transgenic Research», 17, pp. 367-377.
- CHUNG B.N., CANTO T., PALUKAITIS P. (2007): *Stability of recombinant plant viruses containing genes of unrelated plant viruses*, «Journal General Virology», 88, pp. 1347-1355.
- DUXBURY J.M. (2003): *Food systems approaches to nutrition and health: the role of transgenic papaya*, in *Virus Resistant Transgenic Papaya in Hawaii: A Case Study for Technology Transfer to Lesser Developed Countries*, Proceedings of an OECD/USAID/ARS Conference, October 22-24, 2003, Hilo, Hawaii. Organisation for Economic Cooperation and Development/U.S. Agency for International Development/Agricultural Research Service, Washington, DC, pp. 133-138.
- FUCHS M., CAMBRA M., CAPOTE N., JELKMANN W., KUNDU J., LAVAL V., MARTELLI G.P., MINAFRA A., PETROVIC N., PFEIFFER P., POMPE-NOVAK M., RAVELONANDRO M., SILDARELLI P., STUSSI-GARAUD C., VIGNE E. and ZAGRAI I. (2007): *Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance*, «Journal of Plant Pathology», 89, pp. 5-12.
- FUCHS M., CHIRCO E.M., GONSALVES D. (2004a): *Movement of coat protein genes from*

- a virus resistant transgenic squash into a free-living relative*, «Environmental Biosafety Research», 3, pp. 5-16.
- FUCHS M., CHIRCO E.M., McFERNON J., GONSALVES D. (2004b): *Comparative fitness of a freelifving squash species and free-living x virus-resistant transgenic squash hybrids*, «Environmental Biosafety Research», 3, pp. 17-28.
- FUCHS M., GAL-ON A., RACCAH B. e GONSALVES D. (1999): *Epidemiology of an aphid nontransmissible potyvirus in fields of nontransgenic and coat protein transgenic squash*, «Transgenic Research», 8, pp. 429-439.
- FUCHS M., KLAS F.E., McFERNON J.R., GONSALVES D. (1998): *Transgenic melon and squash expressing coat protein genes of aphid-borne viruses do not assist the spread of an aphid non-transmissible strain of cucumber mosaic virus in the field*, «Transgenic Research», 7, pp. 1-14.
- FUCHS M., e GONSALVES D. (2007): *Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies*, «Annual Review Phytopathology», 45, pp. 173-202.
- GARCIA-ARENAL F., FRAILE A., MALPICA J.M. (2001): *Variability and genetic structure of plant virus populations*, «Annual Review Phytopathology», 39, pp. 157-186.
- GIANESSI L.P., SILVERS C.S., SANKULA S., CARPENTER J.E. (2002): *Virus resistant squash*, in *Plant Biotechnology: Current and Potential Impact for Improving Pest Management in U.S. Agriculture. An Analysis of 40 Case Studies*, Washington, DC: Natl. Cent. Food Agric. Policy, 75 pp.
- GONSALVES C., LEE D.R. e GONSALVES D. (2007): *The adoption of genetically modified papaya in Hawaii and its implications for developing countries*, «Journal Developmental Studies», 43, pp. 177-191.
- GONSALVES D. (1998): *Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study*, «Annual Review Phytopathology», 36, pp. 415-437.
- GONSALVES D., VEGAS A., PRASARTSEE V., DREW R., SUZUKI J, ET AL. (2006): *Developing papaya to control papaya ringspot virus by transgenic resistance, intergeneric hybridization, and tolerance breeding*, «Plant Breeding Review», 26, pp. 35-78.
- GREENE A.E., ALLISON R.F. (1994): *Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts*, «Science», 263, pp. 1423-1425.
- HSIEH Y.T. e PAN T.M. (2006): *Influence of planting papaya ringspot virus resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity*, «Journal of Agricultural Food Chemistry», 54, pp. 130-137.
- JAKAB G., VAISTIJ F.E., DROZ E., MANOE P. (1997): *Transgenic plants expressing viral sequences create a favourable environment for recombination between viral sequences*, in *Virus-Resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact*, ed. M Tepfer, E Balazs, Heidelberg: INRA Ed.-Springer, pp. 45-51.
- JENSEN D.D. (1949): *Papaya virus diseases with special reference to papaya ringspot*, «Phytopathology», 39, pp. 191-211.
- JOHNSON S.R., STROM S., GRILLO K. (2008): *Quantification of the Impacts on US Agriculture of Biotechnology-Derived Crops Planted in 2006*, <http://www.ncfap.org>.
- KANIEWSKI W.K. e THOMAS P.E. (2004): *The potato story*, «AgBioForum», 7, pp. 41-46.
- LECOQ H., RAVELONANDRO M., WIPF-SCHEIBEL C., MANSION M., RACCAH B., DUNEZ J. (1993): *Aphid transmission of a non-aphid transmissible strain of zucchini yellow mosaic virus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus*, «Molecular Plant- Microbe Interaction», 6, pp. 403-406.
- LINDBO J.A. and DOUGHERTY W.G. (2005): *Plant pathology and RNAi: a brief history*, «Annual Review of Phytopathology», 43, pp. 191-204.

- MANSHARDT R. (2002): *Is Organic Papaya Production in Hawaii Threatened by Cross-Pollination with Genetically Engineered Varieties?*, [www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/BIO-1.pdf](http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/BIO-1.pdf).
- MAULE A.J., CARANTA C. and BOULTON M.I. (2007): *Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects*, «Molecular Plant Pathology», 8, pp. 223-231.
- MING R., HOU S., FENG Y., YU Q., DIONNE-LAPORTE A., SAW J.H., SENIN P., WANG W., LY B.V., LEWIS K.L.T., SALZBERG S.L., FENG L., JONES M.R., SKELTON R. L., MURRAY J.E., CHEN C., QIAN W., SHEN J., DU P., EUSTICE M., TONG E., TANG H., LYONS E., PAULL R.E., MICHAEL T.P., WALL K., RICE D.W., ALBERT H., WANG M.L., ZHU Y.J., SCHATZ M., NAGARAJAN N., ACOB R.A., GUAN P., BLAS A., WAI C.M., ACKERMAN C.M., REN Y., LIU C., WANG J., WANG J., NA J.K., SHAKIROV E.V., HAAS B., THIMMAPURAM J., NELSON D., WANG X., BOWERS J.E., GSCHWEND A.R., DELCHER A.L., SINGH R., SUZUKI J.Y., TRIPATHI S., NEUPANE K., WEI H., IRIKURA B., PAIDI M., JIANG N., ZHANG W., PRESTING G., WINDSOR W., NAVAJAS-PEREZ R., TORRES M.J., FELTUS F.A., PORTER B., LI Y., BURROUGHS A.M., LUO M., LIU L., CHRISTOPHER D.A., MOUNT S.M., MOORE P.H., SUGIMURA T., JIANG J., SCHULER M.A., FRIEDMAN V., MITCHELL-OLD T., SHIPPEN D.E., DEPAMPHILIS C.W., PALMER J.D., FREELING M., PATERSON A.H., GONSALVES D., WANG L., e ALAM M. (2008): *The draft genome of the transgenic tropical fruit treepapaya (Carica papaya Linnaeus)*, «Nature», 452, pp. 991-997.
- MOURY B., DESBIEZ C., JACQUEMOND M. e LECOQ, H. (2006): *Genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molecular epidemiology*, «Advances in Virus Research», 67, pp. 49-87.
- MUNGER H.M. (1993): *Breeding for viral resistance in cucurbits*, in *Resistance to viral diseases of vegetables: Genetics and breeding*, Timber Press, Portland, OR, pp. 8-43.
- NELL-DAVIDSON, SN. (2008): *Forbidden Fruit: Transgenic Papaya in Thailand*, «Plant Physiology», 147, pp. 487-493.
- PALUKAITIS P. and CARR J.P. (2008): *Plant resistance responses to viruses*, «Journal of Plant Pathology», 90, pp. 153-171.
- QUEMADA H., STREHLOW L., WALTERS D., STAUB J. (2008): *Population Structure and Incidence of Virus Infection in Free-Living Populations of Cucurbita Pepo*, Environmental Biosafety Research (submitted), <http://www.ars.usda.gov>.
- SANFORD J.C. AND JOHNSTON S.A. (1985): *The concept of pathogen-derived resistance*, «Journal of Theoretical Biology», 113, pp. 395-405.
- SCORZA R., CALLAHAN A., LEVY L., DAMSTEEGT V., WEBB K., RAVELONANDRO M. (2001): *Post-transcriptional gene silencing in Plum pox virus resistant transgenic European plum containing the Plum pox potyvirus coat protein gene*, «Transgenic Research», 10, pp. 201-209.
- SCORZA R., RAVELONANDRO M., CALLAHAN A.M., CORDTS J.M., FUCHS M., DUNEZ J., GONSALVES D. (1994): *Transgenic plums (Prunus domestica L.) express the Plum pox virus coat protein gene*, «Plant Cell Reports», 14, pp. 18-22.
- SHANKULA S. (2006): *Quantification of the impacts on US agriculture of biotechnology-derived crops planted in 2005*, <http://www.ncfap.org>.
- SRIWATANAPONGSE S., IAMSUPASIT N., ATTATHOM S., NAPASINTUWONG O. e TRAXLER G. (2007): *The Study of Agricultural Benefits in Thailand*, Biotechnology Alliance Association, Bangkok, Thailand.
- STEWART Jr C.N., HALFHILL M.D. e WARWICK S.I. (2003): *Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives*, «Nature Genetics», 4, pp. 806-817.
- TENNANT P.F., GONSALVES C., LING K.S., FITCH M., MANSHARDT R. ET AL. (1994):

- Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya*, «Phytopathology», 84, pp. 1359-66.
- TEPPER M. (2002): *Risk assessment of virus-resistant transgenic plants*, «Annual Review Phytopathology», 40, pp. 467-491.
- THOMAS P.E., HASSAN S., KANIEWSKI W.K., LAWSON E.C., ZALEWSKI J.C. (1998): *A search for evidence of virus/transgene interactions in potatoes transformed with the potato leafroll virus replicase and coat protein genes*, «Molecular Breeding», 4, pp. 407-417.
- TRICOLI D.M., CARNEY K.J., RUSSELL P.F., MCMASTER J.R., GROFF D.W., ET AL. (1995): *Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to Cucumber mosaic virus, Watermelon mosaic virus 2, and Zucchini yellow mosaic virus*, «Bio/Technology», 13, pp. 1458-65.
- TURTURO C., FRISCINA A., GAUBERT S., JACQUEMOND M., THOMPSON J.R., TEPPER M. (2008): *Evaluation of potential risks associated with recombination in transgenic plants expressing viral sequences*, «Journal of General Virology», 89, pp. 327-335.
- VIGNE E., BERGDOLL M., GUYADER S., FUCHS M. (2004): *Population structure and genetic diversity within Grapevine fanleaf virus isolates from a naturally infected vineyard: evidence for mixed infection and recombination*, «Journal General Virology», 85, pp. 2435-2445.



## Il controllo delle infestazioni entomatiche con mezzi chimici

### PREMESSA

È noto che l'equilibrio biologico negli ecosistemi terrestri, naturali o antropizzati, rappresentati graficamente dalla cosiddetta "piramide ecologica", è assicurato dai meccanismi omeostatici a feed-back che regolano lo sviluppo della biomassa nei tre principali livelli trofici (1° - accumulatori: piante; 2° - consumatori primari: fitofagi; 3° - consumatori secondari: zoofagi).

Ecologicamente parlando, le infestazioni di insetti fitofagi alle colture, altro non sono che esplosioni demografiche di una o più specie di consumatori primari ("2° livello trofico"), provocate dall'alterazione dei rapporti naturali di biomassa tra consumatori primari e accumulatori vegetali (1° livello trofico) ovvero, più semplicemente, dalle modificazioni quali/quantitative arrecate alla fitomassa con la coltivazione. Modificazioni qualitative: sostituzione di un grande numero di piante spontanee locali con una o poche specie coltivate (e particolarmente idonee allo sviluppo demografico delle specie fitofaghe infestanti); e quantitative: eccezionale sviluppo della fitomassa che diventa risorsa alimentare sovrabbondante per detti fitofagi.

In quest'ottica, gli interventi in difesa delle colture dalle infestazioni di insetti fitofagi non mirano al fine (semplicistico e fallimentare, come dimostrato dall'uso indiscriminato di insetticidi chimici di sintesi nell'ultimo mezzo secolo: Solinas, 2003) di eliminare completamente e definitivamente tali insetti, bensì al controllo demografico dei medesimi, onde contenerli (o riportarli) al di sotto di determinati livelli (soglie economiche) di popolazione.

\* *Dipartimento di Scienze agrarie e ambientali, Università degli Studi di Perugia*

## STATO DELL'ARTE

I metodi di difesa entomologica delle piante con mezzi chimici attualmente in uso sono tutti dichiaratamente basati su principi di “compatibilità ecologica” e di “sostenibilità economica”, ma ciò può essere ritenuto valido in riferimento alle modalità più che ai mezzi di intervento. Questi, infatti, si prestano con difficoltà a essere qualificati di per sé “ecocompatibili”, specialmente se si parla di insetticidi chimici di sintesi. È certamente più corretto definirli, eventualmente, “a basso impatto ambientale”. Ma anche questa definizione rimane generica, se mancano precisi punti di riferimento, ordinariamente rappresentati dai ben noti “effetti collaterali indesiderabili” dell’uso ripetuto di mezzi chimici sulle colture, e comunemente identificati come tossicità verso gli operatori dei trattamenti, residui tossici nelle derrate alimentari, resistenza e risorgenza demografica dei fitofagi dannosi, e riduzione dell’entomofauna utile.

I principi attivi chimici “tradizionali”, pur mostrando tra loro differente efficacia insetticida (talora più o meno volutamente scambiata per selettività) nei confronti dei diversi gruppi di insetti, esercitano tutti azione biotossica sostanzialmente universale. Le potenzialità innovative di questi mezzi, nel senso di una riduzione dell’impatto ambientale, sono dunque da ricercare soprattutto nelle possibilità che essi offrono di venire usati con strategie d’impiego che ne abbassano detto impatto adeguatamente, e compatibilmente con la sostenibilità economica dell’intervento. E ciò risulta sempre più fattibile mediante l’applicazione di strumenti affidabili di campionamento e monitoraggio in tempo reale dei livelli di popolazione dei fitofagi interessati e dei loro regolatori demografici naturali; come pure mediante particolari tecnologie formulative dei coadiuvanti (purtroppo, non sempre innocui, anzi talvolta più pericolosi del principio attivo stesso) per migliorare nel formulato caratteristiche importanti come ritenzione, bagnatura, distribuzione, penetrazione e assorbimento della sostanza attiva; e con l’introduzione nei formulati stessi di attrattivi specifici per il fitofago e/o repellenti per gli insetti utili.

Negli ultimi tempi, tuttavia, l’industria chimica sta cercando di produrre anche nuove molecole insetticide con potenzialità innovative basate su possibilità intrinseche di ovviare in tutto o in parte agli effetti collaterali sopra menzionati, e in particolare ai fenomeni della resistenza diretta e/o crociata agli insetticidi da parte dei fitofagi più dannosi. E ciò è reso possibile grazie all’applicazione da parte dei chimici delle importanti conoscenze di base accumulate soprattutto negli ultimi decenni sulla fisiologia biochimica degli

insetti (del sistema nervoso in particolare), unitamente a quelle più generali sulle “interazioni insetti-piante”.

Nonostante i grandi progressi dei mezzi biologici e biotecnici, e a parte gl'insetticidi organici di origine vegetale, il cui impiego è praticamente limitato alle cosiddette “agricolture alternative” (“agricoltura biologica”, in particolare), il modesto uso di oli minerali detti “di nuova generazione” ma sostanzialmente non nuovi, e i mezzi (metodi?) agroecologici (“Biodiversità vegetale e controllo dei fitofagi”, *sensu* Altieri et al., 2003), molto promettenti ma ancora in fase pionieristica, la difesa delle coltivazioni dalle infestazioni entomatiche risulta ancora in massima parte (oltre il 90% a livello mondiale) affidata agli insetticidi organici di sintesi, ai quali pertanto si continua a guardare in attesa di valide innovazioni.

Per i principi attivi dei gruppi tradizionali (fosfororganici, carbammati e piretroidi, principalmente), le potenzialità innovative risultano limitate alle strategie d'impiego dei medesimi soprattutto per cercare di contenerne i riflessi negativi sull'entomofauna utile, mentre rimangono grossi limiti, ad esempio, per quanto riguarda la resistenza dei fitofagi dannosi, data la comunanza dei meccanismi di azione dei fosfororganici e della maggioranza dei carbammati (e dunque la facilità di far emergere resistenze crociate) e le difficoltà di ricorrere al cambio frequente dei principi attivi, aggravate dalla drastica riduzione del numero di detti principi ancora disponibili (Direttiva europea 91/414).

Particolare interesse e notevoli aspettative destano un certo numero di principi attivi di recente formulazione, in quanto presentano bassa tossicità per mammiferi e altri gruppi animali “non target” e meccanismi di azione biotossica alquanto differenziati tra loro e rispetto ai gruppi insetticidi più comuni in commercio. Ciò che permette un più efficace controllo della resistenza normale ai singoli principi attivi (mediante l'uso alternativo dei medesimi) e minori rischi di resistenze crociate.

Si riporta appresso come esempio una breve rassegna di tali prodotti (in ordine alfabetico: Clorantpriliprole, Emamectina benzoato, Flonicamid, Metaflumizone, Spiromesifen), così come sono stati presentati alle Giornate Fitopatologiche 2008 (sia pure con un prudentiale “beneficio d'inventario” da parte del sottoscritto circa i giudizi di merito non sempre disinteressatamente espressi dagli oratori in quell'importante assise) e che meritano particolare attenzione per le riportate caratteristiche di basso impatto ambientale.

***Chlorantraniliprole*** (Bassi et al., 2008) è il primo membro di una nuova classe di insetticidi, le ammidi dell'acido antranilico (Cordova et al., 2006), scoperta e sviluppata dalla Dupont (Rynaxypyr®). Questo prodotto

ha un'azione biotossica nuova (gruppo 28 nella classificazione IRAC): bersaglio molecolare sono i canali ionici del calcio presenti sulle fibre muscolari, definiti "recettori rianodinici" (RyRs) per la loro affinità verso l'alcaloide di origine vegetale "rianodina". Il prodotto si lega ai citati recettori molecolari del reticolo sarcoplasmico, attivando il rilascio incontrollato degli ioni calcio nel citosol e quindi l'esaurimento del loro stock. Ciò provoca l'arresto immediato delle normali contrazioni muscolari, con sintomi di atassia seguiti da paralisi e morte. La paralisi è quasi immediata e determina la rapida interruzione dell'attività trofica, da pochi minuti a qualche ora dopo l'ingestione. La morte dell'insetto interviene normalmente 24-72 ore dopo l'assunzione della sostanza attiva (Cordova et al., 2006).

Il prodotto ha una bassa solubilità in acqua (a 20°C: 1,0 mg/l) e nella maggior parte dei solventi organici.

Sulle piante trattate si comporta come citotropico translaminare e debolmente sistemico per via acropeta.

Gli insetti s'intossicano principalmente per ingestione e secondariamente per contatto.

Il prodotto ha una tossicità acuta molto bassa per i mammiferi (orale DL50 ratto: >5000 mg/kg; dermale DL50 ratto: >5000 mg/kg), non è irritante né sensibilizzante per gli occhi e per la pelle. Anche la tossicità cronica è molto bassa, come basso è il bioaccumulo potenziale (logaritmo del coefficiente di partizione ottanolo/acqua: 2,76); non ha potenziale mutagenicità (testi di Ames: negativi), né effetti embriotossici o cancerogeni.

La combinazione di bassa tossicità e basse dosi d'impiego (10-60 g di p. attivo/ettaro) offre margini di sicurezza in termini di esposizione degli operatori e di contaminazione alimentare.

Il prodotto risulta efficace contro importanti fitofagi appartenenti a diversi ordini d'insetti (lepidotteri, coleotteri, ditteri) in applicazioni fogliari su colture frutticole, orticole, vite e mais (Bassi et al., 2007).

I risultati dei test registrativi indicano un impatto molto basso del prodotto su mortalità e riproduzione di organismi utili quali lombrichi (*Lumbricus terrestris*), api, acari predatori (*Typhlodromus pyri*), imenotteri parassitoidi (Braconidae, Aphidiidae, Trichogrammatidae, Aphelinidae), coleotteri (Coccinellidae), neurotteri (Chrysopidae), eterotteri (Anthracoridae, Nabidae, Lygaeidae), ditteri (Syrphidae), in condizioni di laboratorio e di campo, con risultati che indicano impatto basso o nullo in base alla classificazione OILB degli effetti (Marchesini et al., 2008).

Chlorantraniliprole ha una bassa tossicità acuta, cronica, alimentare e riproduttiva per la fauna selvatica (uccelli, pesci e mammiferi). Pure bassa è la

tossicità per alghe e piante acquatiche quali *Lemna* spp. È invece tossico per l'indicatore invertebrato acquatico *Daphnia magna*. Il prodotto e i suoi metaboliti non hanno effetti negativi sui microorganismi del suolo.

La via primaria di degradazione è chimica e dà luogo a un metabolita principale biologicamente inattivo e non lisciviabile. Il prodotto si degrada nel terreno secondo un'emivita variabile da < 2 a 12 mesi negli studi standard. La degradazione del prodotto nel terreno è positivamente correlata alla temperatura e non è influenzata dal pH. L'emivita risulta sempre più breve in presenza della coltura.

**Emamectina benzoato** (Liguori et al., 2008) è un insetticida di derivazione naturale appartenente alla famiglia chimica delle avermectine e sviluppato da Syngenta Crop Protection AG (Affirm®). Le prime avermectine furono isolate già negli anni '70 dai prodotti di fermentazione del microrganismo del terreno *Streptomyces avermitilis*.

La sostanza attiva agisce stimolando il rilascio del neurotrasmettitore Acido Gamma-Amino-Butirrico (GABA) a livello delle cellule nervose inibitorie. Ciò causa un continuo flusso di ioni cloro nelle cellule del muscolo e il conseguente blocco della contrazione con conseguente arresto dell'alimentazione e paralisi nel giro di poche ore.

Per questo suo particolare meccanismo di azione biotossica, Emamectina benzoato non presenta resistenza crociata con gli insetticidi attualmente disponibili per la lotta contro i lepidotteri fitofagi (Reyes et al., 2007), verso i quali la forma salificata del prodotto (15-30 g di p.a./hl) manifesta una potente attività larvicida in diverse colture agrarie frutticole, orticole e vite (Dybas e Babu, 1988; Lasota e Dybas, 1991).

Il prodotto ha una solubilità scarsa in acqua (0,31 g/l a 25°C) ma notevole nei solventi organici (toluene 20,0 g/l; cicloesano 0,23 g/l).

Penetra negli insetti per contatto e per ingestione di tessuti vegetali avvelenati.

Viene assorbito rapidamente dalla vegetazione, manifestando proprietà translaminari, mentre la parte di prodotto che rimane sulla superficie delle piante trattate, viene rapidamente degradata per fotoossidazione fino a livelli non tossici (Ishaaya et al., 2002). La fotolisi è molto rapida anche nel terreno (emivita dichiarata: 5 giorni); ed essendo praticamente immobile non presenta rischi di percolazione nella falda.

Emamectina benzoato viene dato come mediocrementemente tossico per i mammiferi (DL50 orale acuta: 76-89 mg/kg ratto; DL50 dermale acuta: > 2000 mg/kg coniglio), ma notevolmente tossico per le api esposte direttamente al trattamento e per gli organismi acquatici.

Dato il rapido assorbimento nella vegetazione e la veloce fotodegradazione sulla superficie vegetale, il prodotto si presta bene all'impiego strategico per trattamenti selettivi nei confronti degli organismi ausiliari (entomoparassitoidi e predatori).

**Flonicamid** (Nieto J. e Simonetta F., 2008) è una nuova molecola della famiglia chimica delle piridinecarbossamidi, proveniente dalla ricerca ISK (Morita et al., 2000; Laurentie e Morita, 2005) e commercializzata dalla ISK Biosciences Europe S.A. Il principio attivo non è neurotossico e agisce per un meccanismo d'azione non ancora bene identificato ma comunque non rappresentato da alcun'altra famiglia chimica di insetticidi, e pertanto particolarmente idoneo a essere utilizzato in strategie antiresistenza.

Risulta particolarmente attivo per contatto e per ingestione su insetti ad apparato boccale pungente succhiante (Afdi e Aleirodidi). L'esposizione a flonicamid provoca negli insetti bersaglio un'immediata cessazione dell'attività trofica (entro la prima ora dall'esposizione) e la conseguente morte per disidratazione (nei successivi 2-4 giorni seguenti al trattamento), sia negli stadi adulti che in quelli preimmaginali.

Flonicamid viene assorbito dalle piante trattate per via fogliare o radicale, e traslocato per via xilematica verso l'apice del germoglio. Ha dimostrato particolare efficacia nel controllo di alcune importanti specie di afidi non facili da contenere su melo (*Dysaphis plantaginea*) e su pesco-nettarine (*Myzus persicae* e *Myzus varians*).

Il prodotto è inodoro, relativamente solubile in acqua (5,2 g/l a 20°C), e alquanto fotostabile ( $\geq 3$  gg a 100.000 lux).

Flonicamid non ha dimostrato effetti negativi su di un'ampia varietà di artropodi utili, quali Imenotteri impollinatori (*Bombus terrestris* e *Apis mellifera*); e regolatori demografici naturali di afidi: Acari Fitoseidi (*Amblyseius degenerans*, *Phytoseiulus persimilis* e *Typhlodromus pyri*) su Tripidi; Eterotteri Antocoridi (*Anthocoris femoralis*) su Psilla; Imenotteri (*Aphidius colemani*) su Afdi; Coleotteri (*Atheta coriaria*) su Tripidi e (*Coccinella septempunctata*) su Afdi; Neurotteri (*Chrysoperla carnea*) su Afdi; Ditteri (*Episyrphus balteatus*) su Afdi; Eterotteri Miridi (*Macrolophus caliginosus*) su Aleirodidi.

Il prodotto presenta bassa tossicità verso i mammiferi (Orale DL50 ratto maschio: 884 mg/kg; Orale DL50 ratto femmina: 1768 mg/kg; Dermale DL 50 ratto >5000 mg/kg); non produce irritazione oculare né cutanea (su coniglio); non risulta teratogeno e non presenta mutagenicità (Ames Test: negativo).

Esito favorevole hanno dato anche i test sulla tossicità verso organismi acquatici come pesci (Trota arcobaleno - *Oncorhynchus mykiss*: CL50, 96 h >100

mg/l; Pesce Persico - *Lepomis macrochirus*: CL50, 96 h >100 mg/l; Cipriodonte - *Cyprinodon variegatus*: CL50, 96 h >120 mg/l), Daphnia (*Daphnia magna*: EC50, 48 h >100 mg/l), alghe (EC50, 72 h >100 mg/l), Lenticchia d'acqua (*Lemna* sp.: EC50, 7 giorni >119 mg/l); e verso uccelli selvatici (Germano reale: acuta LD50, 2621 su maschio e 1591 su femmina mg/kg p.c.; Germano reale: dieta CL50 >5000 mg/kg dieta).

Flonicamid si degrada nel suolo a opera di batteri con una emivita di 1,1 giorni. Il principio attivo per le sue caratteristiche non presenta rischi di contaminazione delle acque superficiali e di falda.

**Metaflumizone** (Marchi et al., 2008) è un nuovo insetticida appartenente alla famiglia chimica dei semicarbazoni (Jose et al., 2007), cosviluppato dalle industrie Basf e Nihon Nohyaku, caratterizzato da un'azione biotossica non riscontrata finora in altri prodotti. Il sito bersaglio del principio attivo non è stato ancora identificato, tuttavia è stata evidenziata la sua azione sul sistema nervoso dell'insetto, dove blocca i canali del sodio della membrana neuronale, provocando inattivazione dei neuroni con conseguente "paralisi rilasciata" dell'insetto. Questo cessa di alimentarsi dopo 15 minuti - 12 ore dall'applicazione e muore nel giro di 1-72 ore.

Sperimentazioni condotte in laboratorio e in campo avrebbero evidenziato l'assenza di fenomeni di resistenza crociata con altre famiglie chimiche, quali carbammati, fosfororganici, piretroidi, neonicotinoidi, benzoiluree, ossadiazine e spinosine.

Si tratta di un insetticida ad ampio spettro di azione e media persistenza (attività residuale fino a 7-10 giorni), particolarmente efficace nel controllo della Dorifora della patata (*Leptinotarsa decemlineata*) su patata e melanzana, di *Heliotis* sp. su melanzana, di *Heliothis armigera*, *Pieris brassicae* e *Plutella xylostella* su cavoli, di *Heliothis armigera* su pomodoro, di *Agrotis* spp., *Heliothis armigera* e *Autographa gamma* su lattuga.

Metaflumizone viene assorbito prontamente dai tessuti della pianta trattata, mentre presenta scarsa mobilità all'interno della medesima. Inoltre presenta un'elevata affinità per lo strato ceroso che riveste la superficie della pianta.

La tossicità acuta del prodotto verso i mammiferi è abbastanza bassa (orale DL50 (ratto) >2000 mg/kg (maschi/femmine; dermale DL50 (ratto) >4000 mg/kg (maschi/femmine), e non risulta irritante cutaneo (coniglio), né cancerogeno, teratogeno o mutageno. Test su Germano hanno riportato (acuta orale DL50 > 2000 mg p.a./kg bw).

Studi condotti in laboratorio e in pieno campo ne hanno dimostrato un basso impatto verso lombrichi (CL50, 14 g > 1000 mg p.a./ kg suolo), insetti

impollinatori (*Apis mellifera*: 48 h contatto DL50 (protocollo US EPA)\* > 106 µg p.a./ape; 96 h contatto DL50 (protocollo EU)\*\* > 1,65 µg p.a./ape; 96 h orale DL50 (protocollo EU) > 2,43 µg p.a./ape), e regolatori demografici naturali (*Amblyseius sp.*, *Crysopa sp.*, *Geocoris sp.*, *Nabis sp.*, *Orius sp.*, *Trichogramma sp.*).

L'impatto su organismi acquatici è stato saggiato con i risultati appresso indicati su: Trota arcobaleno (acuta 96 h CL50, solo acqua, > 343 ppb); Pesce gatto (acuta 96 h CL50, esposizione acqua/sedimento, > 300 ppb (acqua) > 1 ppm (sedimento); Carpa (acuta 96 h CL50, esposizione acqua/sedimento, > 300 ppb (acqua) > 1 ppm (sedimento); Daphnia (acuta 48 h CE50 > 331 ppb); Alga verde (acuta 96 h CE50 > 313 ppb).

Su tutte le colture saggiate, anche a dosi tre volte superiori a quella in etichetta, non ha procurato sintomi di fitotossicità.

La solubilità in acqua di metaflumizone (E/Z)-isomeri) è molto bassa ( $1,79 \times 10^{-3}$  mg/l, a 20 °C), per cui esso risulta poco mobile nel suolo, e presenta una emivita di 4,3-27 giorni.

***Spiromesifen*** (Rofeni et al., 2008) è un nuovo principio attivo dotato di attività insetticida e acaricida, appartenente alla classe chimica degli acidi tetronici spiro ciclici (Bretschneider et al., 2005), scoperto e sviluppato dalla Bayer CropScience AG.

La molecola si distingue per un meccanismo d'azione innovativo, che inibisce la biosintesi dei lipidi negli artropodi bersaglio. Il prodotto non evidenzia resistenza crociata con gli acaricidi e insetticidi attualmente in commercio (Nauen e Konanz, 2005), per cui viene presentato come particolarmente interessante nelle strategie antiresistenza.

Gl'insetti, in particolare Aleurodidi multi resistenti e acari Tetranychidi dannosi alle colture orticole in serra, assumono il principio attivo per ingestione e per contatto. Una notevole efficacia è stata evidenziata contro gli stadi giovanili di Aleurodidi, ma anche contro acari Tetranychidi, verso i quali è prevalente l'attività di contatto contro uova, stadi giovanili e femmine adulte (Nauen et al., 2005).

Data la destinazione ufficiale limitata all'impiego in serra, nelle condizioni di "buona pratica agricola", spiromesifen può essere considerato a basso/nesso rischio di effetti indesiderabili a carico degli organismi non target normalmente presenti negli ecosistemi agrari, quali uccelli, mammiferi, lombrichi, artropodi entomofagi e microrganismi presenti nel suolo (Nicolaus et al., 2005).

Sono stati comunque effettuati e con esiti relativamente tranquillizzanti i



normali test di tossicità per: - Mammiferi: acuta (orale: (DL50) ratto > 2500 mg/kg peso corporeo; dermale: (DL50) ratto > 2000 mg/kg peso corporeo; irritazione cutanea coniglio: non irritante; irritazione oculare coniglio: non irritante); e a lungo termine e dello sviluppo (non cancerogeno, non teratogeno e non mutageno); - uccelli (Quaglia - *Colinus virginianus* (DL50) > 2000 mg/kg peso corporeo; NOEC, 20 settimane via dieta: 720 mg/kg dieta); - organismi acquatici (Trotta arcobaleno - *Oncorhynchus mykiss* (CL50, 96 h) 0,0155 mg/l; Alghe - *Pseudokirchneriella subcapitata* (cronica, ErC50, 72 h > 0,094 mg/l); Daphnia - *Daphnia magna* (EC50, 48 h) > 0,0923 mg/l); e Lombrichi (*Eisenia fetida* (CL50, 14 gg > 1000 mg/kg substrato).

Per verificare l'impatto del prodotto con gl'impollinatori spesso impiegati in serra per il pomodoro (*Bombus terrestris* in particolare), sono state condotte alcune prove in diverse condizioni colturali, le quali hanno evidenziato che un doppio trattamento con spiromesifen non determina effetti negativi sulla sanità delle colonie, né sull'efficienza di impollinazione di detti pronubi (Bielza et al., 2005).

Nessun effetto avverso sarebbe stato riscontrato, alle dosi di impiego consigliate, su artropodi utili né su microrganismi del terreno. E non si sarebbe mai manifestata fitotossicità sulle colture trattate sopra menzionate.

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Affinché il controllo delle infestazioni d'insetti sulle colture, possa essere davvero "ecologicamente compatibile" e insieme "economicamente sostenibile", non c'è dubbio che si dovrà fare sempre più affidamento sull'estensione massima e generalizzata dell'uso di mezzi e metodi più *secundum natura* (biologici, biotecnici, agroecologici), con ricorso agl'insetticidi chimici di sintesi sempre più limitato ai casi di estrema e accertata necessità.

Ma intanto, nonostante i grandi progressi dell'ecologia chimica (interazioni insetti-piante) e di quella comportamentale (etologia entomologica) degli ultimi decenni, le conoscenze necessarie per assicurare maggiore successo e quindi un più ampio ricorso al biologico, al biotecnico e all'agroecologico, risultano ancora insufficienti per garantire i risultati applicativi sperati e ragionevolmente attesi, capaci di conquistare la piena fiducia dell'agricoltore.

E la logica e pratica conseguenza di questa situazione è che ancora oggi, oltre il 90% (a livello mondiale) delle infestazioni entomatiche viene controllato facendo ricorso agl'insetticidi chimici di sintesi.

Pertanto, non può essere sottovalutato l'attuale impegno dell'industria dei

fitofarmaci a produrre nuove molecole intrinsecamente capaci di ridurre (se non proprio ovviare) i noti effetti collaterali indesiderabili degli insetticidi chimici di sintesi.

Bisogna anche aggiungere però, che non sempre i passi sono diretti nel verso giusto, come purtroppo si è notato anche recentemente nell'importante assise nazionale sopra menzionata, dove sono stati enfatizzati risultati di prove sperimentali per riaffermare unicamente il potere insetticida di prodotti, dei quali è già stata evidenziata a livello internazionale (Buffin, 2003) una grave pericolosità ambientale e per la salute umana, sia del principio attivo (mi riferisco in particolare a imidacloprid e relativi metaboliti di degradazione) che di coadiuvanti (es. naftalene e silice) dei formulati commerciali impiegati.

#### RIASSUNTO

Dopo una breve introduzione sul significato ecologico delle infestazioni di insetti fitofagi e sugli interventi umani in difesa delle coltivazioni, seguita da un quadro sommario dell'attuale importanza dell'impiego dei mezzi chimici insetticidi in agricoltura, viene riportata una breve rassegna esemplificativa di prodotti chimici di sintesi intrinsecamente capaci di ridurre se non evitare la resistenza degli insetti, con un impatto ambientale (dettagliatamente dichiarato) sostenibile.

#### ABSTRACT

*Pest insect outbreaks and control.* After a brief introduction on a general ecological significance of the insect pest outbreaks and control, as well as of current actual importance of the insect chemical control on crops, a survey is reported of some relatively new synthetic chemical compounds having intrinsic environmentally friendly properties and especially preventing a serious problem such as pest insect resistance to insecticides.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ALTIERI M.A., NICHOLLS C.I., PONTI L. (2003): *Biodiversità e controllo dei fitofagi negli agroecosistemi*, Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Firenze. ISBN 88-900627-8-9.
- BASSI A., ALBER R., WILES J.A., RISON J.L., FROST N.M., MARMOR F.W., MARCON P.C. (2007): *Chlorantraniliprole: a novel anthranilic diamide insecticide*, Proceedings of XVI International Plant Protection Congress, 1, pp. 52-59.

- BASSI A., VERGARA L., ALBER R., SBRISCIA FIORETTI C., WILES J. (2008): *Chlorantranilprole (Rynaxypyr) un nuovo insetticida: Proprietà generali e attività su Spodoptera littoralis*, Atti Giornate Fitopatologiche, 2008, 1, pp. 9-16.
- BIELZA P., CONTRERAS J., QUINTO V., IZQUIERDO J., MANSANET V., ELBERT A. (2005): *Effects of Oberon® 240 SC on bumblebees pollinating greenhouse*, «Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer», 58, pp. 469-484.
- BRETSCHNEIDER T., FISCHER R., BENET-BUCHHOLZ J. (2005): *Spiromesifen (Oberon®) - discovery, synthesis and X-ray structure*, «Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer», 58, pp. 307-318.
- BUFFIN D. (2003): Pesticides News, «The Journal of Pesticide Action Network UK», 62, Quarterly/December 2003, pp. 22-23.
- CORDOVA D., BENNER E.A., SACHER M.D., RAUH J.J., SOPA J.S., LAHM G.P., SELBY T.P., STEVENSON T.M., FLEXNER L., GUTTERIDGE S., RHOADES D.F., WU L., SMITHY R.M., TAO Y. (2006): *Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation*, «Pesticide Biochemistry and Physiology», 84, 196: 214A.
- DYBAS R.A., BABU J.R. (1988): *4"-deoxy-4"-methylamino-4"-epiavermectin B1 hydrochloride (MK-243): a novel avermectin insecticide for crop protection*, Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases, 1, pp. 57-64.
- ISHAAYA I., KONTSEDALOV S., HOROWITZ A.R. (2002): *Emamectin, a novel insecticide for controlling field crop pests*, «Pest Management Science», 58, pp. 1091-1095.
- JOSE L., ARMES N.J., FARLOW R., ALDRIDGE K., ROBIN F., TEDESCHI L. (2007): *Metaflumizone a new broad-spectrum insecticide for crop protection*. XVI International Plant Protection Congress. Session, 2A-8.
- LASOTA J.A., DYBAS R.A. (1991): *Avermectins: a novel class of compounds: Implications for use in arthropod pest control*, «Annu. Rev. Entomol.», 36, pp. 91-117.
- LIGUORI R., CESTARI P., SERRATI L., FUSARINI L. (2008): *Emamectina benzoato (AF-FIRM): Innovativo insetticida per la difesa contro i lepidotteri fitofagi*, Atti Giornate Fitopatologiche, 2008, 1, pp. 3-8.
- MARCHESINI E., MORI N., PASINI M., BASSI A. (2008): *Selettività di Rynaxypyr™ su artropodofauna utile in agroecosistemi diversi*, Atti Giornate Fitopatologiche, 2008, 1, pp. 71-76.
- MARCHI A., GENTILI E., TARLAZZI S., M. MANARESI M. (2008): *Metaflumizone (AL-VERDE®): nuovo insetticida ad ampio spettro per la difesa di patata e colture orticole*, Atti Giornate Fitopatologiche, 2008, 1, pp. 23-28.
- NAUEN R. e KONANZ S. (2005): *Spiromesifen (Oberon®) as a new chemical option for resistance management in whiteflies and spider mites*, «Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer», 58, pp. 485-502.
- NAUEN R., SCHNORBACH H.J., ELBERT A. (2005): *The biological profile of the insecticide Oberon®*, «Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer», 58, pp. 417-440.
- NICOLAUS B., ROMIJN C., BOWERS L. (2005): *Ecotoxicological profile of the insecticide Oberon®*, «Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer», 58, pp. 353-370.
- NIETO J., SIMONETTA F. (2008): *Flonicamid (TEPPEKI) nuovo insetticida sistemico per il controllo di Afidi e Mosca bianca*, Atti Giornate Fitopatologiche, 2008, 1, pp. 17-22.
- REYES M., FRANCK P., CHARMILLOT P.J., IORIATTI C., OLIVARES J., PASQUALINI E., SAUPHANOR B. (2007): *Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the Codling moth, Cydia pomonella*, «Pest Management Science», 63, pp. 890-902.

- ROFFENI S., ARCANGELI G., GOLLO M., GUALCO A., MEYER J., CANTONI A. (2008): *Spiromesifen (OBERON): Nuovo insetticida per il controllo di alcuni artropodi dannosi delle colture orticole*, Atti Giornate Fitopatologiche, 2008, 1, pp. 29-34.
- SOLINAS M. (2003): *Evoluzione dei mezzi di difesa fitosanitaria: La difesa entomologica*, «I Georgofili. Quaderni», 2003, I, pp. 85-102.

## Innovazioni nella difesa delle colture da nematodi fitoparassiti

I nematodi sono presenti sul pianeta da circa mezzo miliardo di anni e rappresentano un gruppo animale di successo, diversificato e specializzato, presente in natura in tutte le nicchie ecologiche disponibili. Nel terreno, molti gruppi svolgono un ruolo utile come decompositori o predatori, e solo una piccola frazione del totale delle specie è nota per parassitare le piante. Fra queste, alcune specie inducono un impatto economico significativo sulle colture, e risultano essere un serio fattore limitante per le produzioni agrarie.

Questa constatazione spiega l'attenzione dedicata nelle ultime decadi ai nematodi fitoparassiti e gli sforzi finalizzati al loro contenimento. Come per altre discipline afferenti alla protezione delle piante, la nematologia è oggi in una fase matura in cui l'ottimismo iniziale sull'uso generalizzato di prodotti chimici e fumiganti ha lasciato spazio a una visione più pragmatica e olistica, finalizzata alla gestione integrata e razionale delle fitoparassitosi.

Le specie fitoparassite afferiscono principalmente ai nematodi galligeni, cisticoli e a specie vettrici di virus. Altri gruppi d'importanza agraria includono nematodi delle lesioni e fogliari. Le perdite di produttività variano in funzione delle specie e delle colture interessate. Diverse stime, spesso non in accordo fra loro, collocano le perdite di produzione causate dai nematodi, incluso il prodotto non commerciabile, in un ordine di grandezza variabile dal 5 al 20% della produzione agraria mondiale. La stima dell'impatto economico causato dai nematodi non è infatti agevole, variando sia in funzione del tipo di danno causato che del parametro agronomico o economico utilizzato per la sua quantificazione (ad es. resa colturale, percentuale di prodotto non com-

\* *Istituto per la Protezione delle Piante, CNR, Bari*

mercabile ma destinabile ad altro uso agroindustriale, costi diretti o indiretti derivanti dalle strategie di difesa adottate).

Nei paesi maggiormente industrializzati l'espansione di attività agricole di tipo sostenibile, integrato o "biologico" richiede lo sviluppo di nuovi fattori di produzione e la ricerca di tecnologie alternative ai fitofarmaci per produzioni specializzate può avere anche ricadute applicabili nell'agricoltura convenzionale. In questa relazione verranno presi in esame alcuni aspetti teorici e applicativi relativi alle innovazioni introdotte nella gestione dei problemi nematologici, con particolare riguardo alle procedure maggiormente ecocompatibili.

#### I. CENNI SU NEMATODI VETTORI DI VIRUS, STRATEGIE DI DIFESA E PREVENZIONE

Due gruppi di nematodi, appartenenti alle famiglie Longidoridae (Dorylaimida) e Trichodoridae (Triplonchida), includono specie in grado di trasmettere virus delle piante. In particolare, i Longidoridae trasmettono Nepovirus, mentre i Trichodoridae sono vettori di Tobravirus (Lamberti e Roca, 1987; Decraemer & Robbins, 2007).

Il GFLV, *Grapevine fanleaf virus*, è il più importante virus trasmesso da nematodi in Italia. Esso è l'agente causale del complesso dell'arricciamento infettivo della vite, noto come "fanleaf", malattia molto significativa dal punto di vista economico, che causa deformazioni di foglie e steli, estesi giallumi fogliari con consistenti perdite di produzione (Lamberti, 1991; Martelli, 2002). GFLV è un Nepovirus che può essere anche trasmesso per via meccanica e il cui vettore naturale è *Xiphinema index*, specie diffusa in molte regioni del mondo in cui la vite è coltivata. Le perdite di produzione sono consistenti, per via dei foci epidemici che si sviluppano progressivamente nei vigneti infestati dal vettore, ovvero quando viene utilizzato materiale di propagazione non certificato.

Recenti indagini hanno mostrato che GFLV è ancora endemico, in Italia, nel materiale di propagazione (Bica et al., 2002). *Xiphinema index* è purtroppo endemico nelle aree del Mediterraneo, ma non è stato rinvenuto in campi di pre-moltiplicazione, per cui è possibile che il virus sia diffuso con partite di materiale di propagazione infetto (Bica et al., 2002). *Xiphinema index* è spesso risultato associato a GFLV in Italia meridionale (Catalano et al., 1992). In Puglia, questo nematode è stato rinvenuto negli ultimi anni con frequenze del 28% dei campioni analizzati, provenienti da parcelle da reinvestire a vite ovvero da vigneti in corso. Si tratta di un nematode longevo, il cui ciclo di vita

può durare più di un anno, in grado di rimanere virulifero per lunghi periodi di tempo e di acquisire particelle virali anche alimentandosi sui residui delle radici presenti nel terreno dopo la rimozione delle piante (Raski et al., 1965; Taylor e Raski, 1964). L'associazione virus-vettore è molto specifica e le particelle di GFLV acquisite durante la fase di alimentazione rimangono adsorbite sulla superficie interna dello stiletto e dell'esofago, dove possono restare per lunghi periodi di tempo. Il virus viene rilasciato attraverso lo stiletto quando il vettore si alimenta su nuove radici, ma viene perduto con la muta (Taylor e Robertson, 1970; Belin et al., 2001).

Altri importanti virus trasmessi da nematodi in Italia sono: SLRV, *Strawberry Latent Ringspot Virus*, responsabile della malattia nota come "rosetta a foglie saliciformi del pesco", caratterizzata da internodi raccorciati con vegetazione affastellata e trasmesso da *Xiphinema diversicaudatum*, e AILV, *Artichoke Italian Latent Virus*, trasmesso da *Longidorus apulus* su carciofo (Lamberti e Roca, 1987).

Una fondamentale strategia di contenimento della diffusione di GFLV o altri virus si basa sull'uso di materiale di propagazione certificato esente dalla malattia. Con questa procedura di difesa si mira infatti a prevenire la dispersione del virus. A tal fine numerosi progressi sono stati effettuati negli ultimi anni, e sono disponibili tecniche biologico-molecolari basate sia sull'uso di anticorpi (ELISA) che su sonde specifiche con PCR, in grado di rivelare la presenza del virus nei tessuti vegetali o anche in singoli esemplari del vettore (Esmenjaud et al., 1993; 1994; Rowhani et al., 1993). Tecniche basate su sonde a DNA fluorescente consentono di accertare non solo la presenza del virus, ma d'individuare singoli polimorfismi nucleotidici, per via dell'elevata specificità. Queste proprietà, correlate all'informazione presente nel genoma virale, hanno una pratica applicazione in epidemiologia e diagnostica quarantaria, ovvero quando è necessario identificare isolati endemici in specifiche aree geografiche.

Quando il vettore è presente in campo, le risorse per evitare la sua dispersione con il vigneto in atto sono molto limitate. Dopo l'espianto, la rotazione con colture non ospiti per alcuni anni rimane sempre una strategia necessaria e può essere utilmente integrata con trattamenti nematocidi con prodotti come l'1,3 dicloropropene, in grado di abbattere la popolazione del vettore (Lamberti, 1991). In assenza di fumigazione, i vigneti infestati da *X. index* normalmente richiedono un periodo di quarantena più lungo (4-7 anni), prima che sia possibile il reimpianto. In ogni caso, sono sempre necessari campionamenti replicati nel tempo e nello spazio per verificare l'assenza o l'eliminazione del vettore.

La ricerca di materiale vegetale resistente, sebbene sia un'alternativa molto promettente, è resa difficile dalla durata delle strategie di miglioramento genetico per portainnesti resistenti e che siano compatibili per l'innesto (Esmenjaud e Bouquet, 2008). Fonti di resistenza a *X. index* sono presenti in *Vitis candicans*, *V. solonis*, *V. arizonica*, *V. rufotomentosa* e *V. smalliana* (Kunde et al., 1968). Fra i portainnesti e gli ibridi di *Vitis* spp., a parte la moderata resistenza a *X. index* del 1613C, resistenza moderata al nematode è stata rinvenuta anche nei portainnesti Freedom e Harmony, ottenuti sempre dal 1613C (Harris, 1988). Purtroppo questi portainnesti non manifestano resistenza al virus. Nella cultivar Börner (ibrido di *V. riparia* × *V. cinerea*), è riportata resistenza sia a *X. index* che a GFLV (Becker 1989; Becker e Sopp, 1990). Tuttavia, in prove di campo condotte in Francia, l'infezione da GFLV su Cabernet-Sauvignon innestato su Börner non ha mostrato differenze significative dagli altri portainnesti suscettibili (Esmenjaud e Bouquet, 2008).

Interessanti fonti di resistenza sono state rinvenute anche in *Muscadinia rotundifolia*. Purtroppo la distanza genetica che separa questa specie dal genere *Vitis* non la rende compatibile e suscettibile d'impiego come portainnesto per *V. vinifera* (Bouquet & Hevin, 1978; Bouquet, 1980). Alcuni ibridi brevettati di *V. vinifera* × *M. rotundifolia* hanno manifestato resistenza a GFLV (Walker et al., 1994), in seguito rivelatasi parziale, per via del fatto che consentivano il movimento del virus nei tessuti della pianta limitando i danni a livello del frutto. Fra questi, solo il VR 039-16 viene considerato in California per i siti a rischio di fanleaf (Esmenjaud e Bouquet, 2008). Questo portainnesto presenta però altri inconvenienti, fra cui la suscettibilità a nematodi galligeni e la difficile moltiplicazione.

Alcuni portainnesti sono stati ottenuti in Francia dall'incrocio di ibridi F<sub>1</sub> *V. vinifera* × *M. rotundifolia* (resistenti a nematodi) col portainnesto 140 Ruggeri (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). L'ibrido Mtp 3146-1-87 è tollerante alla clorosi ed è usato nel Mediterraneo. Esso ha mostrato in campo un notevole ritardo nell'infezione da GFLV e, rispetto a SO4 e 140 Ruggeri, una maggior produzione (Bouquet et al. 2003). Questo portainnesto richiede però un affinamento di alcune caratteristiche agronomiche per quanto riguarda la facilità di moltiplicazione.

## 2. METODOLOGIE BASATE SU ANTAGONISTI BIOLOGICI: ASPETTI TEORICI (MODELLISTICA) E PRATICO-APPLICATIVI

Il terreno è un sistema complesso in cui i nematodi fitoparassiti coesistono con numerosi antagonisti naturali a diverso grado di specializzazione, come



funghi acquatici, ifomiceti, batteri, amebe o predatori come nematodi, tardigradi e acari (Sayre e Starr 1988; Stirling, 1991; Ciancio, 2000). L'ambiente tellurico presenta infatti una grande biodiversità microbiologica, dell'ordine di  $10^3$  specie per grammo di terreno (Torsvik et al., 1990). Sebbene la maggior parte dei microrganismi svolga funzioni come la decomposizione o il riciclo dei nutrienti, nei terreni non coltivati è spesso possibile osservare una grande diversità di antagonisti. L'uso indiscriminato di nematocidi di sintesi e di fumiganti spesso comporta, nei terreni agricoli, una riduzione significativa di tutte le specie, incluso quelle utili, sia dal punto di vista della densità che per quanto concerne la loro biodiversità.

### 2.1 *Principali antagonisti*

Gli antagonisti di nematodi rientrano principalmente in due gruppi: batteri e funghi. I batteri del genere *Pasteuria* sono antagonisti specifici. Si tratta di specie Gram-positive afferenti alle Bacillaceae, specializzate e caratterizzate da endospore infettive e durevoli, dal tipico aspetto a ventosa (Sayre e Starr, 1988; Stirling, 1991; Sturhan et al., 1994). Numerose specie attaccano nematodi fitoparassiti, ma il gruppo include anche specie parassite di nematodi predatori o di vita libera, presenti sia in terreni agrari che in terreni non coltivati. Quasi tutte le specie di *Pasteuria* sono state osservate in nematodi, con l'eccezione di *P. ramosa*, parassita di *Daphnia* spp. *Pasteuria penetrans* è parassita di nematodi galligeni del genere *Meloidogyne* (Mankau, 1975; Stirling, 1991; Sayre e Starr, 1988). Altre specie sono: *P. thornei*, descritta da *Pratylenchus brachyurus* (Starr e Sayre, 1988); *P. nishizawae*, descritta da *Heterodera glycines* (Noel et al., 2005); *Candidatus P. usgae*, descritta da *Belonolaimus longicaudatus* (Giblin Davis et al., 2003) e *P. hartismeri* descritta da *Meloidogyne ardenensis* (Gowen et al., 2008).

Tutte le specie di *Pasteuria* hanno un'endospora durevole provvista di fibre parasporali. Essa è sia una forma di resistenza che un propagulo infettivo, è molto resistente alle alte temperature e alla disidratazione, e resta vitale per molto tempo (Mankau, 1975; Stirling, 1991). Le fibre parasporali consentono l'adesione all'ospite, che è molto specifica. Nel genere *Pasteuria* sono presenti specie che sporulano nell'ospite adulto (*P. penetrans*, *P. nishizawae*), negli stadi giovanili (Sturhan et al., 1994; Ciancio, 1995a) o in entrambi gli stadi dell'ospite (Ciancio, 1995a; Galeano et al., 2003).

L'infezione avviene in maniera passiva per adesione dell'endospora alla cuticola del nematode, grazie ai movimenti di quest'ultimo nel terreno. Dopo

una fase di attivazione, il processo germinativo penetra nella cuticola, originando la fase parassitaria con la proliferazione di un tallo dicotomico. Il ciclo termina con la sporulazione e la formazione di nuove endospore all'interno del nematode che vengono disperse nel terreno, per iniziare a un nuovo ciclo alla morte di quest'ultimo.

Altri batteri Gram-negativi sono stati recentemente individuati e mostrano un ciclo parassitario simile a quello di *Pasteuria* spp. Essi sono in grado di aderire alle larve di *Meloidogyne* spp. e di germinare al loro interno, dando origine a una fase infettiva che si conclude con la morte dell'ospite. Questo gruppo di batteri, non coltivabili, è attualmente allo studio. Inoltre, applicazioni di tipo metagenomico hanno mostrato l'esistenza di una grande biodiversità di specie batteriche associate a nematodi d'importanza agraria, suggerendo che quanto oggi è noto rappresenti solo una frazione delle specie esistenti (Nour et al., 2003).

Fra i funghi che attaccano i nematodi, solo alcune specie hanno un interesse pratico. Gli organi di cattura di alcuni ifomiceti (per esempio le trappole di *Arthrobotrys* spp.) sono strutture molto sofisticate ma non specifiche, finalizzate ad acquisire fonti aggiuntive di nutrimento per fronteggiare la competizione da parte di altri microrganismi. In altri casi è invece la biologia degli stessi organismi a non renderli adatti a uno scopo pratico, come per *Catenaria anguillulae*, un fungo acquatico comune nei terreni agrari. Sebbene sia molto diffuso, la necessità di un ambiente acquatico ne limita l'applicazione. Altre specie, pur provviste di veri organi di attacco (per esempio le cellule "cannone" di *Haptoglossa* o le spore a uncino di *Harposporium*) hanno un ruolo marginale nell'ecologia del terreno, sono coltivabili con difficoltà o interessano solo i nematodi di vita libera.

Applicazioni con alcuni prodotti industriali a base di micelio sono riportate in letteratura per *A. irregularis* (Cayrol, 1983), *A. oligospora* e *Dactylellina dactyloides* (Jaffee, 2000; 2003). Queste specie sono caratterizzate da trappole formate da ife adesive o anelli costrittori di cui si servono per la cattura dei nematodi. Risultati di maggior interesse sono riferiti per ifomiceti quali *Pochonia chlamydosporia*, parassita di uova di nematodi galligeni e cisticoli (Kerry et al., 1993; De Leij et al., 1993; Bourne et al., 1994; Kerry e Bourne, 1996) o per il predatore *Dactylellina ellipsospora* (syn. *Monacrosporium ellipsosporum*) (Gaspard e Mankau, 1987; Jaffee e Muldoon, 1994; Jaffee, 2003) (tab. 1). Quest'ultima specie forma nella rizosfera delle reti di ife provviste di bottoni adesivi, che immobilizzano i nematodi prima di essere colonizzati dal micelio del predatore. Un altro fungo parassita d'interesse agrario è l'ifomicete *Hirsutella rhossiliensis*, caratterizzato da conidi adesivi che germinano in seguito

all'adesione passiva all'ospite, per svilupparsi con un micelio al suo interno. Numerose sperimentazioni hanno chiarito per questa specie il rapporto di densità dipendenza con l'ospite e i fattori biotici e abiotici in grado d'influenzarne l'attività (Jaffee e McInnis, 1991; Jaffee et al., 1992).

## 2.2 *Modellistica*

L'approccio sperimentale allo studio degli antagonisti dei nematodi si basa sull'osservazione ripetuta nel tempo di un microcosmo (rizosfera), col rilievo dei dati relativi al parassitismo e alla densità di ospiti e antagonisti. Per interpretare le dinamiche di popolazione è però necessario disporre di un quadro teorico sulla regolazione in natura operata dagli antagonisti. L'insieme costituito dai nematodi fitoparassiti, antagonisti, dalle altre componenti biotiche del terreno, unitamente all'apparato radicale e ai fattori pedologici e ambientali, costituisce un tipico sistema complesso provvisto di componenti caotiche che rendono difficile prevederne l'evoluzione nel tempo (Ciancio, 2000). Sono disponibili però dei modelli interpretativi in grado di far luce sui meccanismi di regolazione delle popolazioni in natura. La modellistica delle relazioni ospite-parassita trae ausilio dagli studi teorici svolti nel passato e dalle problematiche legate al monitoraggio di antagonisti o parassitoidi (Hassel, 1978). Lotka e Volterra, come in seguito Anderson e May (1981), hanno costruito una solida base teorica su cui sviluppare modelli e simulazioni, utili anche per invertebrati e antagonisti.

I dati delle dinamiche di popolazione rappresentano la base quantitativa dell'analisi delle relazioni densità-parassitismo nel tempo e/o nello spazio (Jaffee, 1992) e delle relazioni densità-dipendenti (Jaffee et al., 1990). Uno degli obiettivi dei modelli è valutare gli effetti di medio e lungo termine dei trattamenti inondativi ovvero dei semplici inoculi, effettuati con la trasmissione dell'infezione nella popolazione ospite, da parte dei microrganismi citati. Il primo modello generale in grado di descrivere una regolazione stabile nel tempo (Lotka-Volterra, LV), si basa su un sistema di due equazioni applicabile a un ampio spettro di situazioni. Esso utilizza quattro costanti che descrivono l'antagonismo fra due specie, una delle quali ( $X$ ) è la preda/ospite mentre la seconda ( $Y$ ) è il predatore/parassita. Per l'applicazione al sistema nematodi-antagonisti, la densità dei nematodi nel tempo  $t$  è riferita a un volume del microcosmo (per es. 100 cm<sup>3</sup> o un litro di terreno della rizosfera) mentre la prevalenza (percentuale di vero parassitismo o di esemplari infetti) è usata per l'antagonista. Nella sua forma più semplice, alle differenze, ogni valore di  $X$

e  $Y$  può essere calcolato a partire da valori iniziali, con somme o differenze a intervalli di tempo regolari (giorni, settimane o mesi, in funzione della scala del campionamento usata). Le equazioni 1) e 2) del modello originano, con le costanti appropriate, delle fluttuazioni con cicli regolari nel tempo:

$$X_{t+1} = X_t + a X_t - b X_t Y_t \quad 1)$$

$$Y_{t+1} = Y_t + c X_t Y_t - d Y_t \quad 2)$$

Per una popolazione di nematodi con un singolo parassita specifico (per esempio *Pasteuria*), le costanti sono: il tasso  $a$  di moltiplicazione dell'ospite, il tasso  $b$  di declino dovuto all'antagonista (o prevalenza), il tasso  $c$  di crescita della popolazione dell'antagonista (o prevalenza), e il tasso  $d$  di riduzione del parassita (o prevalenza), per via della mortalità naturale del parassita.

In questo modello è possibile osservare la relazione fra due specie su un solo piano cartesiano chiamato "spazio delle fasi" (fig. 1a). Nel solo caso di relazioni stabili, le simulazioni producono un ciclo con un'orbita a "satellite" visibile quando le osservazioni (reali o simulate) sono proiettate su questo piano. Il ciclo si produce per via delle fluttuazioni dei valori nel tempo e ha un andamento antiorario. Inoltre, la sua forma varia in funzione dei punti iniziali usati per le dinamiche simulate (fig. 1b,c). Le densità e prevalenze simulate tendono a chiudere il ciclo intorno a un singolo punto chiamato "punto d'equilibrio", man mano che i valori iniziali delle due variabili si avvicinano alle sue coordinate. In termini dinamici, al punto d'equilibrio non si osservano variazioni o fluttuazioni nel tempo di prevalenza e densità, che si riducono a due rette orizzontali ( $dx/dt = dy/dt = 0$ ). I valori delle coordinate del punto d'equilibrio (indicati con un asterisco) sono dati dai rapporti fra le costanti usate nel modello:  $X^* = d / c$  e  $Y^* = a / b$ .

Questo modello è stato applicato allo studio di una popolazione di *Xiphinema diversicaudatum* su pesco e di *Tylenchulus semipenetrans* su agrumi, ciascuna associata a una specifica *Pasteuria* sp. (Ciancio, 1995b; 1996). Sebbene le dinamiche reali delle popolazioni studiate ricadano nei cicli simulati dal modello, quest'ultimo non fornisce informazioni circa i meccanismi di regolazione, per via della mancanza di dettagli analitici. Per via della sua regolarità, inoltre, esso non spiega gli effetti delle numerose variabili esterne coinvolte nel parassitismo in natura e altri effetti stocastici. Le equazioni 1) e 2) hanno comunque migliorato l'interpretazione dei dati, fornendo un quadro più attendibile rispetto ad altri modelli applicabili a insetti, per es.

quello di Nicholson-Bailey, per via delle instabilità prodotte da quest'ultimo (Atibalentja et al., 1998).

Il modello G sviluppato da Anderson & May (1981), consente un'interpretazione più analitica della regolazione da microparassiti come *Pasteuria* spp. Nella sua forma alle differenze, esso è il seguente:

$$H_{t+1} = H_t + r H_t - \alpha Y_t \quad 3)$$

$$X_{t+1} = X_t + a (X_t + Y_t) - b X_t - v W_t X_t + \gamma Y_t \quad 4)$$

$$Y_{t+1} = Y_t + v W_t X_t - (\alpha + b + \gamma) Y_t \quad 5)$$

$$W_{t+1} = W_t + \lambda Y_t - (\mu + v H_t) W_t \quad 6)$$

In questo modello  $H$  corrisponde alla densità di popolazione in un volume di spazio (nel caso dei nematodi: la rizosfera);  $X$  indica la frazione della popolazione ospite parassitata, ma non ancora in grado di trasmettere il parassita;  $Y$  indica la componente della popolazione in grado di trasmettere l'infezione e  $W$  corrisponde alla densità dell'antagonista nello stesso volume (rizosfera). Il sistema calcola per ogni tempo  $t$  l'incremento o variazione delle varie popolazioni. Le costanti sono  $a$ : tasso di moltiplicazione dell'ospite,  $b$ : tasso di mortalità dell'ospite,  $\alpha$ : mortalità indotta dal parassitismo,  $v$ : tasso di variazione da infetto a infettivo dell'ospite,  $\gamma$ : tasso di guarigione dell'ospite,  $\lambda$ : numero di propaguli del parassita prodotti per ospite e  $\mu$ : tasso di mortalità del parassita.

Utilizzando questi modelli è possibile simulare, noti i valori della costanti e le densità iniziali delle due specie, le dinamiche di popolazione per ottenere informazioni utili sul sistema, per es. sulle quantità di propaguli dell'antagonista da introdurre nel terreno per incrementare le probabilità di ottenere delle estinzioni locali. Le popolazioni dei nematodi, infatti, sono confinate in un microcosmo che corrisponde al volume di terreno esplorato dalle radici, e la mobilità delle larve è limitata alla ricerca di un sito di penetrazione, mentre i movimenti su distanze maggiori risultano dall'azione dell'uomo o dal trasporto passivo (percolazione, acque d'irrigazione ecc.). L'estinzione locale pertanto si riferisce al microcosmo, al cui interno devono essere eseguite le osservazioni ripetute nel tempo (Jaffee e McInnis, 1991; Jaffee, 1992; Verdejo-Lucas, 1992; Ciancio, 1995b). Poiché il campionamento è spesso di tipo distruttivo, per poter analizzare la relazione densità-dipendenti è utile ripor-

tare, per ciascuna osservazione temporale, le densità dei due organismi nello spazio della fasi rappresentato dalle densità dell'ospite e del parassita. È anche possibile effettuare un unico campionamento nello spazio, con numerose ripetizioni, per ricavare un quadro delle relazione densità-parassitismo senza effettuare uno studio prolungato nel tempo (Jaffee e McInnis, 1991; Ciancio, 1996), poiché le diverse associazioni ospite-parassita non sono sincrone. La rappresentazione nel piano delle fasi di un numero sufficiente di osservazioni consente quindi la ricostruzione del ciclo.

Anche in questo modello, nello spazio delle fasi le variazioni temporali delle due popolazioni seguono un'orbita circolare ad andamento antiorario, con un numero elevato di cicli possibili, in funzione del punto d'avvio della simulazione. Anche in questo caso si osservano punti d'equilibrio, che rappresentano il sistema quando le densità restano costanti nel tempo. Sono questi punti, o meglio la regione dello spazio di contorno che rimane stabile, a rappresentare e simulare gli effetti osservati in campo di soppressività del terreno o di regolazione biologica. Come indicato da Anderson & May (1981), il punto d'equilibrio della popolazione totale dell'ospite  $H^*$  dipende dal suo tasso di evasione dalla classe "infetti" ( $\Gamma = \alpha + b + \gamma$ ), dal coefficiente di trasmissione dei propaguli ( $\beta = v\lambda / \mu$ ) e dal numero totale di stadi infettivi prodotti per ospite:  $\Lambda = (\alpha + b + \gamma) / \lambda$ . Per la densità dell'antagonista, il suo punto d'equilibrio  $W^*$  dipende dal tasso di crescita dell'ospite ( $r = a - b$ ), dal tasso  $\Gamma$ , dalla mortalità indotta dal parassitismo ( $\alpha$ ) e dal tasso di variazione dell'ospite, da infetto a infettivo ( $v$ ).

Le simulazioni realizzate con questo o altri modelli ancor più complessi, sebbene non siano in grado di prevedere l'evoluzione nel tempo di un sistema naturale per via di perturbazioni esterne e di componenti caotiche proprie, ci permettono di conoscere il meccanismo di regolazione naturale. Sulla base di queste informazioni è possibile ricavare delle indicazioni pratiche utili, per esempio stimare le dosi dei trattamenti con gli antagonisti e i tempi richiesti per ottenere l'effetto desiderato, con l'introduzione di antagonisti ovvero favorendo il loro incremento, se già presenti nel sistema (Jaffee, 1992; Ciancio, 1995b; 1996; Atibalentja et al., 1998; Ciancio e Quenehervé, 2000).

### 2.3 Aspetti pratici e applicativi

Numerose prove sperimentali con *P. penetrans* hanno mostrato interessanti potenzialità. Questa specie, a lungo considerata un parassita obbligato (Mankau, 1975; Stirling, 1991; Sayre e Starr, 1988; Williams et al., 1989), è

l'agente biologico più efficace per il controllo dei nematodi galligeni (tab. 1). Recenti progressi (Hewlett, com. pers.) indicano che la sua coltivazione *in vitro* è possibile. La produzione di endospore su larga scala è attualmente nella fase di passaggio dal laboratorio all'industria. Negli Stati Uniti è in corso di registrazione un prodotto a base di endospore di *P. usgae* ottenute con fermentazione su substrati artificiali, per il controllo di *Belonolaimus longicaudatus*. Anche il sequenziamento del genoma di *P. penetrans* è in fase avanzata (Davies, com. pers.) e indica una parentela con *Bacillus subtilis*. Con la produzione di endospore a basso costo e su larga scala, lo sfruttamento di questi batteri sarà reso possibile. Resta da chiarire il ruolo di fattori come l'elevata specificità di adesione all'ospite, da controbilanciare con l'uso di più isolati.

Anche alcuni funghi nematofagi mostrano fattori favorevoli allo sviluppo di prodotti applicativi. Per *P. chlamydosporia*, ad esempio, è accertata una specializzazione parassitaria legata a una serinproteasi (VCP1) attiva nelle prime fasi di penetrazione dell'ifa nell'uovo. Questo enzima è presente con varianti dovute, nel gene codificante, a polimorfismi che, cambiando la composizione amminoacidica dell'enzima, ne alterano la conformazione molecolare e la relativa funzionalità. La VCP1 mostra, negli isolati provenienti da nematodi galligeni, maggiore efficacia nella lisi della cuticola di *Meloidogyne*, mentre altre varianti, presenti in isolati provenienti da nematodi cisticoli del genere *Heterodera*, mostrano maggior efficacia sulla cuticola di queste specie (Morton et al., 2003). Questa specializzazione parassitaria suggerisce un'approfondita conoscenza degli isolati da utilizzare e dei nematodi bersaglio, prima di avviare un programma applicativo con questo fungo.

Altri fattori devono essere considerati nella selezione dei funghi nematofagi da applicare, come la presenza di clamidospore, che conferisce una maggiore longevità del preparato e facilità di dosaggio. Questo fattore favorisce *P. chlamydosporia* rispetto ad altri fomiceti, per via del gran numero di clamidospore che alcuni isolati producono. In *H. rhossiliensis* la trasmissione della spora al nematode è influenzata dal potenziale della soluzione circolante nel terreno. Questo fungo è densità-dipendente, ma può estinguersi in assenza dell'ospite e sviluppa epidemie locali in tempi molto lunghi (Jaffee, 1992). Un fattore importante è la dimensione dei pori del terreno, e quindi la sua struttura, poiché l'infezione dell'ospite avviene attraverso conidi infettivi posti all'apice di una fialide, prodotta perpendicolarmente all'ifa. Il diametro dei pori del terreno in cui l'ifa e le fialidi vengono esposte influenza il parassitismo. In terreni sabbiosi, con pori (e particelle) di grandi dimensioni, la probabilità del parassitismo è inferiore rispetto a quanto osservabile in terreni limosi, dato che un maggior volume aumenta la probabilità dell'ospite

di evadere l'infezione passiva. In terreni molto compatti, viceversa, la scarsa mobilità dei nematodi rende meno probabile l'adesione delle spore (Jaffee et al., 1990). *Hirsutella rhossiliensis* è stata rinvenuta in Italia in associazione a nematodi Longidoridae (Ciancio et al., 1986) e risulta endemica in Sicilia e in Campania, dove è stata anche osservata su *Heterodera daverti* e larve di *H. goettingiana*.

Infine, un fattore importante da considerare nell'approccio sperimentale riguarda la conoscenza approfondita della biologia degli antagonisti e delle caratteristiche proprie degli organismi con cui interagire. Per *P. chlamydosporia*, ad esempio, oltre la specificità parassitaria, è nota la variabilità degli isolati nella capacità di colonizzare terreno e rizosfera, e come questo fattore risenta della presenza degli apparati radicali delle piante utilizzate nella rotazione (Bourne et al., 1994). Un ulteriore fattore da considerare è l'impatto ambientale di queste specie, e la potenziale attività contro altri organismi o specie superiori, incluso l'uomo. Alcuni funghi considerati nematofagi sono patogeni per l'uomo, e questi fattori possono essere importanti. Per le ragioni pratiche e applicative citate, il monitoraggio di un isolato dopo la sua introduzione nell'ambiente è, pertanto, un fattore chiave: sono oggi disponibili tecnologie basate sulla PCR di geni specifici e sul riconoscimento di particolari regioni del DNA presenti in una sola specie o un isolato (Hirsch et al., 2001; Mauchline et al., 2002; Ciancio et al., 2005). È inoltre possibile monitorare *P. chlamydosporia* dopo il suo inoculo, estraendo il DNA dal terreno con tecniche specifiche come l'ibridazione con sonde (dot-blot) o la PCR in tempo reale (Rosso et al., 2007).

### 3. PROSPETTIVE PER LA RICERCA E APPLICAZIONI PRATICHE DI FONTI DI RESISTENZA

Resistenza è un termine generalmente usato per descrivere la capacità delle piante di limitare o sopprimere lo sviluppo e la riproduzione dei nematodi. Tuttavia, in molti casi, esso può significare anche l'assenza di malattie o di sintomi specifici nella pianta, associati ai nematodi. La resistenza genetica è un carattere legato alla presenza di specifici geni nel genoma dell'ospite, definiti geni *R* e può essere "verticale" ovvero "orizzontale". La resistenza verticale è solitamente controllata da un gene dominante ed è specie-specifica. Tuttavia, in qualche caso, essa può essere valida solo per delle varianti intra-specifiche dei nematodi, come razze, patotipi e biotipi. Al contrario, la resistenza orizzontale è poligenica e risulta determinata da parecchi geni minori,



che conferiscono, con effetti additivi, una resistenza quantitativa più larga ai nematodi.

La resistenza genetica è considerata uno dei migliori metodi per il controllo integrato dei nematodi nella pratica agricola ed è stata spesso preferita ad altri metodi comunemente adottati, quali la lotta chimica, biologica o le rotazioni colturali (Barker et al., 1994). Le cultivar resistenti garantiscono il potenziale di resa di una coltivazione in quanto la resistenza consente di migliorare la produzione in campi infestati con densità di popolazione dei parassiti che eccedono la soglia di danno (Sikora *et al.*, 2005). Inoltre, innovative applicazioni di miglioramento genetico hanno permesso di ottenere genotipi resistenti per colture quali cotone, arachide, soia, etc., con un potenziale di resa uguale a quello delle più produttive cultivar suscettibili (Starr et al., 2002). Oltre a essere un metodo a impatto ambientale nullo, l'uso della resistenza da parte dei produttori prevede un minimo costo diretto e si adatta quindi a tutti i sistemi di produzione agricola, sia intensivi che di sussistenza.

Tuttavia, anche l'uso della resistenza genetica presenta vari problemi che rappresentano una difficile sfida per la ricerca futura nel settore. Uno dei maggiori inconvenienti è l'attuale scarsa disponibilità di fonti di resistenza da usare nella pratica agricola. Solo per poche importanti coltivazioni sono oggi in commercio cultivar resistenti ai nematodi, valide per la produzione di mercato. Tutte, inoltre, presentano resistenza ai soli endoparassiti sedentari, quali i nematodi galligeni (genere *Meloidogyne*) o cisticoli (generi *Heterodera* e *Globodera*). Questi, tuttavia, sono i generi che causano i più ingenti danni economici a livello mondiale. Si riportano esempi di uso corrente negli Stati Uniti di cultivar di tabacco, pomodoro e cotone resistenti a varie specie di *Meloidogyne* e di soia resistente a *H. glycines*, mentre, nell'Europa del Nord, sebbene l'introduzione di patata resistente a *G. rostochiensis* ha avuto successo, essa ha altresì portato alla maggior diffusione della specie vicina *G. pallida*, contro cui l'applicazione della resistenza genetica sta mostrando effetti molto più limitati (Starr e Roberts, 2004). Al contrario, nessuna resistenza a importanti specie di nematodi, specialmente nell'ambito degli ectoparassiti migratori, è stata rinvenuta finora in specie economicamente importanti, mentre la si è trovata solo in specie selvatiche o genotipi non sfruttabili.

Questa scarsità di fonti di resistenza utilizzabili è dovuta al fatto che gran parte delle risorse genetiche disponibili deve ancora essere caratterizzata per la resistenza ai nematodi. Per molte specie, inoltre, non vi è ancora sufficiente germoplasma disponibile in collezione. Individuare il carattere di resistenza in una cultivar o accessione in collezione con i biosaggi attualmente in uso è un'operazione estremamente complessa, di difficile interpretazione e

che prevede tempi lunghi. Pertanto, la ricerca si è da tempo indirizzata alla produzione di marcatori molecolari di resistenza, che possono essere frammenti di DNA strettamente associati ai geni di resistenza o proteine e attività enzimatiche, associate alla reazione resistente delle piante (Abd-Elgawad e Molinari, 2008). I vantaggi di una selezione con marcatori molecolari (marker-assisted selection, MAS) rispetto a quella per mezzo di laboriosi biosaggi (che prevedono la crescita di piantine e la produzione di un inoculo valido, l'inoculazione in vaso con uova o larve e il tempo di sviluppo dei parassiti), sono enormi. Tentativi concreti di MAS sono già stati eseguiti: per la soia, in particolare, la selezione si è basata con successo sul locus genetico *rhg1* con marcatori molecolari del tipo SSR (simple sequence repeat) o microsatelliti (Young e Mudge, 2002).

Una volta che gruppi di DNA marcatori evidenziano una stretta associazione al gene *R* di resistenza da isolare, con tecniche di “cammino sul cromosoma” (*chromosome walking*), è possibile identificare, clonare, sequenziare e caratterizzare il gene. A tutt'oggi, circa 15 geni per la resistenza a nematodi endoparassiti risultano clonati o identificati in mappe genetiche (Williamson e Kumar, 2006). Il primo gene di resistenza ai nematodi a essere clonato è stato *HS1<sup>pro-1</sup>*, dalla barbabietola da zucchero (genere *Beta*). Esso conferisce resistenza al nematode cisticolo *Heterodera schachtii*. L'interazione pianta-nematode più studiata, invece, è quella dei nematodi galligeni (*Meloidogyne*) col pomodoro, il cui gene *Mi* conferisce la resistenza alle tre specie più diffuse, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*. Esso è attualmente uno dei geni di resistenza ai nematodi meglio caratterizzati (Williamson, 1998). *Mi* è l'unico gene noto finora che conferisce resistenza anche a organismi molto diversi dai nematodi, quali l'afide della patata e la mosca bianca, che hanno però un habitus nutrizionale analogo a quello dei nematodi, che prevede la puntura e l'assunzione degli alimenti dalle cellule penetrate con uno stiletto.

Lo scopo pratico dell'isolamento dei geni *R* di resistenza ai nematodi consiste nel loro trasferimento alle varietà di colture economicamente importanti, per le quali la resistenza non è disponibile. Se le piante transgeniche esprimessero una resistenza effettiva contro i nematodi in condizioni di campo, ci sarebbe inoltre la possibilità reale, tramite tecniche di manipolazione genetica, di una drastica riduzione nell'uso di nematocidi altamente tossici e pericolosi per la salute umana e l'ambiente. Al momento, seppure in condizioni controllate di laboratorio, solo il trasferimento intraspecifico di geni di resistenza ha avuto successo, mentre gli stessi geni hanno mostrato un'efficienza limitata se trasferiti in specie diverse. Ad esempio, il gene *Mi-1* conferisce una resistenza effettiva se trasferito in pomodoro suscettibile, ma non funziona se introdotto

nel tabacco o in *Arabidopsis*. Lo stesso gene conferisce resistenza ai nematodi ma non agli afidi della patata, se viene introdotto in melanzana (Williamson e Kumar, 2006). Le prospettive di ricerca in questo settore, quindi, sono indirizzate soprattutto alla disponibilità di validi marcatori molecolari per una rapida selezione nei programmi di miglioramento genetico o screening di collezioni genetiche, e allo studio di tutti i fattori che rendano ottimale la modificazione genetica di piante suscettibili, con i geni isolati.

### 3.1 *Problematiche legate all'insorgenza di popolazioni virulente: l'esempio di Meloidogyne spp.*

Se la resistenza genetica appare come uno dei metodi migliori per il controllo dei nematodi, l'eventuale bassa durabilità è uno degli aspetti più problematici che può vanificarne l'applicazione. Una delle minacce più gravi all'efficienza dei geni di resistenza è l'insorgenza di popolazioni di nematodi in grado di svilupparsi e moltiplicarsi anche su ospiti resistenti. Queste costituiscono le cosiddette popolazioni virulente. Nei nematodi galligeni (*Meloidogyne* spp.) esse sono molto studiate, per via dell'importante ricaduta economica (Starr e Roberts, 2004).

La virulenza potrebbe essere collegata alla mancanza o modificazione di quei prodotti genici dei nematodi la cui presenza "avverte" la pianta per mezzo dei prodotti dei geni-*R*. Più probabilmente, la virulenza può essere dovuta alla modifica di certe funzioni che consentono al nematode di evitare o tamponare la risposta di resistenza della pianta, per esempio producendo antiossidanti o potenziando il proprio sistema antiossidativo o alterando il bilancio ormonale per compromettere la risposta di difesa. A conferma è stato osservato che specie quali *M. hapla* o *M. mayaguensis*, che si riproducono su pomodoro che porta il gene *Mi*, o isolati di *M. incognita* selezionati in serra per la virulenza, hanno attività di enzimi antiossidanti quali superossidodismutasi, catalasi e perossidasi, molto più alte che popolazioni avirulente (Molinari e Miacola, 1997; Molinari, non pubbl.).

Popolazioni di *Meloidogyne* virulente possono essere selezionate in serra da popolazioni di campo avirulente, per mezzo d'inoculi ripetuti su pomodoro resistente. Inoltre, varie popolazioni in campo mostrano una virulenza "naturale" senza essere sottoposte a selezione mediante esposizione al gene *Mi* (Roberts, 1995). In campo ci sono casi in cui lunghe esposizioni alla stessa cultivar di pomodoro resistente possono o no determinare l'insorgenza di popolazioni in grado di superare la resistenza (Noling, 2000; Rich e Ol-

son, 1999). Inoltre, esistono popolazioni in grado di originare linee virulente, mentre altre popolazioni non ne sono capaci (Jarquin-Barberena et al., 1991). Anche se il gene *Mi* è presente in cultivar usate nella pratica agricola da più di vent'anni, la sua durabilità potrebbe quindi essere minacciata nel prossimo futuro dal rinvenimento di popolazioni virulente, la cui frequenza sta progressivamente incrementando.

### 3.2 *Potenzialità degli attivatori chimici di resistenza*

In casi di accertata presenza di popolazioni virulente e di conseguente inefficacia nell'uso di cultivar resistenti, grosse potenzialità potrebbero avere gli attivatori chimici di resistenza quali l'acido salicilico e i suoi analoghi, responsabili nelle piante della cosiddetta resistenza sistemica acquisita (Systemic Acquired Resistance, SAR) (Durrant e Dong, 2004). Quando la SAR è attivata, un'interazione pianta-patogeno normalmente compatibile, cioè risultante in una malattia dell'ospite, può essere resa incompatibile. Pochi studi sono stati condotti finora per accertare se la SAR sia indotta sistemicamente anche da un'infestazione di nematodi e soprattutto se essa possa essere indotta naturalmente o chimicamente, tramite trattamento con acido salicilico o suoi analoghi chimici, per parassiti che attaccano le radici (Molinari, 2007). Studi preliminari hanno recentemente appurato che particolari applicazioni con acido salicilico possono indurre, nel pomodoro, resistenza a nematodi galligeni (Molinari, 2008a; 2008b).

## 4. APPLICAZIONE E SVILUPPO DI METODI AGRONOMICI DI DIFESA: BIOFUMIGAZIONE, SOVESCI E SOSTANZE DI ORIGINE NATURALE

Il metabolismo vegetale produce centinaia di migliaia di principi biologicamente attivi, in gran parte non ancora identificati, con un ruolo trascurabile nei processi fisiologici primari della pianta ma determinanti per le relazioni interspecifiche della stessa e in primo luogo nella difesa della pianta da patogeni e parassiti. Tali sostanze sono di diversa natura chimica (per es. terpenoidi, alcaloidi, glicosidi, fenoli, tannini, ecc.) e possono costituire un'ampia riserva di principi attivi potenzialmente utilizzabili contro i nematodi fitoparassiti (Chitwood, 2002).

I meccanismi d'azione con cui tali molecole esplicano la loro attività nematocida o nematostatica possono essere differenti. Alcuni metaboliti sono in

grado di determinare un'interruzione temporanea o permanente dell'alimentazione del parassita, altri inducono cambiamenti morfologici o fisiologici, mentre per altri principi l'attività può essere semplicemente di tipo repellente. Inoltre, alcune specie vegetali possono agire come "piante trappola", impedendo il completamento del ciclo vitale e la riproduzione del nematode all'interno delle radici.

A dimostrazione dell'enorme potenziale offerto dalle specie vegetali per strategie sostenibili di lotta contro i nematodi fitoparassiti, viene di seguito riportata una rapida rassegna dei principali raggruppamenti botanici cui appartengono specie ad attività nematocida.

#### 4.1 *Sostanze attive ad azione nematocida*

Alla famiglia delle Asteracee appartengono numerose specie ad attività nematocida, ma tra queste le più note sono sicuramente quelle del genere *Tagetes*, che agiscono inizialmente come piante trappola e quindi anche con sostanze nematotossiche contenute nei tessuti (Uhlenbroek e Bijloo, 1959). Le specie a più spiccata azione nematocida, sebbene variabile in relazione al nematode bersaglio, sono *T. erecta*, *T. patula* e *T. minuta* (Ploeg, 1999). Tra le altre Compositae, il genere *Chrysanthemum* ha evidenziato spiccate proprietà nematocide contro nematodi galligeni (Bar-Eyal et al., 2006), ma una buona attività contro diverse specie di nematodi è stata rinvenuta anche in specie appartenenti ai generi *Helenium*, *Gaillardia*, *Eryophyllum* e *Zinnia* (Hijink e Winoto Suatmadji, 1967). I flavonoidi presenti nei tessuti di varie *Artemisia* spp. sembrano inoltre essere responsabili delle proprietà nematocide osservate per tali specie (Sherif et al., 1987).

L'azione nematocida di specie di Cruciferae era già stata riportata nella prima metà del secolo scorso su nematodi cisticoli come *G. rostochiensis* (Ellenby, 1945) e *H. schachtii* (Den Ouden, 1956). L'attività biocida delle Brassicaceae è connessa al loro elevato contenuto in glucosinolati, metaboliti secondari la cui degradazione idrolitica genera componenti volatili quali isotiocianati e nitrili, altamente tossici verso nematodi e funghi. Il potenziale nematocida di tali specie è stato rivalutato negli ultimi decenni grazie agli studi sulla biofumigazione, ovvero l'effetto fumigante generato dai suddetti componenti volatili, derivante dall'interramento della massa verde, o precedentemente essiccata, di crucifere (Mojtahedi et al., 1991).

Numerose specie di Leguminosae tropicali, quali *Crotalaria* spp., *Mucuna* spp. e altre, mostrano un'attività nematocida quando sono incluse in rota-

zioni colturali o vengono utilizzate come sovescio verde (Reddy *et al.*, 1986; Kushida *et al.*, 2003). L'azione soppressiva sembra essere connessa essenzialmente alla produzione di metaboliti tossici o allo sviluppo sulle radici di una specifica microflora batterica in grado di esercitare un effetto soppressivo sulla nematofauna (Kloepper *et al.*, 1991). Tra le leguminose dei climi temperati, il sovescio di foglie e fusti di medica (*Medicago sativa*) e soia (*Glicine max*) ha ridotto la schiusura delle uova di *M. incognita* (Johnson e Shamiyeh, 1975), mentre estratti fogliari di *Phaseolus vulgaris* sono risultati tossici per *Tylenchorhynchus dubius* (Miller *et al.*, 1973).

Contro *Pratylenchus penetrans* e *M. incognita* sono risultati efficaci essudati radicali, estratti fogliari e olii essenziali di numerose specie spontanee o coltivate di Graminacee, quali *Brachiaria* spp., *Cymbopogon* spp., *Digitaria decumbens* (Brito e Ferraz, 1987; Haroon e Smart, 1983), così come il sovescio di biomasse verdi o essiccate di avena (Merwin e Styles, 1989). I prodotti d'idrolisi dei glicosidi presenti in *Sorghum* spp. sembrano essere all'origine dell'azione soppressiva conseguente al sovescio verde di tali piante (Widmer e Abawi, 2000).

Gli olii essenziali presenti in un gran numero di specie vegetali sono in grado di svolgere una intensa attività biocida (Malik *et al.*, 1987). In particolare, vanno ricordate numerose specie aromatiche della famiglia delle Lamieacee (*Mentha* spp., *Ocimum* spp., *Oreganum* spp.) i cui olii essenziali hanno mostrato, sia in laboratorio che nel terreno, una spiccata azione biocida nei confronti di nematodi galligeni (Oka *et al.*, 2000; Walker e Melin, 1996).

Alle Meliaceae appartiene una specie arborea, il neem (*Azadirachta indica*), da secoli nota per la ricchezza delle sue proprietà biologiche e per la sua azione insetticida. Negli ultimi decenni numerosi studi hanno dimostrato la tossicità, contro varie specie di nematodi fitoparassiti, di olii, estratti, foglie, radici ed essudati radicali di questa specie (Akhtar, 2000). Numerose formulazioni nematocide a base di olii di neem sono già commercialmente disponibili. Le basi chimiche della sua attività nematocida sono complesse e non ancora ben chiarite, sebbene steroidi e terpenoidi, in particolare l'azadiractina, appaiano come i principali componenti di tale attività.

Un'altra specie arborea che ha recentemente dato origine allo sviluppo industriale di formulati nematocidi è la quillaja (*Quillaja saponaria*), il cui estratto acquoso corticale presenta un elevato contenuto in saponine e tanini, responsabili dell'attività soppressiva osservata contro nematodi galligeni (D'Addabbo *et al.*, 2005). Più in generale, le saponine, glicosidi di steroidi e triterpenoidi, sono sostanze presenti in molte famiglie botaniche e in grado di svolgere un'elevata attività nematocida (Argentieri *et al.*, 2008).

Molte Solanaceae hanno evidenziato attività soppressiva su varie specie fitoparassite (Haseeb e Butool, 1996), e le specie con il maggior potenziale nematocida, riconducibile all'elevato contenuto in alcaloidi, appartengono al genere *Datura* spp. (Saxena e Sharma, 2005). La presenza di alcaloidi biologicamente attivi è anche alla base dell'azione soppressiva su nematodi galligeni di estratti acquosi e masse verdi sovesciate delle specie arbustiva *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) (Reina et al., 2002) e *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) (Mashela et al., 2007), sebbene nei tessuti di quest'ultima specie siano stati identificati anche altri componenti attivi, quali flavonoidi e tannini.

Un elevato contenuto in componenti attivi contro i nematodi, quali olii essenziali, saponine, flavonoidi ed esteroidei, è inoltre responsabile dell'attività fungicida, battericida, insetticida e anche nematocida riscontrata nel genere *Chenopodium* spp. (Chenopodiaceae), e in particolare in *C. ambrosioides* (Quarles, 1992).

Alla famiglia delle Rutaceae appartiene infine una specie, *Ruta graveolens*, largamente studiata per la sua attività nematocida, in particolare su nematodi galligeni (D'Addabbo e Sasanelli, 2004). In tale raggruppamento botanico, inoltre, rientrano numerose altre specie che, per il loro contenuto in olii essenziali, presentano un elevato potenziale nematocida.

#### 4.2 Applicazione e utilizzo dell'azione nematocida

Le modalità tecniche per uno sfruttamento concreto dell'azione nematocida di queste specie vegetali possono essere di tipo agronomico o industriale. L'utilizzo agronomico può prevedere l'uso in coltura intercalare o in rotazione con colture suscettibili, ovvero un sovescio della massa verde o il suo impiego come pacciamatura della superficie coltivata. L'utilizzo industriale fa riferimento al condizionamento della massa verde per la preparazione di granulati o pellets da distribuire al terreno o all'impiego di un principio attivo per la preparazione di formulati commerciali.

L'individuazione di un principio nematocida di origine vegetale può seguire due differenti approcci (Harvey, 2000). Una prima modalità parte dall'osservazione di un'attività nematostatica o nematocida in una specie vegetale e prosegue attraverso l'isolamento, la caratterizzazione chimica e il successivo saggio biologico dei componenti attivi presenti nella pianta. Un secondo approccio consiste nel procedere casualmente all'isolamento, identificazione e saggio biologico di principi attivi, visto che è molto probabile che i prodotti del metabolismo secondario siano coinvolti nelle interazioni pianta – nematode.

In ogni caso, pochi principi attivi arrivano alla formulazione commerciale, poiché numerosi fattori possono condizionarne lo sviluppo e la commercializzazione. Un primo aspetto da considerare è la brevettabilità di una sostanza, che può essere complicata da una preventiva pubblicazione di dati sulle sue proprietà nematocide. Occorre poi considerare le proprietà tossicologiche e ambientali del principio attivo, visto che la sua origine naturale non ne garantisce la sanità per l'uomo e l'ambiente. Altro elemento condizionante è la possibilità di estrazione in quantitativi elevati, necessari per condurre saggi biologici più estensivi.

Tra i possibili metodi di produzione di una sostanza nematocida di origine vegetale le opzioni tecnicamente ed economicamente più interessanti sono fornite dalle tecniche di biosintesi, quali la produzione su colture cellulari o tessuti, ovvero il trasferimento dell'informazione genica relativa alla sintesi del principio in microrganismi o direttamente nella pianta da proteggere. Il vantaggio principale della produzione su colture cellulari o tissutali è costituito dalla rapida selezione di linee cellulari in grado di produrre più elevati livelli del metabolita, mentre gli aspetti negativi sono legati alla stabilità genetica del materiale usato (Alfermann et al., 2003). Il trasferimento dell'informazione genica in un microrganismo consente la produzione del principio attivo mediante normali fermentazioni, ma non è utilizzabile per metaboliti secondari complessi, in cui numerosi geni siano coinvolti nella conversione di prodotti intermedi nel prodotto desiderato. Peraltro, la manipolazione transgenica del metabolismo di una pianta può risultare assai complessa e portare a scarsi risultati, per cui un'alternativa più semplice può essere quella di trasferire in microrganismi l'informazione relativa alla sintesi del principio attivo (Verpoorte e Memelink, 2002).

## 5. CONCLUSIONI

Abbiamo oggi a disposizione un ampio ventaglio di conoscenze, suscettibili di sviluppo applicativo e/o industriale per esplorare e integrare diverse strategie di controllo dei nematodi fitoparassiti. A tal fine i prodotti e le tecnologie sviluppabili devono necessariamente caratterizzarsi per costi di produzione contenuti, ma anche per efficacia, facilità d'uso e innocuità nei confronti dell'uomo e dell'ambiente.

Le tecnologie per la protezione "biologica" delle colture potranno inoltre integrare nel futuro altri metodi avanzati, incluso la prevenzione o esclusione del parassita, ovvero metodi di recente introduzione come il "precision far-



ming”. Considerando il progresso dell’elettronica di consumo e l’integrazione attuale dei sistemi informativi è possibile anche ipotizzare futuri scenari di monitoraggio in tempo reale e di flussi di dati che, dal campo coltivato, possano informare il produttore o il consumatore, anche per quanto riguarda lo stato fitosanitario e la protezione di una coltura. Inoltre, sono molteplici i vantaggi per l’economia, l’ambiente e la società nonché le implicazioni legate allo sviluppo di prodotti e processi per la gestione dei problemi causati dai nematodi fitoparassiti. Grazie ai microrganismi, alle piante resistenti o ai più efficaci principi attivi di origine naturale possono emergere nuovi settori produttivi industriali e nuovi prodotti. Se le aspettative del mercato permangono in crescita, è infine possibile attendersi un’auspicabile riduzione dell’impatto ambientale derivante dai trattamenti con prodotti di sintesi, con un maggior standard di sicurezza per operatori e consumatori.

#### RIASSUNTO

Vengono descritte le innovazioni relative alle attuali possibilità di difesa delle colture dai principali nematodi fitoparassiti. Per i nematodi vettori di virus, le strategie di difesa si basano sempre sulla prevenzione con l’uso di materiale certificato esente da virus, che trae vantaggio dai moderni metodi di diagnosi molecolare. Per la vite, prospettive interessanti possono derivare anche dalla ricerca sui portinnesti resistenti a GFLV e/o al suo vettore, *Xiphinema index*. Per i nematodi galligeni o cisticoli, diverse metodologie possono essere prese in considerazione e integrate. Vengono illustrati aspetti teorici per l’uso di antagonisti biologici, come la modellistica, e pratico-applicativi, relativi alla biologia dei principali funghi e batteri. Vengono quindi prese in esame le problematiche legate alla disponibilità di geni di resistenza, all’insorgenza di popolazioni virulente e alle potenzialità degli attivatori chimici. Ulteriori innovazioni derivano dall’applicazione e sviluppo di metodi agronomici di difesa come la biofumigazione e l’uso di sostanze di origine naturale, di cui sono brevemente illustrate l’azione nematocida e le applicazioni.

#### ABSTRACT

The innovations related to the possibilities actually available for control of main plant parasitic nematodes are described. For virus vectoring nematodes, protection strategies should always rely on prevention, through the exploitation of plants certified as virus exempt, which benefits from the modern methods of molecular diagnostics. For grapevine, interesting perspectives may result from the research on rootstocks resistant to GFLV and/or its vector, *Xiphinema index*. For root-knot or cyst nematodes several methodologies may be considered and integrated. The use of biological antagonists is reviewed, discussing theoretical aspects like modelling and practical ones, as those related to the biology of main fungi and bacteria. The problems concerning the availability of resistance genes, the

insurgence of virulent populations and the potentialities of chemical activators are then reviewed. Further innovations result from the application and development of agronomic practices of crop protection, like biofumigation and the use of natural compounds, whose nematocidal activity and applications are briefly illustrated.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABD-ELGAWAD M.M., MOLINARI S. (2008): *Markers of plant resistance to nematodes: classical and molecular strategies*, «Nematologia mediterranea», 36, pp. 3-11.
- AKHTAR M. (2000): *Nematicidal potential of the neem tree Azadirachta indica (A. Juss)*, «Integrated Pest Management Review», 5, pp. 57-66.
- ALFERMANN A.W., PETERSEN M., FUSS E. (2003): *Production of natural products by plant cell biotechnology: results, problems and perspectives*, in *Plant tissue culture, 100 years since Gottlieb Haberlandt*, a cura di M. Laimer e W. Rücker, Springer, Wien/New York.
- ANDERSON R.M., MAY R.M. (1981): *The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts*, «Philosophical Transactions of the Royal Society of London», 291, pp. 451-524.
- ARGENTIERI M.P., D'ADDABBO T., TAVA A., AGOSTINELLI A., JURZYSTA M., AVATO P. (2008): *Evaluation of nematocidal properties of saponins from Medicago spp.*, «European Journal of Plant Pathology», 120, pp. 189-197.
- ATIBALENTJA N., NOEL G.R., LIAO T.F., GERTNER G.Z. (1998): *Population changes in Heterodera glycines and its bacterial parasite Pasteuria sp. in naturally infested soil*, «Journal of Nematology», 30, pp. 81-92.
- BAR-EYAL M., SHARON E., SPIEGEL Y. (2006): *Nematicidal activity of Chrysanthemum coronarium*, «European Journal of Plant Pathology», 114, pp. 427-433.
- BARKER K.R., HUSSEY R.S., KRUSBERG L.R., BIRD G.W., DUNN R.A., FERRIS H., FERRIS V.R., FRECKMAN D.W., GABRIEL C.J., GREWAL P.S., MACGUIDWIN A.E., RIDDLE D.L., ROBERTS P.A., SCHMITT D.P. (1994): *Plant and soil nematodes: societal impact and focus for the future*, «Journal of Nematology», 26, pp. 127-137.
- BELIN C., SCHMITT C., DEMANGEAT G., KOMAR V., PINCH L., FUCHS, M. (2001): *Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector Xiphinema index*, «Virology», 291, pp. 161-171.
- BICA D., NICOLOSI E., COSTA A., COLOMBO A., BUONOCORE E. (2002): *Indagine sulla presenza dei principali virus e nematodi della vite in Sicilia*, «Informatore fitopatologico», 52, pp. 64-67.
- BOUQUET A., HEVIN M. (1978): *Green-grafting between Muscadine grape (Vitis rotundifolia Michx) and bunch grapes (Euvitis sp.) as a tool for physiological and pathological investigations*, «Vitis», 17, pp. 134-138.
- BOUQUET A. (1980): *Differences observed in the graft compatibility between some cultivars of Muscadine grape (Vitis rotundifolia Michx) and European grape (Vitis vinifera L. cv. Cabernet-Sauvignon)*, «Vitis», 19, pp. 99-104.
- BOUQUET A., TORREGROSA L., CHATELET, P. (2003): *Combinaison des approches biotechnologiques et conventionnelles dans la sélection de porte-greffes présentant une résistance durable à la transmission de la maladie du court-noué*, «Progress in Agriculture and Viticulture», 120, pp. 507-512, 528-532.

- BOURNE J.M., KERRY B. R., DE LEIJ F.A.A.M. (1994): *Methods for the study of Verticillium chlamydosporium in the rhizosphere. Workshop: Organisms and methods for biological control*, «Journal of Nematology», 26 (Suppl.), pp. 587-591.
- BRITO J.A., FERRAZ S. (1987): *Seleção de gramíneas antagonistas a Meloidogyne javanica*, «Nematologia Brasileira», 11, pp. 260-269.
- CATALANO L., SAVINO V., LAMBERTI, F. (1992): *Presence of grapevine fanleaf nepovirus in populations of Longidorid nematodes and their vectoring capacity*, «Nematologia mediterranea», 20, pp. 67-70.
- CAYROL J. C. (1983): *Lutte biologique contre le Meloidogyne au moyen d'Arthrobotrys irregularis*, «Revue de Nématologie», 6, pp. 265-273.
- CETINTAS R., LIMA R.D., MENDES M. L., BRITO J.A., DICKSON, D.W. (2003): *Meloidogyne javanica on Peanut in Florida*, «Journal of Nematology», 35, pp. 433-436.
- CHEN J., ABAWI G. S., ZUCKERMAN B. M. (1999): *Suppression of Meloidogyne hapla and its damage to lettuce grown in a mineral soil amended with chitin and biocontrol organisms*, «Journal of Nematology (Suppl.)», 31, pp. 719-725
- CHITWOOD D.J. (2002): *Phytochemical based strategies for nematode control*, «Annual Review of Phytopathology», 40, pp. 221-249.
- CIANCIO A., LOGRIECO A., LAMBERTI F. (1986): *Parasitism of Xiphinema diversicaudatum by the fungus Hirsutella rhossiliensis*, «Nematologia mediterranea», 14, pp. 187-192.
- CIANCIO A. (1995a): *Phenotypic adaptations in Pasteuria spp. nematode parasites*, «Journal of Nematology», 27, pp. 328-338.
- CIANCIO A. (1995b): *Density dependent parasitism of Xiphinema diversicaudatum by Pasteuria penetrans in naturally infested soil*, «Phytopathology», 85, pp. 144-149.
- CIANCIO A. (1996): *Osservazioni sulle potenzialità di Pasteuria penetrans nella lotta biologica contro i nematodi*, «Nematologia mediterranea», 24, pp. 143-147.
- CIANCIO A. (2000): *Nematodi, lotta biologica e caos*, «Nematologia mediterranea (Suppl.)», 28, pp. 99-106.
- CIANCIO A., QUENEHERVÉ P. (2000): *Population dynamics of Meloidogyne incognita and infestation levels by Pasteuria penetrans in a naturally infested field in Martinique*, «Nematropica», 30, pp. 77-86.
- CIANCIO A., LOFFREDO A., PARADIES F., TURTURO C., FINETTI SIALER M. (2005): *Detection of Meloidogyne incognita and Pochonia chlamydosporia by fluorogenic molecular probes*, «EPPO Bulletin», 35, pp. 157-164.
- D'ADDABBO T., SASANELLI N. (2005): *Suppressive effect of different plant formulations on populations of the Southern root-knot nematode Meloidogyne incognita*, «Nematologia mediterranea (Suppl.)», 33, pp. 47-50.
- D'ADDABBO T., CURTO G., GRECO P., DI SILVESTRO D., COIRO M.I., LAMBERTI F., FERRARI V., SANTI R., CARELLA A. (2005): *Prove preliminari di lotta contro nematodi galligeni mediante estratti di Quillaja saponaria Molina*, «Nematologia mediterranea», 33, pp. 29-34.
- DE LEIJ F.A.A.M., KERRY B.R., DENNEHY J.A. (1993): *Verticillium chlamydosporium as a biological control agent for Meloidogyne incognita and M. hapla in pot and micro-plot tests*, «Nematologica», 39, pp. 115-126.
- DECRAEMER W., ROBBINS R.T. (2007): *The who, what and where of Longidoridae and Trichodoridae*, «Journal of Nematology», 39, pp. 296-297.
- DEN OUDEN H. (1956): *The influence of hosts and non-susceptible hatching plants on populations of Heterodera schachtii*, «Nematologica», 1, pp. 138-144.
- DURRANT W.E., DONG X. (2004): *Systemic acquired resistance*, «Annual Review of Phytopathology», 42, pp. 185-209.

- ELLENBY C. (1945): *The influence of crucifers and mustard oil on the emergence of larvae of the potato-root eelworm, Heterodera rostochiensis*, «Annals of Applied Biology», 32, pp. 67-70.
- ESMENJAUD D., WALTER B., MINOT J.C., VOISIN R., CORNUET P. (1993): *Biotin-avidin ELISA detection of Grapevine fanleaf virus in the vector nematode Xiphinema index*, «Journal of Nematology», 25, pp. 401-405.
- ESMENJAUD D., ABAD P., PINCK L., WALTER B. (1994): *Detection of a region of the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus by RT-PCR in the nematode vector Xiphinema index*, «Plant Disease», 78, pp. 1087-1090.
- ESMENJAUD D., BOUQUET A. (2008): *Selection and application of resistant germplasm for grapevine nematodes management*, in *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes*, a cura di A. Ciancio e K. G. Mukerji, eds., Springer, NL: in press.
- GALEANO M., VERDEJO-LUCAS S., CIANCIO A. (2003): *Morphology and ultrastructure of a Pasteuria form parasitic in Tylenchorhynchus cylindricus (Nematoda)*, «Journal of Invertebrate Pathology», 83, pp. 83-85.
- GASPARD J.T., MANKAU R. (1987): *Density-dependence and host-specificity of the nematode-trapping fungus Monacrosporium ellipsosporum*, «Revue de Nématologie», 10, pp. 241-246.
- GIBLIN-DAVIS R.M., WILLIAMS D.S., BEKAL S., DICKSON D.W., BRITO J.A., BECKER J.O., PRESTON J.F. (2003): *Candidatus 'Pasteuria usgae' sp. nov., an obligate endoparasite of the phytoparasitic nematode Belonolaimus longicaudatus*, «International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology», 53, pp. 197-200.
- GOWEN S. R., TZORTZAKAKIS E. (1992): *Biological control of Meloidogyne spp. with Pasteuria penetrans*, «EPPO Bulletin», 24, pp. 495-500.
- GOWEN S., DAVIES K.G., PEMBROKE B. (2008): *Potential use of Pasteuria spp. in the management of plant parasitic nematodes*, in *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*, a cura di A. Ciancio e K. G. Mukerji, Springer, NL, pp. 205-219.
- HAROON S., SMART G.C. JR. (1983): *Root extracts of Pangola digitgrass affect egg hatch and larval survival of Meloidogyne incognita*, «Journal of Nematology», 15, pp. 646-649.
- HARRIS, A. R. (1988): *Xiphinema index-resistant Vitis rootstocks screened for comparative field performance in a Chasselas vineyard replant site*, «Vitis», 27, pp. 243-251.
- HARVEY A. (2000): *Strategies for discovery drugs from previously unexplored natural products*, «Drug Discovery Today», 5, pp. 294-300.
- HASEEB A., BUTOOL F. (1996): *Evaluation of nematicidal properties of some members of the family Solanaceae*, «Bioresource Technology», 57, pp. 95-97.
- HASSEL M. P. (1978): *The dynamics of arthropod predator-prey systems*, Princeton University Press, USA, 237 pp.
- HIJINK M.J., WINOTO SUATMADJI R. (1967): *Influence of different compositae on population density of Pratylenchus penetrans and some other root-infesting nematodes*, «Netherlands Journal of Plant Pathology», 73, pp. 71-82.
- HIRSCH P.R., ATKINS S.D., MAUCLINE T.H., MORTON O.C., DAVIES K.G., KERRY B.R. (2001): *Methods for studying the nematophagous fungus Verticillium chlamydosporium in the root environment*, «Plant and Soil», 232, pp. 21-30.
- JAFFEE B.A., MULDOON A.E., PHILLIPS R., MANGEL M. (1990): *Rates of spore transmission, mortality, and production for the nematophagous fungus Hirsutella rhossiliensis*, «Phytopathology», 80, pp. 1083-1088.
- JAFFEE B.A., MCINNIS T.M. (1991): *Sampling strategies for detection of density-dependent*

- parasitism of soil-borne nematodes by nematophagous fungi*, «Revue de Nematologie», 14, pp. 147-150.
- JAFFEE B.A. (1992): *Population biology and biological control of nematodes*, «Canadian Journal of Microbiology», 38, pp. 359-364.
- JAFFEE B., PHILLIPS R., MULDOON A., MANGEL M. (1992): *Density-dependence host-pathogen dynamics in soil microcosms*, «Ecology», 73, pp. 495-506.
- JAFFEE B.A., MULDOON A.E. (1994): *Susceptibility of root-knot and cyst nematodes to the nematode-trapping fungi* *Monacrosporium ellipsosporum* and *M. cionopagum*, «Soil Biology and Biochemistry», 27, 1083-1090.
- JAFFEE B. A. (2000): *Augmentation of soil with the nematophagous fungi* *Hirsutiella rhossiliensis* and *Arthrobotrys haptotyla*, «Phytopathology», 90, pp. 498-504.
- JAFFEE B.A. (2003): *Correlations between most probable number and activity of nematode-trapping fungi*, «Phytopathology», 93, pp. 1599-1605.
- JARQUIN-BARBERENA H., DALMASSO A., DE GUIRAN G., CARDIN M. (1991): *Acquired virulence in the plant parasitic nematode* *Meloidogyne incognita*. 1. *Biological analysis of the phenomenon*, «Revue de Nematologie», 14, pp. 261-275.
- JOHNSON L.F., SHAMIYEH N.B. (1975): *Effect of soil amendments on hatching of* *Meloidogyne incognita* *eggs*, «Phytopathology», 65, pp. 1178-1181.
- KERRY B.R., KIRKWOOD I.A., DE LEIJ F.A.A.M., BARBA J., LEIDJENS M.N., BROOKES P.C. (1993): *Growth and survival of* *Verticillium chlamydosporium* *Goddard, a parasite of nematodes in soil*, «Biocontrol Science and Technology», 3, pp. 355-365.
- KERRY B.R., BOURNE J. M. (1996): *The importance of the rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes - a case study using* *Verticillium chlamydosporium*, «Pesticide Science», 47, pp. 69-75.
- KLOEPPER J.W., RODRÍGUEZ-KÁBANA R., MCINROY J.A., COLLINS D.J. (1991): *Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in rhizospheres of plants with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes*, «Plant and Soil», 136, pp. 95-102.
- KUNDE R. M., LIDER L. A., SCHMITT R. V. (1968): *A test of* *Vitis* *resistance to* *Xiphinema* *index*, «American Journal of Enology and Viticulture», 19, pp. 30-36.
- KUSHIDA A., SUWA N., UEDA Y., MOMOTA Y. (2003): *Effects of* *Crotalaria juncea* *and C. spectabilis* *on hatching and population density of the soybean cyst nematode*, *Heterodera glycines* *(Tylenchida: Heteroderidae)*, «Applied Entomology and Zoology», 38, pp. 393-399.
- LAMBERTI F., ROCA F. (1987): *Present status of nematodes as vectors of plant viruses*, in: *Vistas on Nematology*. Eds. J. A. Veech e D. W. Dickson. «Journal of Nematology», 25, pp. 321-328.
- LAMBERTI F. (1991): *Nematodi parassiti della vite e relativa lotta*, «Vignevini», 11, 43-46.
- MALIK M.S., SANGWAN N.K., DHINDSA K.S., VERMA K.K., BHATTI D.S. (1987): *Nematicidal efficacy of some monoterpenes and related derivatives*, «Pesticides», 21, pp. 30-32.
- MANKAU R. (1975): *Bacillus penetrans* *n. comb. causing a virulent disease of plant parasitic nematodes*, «Journal of Invertebrate Pathology», 26, pp. 333-339.
- MARTELLI G. P. (2002): *Le principali virosi della vite oggi*, «Informatore fitopatologico», 52, pp. 18-27.
- MASHELA P.W., MPHOSI M.S., SHIMELIS H., MOKGALONG N.M. (2007): *Interactions of* *Cucumis myriocarpus*, *Lippia javanica* *and* *Ricinus communis* *organic amendments on suppression of* *Meloidogyne incognita*, «Journal of Phytopathology», 155, pp. 690-693.

- MAUCHLINE T.H., KERRY B.R., HIRSCH P.R. (2002): *Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus Verticillium chlamydosporium by competitive PCR and comparison with selective plating*, «Applied and Environmental Microbiology», 68, pp. 1846-1853.
- MERWIN I.A., STYLES W.C. (1989): *Root-lesion nematode, potassium deficiency and prior cover crops as factors in apple plant disease*, «Journal of the American Society of Horticultural Science», 114, pp. 724-728.
- MILLER P.M., TURNER N.C., TOMLINSON H. (1973): *Toxicity of leaf and stem extracts to Tylenchorhynchus dubius*, «Journal of Nematology», 5, pp. 173-177.
- MOJTAHEDI H., SANTO G.S., HANG A.N., WILSON J.H. (1991): *Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure*, «Journal of Nematology», 23, pp. 170-174.
- MOLINARI S., MIACOLA C. (1997): *Catalase induction in galls by Meloidogyne-tomato root interactions in vitro*, «Nematologia mediterranea», 25, pp. 299-303.
- MOLINARI S. (2007): *New developments in understanding the role of salicylic acid in plant defence*, «CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources», 2, 067.
- MOLINARI S. (2008a): *Salicylic acid as an elicitor of resistance to root-knot nematodes in tomato*, «Acta Horticulturae», 789, pp. 119-126.
- MOLINARI S. (2008b): *Salicylic acid acts as a resistance elicitor on tomato seedlings attacked by root-knot nematodes: effect of plant age*, «Redia», 91, in press.
- MORTON C. O., HIRSCH P. R., PEBERDY J. P., KERRY B. R. (2003a): *Cloning and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus Pochonia chlamydosporia*, «Mycological Research», 107, pp. 38-46.
- NOEL G. R., ATIBALENTJA N., DOMIER L.L. (2005): *Emended description of Pasteuria nishizawae*, «International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology», 55, pp. 1681-1685.
- NOLING J.W. (2000): *Effects of continuous culture of a resistant tomato cultivar on Meloidogyne incognita soil population density and pathogenicity*, «Journal of Nematology», 32, pp. 452.
- NOUR S.M., LAWRENCE J.R., ZHU H., SWERHON G.D.W., WELSH M., WELACKY T.W., TOPP E. (2003): *Bacteria associated with cysts of the soybean cyst nematode (Heterodera glycines)*, «Applied and Environmental Microbiology», 69, pp. 607-615.
- OKA Y., NACAR S., PUTIEVSKY E., RAVID U., YANIV Z., SPIEGEL Y. (2000): *Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode*, «Phytopathology», 90, pp. 710-715.
- PLOEG A.T. (1999): *Greenhouse studies on the effect of marigolds (Tagetes spp.) on four Meloidogyne species*, «Journal of Nematology», 31, pp. 62-69.
- QUARLES W. (1992): *Botanical pesticides from Chenopodium*, «IPM Practitioner», 14, pp. 1-11.
- RASKI D.J., HEWITT W.B., GOHEEN A.C., TAYLOR C.E., TAYLOR R. H. (1965): *Survival of Xiphinema index and reservoirs of fanleaf virus in fallowed vineyard soil*, «Nematologica», 11, pp. 349-352.
- REDDY K.C., SOFFES A.R., PRINE G.M., DUNN R.A (1986): *Tropical legumes for green manure. II Nematode populations and their effects on succeeding crop yields*, «Agronomy Journal», 78, pp. 5-10.
- REINA Y., CROZZOLI R., GRECO N. (2002): *Nematicidal effect of aqueous extracts from leaves of rubber tree (Calotropis procera) on different species of plant parasitic nematodes*, «Fitopatologia Venezolana», 15, pp. 44-49.

- RICH J.R., OLSON S.M. (1999): *Utility of Mi gene resistance in tomato to manage Meloidogyne javanica in North Florida*, «Journal of Nematology», 31, pp. 715-718.
- ROBERTS P.A. (1995): *Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance*, «Annual Review of Phytopathology», 33, pp. 199-221.
- ROSSO L.C., CIANCIO A., FINETTI SIALER M.M. (2007): *Application of molecular methods for detection of Pochonia chlamydosporia from soil*, «Nematropica», 37, pp. 1-8.
- ROWHANI A., CHAY C., GOLINO D.A., FALK B.W. (1993): *Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of Grapevine fanleaf virus in grapevine tissues*, «Phytopathology», 83, pp. 749-753.
- SANTOS M.A., FERRAZ S., MUCHOVEJ J.J. (1992): *Evaluation of 20 species of fungi from Brazil for biocontrol of Meloidogyne incognita race 3*, «Nematropica», 22, pp. 183-192.
- SAXENA R., SHARMA R. (2005): *Efficacy of aqueous extracts of wild medicinal plants on J2 mortality of root knot nematode, Meloidogyne incognita*, «Environmental Ecology», 23, pp. 164-167.
- SAYRE R.M., STARR M.P. (1988): *Bacterial diseases and antagonism of nematodes*, in *Diseases of nematodes*, a cura di G. O. Poinar e H. B. Jansson, CRC Press, Vol. I, pp. 69-101.
- SHERIF A., HALL R.G., EL AMAMY M. (1987): *Drugs, insecticides and other agents from Artemisia*, «Medical Hypotheses», 23, 187-193.
- SIKORA R.A., BRIDGE J., STARR J.L. (2005): *Management practices: an overview of integrated nematode management technologies*, in: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 2ª Edizione, a cura di M. Luc, R.A. Sikora e J. Bridge, CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 793-825.
- STARR J.L., BRIDGE J., COOK R. (2002): *Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential*, in: *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*, a cura di Starr J. L., Cook R. e Bridge J., CAB International, Wallingford, UK, pp. 1-22.
- STARR J.L., ROBERTS P.A. (2004): *Resistance to plant-parasitic nematodes*, in: *Nematology, Advances and Perspective*, Vol. 2, a cura di Z. X. Chen, S. Y.Chen e D.W. Dickson, CAB International, UK, pp. 879-907.
- STARR M.P., SAYRE R.M. (1988): *Pasteuria thornei sp. nov. and Pasteuria penetrans sensu stricto emend., mycelial and endospore-forming bacteria parasitic, respectively, on plant parasitic nematodes of the genera Pratylenchus and Meloidogyne*, «Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie», 139, pp. 11-31.
- STIRLING G. R. (1991): *Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects*, CAB International, Wallingford, UK, 282 pp.
- STURHAN D., WINKELHEIDE R., SAYRE R.M., WERGIN W.P. (1994): *Light and electron microscopical studies of the life-cycle and developmental stages of a Pasteuria isolate parasitizing the pea cyst nematode, Heterodera goettingiana*, «Fundamental and Applied Nematology», 17, pp. 29-42.
- TAYLOR C.E., RASKI D.J. (1964): *On the transmission of grape fanleaf by Xiphinema index*, «Nematologica», 10, pp. 489-495.
- TAYLOR C. E., ROBERTSON W.M. (1970): *Sites of virus retention in the alimentary tract of the nematode vectors, Xiphinema diversicaudatum (Micol.) and X. index (Thorne and Allen)*, «Annals of Applied Biology», 66, pp. 375-380.
- TORSVIK V., GOKSØYR J., DAAE F.L. (1990): *High diversity in DNA of soil bacteria*, «Applied and Environmental Microbiology», 56, 782-787.
- TZORTZAKAKIS E.A., GOWEN S.R. (1994): *Evaluation of Pasteuria penetrans alone and in*

- combinatin with oxamyl, plant resistance and solarization for control of Meloidogyne spp. on vegetables grown in greenhouses in Crete*, «Crop Protection», 13, pp. 455-462.
- UHLENBROEK J.H., BIJLOO J.D. (1958): *Investigations on nematocides I. Isolation and structure of a nematocidal principle occurring in Tagetes roots*, «Rec. Trav. Chim. Pays-Bas», 77, pp. 1004-1009.
- VERDEJO-LUCAS S. (1992): *Seasonal population fluctuations of Meloidogyne spp. and the Pasteuria penetrans group in kiwi orchards*, «Plant Disease», 76, pp. 1275-1279.
- VERPOORTE R., MEMELINK J. (2002): *Engineering secondary metabolite production in plants*, «Current opinion in biotechnology», 13, pp. 181-187.
- VIAENE N.M.M., ABAWI G.S. (2000): *Hirsutella rhossiliensis and Verticillium chlamydosporium as Biocontrol agents of the root-knot nematode Meloidogyne hapla on lettuce*, «Journal of Nematology», 32, pp. 85-100.
- WALKER J.T., MELIN J.B. (1996): *Mentha piperita, Mentha spicata and their effects of their essential oils on Meloidogyne in soil*, «Journal of Nematology (Suppl.)», 28, pp. 629-635.
- WALKER M.A., WOLPERT J.A., & WEBER E. (1994): *Field screening of grape rootstock selections for resistance to fanleaf degeneration*, «Plant Disease», 78, pp. 134-136.
- WIDMER T.L., ABAWI G.S. (2000): *Mechanism of suppression of Meloidogyne hapla and its damage by a green manure of Sudan grass*, «Plant Disease», 84, pp. 562-568.
- WILLIAMS A.B., STIRLING G.R., HAYWARD A.C., PERRY J. (1989): *Properties and attempted culture of Pasteuria penetrans, a bacterial parasite of root-knot nematodes (Meloidogyne javanica)*, «Journal of Applied Bacteriology» 67, pp. 145-156.
- WILLIAMSON V.M. (1998): *Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use*, «Annual Reviews of Phytopathology», 36, pp. 277-291.
- WILLIAMSON V.M., KUMAR A. (2006): *Nematode resistance in plants: the battle underground*, «Trends in Genetics», 22, pp. 396-403.
- YOUNG N.D., MUDGE J. (2002): *Marker-assisted selection for soybean cyst nematode resistance*, in: *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*, a cura di J.L. Starr, R. Cook e J. Bridge, CAB International, Wallingford, UK, pp. 241-252.



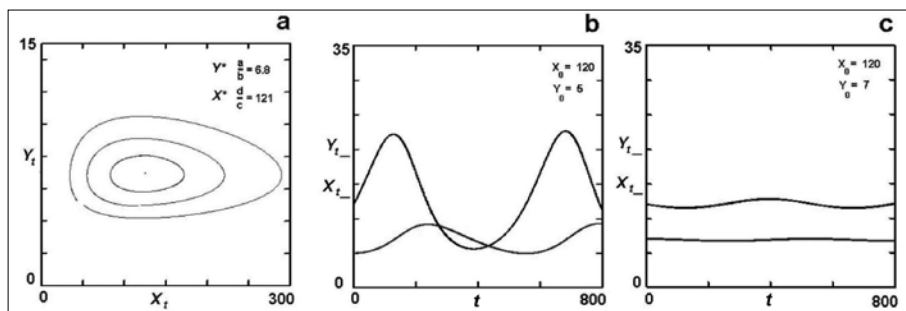


Fig. 1 Applicazione del modello LV alla dinamica di popolazione per un nematode ospite ( $X$ ) e prevalenza da *Pasteuria* ( $Y$ ). Rappresentazione della dinamica nello spazio delle fasi, partendo da diversi valori iniziali di densità e prevalenza (a). La sovrapposizione dell'ampiezza del satellite mostra la convergenza verso il punto d'equilibrio di coordinate  $X^*$ ,  $Y^*$ . La stessa simulazione nel tempo  $t$ , a partire da diversi valori iniziali, mostra la variazione nelle fluttuazioni temporali (b, c).

Antagonista	Nematode	Efficacia <sup>a</sup>	Autori
<i>Pasteuria penetrans</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	G > 90	Stirling, 1991
<i>Dactylellina ellipsospora</i>	M. incognita	J2 > 90	Gaspard & Mankau, 1987
<i>P. penetrans</i>	M. javanica	E, 49 E, 40- 90 <sup>a</sup>	Gowen & Tzortzakakis, 1992
<i>D. ellipsospora</i>	M. incognita	G, 49 - 61 EM, 25 - 33 J2, 4.9 - 5	Santos et al., 1992
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	M. incognita	J, 30-40 E, 28-66	De Leij et al., 1993
<i>P. chlamydosporia</i>	M. hapla	J, 7-13 E, 42-44	De Leij et al., 1993
<i>P. penetrans</i>	<i>Meloidogyne</i> spp.	G, 57- 67 G, 38-82 <sup>b</sup> E, 0 - 49 E, 99 - 43 <sup>b</sup>	Tzortzakakis & Gowen, 1994
<i>P. chlamydosporia</i>	M. incognita	E, 34 - 40	Kerry & Bourne, 1996
<i>Hirsutella rhossiliensis</i>	M. hapla	G, 74	Chen et al., 1999
<i>P. chlamydosporia</i>	M. hapla	J2, 50	Viaene & Abawi, 2000
<i>P. penetrans</i>	M. arenaria	F, 56	Cetintas et al., 2003

<sup>a</sup> Riduzione come % del testimone. E = uova / g radice; EM = masse d'uova / g radice; G = indice di galle; F = femmine / g radice; J2 = larve / 100 cc terreno

<sup>b</sup> In combinazione con oxamyl.

Tab. 1 Principali antagonisti di nematodi ed efficacia dei trattamenti sperimentali riportata



MAURIZIO VURRO\*, MASSIMO CRISTOFARO\*\*, FRANCESCA CASELLA\*,  
ANGELA BOARI\*, MARIA CHIARA ZONNO\*

## Lotta biologica alle piante infestanti

### INTRODUZIONE

Con il termine di *pianta infestante*, oppure *malerba* o, popolarmente, *erbaccia*, si intende generalmente una pianta che, non rivestendo alcuna funzione utile per l'uomo, ne va a danneggiare le produzioni agricole entrando in competizione o parassitizzando queste ultime. Tuttavia, in senso più ampio e completo, il concetto può essere esteso, oltre che alle piante infestanti i campi coltivati, anche a quelle che crescendo in ambienti sia antropizzati che naturali, interferiscono con le attività dell'uomo o modificano gli ecosistemi. Rientrano in questo concetto ampliato, ad esempio quelle che crescono in città e hanno effetti allergenici, o quelle che danneggiano il patrimonio archeologico, le specie acquatiche che ostacolano la viabilità dei corsi d'acqua, o quelle che crescono negli ambienti naturali e riducono la biodiversità.

### LA LOTTA BIOLOGICA

La lotta biologica alle specie infestanti è una applicazione “non convenzionale” della patologia vegetale e della entomologia con la quale un organismo dannoso è utilizzato per mitigare l'effetto dannoso di specie bersaglio senza danneggiare le specie vegetali non-bersaglio, come quelle coltivate o indigene. L'idea di impiegare organismi viventi per controllare le piante infestanti risale a oltre un secolo fa, e risultati molto incoraggianti sono stati ottenuti negli

\* Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Bari

\*\* ENEA C. R. Casaccia, BAS BIOTEC-SIC, S. Maria di Galeria (Rm)

anni 60-70. Ma è a partire dagli anni '80 che vi è stato un rinnovato interesse per queste ricerche che ha portato a numerosi promettenti sviluppi, e nel prossimo futuro ci saranno probabilmente ulteriori motivi di interesse. Fra questi, l'aumentata richiesta per la riduzione dell'impiego dei prodotti chimici nelle produzioni alimentari da parte dell'opinione pubblica; l'incremento dei consumi di prodotti agricoli e agro-industriali biologici; la messa al bando di diserbanti ritenuti pericolosi; i costi sempre più elevati per lo sviluppo e la registrazione di nuove sostanze attive; la mancanza di erbicidi registrati per le colture minori; l'insorgenza di fenomeni di resistenza agli erbicidi di sintesi nelle specie infestanti; l'impossibilità di utilizzare prodotti chimici in taluni ambienti naturali o antropizzati; l'aumentata consapevolezza della necessità di protezione dell'ambiente; gli effetti negativi di altre esistenti pratiche di gestione delle infestanti; la necessità di controllare infestanti non-agrarie e invasive; gli elevati costi dei metodi di gestione delle infestanti negli ambienti naturali e nelle colture estensive.

Il controllo biologico si basa sullo sfruttamento di determinate caratteristiche di un organismo *agente* nei confronti di un altro organismo *bersaglio*. L'obiettivo dovrebbe essere quello di ridurre la presenza della malerba a un livello, o al di sotto di un livello, economicamente significativo (Huffaker, 1958).

Se correttamente impiegata e stabilizzata la lotta biologica classica (vedi sezione successiva) si presenta come una tecnica di controllo delle malerbe poco dispendiosa, permanente, non pericolosa per l'ambiente e che non comporta trattamenti ripetuti o correttivi. L'utilizzo delle strategie del controllo biologico non implica l'eradicazione della pianta anzi, perché lo stesso consegua un successo continuativo, un piccolo numero di *bersagli* dovrebbe permanere per assicurare la sopravvivenza dell'agente. Questo, a sua volta, dovrebbe essere sempre efficace per contenere il numero di piante bersaglio.

Gli insetti sono stati finora i principali protagonisti della lotta biologica in quanto costituiscono il gruppo più numeroso di nemici delle piante. Le specie di insetti che hanno evidenziato capacità applicative nel controllo biologico delle malerbe appartengono agli ordini degli Emitteri, Omotteri, Tisanotteri, Coleotteri, Lepidotteri, Ditteri e Imenotteri. Altre specie animali sono state utilizzate, con risultati non sempre soddisfacenti; ad esempio un acaro è stato introdotto in Australia allo scopo di controllare una specie di cactus originaria di quelle zone (Mann, 1969); i pesci, le lumache e il lamantino sono stati utilizzati per il controllo di alcune piante acquatiche.

Altri organismi in grado di controllare adeguatamente le malerbe sono gli agenti patogeni (funghi, virus, batteri). In particolare, i funghi, come gli

insetti, risultano i più utilizzabili perché presentano: (1) un alto grado di specializzazione nei confronti dell'ospite, (2) alte capacità di adattamento sull'ospite e (3) un elevato numero di specie adattabili a diverse situazioni ecologiche (National Academy of Science, 1969).

Gli interventi di lotta biologica alle infestanti possono essere utilizzati in differenti condizioni e ambienti, alcuni dei quali particolarmente favorevoli a queste applicazioni, quali le coltivazioni biologiche e coltivazioni a gestione integrata, gli ambienti naturali, quelli forestali, gli ambienti acquatici (canali, corsi d'acqua, laghi) e quelli antropizzati (parchi urbani, zone archeologiche, margini stradali e ferroviari).

La lotta biologica contro le infestanti viene realizzata con due modalità fondamentali: il metodo classico e quello inondativo, che verranno di seguito illustrati.

Un ulteriore metodo, chiamato "conservativo" o "system management", un approccio di tipo ecologico, propone di proteggere e ampliare le popolazioni di agenti di biocontrollo naturalmente presenti, attraverso modifiche ambientali o adattamento di preesistenti pratiche agricole, in modo da far raggiungere a tali popolazioni una dimensione sufficiente a controllare la popolazione infestante bersaglio (Frantzen et al., 2001).

## IL METODO CLASSICO

Definito anche "inoculativo" consiste nel rilascio di uno o più agenti, importati dalla stessa zona di origine della infestante, nell'ambiente in cui l'infestante si è diffusa e provoca danni a causa dell'assenza di nemici naturali. Questo metodo prevede l'immissione dell'agente di controllo con minime manipolazioni tecnologiche, su una superficie limitata rispetto a quella infestata in modo da ottenere una progressiva epidemia che consenta nel tempo il controllo dell'infestante nell'area considerata. Si tratta di una strategia dal basso costo, e risulta particolarmente adatta per la gestione di quelle popolazioni infestanti diffuse in aree vaste o a bassa redditività, quali pascoli, ambienti naturali, ambienti acquatici, zone boschive, che si riproducono soprattutto per via vegetativa e quindi geneticamente omogenee. In queste situazioni esse rappresentano ideali bersagli per il controllo con agenti che si sono coevoluti e che sono solo stati separati fisicamente per un periodo di tempo. Se le condizioni sono favorevoli, l'agente si moltiplica e si diffonde nella popolazione infestante limitandone la crescita e riducendone la diffusione. La popolazione inizia quindi lentamente a declinare. In

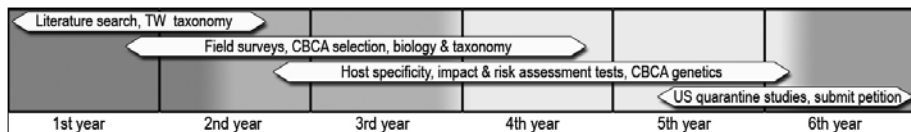


Fig. 1 *Diagramma schematico di un progetto di lotta biologica in funzione del tempo.*  
 Abbreviazioni: TW = pianta infestante bersaglio; CBCA = Agente Candidato di Controllo Biologico.

questo caso sono necessari parecchi mesi, o anni, prima che si raggiunga il desiderato livello di controllo.

Dal primo tentativo di lotta biologica *classica* (intorno al 1865), erano stati introdotti in varie zone del mondo, contro 100 specie di infestanti naturalizzate, circa 200 organismi (Julien, 1987). Gli esiti di tutte queste introduzioni di nemici naturali sono alquanto variabili, anche se in circa il 25-30% dei casi si può affermare con sicurezza di avere ottenuto dei risultati soddisfacenti, raggiungendo un controllo permanente delle infestanti bersaglio su ampie aree.

Il controllo biologico *classico* è applicabile soprattutto in aree relativamente stabili dal punto di vista geo-climatico, come i pascoli naturali o le foreste, oppure in tutte quelle zone in cui il ricorso a mezzi di controllo chimici o meccanici è economicamente sconveniente o proibito. La sua applicazione, anche se non del tutto impossibile, comunque risulta assai difficoltosa nelle zone caratterizzate da una agricoltura intensiva, in cui si hanno annuali variazioni nell'ordinamento colturale e vengono irrorate cospicue quantità di pesticidi.

Il grande vantaggio della strategia *introduttiva* o *classica*, è che il costo del controllo è indipendente dalla sua durata o dalla superficie dell'area infestata. Il controllo permanente di una malerba su aree estese migliaia di ettari non costa più di un intervento su superfici sensibilmente inferiori, per una durata di uno o più anni. Il costo per ettaro di tale strategia diminuisce in maniera proporzionale con l'aumentare della superficie considerata e con l'aumentare della durata del controllo stesso. I costi da affrontare in un progetto di biocontrollo di una malerba con la strategia *classica* riguardano (fig. 1) in particolare la ricerca nella zona di origine dell'infestante e i test e i rilasci iniziali degli agenti di controllo.

Una volta introdotti e stabilizzati questi si riproducono e si disperdono autonomamente sulle piante bersaglio. Anche se non richiede grossi investimenti di capitale, la strategia *classica*, presenta la necessità di dover attendere, prima che si intravedano i primi risultati, lunghi periodi di tempo (anche

10-15 anni); in funzione di ciò, il metodo è applicabile ad aree a basso valore economico, come ad esempio i pascoli naturali. Un altro svantaggio riguarda il fatto che gli insetti nella loro attiva ricerca della malerba ospite, o eventualmente i patogeni che si diffondono nell'ambiente, possono attaccarla e colpirla ovunque essa sia presente, anche in quelle zone ove venga considerata una pianta utile. Infatti una volta rilasciato e stabilizzato, un agente di controllo non può essere facilmente frenato. Deve quindi essere posta una attenta considerazione ai possibili conflitti di interesse che potrebbero sorgere tra gli aspetti utili e quelli dannosi della malerba, e ai possibili cambiamenti futuri in questi valori, prima che venga intrapresa una strategia di controllo biologico classico.

Per lungo tempo i progetti inerenti i programmi di controllo biologico sono stati intrapresi in maniera alquanto superficiale non dando alcuna considerazione all'aspetto scientifico del problema (Harris, 1977). Negli ultimi decenni il metodo si è evoluto considerevolmente grazie allo sviluppo di protocolli sperimentali impostato su basi scientifiche (Harris, 1971; Wapshere, 1974a/b; Wapshere, 1975; DeLoach, 1978).

Attualmente l'efficacia dell'organismo viene valutata sulla base di due metodiche: il *metodo Harris* e il *metodo Wapshere*. Il primo propone di selezionare gli organismi "agenti" secondo la loro specificità, il tipo di danno indotto, il periodo di attacco, il fattore di mortalità; il secondo dà rilevanza soprattutto alle osservazioni fatte in pieno campo (diffusione aggressività, virulenza, ecc.) (Harris, 1973; Wapshere, 1975).

L'organismo "agente", oltre a essere efficace, deve risultare altamente specifico nei confronti della pianta "bersaglio" e, conseguentemente, innocuo per le altre piante. A tal fine Wapshere ha proposto un metodo di selezione per la determinazione della gamma d'ospite detto della "spirale filogenetica" che tiene conto, cioè, delle piante correlate tassonomicamente alla famiglia dell'infestante. Non va trascurata la valutazione della specificità anche nei confronti delle cosiddette "piante a rischio", per esempio quelle attaccate da organismi tassonomicamente vicini all'organismo agente (Schroeder, 1983).

Programmi di lotta biologica classica con artropodi sono stati condotti in particolare negli Stati Uniti, in Canada, Australia, Paesi nei quali le piante infestanti (allototone) sono un serio problema in aree non coltivate dove entrano in competizione con la flora nativa. Il tipo di habitat, naturale e a basso valore economico, ha reso non solo possibile ma altamente raccomandabile l'applicazione di programmi di lotta biologica.

Esempi di successo nella lotta biologica alle infestanti sono stati ottenuti inizialmente con *Lantana camara* nelle Hawaii (all'inizio del '900), per

poi proseguire con il fico d'India (*Opuntia* spp.), *Senecio jacobea*, *Chondrilla juncea*, *Euphorbia esula*, *Onopordum acanthium*, *Centaurea solstitialis*, *Tamarix* spp.

Nel caso della carduina annuale *Centaurea solstitialis* (Asteraceae), responsabile di una delle più dannose infestazioni negli Stati Uniti, per parecchi anni gli studi sono stati focalizzati su organismi che colpivano i boccioli fiorali e che avevano un diretto impatto sulla produzione dei semi, tra cui i ditteri tefritidi *Urophora sirunaseva* e *Chaetorellia australis* e i coleotteri curculionidi *Bangasternus orientalis*, *Eustenopus villosus* e *Larinus curtus* (Campobasso et al., 1998; Clement et al., 1988; Sobhian, 1993; Sobhian e Fornasari, 1994). Nonostante il rilascio di questi 5 agenti, l'impatto sulle popolazioni di *C. solstitialis* nell'ovest degli USA è stato per molti anni piuttosto scarso (Pitcairn et al., 2006 a/b). Per questo motivo, negli ultimi anni sono stati presi in considerazione altri agenti di controllo, che colpiscono la pianta infestante nei primi stadi fenologici (rosetta o all'inizio della levata): è il caso del coleottero curculionide *Ceratapion basicorne*, la cui larva si sviluppa a spese del colletto della radice, o del coleottero alticino *Psylliodes chalconera*, che colpisce il meristema apicale e lo stelo all'inizio della levata (Cristofaro et al., 2004; Smith et al., 2006). In particolare per questi due agenti la ricerca non si è limitata alla valutazione della specificità alimentare, ma ha preso anche in considerazione parametri innovativi quali il comportamento di aggregazione e la valutazione dell'impatto sulla pianta infestante. Inoltre, per entrambe le specie considerate, è stato necessario mettere a punto programmi di analisi biomolecolare in grado di distinguere i 2 agenti da specie e/o sottospecie morfologicamente vicine (Antonini et al., 2005). Il progetto sul controllo biologico di questa pianta infestante si sta concludendo con il rilascio in California anche della ruggine *Puccinia centaureae* e con le ultime prove di campo con l'eriofide *Aceria solstitialis* (Fisher et al., 2007; Monfreda et al., 2005; 2007).

Analogamente, il programma sulla lotta biologica a un'infestante perenne con moltiplicazione agamica per rizomi, l'euforbiacea *Euphorbia esula*, ha richiesto l'intervento polivalente di diverse associazioni entomologiche: il lepidottero sfingide *Hyles euphorbiae*, il coleottero cerambicide *Oberea erythrocephala*, e 2 ditteri galligeni (*Dasineura capsulae* e *Spurgia capitigena*); tuttavia i risultati più interessanti sono stati ottenuti impiegando un genere di piccoli crisomelidi alticini (*Aphthona* spp.), che pur danneggiando in modo molto limitato la pianta allo stadio larvale (questi insetti provocano piccole lesioni superficiali ai peli radicali), inducevano dei devastanti danni secondari alla popolazione dell'infestante. Studi sull'associazione fungo-insetto, hanno messo chiaramente in luce la sinergia esistente tra il danno larvale di varie specie di



alticini del genere *Aphthona* e quello provocato da funghi generici del genere *Rizoctonia* (Caesar et al., 1993; 1998, Kremer et al., 2004).

Per decenni, gli artropodi sono stati preferiti come agenti di lotta biologica classica (Julien e Griffiths, 1998), in parte perché il potenziale ruolo dei patogeni era stato sottovalutato. Negli ultimi 35-40 anni si è assistito a un aumento dell'uso dei patogeni, sia riguardo l'approccio classico che il metodo inondativo. Fra i patogeni, quelli fungini sono stati solitamente preferiti rispetto ad agenti batterici o virali nei programmi di lotta classica (Charudattan, 2001), soprattutto perché in genere non richiedono un vettore per la disseminazione, e anche perché spesso hanno un livello di specificità superiore. Benché patogeni radicali siano conosciuti agenti di devastanti malattie delle piante, sono quelli fogliari preferenzialmente selezionati come agenti di biocontrollo in quanto in genere sono più specifici e più facilmente dispersi dal vento o dalle piogge (Watson, 1991). Funghi biotrofici (obbligati) sono patogeni chiave per la lotta classica in quanto sono altamente ospite-specifici e parassitizzano e danneggiano severamente piante vigorose (Watson, 1991), ottenendo nutrienti direttamente dai tessuti viventi. Fra tali organismi sono compresi quelli agenti di sintomi quali ruggini, carboni e muffe. Essi raramente uccidono le piante direttamente, ma hanno degli effetti negativi, determinando un dispendio di energie, con effetti comparabili a quelli degli insetti erbivori (Charudattan, 2005).

Poiché fondamentalmente l'uomo non ha ulteriori possibilità di gestione del microrganismo una volta rilasciato nell'ambiente, per poter avere successo e nel contempo non causare danni, i requisiti fondamentali che un fungo patogeno utilizzabile con il metodo classico deve soddisfare sono in particolare: specificità verso la specie bersaglio, elevata virulenza, mobilità nell'ambiente, elevata capacità riproduttiva e adattabilità all'ambiente.

Anche per il controllo biologico utilizzando i patogeni fungini, i migliori risultati sono stati ottenuti in questo campo in particolare in Australia e nel continente americano proprio perché numerose specie vegetali sono state introdotte, quasi sempre dall'Europa e spesso al semplice scopo ornamentale, e sono divenute infestanti proprio perché non avevano nessun nemico naturale.

I primi tentativi formali di lotta classica con i patogeni iniziarono verso la fine degli anni '60 con un progetto per trovare e utilizzare un patogeno per specie di *Rumex* infestanti negli Stati Uniti (Inman, 1971) e rovo (*Rubus* spp.) in Cile (Oehrens, 1977). Dagli anni 70 in poi ci sono stati numerosi tentativi di successo nei programmi di biocontrollo (Charudattan, 2005; Watson, 1991).

Fra gli interventi meglio riusciti c'è il controllo di *Acacia saligna* (fam. Fabaceae) con l'impiego della ruggine *Uromycladium tepperianum* introdotta in Sud Africa dall'Australia, zona di origine della specie infestante (Morris, 1999). *A. saligna* è considerata la specie invasiva più pericolosa per la regione floristica di Capo Fynbos, un ecosistema unico del Sud Africa. Il fungo introdotto causa lo sviluppo di galle sulle branche e sui rami determinandone la rottura e la caduta, e infine anche la morte della pianta. Il fungo fu introdotto negli anni 1987-1989. Negli otto anni successivi alla sua introduzione il fungo si diffuse in tutta la zona di infestazione, determinando una riduzione della densità della specie stimata fra il 90 e 95%. Anche il numero di semi nel seed bank si è ridotto considerevolmente e il declino della specie è tuttora in corso (Morris, 1997).

Un altro "famoso" esempio di successo è l'uso di *Puccinia chondrillina* per controllare l'infestante *Chondrilla juncea* (fam. Asteraceae) in Australia. Questa infestante, chiamata "lattugaccio comune" è originaria del bacino del Mediterraneo. Ed è proprio dal Mediterraneo (in particolare alcuni isolati sono stati ritrovati dalla zona del Gargano, in Puglia) che alcuni isolati sono stati ottenuti e rilasciati in Australia, consentendo un efficace controllo della infestante. Si calcola che i benefici ottenuti grazie al rilascio di questo agente siano almeno 100 volte superiori ai costi sostenuti per gli studi compiuti e per il rilascio stesso (Cullen, 1985).

Un altro programma di successo ha visto l'impiego di un carbone, *Entylo-  
ma ageratinae*, dalla Giamaica per il controllo di *Ageratina riparia* (fam. Asteraceae), una infestante introdotta dal Messico nelle foreste e nei pascoli delle Hawaii nel 1974. Due o tre mesi dopo il rilascio nell'ambiente, devastanti epidemie furono osservate nelle popolazioni più dense della infestante. La popolazione di *A. riparia* fu ridotta a meno del 5 % in circa 9 mesi. La stessa situazione si ebbe nei 3-4 anni successivi, quando il fungo venne rilasciato a più riprese in altre zone. Si calcola che con questi interventi circa 50.000 ettari siano stati riabilitati a pascolo grazie all'impiego di questo patogeno, e non è stata mai segnalata alcuna evidenza di fenomeni di resistenza della infestante e tanto meno di presenza di forme mutate del patogeno (Trujillo et al., 1988; Trujillo, 2005). Il fungo è stato anche introdotto in Nuova Zelanda fra il 1998 e il 2001, insieme a *Procecidochares alani* consentendo un controllo pressoché definitivo della infestante (Barton et al., 2007).

I protocolli generali nei programmi di lotta classica differiscono poco a prescindere se il potenziale agente sono patogeni o artropodi.

Una volta individuata la specie infestante target, il punto di partenza è la ricerca dei potenziali agenti di lotta e dalla loro identificazione. Questo

avviene innanzitutto con una approfondita ricerca bibliografica per individuare la zona di origine della infestante e quella di eventuali potenziali agenti conosciuti. La conoscenza del centro evolutivo di origine della infestante è fondamentale e consente di pianificare la ricerca in campo in tali zone, dove i nemici naturali si sono coevoluti con la specie infestante, e quindi è più probabile che siano più specifici e anche relativamente più abbondanti (Evans et al., 2001). Una volta che gli organismi di potenziale interesse sono stati identificati, diverse popolazioni/isolati vengono collezionate e successivamente saggiate. Iniziali test di specificità vengono condotti in modo da scartare potenziali candidati non specifici. Una attenta valutazione della efficacia, e ancor prima, della specificità, deve precedere la eventuale introduzione dell'organismo nell'ambiente. Ad esempio, gli studi condotti su una specie di *Uromyces* per il controllo del *Cytisus scoparium* vennero abbandonati in quanto tale specie era in grado di infettare anche una specie spontanea (*Chamaecytisus palmensis*) botanicamente vicina alla pianta bersaglio nelle prime fasi di screening (Morin et al., 2000). La introduzione dei patogeni finora si è dimostrata impeccabile da un punto di vista della sicurezza, con la mancanza assoluta di segnalazione di agenti rilasciati che hanno provocato effetti inattesi e indesiderati (Barton, 2004).

Superate le prove di specificità, test di patogenicità e virulenza vengono poi condotti, in modo da assicurarsi che gli isolati candidati siano in grado di infettare le popolazioni della infestante bersaglio presente nell'ambiente in cui è stata introdotta. Le condizioni richieste per lo sviluppo e la diffusione dell'agente vengono quindi opportunamente individuate (Berner e Bruckart, 2005). Una accurata valutazione della virulenza diventa poi fondamentale per dimostrare la necessità e la potenziale efficacia ottenibile dalla introduzione dell'agente di biocontrollo.

#### RILASCIO E INSEDIAMENTO NEL NUOVO HABITAT

Nel campo della lotta biologica di tipo classico, si debbono prevedere studi preliminari sulla biologia e l'ecologia della specie vegetale da controllare, sulla biocenosi (animale e vegetale) a essa associata sia nella zona di origine che in quelle d'introduzione, sulle condizioni abiotiche presenti, quali la natura del suolo, il clima e i dati pluviometrici.

A questi background seguiranno una serie di rilevazioni di campo in aree controllate e non, che consentiranno di valutare la stabilizzazione dell'organismo di controllo introdotto e la sua fitness nel nuovo ambiente. Ci sono diversi esempi

che dimostrano che l'introduzione di una specie relativamente poco frequente nella zona di origine, ha mostrato invece un'esplosione demografica nell'area di introduzione. Tra queste, si possono citare a titolo indicativo 3 esempi: il dittero tefritide *Chaorellia australis*, introdotto accidentalmente in California per il controllo di *Centaurea solstitialis*, i coleotteri crisomelidi *Aphthona* spp. e *Diorhabda* spp., rispettivamente per il controllo di *Euphorbia esula* e *Tamarix* spp. (Cline et al., 2008; Lym e Nelson, 2000; De Loach et al., 2000; 2003). Tale comportamento va attribuito non solo alla grandissima quantità di fonte alimentare presente nel nuovo habitat, ma anche alla (selettiva) mancanza di organismi di controllo specifici per l'agente introdotto (ovvero i parassitoidi e i predatori che contengono la specie fitofaga nelle zone di origine (Sheppard et al., 2006).

Va tuttavia messo in luce che alcuni autori hanno riscontrato qualvolta degli effetti negativi indiretti causati da alcuni organismi di controllo biologico, a discapito di specie animali e/o vegetali che sono lontane troficamente dall'associazione presa in considerazione (Carvalho et al., 2008; Louda et al., 2005). Un esempio può essere le specie di uccelli che nidificano su piante (considerate infestanti) del genere *Tamarix*, o il decremento della produzione di miele in California quando viene controllato il cardo *Centaurea solstitialis*.

#### IL METODO INONDATIVO

Consiste nell'applicazione dell'agente fitopatogeno in grandi dosi al fine di ottenere una rapida epidemia, con applicazioni analoghe a quelle impiegate per gli erbicidi chimici. Esso si basa quindi sulla gestione delle specie indesiderate utilizzando i nemici naturalmente presenti nell'ambiente di diffusione della infestante e potenzialmente in grado di causare un elevato grado di malattia. In natura questa potenzialità non si esplica a causa, per esempio, di un basso livello di diffusione del patogeno nell'ambiente o a una ridotta disponibilità d'inoculo nel momento in cui sarebbe necessario intervenire. Il metodo inondativo si propone, quindi, di aumentare la disponibilità di inoculo, accrescendolo in idonee condizioni di laboratorio o industriali e, successivamente, di applicarlo in dosi elevate sulla intera popolazione infestante, come un erbicida tradizionale. Il metodo inondativo è più adatto negli agrosistemi intensivi sia per le modalità di azione e di somministrazione, e sia per l'efficacia dei trattamenti. A causa delle analogie con gli erbicidi chimici, e poiché inizialmente furono utilizzati solo microrganismi fungini, venne coniato il termine di micoerbicidi. Poiché attualmente si utilizzano anche altri microrganismi fitopatogeni o i loro prodotti, si utilizza più ampiamente il termine "bioerbicidi". La maggior parte dei funghi fitopatogeni impiegati sono

patogeni indigeni, benché molti studi abbiano riguardato la possibile introduzione in quantità massicce di patogeni esotici. Questi sono spesso applicati come bioerbicidi di post-emergenza delle infestanti, e possono essere applicati anche più di una volta durante la stagione, comunque prima che la infestante bersaglio abbia raggiunto un livello indesiderato di dannosità. Sono in genere necessarie applicazioni annuali poiché di solito la sopravvivenza del patogeno è limitata nel tempo (non sopravvive fra le stagioni) e quindi non è in grado di produrre l'elevato livello di infezione necessario per causare l'epidemia (Charudattan, 1988; TeBeest et al., 1992). Al contrario dei patogeni obbligati, i funghi patogeni facoltativi, comprendendo emibiotrofi e necrotrofi, possono essere facilmente accresciuti su substrati artificiali, e quindi si prestano a essere prodotti in grandi quantità e a essere utilizzati in dosi massicce. I patogeni necrotrofi, che infettano le piante prima uccidendo le cellule e poi colonizzando i tessuti morti sono stati preferiti nei programmi di lotta inondativa, ma raramente utilizzati in quelli di lotta classica. (Morris et al., 1999; Gourelay et al., 2000). Si stima che oltre 200 patogeni vegetali siano stati valutati per il loro potenziale come bioerbicidi, includendo funghi e batteri responsabili di malattie fogliari, soil-borne funghi e batteri fitopatogeni, e rizobatteri deleteri (Roskopf et al., 1999; Charudattan, 2001; Boyetchko et al., 2002).

Le principali caratteristiche che vengono solitamente considerate, e da cui può dipendere il successo di un potenziale bioerbicida sono: efficacia (virulenza verso la specie bersaglio), potenziale per la commercializzazione (efficacia in condizioni di campo), specificità e spettro d'ospite, velocità di azione, facilità di accrescimento *in vitro*, compatibilità con altri pesticidi, applicabilità con i comuni sistemi per la somministrazione dei fitofarmaci.

L'abilità di un patogeno a causare danno verso la infestante bersaglio è influenzata da numerosi fattori, fra cui la concentrazione dell'inoculo, la dose di applicazione, le condizioni ambientali (temperatura e umidità relativa in particolare), le modalità di formulazione, i parametri di distribuzione (ad es., nel caso di applicazione aerea: dimensione delle gocce, deposizione e distribuzione), età o stadio di sviluppo della pianta bersaglio, presenza di specie non target (ostacolo), micro e macro organismi presenti nella fillosfera o rizosfera, eventuale presenza di pesticidi applicati alle colture.

#### OSTACOLI E MIGLIORAMENTO

Nonostante gli studi realizzati, il numero di bioerbicidi che hanno raggiunto il mercato risulta ancora piuttosto basso (tab. 1), e questo è dovuto a una serie

PRODOTTO	ANNO	Patogeno	INFESTANTI BERSAGLIO	COLTURA/AMBIENTE	NAZIONE	STATUS
Biochon	1997	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Infestanti arboree, ad es. <i>Prunus serotina</i>	Foreste	Olanda	Disponibile fino al 2000
BioMal	1992	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>malvae</i>	<i>Malva pusilla</i>	Frumento, lenticchia, lino	Canada	Non disponibile commercialmente. In fase di rivalutazione per il mercato.
Camperico	1997	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>poeae</i>	<i>Poa annua</i>	Campi da golf	Giappone	Commercialmente disponibile
CASST	1983	<i>Alternaria cassiae</i>	<i>Cassia</i> spp.	Soia, arachidi	USA	Non più disponibile per mancanza di interesse commerciale
Chontrol = Ecoclear	2004	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Latifoglie	Foreste	Canada	Commercialmente disponibile
Collego	1982	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>	<i>Aeschynomene virginica</i>	Riso, soia	USA	Non più prodotto dal 2003, ora in fase di ri-registrazione con il nome di Lock Down
DeVine	1981	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i>	Agrumeti	USA	Commercialmente disponibile
Dr BioSedge	1987	<i>Puccinia canaliculata</i>	<i>Cyperus esculentus</i>	Soia, canna da zucchero, mais, patata, cotone	USA	Registrato, ma il prodotto aveva un sistema di produzione non economicamente conveniente
Hakatak	1999	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Hakea gummosis</i> , <i>H. sericea</i>	Ambienti naturali	Sud Africa	Mai registrato, ma può essere prodotto su richiesta
Lubao	1963	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>cuscutae</i>	<i>Cuscuta</i> spp.	Soia	Cina	Probabilmente ancora disponibile
Mycotech	2004	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Latifoglie	Foreste	Canada	Commercialmente disponibile
SARRITOR	2008	<i>Sclerotinia minor</i>	<i>Tanacetum officinale</i> e altre dicotiledoni	Prati, pascoli	Canada	In fase di valutazione commerciale
Smolder	2005	<i>Alternaria destruens</i>	<i>Cuscuta</i> spp.	Vivai, piante ornamentali	USA	Registrato. Quasi sul mercato
SolviNix	2008	Tobacco mild green mosaic virus - TMGMV	<i>Solanum viarum</i>	Pascoli	USA	In fase di valutazione commerciale
Stumpout	1997	<i>Cylindrobasisidium leave</i>	<i>Acacia</i> spp.	Ambienti naturali	Sud Africa	Disponibile
Woad Warrior	2002	<i>Puccinia thlaspeos</i>	<i>Isatis tinctoria</i>	Fattorie, pascoli, aree abbandonate, margini stradali	USA	Registrato

Tab. 1 *Elenco degli erbicidi microbici sviluppati e "status" commerciale*

di ostacoli che ne limitano lo sviluppo e la commercializzazione. Tali ostacoli includono problemi di tipo tecnologico (quali le difficoltà di produrre grandi quantità di inoculo attraverso i processi fermentativi, o le formulazioni che assicurino una elevata stabilità e una prolungata “vita di scaffale”; limitazioni commerciali, quali la dimensione solitamente ridotta del mercato, gli alti costi di produzione e di registrazione, o norme restrittive che limitano l’impiego di organismi viventi; limitazione biologiche, come le difficoltà dovute alla gestione di organismi viventi, che possono perdere la virulenza o interagire con altri organismi quando applicati; fattori ambientali, come gli effetti negativi dovuti alle sfavorevoli condizioni climatiche, fenomeni di dilavamento, o la inattivazione dell’inoculo a causa delle radiazioni luminose o per le temperature troppo elevate.

Per questi motivi, molti studi hanno riguardato la possibilità di migliorare l’efficacia dei microrganismi, considerando, ad esempio, la possibilità di individuare nuovi microrganismi o bersagli più adatti; il miglioramento delle modalità di produzione, formulazione e distribuzione degli agenti di biocontrollo; l’aumento della efficacia mediante selezione di migliori caratteristiche o strategie genetiche; l’applicazione combinata di organismi con altri microrganismi, metaboliti, batteri, insetti, erbicidi. Alcuni di questi approcci verranno descritti in seguito. Alcuni prodotti sono stati immessi sul mercato più o meno recentemente, e con alterne fortune. Fra questi, si ricorda:

*Collego*. Formulato commerciale a base di *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* usato negli Stati Uniti nel 1982 per la lotta alla leguminosa infestante *Aeschynomene virginica*, nelle colture di riso e soia. È un formulato a base di conidi disidratati applicate in una sospensione liquida, in grado di infettare foglie, piccioli e fusti, oltre che semi e plantule. Dopo l’applicazione, le lesioni sono visibili dopo 7-10 giorni dopo l’applicazione, e la malattia consente un controllo del 90-100%. Il prodotto è stato immesso e ritirato dal commercio più volte. Recentemente è stata avviata una procedura per una nuova registrazione con il nome di LockDown che dovrebbe concludersi quest’anno.

*De Vine*. A base di *Phytophthora palmivora*, un fungo patogeno di *Morrenia odorata*, una infestante degli agrumeti. È venduto come sospensione liquida contenente circa  $6 \times 10^5$  clamidospore/ml, da applicare sulla superficie del terreno. Provoca la necrosi dei fusti e la morte delle piante in 1-6 settimane, a seconda della età delle stesse.

*Mycotech*. Il prodotto è stato messo a punto per proteggere le foreste di conifere in Canada, in particolare di pino strobo, dalla competizione con le latifoglie infestanti arboree. Nelle foreste sottoposte a tagli programmati, i

pini vengono seminati per favorire la naturale rigenerazione, ma subiscono la competizione di altre specie ad accrescimento più rapido. Questo prodotto, registrato nel 2002, è a base di *Chondrostereum purpureum*, un microrganismo fungino largamente presente nelle foreste di latifoglie delle zone temperate. Il micelio fungino di isolati non modificati viene incorporato in un gel biodegradabile che protegge e nutre il fungo. Viene applicato sulle superfici di taglio delle infestanti appena eseguito, in modo da innescare il processo naturale di marciume del legno, che impedisce la ricrescita della pianta infestante o la formazione di polloni radicali o succhioni. In questo modo viene favorita la crescita dei giovani pini, che non sono colpiti da questo patogeno. La efficacia di controllo di infestanti arboree e arbustive decidue è fra il 70 e il 100%, a seconda della specie trattata. Estese sperimentazioni condotte in oltre dieci anni hanno dimostrato non solo l'efficacia del prodotto, ma anche la totale assenza di rischi per l'Uomo e per l'ambiente, quando usato secondo le indicazioni di etichetta.

*Stump Out*. Sviluppato in Sud Africa, è un preparato a base del fungo basidiomicete *Cylindrobasidium laeve* per la lotta contro alcune specie di *Acacia* introdotte dall'Australia. Le basidiospore del fungo, confezionate in sacchetti, prima dell'applicazione vengono diluite in olio di girasole e 1-2 ml della emulsione vengono applicati con un pennello sulla superficie di taglio fresca delle infestanti. Il fungo, entro 6-12 mesi dal trattamento, colonizza il ceppo e impedisce lo sviluppo di ricacci determinando quindi la morte della pianta, con una efficacia quasi totale.

#### NUOVI AGENTI

Molti degli studi sono stati concentrati sull'impiego di funghi. Tuttavia recentemente altri agenti molto promettenti e finora sottostimati sono stati considerati, come batteri e virus, o anche patogeni con un più ampio spettro d'ospite.

Fra questi il SolviNix, a base di Tobacco Mild Green Mosaic Virus (TMGMV) proposto per il controllo di *Solanum viarum*, una infestante molto nociva negli Stati Uniti Sud-Orientali, appare particolarmente promettente. Il virus ha un impatto drammatico, causando la rapida morte delle piante trattate, e ha un elevato livello di specificità che garantisce contro i rischi per le persone o gli animali. Viene prodotto inoculando piantagioni di tabacco, che funge da portatore sano, da cui vengono recuperati i succhi cellulari, contenenti le particelle virali, che poi possono



essere utilizzati per i trattamenti contro la infestante bersaglio (Charudatan e Hiebert, 2007).

Uno dei fattori che possono limitare l'impiego dei bioerbicidi è l'eccessiva specificità, che se da un lato può essere una garanzia nella sicurezza dell'impiego, dall'altro ne riduce le possibilità applicative solo alla situazione, peraltro infrequente, di una infestazione ridotta a una singola specie bersaglio. A questo riguardo un interessante agente oggetto di studio è *Sclerotinia minor*, il principio attivo del SARRITOR, un bioerbicida in corso di registrazione in Canada per il controllo di *Taraxacum officinale* e di altre dicotiledoni infestanti in prati e pascoli. Il prodotto viene applicato sul terreno sotto forma di granuli, e la malattia si sviluppa rapidamente portando a morte le piante colpite nel giro di soli 7 giorni, due volte più velocemente rispetto agli erbicidi chimici commerciali. Il prodotto è anche compatibile con le normali operazioni di mantenimento del prato, come fertilizzazione, irrigazione e sfalcio (Watson, 2007).

CAMPERICO è invece il primo bioerbicida batterico in commercio. È a base di *Xanthomonas campestris* pv. *poae* ed è commercializzato in Giappone per il controllo di *Poa annua*, infestante dei campi da golf. La caratteristica principale di questo prodotto è che la estrema specificità, quasi sempre fattore limitante per i bioerbicidi, in questo caso viene sfruttata utilmente. Il batterio infatti è in grado di colpire la infestante bersaglio, una graminacea annuale, mentre non è patogeno per *P. pratensis* e *Lolium perenne*, altre graminacee usualmente impiegate per la realizzazione dei manti erbosi dei campi da golf (Imaizumi et al., 1999).

#### MIGLIORAMENTO DEI PROCESSI PRODUTTIVI

La produzione di inoculo microbico con metodi economici gioca un ruolo fondamentale nel determinare il costo finale di un prodotto sul mercato, e ne quindi influenza il successo commerciale. Substrati colturali per la produzione di propaguli fungini dovrebbero essere selezionati usando appropriate tecnologie di fermentazione, seguiti dalla valutazione delle migliori condizioni per la crescita, selezione delle migliori tecnologie per separare i propaguli dal prodotto di fermentazione, e valutazione della "vita di scaffale" del prodotto formulato. L'uso di biomasse ottenute da residui di processi agroindustriali o da pratiche agricole potrebbero ridurre i costi di produzione. Molasse, pani esausti della lavorazione delle olive, residue dalle birrerie, o scarti delle lavorazioni industriali di frutta e verdura sono solo alcuni esempi di prodotti che ancora contengono nutrienti

che potrebbero essere usati favorevolmente per accrescere microbi. Spesso lo smaltimento di tali scarti presenta problemi economici e ambientali, e quindi essi rappresenterebbero substrati ideali e a basso costo per la produzione di molti agenti microbici di lotta biologica (Vurro e Casella, 2008).

#### APPLICAZIONE E RILASCIO

Uno dei principali problemi nell'impiego di agenti microbici è quello di trovare metodi di applicazione adatti, che consentano una distribuzione uniforme dell'agente al sito desiderato, evitando sprechi o consumi eccessivi che aumenterebbero i costi di trattamento e i rischi di effetti indesiderati.

L'applicazione di elevati volumi di bioerbicidi è di solito proposta per assicurare la completa copertura delle aree infettabili (bersagli) e per fornire una umidità sufficiente per consentire la germinazione dei conidi (Klein, 1992). Tuttavia l'impiego di elevati volumi può deprimere l'uso dei bioerbicidi, perché influisce negativamente sui costi, sulle modalità e sui tempi di trasporto e applicazione dei prodotti. È stato osservato che il numero di lesioni prodotte o la densità di infezione non è influenzata dal solo volume di applicazione, ma piuttosto dalla dimensione delle gocce della sospensione applicata, nonché dalla persistenza delle gocce, dalla loro uniformità di distribuzione e dalla concentrazione dell'inoculo per ciascuna goccia. (Lawrie et al., 1997). E quindi l'efficacia del prodotto può essere fortemente influenzata dal dispositivo di distribuzione.

L'impiego di sistemi o tecnologie usualmente disponibili in agricoltura potrebbero influenzare l'accettabilità degli agenti da parte degli agricoltori, e allargarne il mercato. Per esempio, la "microbigation" cioè l'uso dei sistemi di irrigazione di precisione per l'applicazione di sospensioni conidiche al terreno è stato recentemente proposto (Boari et al., 2007). Tali sistemi sono già ampiamente utilizzati per la somministrazione di sostanze nutritive e curative oltre che acqua, direttamente in prossimità dell'apparato radicale delle colture. Un vantaggio dell'impiego dei sistemi di microirrigazione per distribuire bioerbicidi al terreno è la possibilità di proteggerli da fattori ambientali avversi, quali radiazioni UV o vento, oltre che dalle elevate temperature. Un ulteriore vantaggio è la distribuzione precisa in prossimità dell'apparato radicale e non nell'intero campo, determinando quindi una riduzione dei volumi dei trattamenti.

Altri sistemi disponibili per l'agricoltura di precisione, come ad esempio dispositivi che riescono a riconoscere la presenza della infestante sul suolo

nudo possono essere impiegati molto vantaggiosamente, trattando solo le piante bersaglio, e di conseguenza minimizzando i consumi e quindi i costi del trattamento.

L'applicazione di agenti microbici come "agenti concianti" dei semi o al momento del trapianto potrebbe certamente ridurre i costi di applicazione e distribuzione. In questo caso però gli agenti dovrebbero essere "rhizosphere competent", cioè essere in grado di crescere lungo le radici della coltura e rimanere vitale durante tutte le fasi di vita della pianta coltivata. Benché questa proprietà sia limitata solo a un numero limitato di patogeni, questa applicazione potrebbe essere molto utile nel caso di quelle specie, come le piante parassite (ad esempio specie di *Orobancha*), che dipendono completamente dalla pianta per l'intero ciclo vitale, vivendo costantemente a contatto dell'apparato radicale dell'ospite.

Un'altra interessante modalità applicativa è rappresentata dall'uso del TMGMV per il controllo di *S. viarum* (Charudattan et al., 2004). Poiché il virus viene distribuito su ampie superfici adibite a pascolo, è stato messo a punto un sistema di distribuzione a bassa pressione combinato con la abrasione delle piante, ottenuto con una specie di "maglia metallica" trainata dal mezzo semovente che esegue l'applicazione del virus immediatamente dopo, o in alternativa con un sistema ad alta pressione, che in pratica ha l'effetto di "iniettare" il virus nei tessuti vegetali.

Altri mezzi di distribuzione dei bioerbicidi sono le formulazioni solide, utilizzate nei trattamenti pre-emergenza, cioè per quei prodotti che colpiscono le infestanti al livello o al di sotto della superficie del terreno (Boyette et al., 1996). Fra i vari substrati impiegati per queste formulazioni si ricorda il "Pesta", a base di farina di frumento, studiato per esempio per l'applicazione di *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria crassa* e *Fusarium lateritium* (Connick et al., 1991) o farina di mais mista a sabbia per *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, un bioerbicida proposto per il controllo di *Cucurbita texana* (Boyette et al., 1984). Le formulazioni solide permettono di prolungare la shelf-life e agiscono come "tampone" proteggendo il microrganismo quando in campo si verificano condizioni climatiche avverse (Boyetchko, 1999).

#### INTEGRAZIONE DEGLI AGENTI DI BIOCONTROLLO CON ALTRI AGENTI, ERBICIDI O ALTRI COMPOSTI CHIMICI

Un importante fattore che può ridurre l'efficacia di un potenziale bioerbicida è l'abilità della infestante di resistere alla invasione e colonizzazione dell'agente di

biocontrollo. Numerosi tentativi sono stati fatti per combinare i bioerbicidi con composti chimici, come fungicidi ed erbicidi, o con sostanze naturali, come tossine ed enzimi, nel tentativo di aumentarne l'efficacia. Queste combinazioni possono ad esempio sopprimere o indebolire i meccanismi di difesa delle piante bersaglio, ad esempio bloccando la produzione di metaboliti secondari di difesa della pianta, o abbattendo le barriere fisiche all'attacco del patogeno, con il risultato di aumentare l'efficacia del biocontrollo (Duke et al., 2007, e riferimenti ivi contenuti).

Ad esempio, la strategia di impiegare dosi subletali di erbicida è stata utilizzata per aumentare l'efficacia di alcuni agenti patogeni, come nel caso del trattamento con glifosate a basse dosi che determina la inibizione della produzione di fitoalessine, rendendo la leguminosa infestante *Senna obtusifolia* più suscettibile alla infezione causata da *Alternaria cassiae* (Sharon et al., 1992). Altri studi riportano una migliore efficacia di *Pyricularia setariae* nel controllare il falso panico (*Setaria viridis*) una graminacea infestante, se applicato con dosi ridotte del graminicida setoxydim (Peng e Byer, 2005), o di *Ascochyta caulina* nel controllare *Chenopodium album* se i conidi del fungo vengono applicati insieme a dosi ridotte dell'erbicida metribuzin (Vurro et al., 2001).

Anche per i programmi di lotta biologica utilizzando insetti fitofagi, in particolare quando la pianta infestante presenta una distribuzione che richiede strategie integrate di gestione, lo *screening* dell'insetto agente di controllo prevede anche studi sugli effetti di erbicidi (a basso dosaggio) sul suo ciclo vitale e sul suo potenziale di distribuzione. Non mancano casi in cui tali studi mostrano addirittura un incremento della *fitness* dell'insetto quando si alimenta su pianta trattate a basse dosi di erbicida (Collier et al., 2007; Nelson e Lym, 2003).

Interessanti risultati sono stati anche ottenuti applicando gli agenti di biocontrollo insieme a composti in grado di ridurre le difese delle piante, come ad esempio chelatori del calcio, che riducono la formazione di callosio (Gressel et al., 2002) o con l'acido  $\delta$ -aminolevulinico, un precursore dei tetrapirroli, composti coinvolti nei processi di decolorazione e morte dei tessuti vegetali (Hirase et al., 2006).

Per aumentare ulteriormente l'efficacia erbicida degli agenti, è stata anche proposta una applicazione "multipla", consistente nella applicazione inondativa di più patogeni, per il controllo contemporaneo di alcune infestanti. Questo tipo di intervento può permettere sia di ampliare lo spettro d'ospite della miscela bioerbicida, ma anche la preparazione di una miscela "ad hoc" preparata in base alle infestanti da controllare. Ad esempio Chandramohan et al. (2003) hanno miscelato tre patogeni specifici: *Alternaria cassiae* (specifico per *Cassia obtusifolia*), *Phomopsis amaranthicola* (specifico per *Amaranthus*

spp.), e *Colletotrichum dematium* f. sp. *crotalariae* (specifico per *Crotalaria spectabilis*) riuscendo a controllare contemporaneamente le tre infestanti. L'eccellente controllo di sette graminacee infestanti è stato anche raggiunto con l'impiego contemporaneo di tre diversi patogeni specifici (*Drechslera gigantea*, *Exserohilum rostratum* e *E. longirostratus*) (Chandramohan et al., 2002).

#### MIGLIORAMENTO GENETICO

Numerose tecniche consentono di ottenere modifiche genetiche in funghi fitopatogeni. Tali strategie, per quanto non immediatamente perseguibili per fini pratici, consentono di acquisire importanti informazioni sulle interazioni pianta-patogeno, sulla comprensione dei meccanismi di virulenza e di difesa, e permettono di ipotizzare nuove strategie per aumentare l'efficacia degli agenti di biocontrollo. Ad esempio, alcuni geni cosiddetti "soft", come quelli codificanti carboidrati, auxine, pectinasi, espansine, cellulasi o ossalati, o geni "hard" cioè codificanti tossine come NEP1 e cerato-platanina sono stati recentemente inseriti nel genoma di alcuni potenziali micoerbicidi, quali *Fusarium* spp. e *Colletotrichum coccodes*, con interessanti risultati in termini di aumento di efficacia e anche ampliamento dello spettro d'ospite (Gressel et al., 2007). Mutazioni genetiche o la selezione di mutanti naturali consentirebbero anche di ottenere bioerbicidi con altre caratteristiche migliorate, come ad esempio la resistenza a pesticidi chimici, alla disidratazione, alle temperature estreme, o anche maggiori produttori di sostanze naturali.

#### RILASCIO CONGIUNTO DI FUNGHI E INSETTI

In alcuni casi il danno provocato dai singoli agenti di biocontrollo può non essere tale da garantire un sufficiente livello di riduzione della popolazione infestante. Già nel passato, l'associazione artropode-patogeno ha dimostrato di avere spesso delle valenze di sinergia e, in alcuni casi di simbiosi. A questo proposito si può citare l'associazione tra un coleottero curculionide e la ruggine *Puccinia punctiformis* su *Cirsium arvense* (Kluth et al., 2001): in questo caso, sembra che ci sia una preferenza della femmina del curculionide per piante infette, mentre la ruggine si può avvalere del coleottero come "vettore" per propagare l'infezione su altre piante.

Inoltre, larve di *Phytomyza orobanchia*, un dittero agromizide, sono state impiegate per rilasci inondativi (da 500 a 1000 per ettaro). Questi insetti, pur essendo in grado di nutrirsi intensamente di fusti e semi di Orobanche, e

pur determinando una riduzione della produzione di semi fino al 96 %, non sono sufficienti per un efficace controllo di *Orobanchae*, a causa dell'enorme numero di semi altamente longevi che tale specie produce (Klein e Kroschel, 2002). Tuttavia, il rilascio di insetti potrebbe essere molto più efficace se fossero impiegati non solo come agenti di biocontrollo, ma anche come mezzi di distribuzione di altri agenti di biocontrollo come i funghi fitopatogeni. Essi potrebbero trasportare conidi, spore o cellule di patogeni specifici, e questa capacità acquisterebbe maggiore importanza, piuttosto che la loro efficacia come agenti di controllo. Da questo punto di vista molti insetti, in passato scartati dai programmi perché non buoni "mangiatori" di infestanti, potrebbero essere reconsiderati come buoni "trasportatori" di agenti di controllo. Tale impiego è stato scarsamente considerato. Ad esempio, alcuni tentativi sono stati compiuti per utilizzare *Phytomyza vitalbae* per trasportare il fungo patogeno *Phoma clematidina* per il controllo di *Clematis vitalba* in Nuova Zelanda (Hill et al., 2003).

Esempi sinergici sono stati dimostrati per l'associazione *Aphthona-Rhizoctonia* su *Euphorbia esula* (Caesar et al., 1993); Kremer e Spencer (1989 a/b) hanno evidenziato come l'emittero *Niesthrea louisianica* potesse permettere una maggiore insorgenza di infezione di *Fusarium* spp. su *Abutilon theophrasti*.

In altri casi gli insetti possono, causando ferite o danni sulle piante, favorire la penetrazione dei patogeni e quindi aumentare la severità della malattia. Per esempio il curculionide *Ceutorhynchius troglodytes* crea lesioni che consentono al fungo patogeno *Phomopsis subordinaria* di penetrare nei tessuti di *Plantago lanceolata* (De Nooij, 1988).

Altri tentativi hanno considerato la possibilità di diffondere specie di *Fusarium* tramite il rilascio di insetti. Ad esempio, insetti che si cibano dei coni e dei semi di pini sono stati considerati come possibili agenti di diffusione del devastante cancro del pino causato da *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*, per la lotta biologica nei paesi dell'emisfero meridionale, dove le conifere infestanti sono fra i principali problemi ambientali ed ecologici (Hoover et al., 1996).

Infine, va evidenziato che il binomio insetto-fungo potrebbe esprimere la sua potenzialità se integrato in un processo semi-industriale: ovvero, se sia il fungo che l'insetto fossero moltiplicati in modo massale in specifiche strutture (biofabbriche) o/e che fossero messe a punto trappole "catch-and-release", utilizzando feromoni sessuali e/o di aggregazione e camere di contaminazione in cui l'insetto viene catturato e successivamente "sporcato" dalle spore del fungo prima di essere liberato di nuovo nell'ambiente (Cosse et al., 2006; Vega et al., 2008).

## RISCHI

Benché in genere ben disposta verso le pratiche di agricoltura biologica e richieda metodi sicuri e sani per la produzione di alimenti, l'opinione pubblica appare invece preoccupata dei rischi e delle conseguenze del rilascio nell'ambiente di organismi, sia per l'ambiente in generale, e sia per gli organismi non-bersaglio, l'Uomo in primo luogo.

Per l'analisi e la valutazione di tali rischi potrebbe rivelarsi utile l'impiego di strumenti genetici, come ad esempio marcatori genetici specifici che consentirebbero di riconoscere e di "tracciare" gli isolati microbici dopo il loro rilascio, e quindi permettere senza dubbi di determinare il loro "destino" nell'ambiente, la stabilità, la persistenza, o i rischi di dispersione.

La competizione per lo spazio e i nutrienti è una strategia molto comune nei microrganismi per avvantaggiarsi rispetto ad altri organismi. Il rischio di una "sostituzione competitiva" nel caso di agenti per la lotta biologica alle infestanti potrebbe essere considerata come la possibilità che un agente introdotto potrebbe escludere un organismo nativo dal suo ambiente, quindi modificando negativamente l'ecosistema. Per esempio, nella lotta alle infestanti, nel caso di applicazione al suolo potrebbe esserci il rischio, anche se molto basso, di un effetto negativo sulla composizione microbica della rizosfera della coltura.

Alcune spore o conidi fungini possono causare allergie in soggetti sensibili, come anche reazioni in animali domestici o selvatici. Potenzialmente, un agente di lotta alle infestanti potrebbe possedere questa peculiarità, che deve essere opportunamente valutata.

Spesso gli organismi fitopatogeni producono metaboliti bioattivi, tossine, antibiotici, e questi composti potrebbero essere prodotti e dispersi da agenti di biocontrollo quando applicati e rilasciati nell'ambiente. In questo caso sarebbe importante valutare il rischio reale di produzione di tali metaboliti, ad esempio valutando la esatta produzione di tossine quando i funghi sono formulati, o quando sono applicati e crescono sulle piante bersaglio. Questo perché molti microrganismi producono elevate quantità di metaboliti secondari solo quando accresciuti per alcune settimane su idonei substrati di crescita, dove hanno a disposizione elevate quantità di sostanze nutritive e possono produrre cospicue quantità di biomassa, come avviene ad esempio per le micotossine prodotte durante la conservazione di cereali, o nel caso di contaminazione di alimenti. Ma l'accumulo di metaboliti può essere sensibilmente diverso nel caso di un fungo formulato come conidi disidratati, o clamidospore, come sono di solito i micoerbicidi. In condizione di campo le

sostanze nutritive non sono così abbondanti, e di solito il micoerbicida causa un elevato grado di malattia entro pochi giorni, e quindi scompare insieme alla pianta bersaglio. Così, la potenzialità di produrre elevate quantità di tossine sembra essere piuttosto limitato. Ad esempio *Myrothecium verrucaria*, un fungo patogeno proposto come agente per il biocontrollo di *Pueraria montana* var. *lobata*, quando accresciuto sia su substrati liquidi che solidi produce un gran numero di tricoteceni macrociclici, delle pericolose micotossine come epiroridin E, verrucarina A e J, a concentrazioni nell'ordine di milligrammi per grammo di coltura. Tuttavia nessuno di questi metaboliti è stato individuato per analisi HPLC nei tessuti della pianta ospite infettati artificialmente con i conidi di questo fungo (Abbas et al., 2001).

Un altro rischio non insignificante e percepito dalla opinione pubblica è la possibilità che gli agenti di biocontrollo possano colpire piante coltivate o native. Questo problema è uno delle questioni più importanti e controverse del rilascio di agenti di controllo. Comunque, molti patogeni impiegati come bioerbicidi sono specifici o hanno un numero molto limitato di ospiti, mentre la questione per il metodo classico non si pone, perché vengono rilasciati solo organismi altamente specializzati. Per i patogeni meno specifici il problema può essere risolto utilizzando opportune procedure di applicazione, o mediante il rilascio in ambienti privi di rischio, come indicato nel già citato esempio del Sarritor.

Un altro aspetto che necessita di essere valutato è il rischio genetico, inteso come la possibilità di mutazioni genetiche che potrebbero avere effetti sullo spettro d'ospite, o di ricombinazioni sessuali o asessuali con altre specie o con specie patogene correlate.

Comunque, le tecnologie e gli strumenti scientifici oggi a disposizione sono così accurati e precisi che permettono di dare una esatta valutazione di questi rischi. Questo può avere delle conseguenze positive sull'accettazione degli organismi per la lotta biologica alle infestanti, sia a livello di opinione pubblica e sia di legislazione.

#### RIASSUNTO

La lotta biologica alle specie vegetali infestanti è una applicazione "non convenzionale" in particolare della patologia vegetale e della entomologia, grazie alla quale un organismo dannoso è utilizzato per mitigare l'effetto negativo di specie vegetali bersaglio senza danneggiare le specie vegetali non-bersaglio, come quelle coltivate o indigene. La lotta biologica contro le infestanti viene realizzata con due modalità fondamentali: il metodo "classico" e quello "inondativo". I principali agenti di biocontrollo, le modalità per l'appli-



cazione e il rilascio, nonché i vantaggi e gli svantaggi rispetto alle strategie convenzionali di gestione vengono descritti in questo articolo. Vengono anche illustrati alcuni dei più importanti successi ottenuti nel campo della lotta biologica, i principali requisiti necessari per rendere un potenziale agente adatto all'impiego, i maggiori fattori che limitano l'utilizzo di agenti di biocontrollo, alcune strategie possibili per migliorarne l'efficacia, e i potenziali rischi derivanti dal loro rilascio nell'ambiente.

# ABSTRACT

Biological control of weeds is a “non-conventional” application mainly of plant pathology and entomology, thanks to which a damaging organism is applied to reduce the negative effects of the target plants, avoiding any damage to the non-target plants, such as crop or endemic species. Weed biological control is realized with two main strategies: the “classic” and the “inundative” method. The main biocontrol agents, the strategies of release and application, as well as the advantages and disadvantages of these strategies in comparison with other conventional control methods are described in the article. Some of the main successes in the field of weed biocontrol are also described, together with the main characteristics that make a potential agent suitable for the release, the limiting factors for their application, some strategies to enhance their efficacy, and the possible risks resulting from their release into the environment.

# RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ABBAS H.K., TAK H., BOYETTE C.D., SHIER W.T., JARVIS B.B. (2001): *Macrocytic trichothecenes are undetectable in kudzu (Pueraria montana) plants treated with a high-producing isolate of Myrothecium verrucaria*, «Phytochemistry», 58, pp. 269-276.
- ANTONINI G., AUDISIO P., CRISTOFARO M., COLETTI G., DE BIASE A., DOLGOVSKAYA R., KOROTYAEV B., REZNIK S., RECTOR B., TRONCI C., VOLKOVITSH M. (2005): *Psylliodes sp. nr. chalcomerus and Ceratapion basicorne: synergism of morphological observations, life history, host range and genetic analyses for the selection as candidates for the biological control of Centaurea solstitialis L.*, Proceedings 8th International Conference on Ecology and Management of Alien Plant Invasions, Katowice, Poland, p. 44.
- BARTON J. (2004): *How good are we at predicting the field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds?*, «Biological Control», 31, pp. 99-122.
- BARTON J., FOWLER S.V., GIANOTTI A. F., WINKS C.J., DE BEURS M., ARNOLD G.C., FORRESTER G. (2007): *Successful biological control of mist flower (Ageratina riparia) in New Zealand: Agent establishment, impact and benefits to the native flora*, «Biological Control», 40, pp. 370-385.
- BERNER D.K., BRUCKART W.L. (2005): *A decision tree for evaluation of exotic plant pathogens for classical biological control of introduced invasive weeds*, «Biological Control», 34, pp. 222-232.
- BOARI A., ZUCCARI D., VURRO M. (2008): *“Microbigation”: delivery of biological control agents through drip irrigation systems*, «Irrigation Science», 26, pp 101-107.
- BOYETCHKO S. M. (1999): *Innovative applications of microbial agents for biological weed*

- control, in *Biotechnological Approaches in Biocontrol of Plant Pathogens*, a cura di K.G. Mukerji, Plenum Publishers, New York, pp. 73-97.
- BOYETCHKO S.M., ROSSKOPF E.N., CAESAR A.J., CHARUDATTAN R. (2002): *Biological weed control with pathogens: Search for candidates to applications*, in *Applied Mycology and Biotechnology*, a cura di G.G. Khachatourians e D.K. Arora, Elsevier Science, The Netherlands, II, pp. 239-274.
- BOYETTE C.D., QUIMBY P.C. JR., CAESAR A.J., BIRDSALL J.L., CONNICK W.J. JR., DAIGLE D.J., JACKSON M.A., EGLEY G.H., ABBAS H.K. (1996): *Adjuvants, formulations, and spraying systems for improvement of mycoherbicides*, «Weed Technology», 10, pp. 637-644.
- BOYETTE C.D., TEMPLETON G.E., OLIVER L.R. (1984): *Texas gourd (Cucurbita texana) control with Fusarium lateritium f. sp. cucurbitae*, «Weed Science», 32, pp. 649-655.
- CAESAR A.J., CAMPOBASSO G., TERRAGITTI G. (1998): *Identification, pathogenicity and comparative virulence of Fusarium spp. associated with diseased Euphorbia spp. in Europe*, «Biocontrol Science and Technology», 8, pp. 313-319.
- CAESAR A.J., REES N.E., SPENCER N.R., QUIMBY P.C. JR. (1993): *Characterization of Rhizoctonia spp. causing disease of leafy spurge in the northern plains*, «Plant Disease», 77, pp. 681-684.
- CAMPOBASSO G., SOBHIAN R., KNUTSON L., TERRAGITTI G. (1998): *Host specificity of Bangasternus orientalis Capiomont (Coleoptera: Curculionidae) introduced into the United States for biological control of yellow starthistle (Centaurea solstitialis L., Asteraceae, Carduaceae)*, «Environmental Entomology», 27, pp. 1525-1530.
- CARVALHEIRO L.G., BUCKLEY Y.M., VENTIM R., MEMMOTT, J. (2008): *Assessing indirect impacts of biocontrol agents on native biodiversity: a community level approach*, Proceedings XII ISBCW, a cura di M.H. Julien, R. Sforza, M.C. Bon, H.C. Evans, P.E. Hatcher, H.L. Hinz, B.G. Rector, CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 91-94.
- CHANDRAMOHAN S., CHARUDATTAN R. (2003): *A multiple-pathogen system for bioherbicide control of several weeds*, «Biocontrol Science and Technology», 13, pp. 199-205.
- CHANDRAMOHAN S., CHARUDATTAN R., SONODA R.M., SINGH M. (2002): *Field evaluation of a fungal mixture for the control of seven weedy grasses*, «Weed Science», 50, pp. 204-213.
- CHARUDATTAN R. (1988): *Inundative control of weeds with indigenous fungal plant pathogens*, in *Fungi in Biological Control Systems*, a cura di M.N. Burge, Manchester University Press, Manchester, U.K., pp. 86-110.
- CHARUDATTAN R. (2001): *Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology*, «Biocontrol», 46, pp. 229-260.
- CHARUDATTAN R. (2005): *Ecological, practical, and political inputs into selection of weed targets: what makes a good biological control target?*, «Biological Control», 35, pp. 183-196.
- CHARUDATTAN R., HIEBERT E. (2007): *A plant virus as a bioherbicide for Tropical Soda Apple, Solanum viarum*, «Outlooks on Pest Management», 18, pp. 167-171.
- CHARUDATTAN R., PETERSEN M.S., HIEBERT E. (2004): *Use of Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)-mediated lethal hypersensitive response (HR) as a novel method of weed control*, U.S. Patent No. 6,689,718 B2, February 10, 2004.
- CLEMENT S.L., MIMMOCCHI T., SOBHIAN R., DUNN P.H. (1988): *Host specificity of adult Eustenopus hirtus (Waltl) (Coleoptera: Curculionidae), a potential biological control agent of yellow starthistle, Centaurea solstitialis L. (Asteraceae, Carduaceae)*, «Proceedings of the Entomological Society of Washington», 90, pp. 501-507.

- CLINE D., JURICEK C., LYM R.G., KIRBY D.R. (2008): *Leafy spurge* (*Euphorbia esula*) control with *Aphthona* spp. affects seedbank composition and native grass reestablishment, «Invasive Plant Science and Management», 1, pp. 120-132.
- COLLIER T.R., ENLOE S.F., SCIEGIENKA J.K., MENALLED F.D. (2007): *Combined impacts of Ceutorhynchus litura and herbicide treatments for Canada thistle suppression*, «Biological Control», 43, pp 231-236.
- CONNICK W.J. JR., BOYETTE C.D., MCALPINE J.R. (1991): *Formulation of mycoherbicides using pasta-like process*, «Biological Control», 1, pp. 281-287.
- COSSE A.A., BARTELT R.J., ZILKOWSKI B.W., BEAN D.W., ANDRESS E.R. (2006): *Behaviourally active green leaf volatiles for monitoring the leaf beetle Diorhabda elongata, a biocontrol agent of saltcedar, Tamarix spp.*, «Journal of Chemical Ecology», 32, pp. 2695-2708.
- CRISTOFARO M., DOLGOVSKAYA M.Y., KONSTANTINOV A., LECCE F., REZNIK S., SMITH L., TRONCI C., VOLKOVITSH M.G. (2004): *Psylliodes chalconera (Illiger) (Coleoptera: Chrysomelidae: alticinae), a flea beetle candidate for biological control of yellow starthistle Centaurea solstitialis*, in *Proceedings of the XI Symposium on Biological Control of Weeds*, Canberra, Australia, April 27-May 2 2003, a cura di J.M. Cullen, D.T. Briesse, D.J. Kriticos, W.M. Lonsdale, L. Morin, J.K. Scott, pp. 75-80.
- CULLEN J.M. (1985): *Bringing the cost benefit analysis of biological control of Chondrilla juncea up to date*, in *Proceedings of the VI ISBCW*, August 19-25, 1984, Vancouver, Canada, a cura di E.S. Delfosse, Agriculture Canada, Ottawa, pp. 145-152.
- DELOACH C.J. (1978): *Considerations in introducing foreign biotic agents to control native weeds of rangelands*, in *Proceedings of the IV International Symposium on the Biological Control of Weeds*, Gainesville, Florida, 30 August–2 September 1976, University of Florida, Gainesville, pp. 39-50.
- DELOACH C.J., CARRUTHERS R.I., LOVICH J.E., DUDLEY T.L., SMITH S.D. (2000): *Ecological interactions in the biological control of saltcedar (Tamarix spp.) in the United States: toward a new understanding*, in *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4–14 July 1999, a cura di N.R. Spencer, Montana State University, Bozeman, pp. 819-873.
- DELOACH C.J., LEWIS P.A., HERR J.C., CARRUTHERS R.I., TRACY J.L., JOHNSON J. (2003): *Host specificity of the leaf beetle, Diorhabda elongata deserticola (Coleoptera: Chrysomelidae) from Asia, a biological control agent for saltcedars (Tamarix: Tamaricaceae) in the western United States*, «Biological Control», 27, pp. 117-147.
- DE NOOIJ M. (1988): *The role of weevils in the infection process of the fungus Phomopsis subordinaria in Plantago lanceolata*, «Oikos», 52, pp. 51-58.
- DUKE S.O., WEDGE D.E., CERDEIRA A.L., MATALLO M.B. (2007): *Interactions of synthetic herbicides with plant disease and microbial herbicides*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 277-296.
- EVANS H.C., FRÖHLICH J., SHAMOUN S.F. (2001): *Biological control of weeds. Fungal biocontrol agents of weeds*, in *Bio-exploitation of Filamentous Fungi* a cura di S.B. Pointing e K.D. Hyde, Fungal Diversity Press, Hong Kong, China, pp. 349-401.
- FISHER A.J., WOODS DM, SMITH L., BRUCKART W. (2007): *Developing an optimal release strategy for the rust fungus Puccinia jaceae var. solstitialis for biological control of Centaurea solstitialis (yellow starthistle)*, «Biological Control», 42, pp. 161-171.
- FRANTZEN J., PAUL N.D., MÜLLER-SHÄRER H. (2001): *The system management approach of biological weed control: some theoretical considerations and aspects of application*, «Bio-Control», 46, pp. 139-55.

- GOURLAY A.H., WITTENBERG R., HILL R.L., SPIERS A.G., FOWLER S.V. (2000): *The biological control program against Clematis vitalba in New Zealand*, in *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4–10 July 1999, a cura di N.R. Spencer, Montana State University, Bozeman, pp. 799-806.
- GRESSEL J., MEIR S., HERSCHKOVITZ Y., AL-AHMAD H., GREENSPOON I., BABALOLA O., AMSELLEM Z. (2007): *Approaches to and successes in developing transgenically enhanced mycoherbicides*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management* a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 297-305.
- GRESSEL J., MICHAELI D., KAMPFEL V., AMSELLEM Z., WARSHAWSKY A. (2002): *Ultralow calcium requirements of fungi facilitate use of calcium regulating agents to suppress host calcium-dependent defenses, synergizing infection by a mycoherbicide*, «Journal of Agriculture and Food Chemistry», 50, pp. 6353-6360.
- HATCHER P.E., PAUL N.D. (2001): *Plant pathogen–herbivore interactions and their effects on weeds*, in *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations*, a cura di M.J. Jeger e N.J. Spence, CABI International, UK, pp. 193-225.
- HARRIS P. (1971): *Current approaches to biological control of weeds*, in *Technical communication*, Commonwealth Institute of Biological Control, 4, pp. 67-76.
- HARRIS P. (1973): *Insects in the population dynamics of plants*, in *Insect/Plant relationships*, a cura di M. Van Emden, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 201-209.
- HARRIS P. (1977): *Biological control of weeds: from art to science*, in *Proceedings of the 15th International Congress of Entomology*, Washington, D.C. 1976, pp. 478-483.
- HILL R.L., FOWLER S.V., WITTENBERG R., BARTON J., CASONATO S., GOURLAY A.H., WINKS C. (2003): *Phytophthora vitalbae, Phoma clematidina, and insect–plant pathogen interactions in the biological control of weeds*, in *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*, Canberra, Australia, 27 April-2 May 2003, a cura di J.M. Cullen, D.T. Brieseman, D.J. Kriticos, W.M. Lonsdale, L. Morin, J.K. Scott, pp. 48-56.
- HIRASE K., NISHIDA M., SHINMI T. (2006): *Effect of  $\delta$ -aminolevulinic acid on the herbicidal efficacy of foliar-applied MTB-951, a mycoherbicide to control Echinochloa crus-galli L.*, «Weed Biology Management», 6, pp. 44-49.
- HOOVER K., WOOD D.L., STORER A.J., FOX J.W., BROS W.E. (1996): *Transmission of the pine pitch canker fungus Fusarium subglutinans f. sp. pini, to Monterey pine, Pinus radiata, by cone- and twig-infesting beetles*, «The Canadian Entomologist», 128, pp. 981-994.
- HUFFAKER C.B. (1958): *Principles of biological control of weeds*, in *Proceeding of the X International Congress of Entomology*, Montreal, 1956, pp. 533-542.
- IMAIZUMI S., HONDA M., MORITA K., TATENO A., FUJIMORI T. (1999): *Study of the biological control of annual bluegrass using a plant-pathogenic bacterium*, «Journal of Weed Science and Technology», 44, pp. 361-369.
- INMAN R.E. (1971): *A preliminary evaluation of Rumex rust as a biological control agent for curly dock*, «Phytopathology», 61, pp. 102-107.
- JULIEN M.H., GRIFFITHS M.W. (1988): *Biological Control of Weeds. A world catalogue of agents and their target weeds*, CAB International, Wallingford, UK, II, 146 pp.
- KLEIN O., KROSCHER J. (2002): *Biological control of Orobanche spp. with Phytophthora orobanchia, a review*, «BioControl», 47, pp. 245-277.
- KLEIN T. (1992): *The application of mycoherbicides*, «Plant Protection Q.», 7, pp. 161-162.

- KLUTH C., KREUSS A., TSCHARNTKE T. (2001): *Interactions between the rust fungus Puccinia punctiformis and ectophagous and endophagous insects on creeping thistle*, «Journal of Applied Ecology», 38, pp. 548-556.
- KREMER R.J., CAESAR A.J., SOUISSI T. (2004): *Soilborne microorganisms of Euphorbia are potential biological control agents of the invasive weed leafy spurge*, «Applied Soil Ecology», 32, pp. 27-37.
- KREMER R.J., SPENCER N.R. (1989a): *Impact of a seed-feeding insect and microorganisms on velvetleaf (Abutilon theophrasti) seed viability*, «Weed Science», 37, pp. 211-216.
- KREMER R.J., SPENCER N.R. (1989b): *Interaction of insects, fungi, and burial on velvetleaf (Abutilon theophrasti) seed viability*, «Weed Technology», 3, pp. 322-328.
- LAWRIE J., GREAVES M.P., DOWN V.M., CHASSOT A. (1997): *Some effects of spray droplet size on distribution, germination of and infection by mycoherbicide spores*, «Aspects of Applied Biology», 48, pp. 175-182.
- LOUDA S.M., RAND T.A., RUSSELL F.L., ARNETT A.E. (2005): *Assessment of ecological risks in weed biocontrol: input from retrospective ecological analyses*, «Biological Control», 35, pp. 253-264.
- LYM R.G., NELSON J.A. (2000): *Biological control of leafy spurge (Euphorbia esula) with Aphthona spp. along railroad right-of-ways*, «Weed Technology», 14, pp. 642-646.
- MANN J. (1969): *Cactus-feeding insects and mites*, «U.S. National Museum Bulletin», 256, p. 158.
- MONFREDA R., DE LILLO E., CRISTOFARO M. (2005): *Studio preliminare degli Eriophyoidae infedati su Centaurea solstitialis L. nel bacino del Mediterraneo*, in *Proceedings XX Congresso Nazionale di Entomologia*, Assisi, 13-18 Giugno 2005, p. 396.
- MONFREDA R., DE LILLO E., CRISTOFARO M. (2007): *Eriophyoid mites on Centaurea solstitialis L. in the Mediterranean area*, in *Proceedings XII International Symposium on Biological Control of Weeds*, 22-27 April, 2007, La Grande Motte, France, p. 112.
- MORIN L., JOURDAN M., PAYNTER Q. (2000): *The gloomy future of the broom rust as a biocontrol agent*, in *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4-10 July 1999, a cura di N.R. Spencer, Montana State University, Bozeman, USA, pp. 633-638.
- MORRIS M.J., WOOD A.R., DEN BREEËN A. (1999): *Plant pathogens and biological control of weeds in South Africa: a review of projects and progress during the last decade*, «African Entomology Memoir», 1, pp. 129-137.
- MORRIS M.J. (1997): *Impact of the gall-forming rust fungus Uromycladium tepperianum on the invasive tree Acacia saligna in South Africa*, «Biological Control», 10, pp. 75-82.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE - NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1969): *Principles of Plant and Animal Pest Control. Vol. 2, Weed Control*, Natl Acad. Sci. Publ., 471pp.
- NELSON J.A., LYM R.G. (2003): *Interactive effects of Aphthona nigriscutis and picloram plus 2,4-D in leafy spurge (Euphorbia esula)*, «Weed Science», 51, pp. 118-124.
- OEHRENS E. (1977): *Biological control of blackberry through the introduction of the rust, Phragmidium violaceum, in Chile*, «FAO Plant Protection Bulletin», 25, pp. 26-28.
- PENG G., BYER K.N. (2005): *Interactions of Pyricularia setariae with herbicides for control of green foxtail (Setaria viridis)*, «Weed Technology», 19, pp. 589-598.
- PITCAIRN M.J., SCHOENIG S., YACOB R., GENDRON J. (2006): *Yellow starthistle continues its spread in California*, «California Agriculture», 60, pp. 83-90.
- PITCAIRN M.J., WOODS D.M., POPESCU V. (2006): *Changes in densities of biological control agents and yellow starthistle at long-term study sites in California*, «Proceedings Western Society of Weed Science», 59, pp. 58.

- ROSSKOPF E.N., CHARUDATTAN R., KADIR J.B. (1999): *Use of plant pathogens in weed control*, in *Handbook of Biological Control*, a cura di T.S. Bellows e T.W. Fisher, Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 891-918.
- SCHROEDER D. (1983): *Biological control of weeds*, in *Recent advances in weed control*, a cura di W.W. Fletcher, CAB, Slough, UK, pp. 41-77.
- SHARON A., AMSELLEM Z., GRESSEL J. (1992): *Glyphosate suppression of an elicited defense response: Increased susceptibility of Cassia obtusifolia to a mycoherbicide*, «Plant Physiology», 98, pp. 654-659.
- SHEPPARD A.W., SHAW R.H., SFORZA R. (2006): *Top 20 environmental weeds for classical biological control in Europe: a review of opportunities, regulations and other barriers to adoption*, «Weed Research», 46, pp. 93-177.
- SMITH L., HAYAT R., CRISTOFARO M., TRONCI C., TOZLU G., LECCE F. (2006): *Assessment of risk of attack to safflower by Ceratapion basicorne (Coleoptera: Apionidae), a prospective biological control agent of Centaurea solstitialis (Asteraceae)*, «Biological Control», 36, pp. 337-344.
- SOBHIAN R. (1993): *Life history and host specificity of Urophora sirunaseva (Hering) (Dipt., Tephritidae), a candidate for biological control of yellow starthistle, with remarks on the host plant*, «Zeitschrift für Angewandte Entomologie», 116, pp. 381-390.
- SOBHIAN R., FORNASARI L. (1994): *Biology of Larinus curtus Hochhut (Coleoptera: Curculionidae), a European weevil for biological control of yellow starthistle, Centaurea solstitialis L. (Asteraceae), in the United States*, «Biological control: theory and applications in pest-management», 4 (4), pp. 328-335.
- TEBEEST D.O., YANG X., CISAR C.R. (1992): *The status of biological control of weeds with fungal pathogens*, «Annual Review of Phytopathology», 30, pp. 637-657.
- THOMPSON B.M., KIRKPATRICK M.M., SANDS D.C., PILGERAM A.L. (2007): *Genetically enhancing the efficacy of plant pathogens for control of weeds*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 267-275.
- TRUJILLO E.E. (1985): *Biological control of Hamakua pa-makani with Cercospora sp. in Hawaii*, in *Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds*, August 19-25, 1984, Vancouver, Canada, a cura di E.S. Delfosse, Agriculture Canada, Ottawa, pp. 66-671.
- TRUJILLO E.E. (2005): *History and success of plant pathogens for biological control of introduced weeds in Hawaii*, «Biological Control», 33, pp. 113-122.
- TRUJILLO E.E., ARAGAKI M., SHOEMAKER R.A. (1988): *Infection, disease development, and axenic culture of Entyloma compositarum, the cause of Hamakua pamakani blight in Hawaii*, «Plant Disease», 72, pp. 355-357.
- VEGA F., DOWD P.F., LACEY L.A., PELL J.K., JACKSON D.M., KLEIN M.G. (2008): *Dissemination of beneficial microbial agents by insects*, in *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Springer, The Netherlands, Chapter 3, pp. 127-146.
- VURRO M. (2007): *Benefits and risks of using fungal toxins in biological control strategies*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 53-74.
- VURRO M., CASELLA F. (2008): *Weed microbial biocontrol agents: benefits and limitations*, «Outlooks on Pest Management», 19, pp. 67-72.
- VURRO M., ZONNO M.C., EVIDENTE A., ANDOLFI A., MONTEMURRO P. (2001): *Enhancement of efficacy of Ascochyta caulina to control Chenopodium album by use of phytotoxins and reduced rates of herbicides*, «Biological Control», 21, pp. 182-190.

- WAPSHERE A.J. (1974a): *A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control*, «Annals of Applied Biology», 77, pp. 201-211.
- WAPSHERE A.J. (1974b): *Host specificity of phytophagous organisms and the evolutionary centres of plant genera or subgenera*, «Entomophaga», 19, pp. 301-309.
- WAPSHERE A.J. (1975): *A protocol for programmes for biological control of weeds*, «Pest Articles and News Summaries», 21, pp. 295-303.
- WATSON A.K. (1991): *The classical approach with plants pathogens*, in *Microbial Control of Weeds*, a cura di D.O. TeBeest, Chapman & Hall Inc., New York, USA, pp. 3-23.
- WATSON A.K. (2007): *Sclerotinia minor - Biocontrol Target or Agent?* in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 205-211.





## Malattie degli ortofrutticoli in postraccolta

### I. INTRODUZIONE

In questi ultimi decenni l'agricoltura ha subito profondi cambiamenti per adeguarsi alla rapida evoluzione dell'economia e del mercato e alle mutate esigenze del consumatore. La concentrazione di specifiche produzioni in particolari aree e in particolari momenti dell'anno determina pericolosi fenomeni di sovrapproduzione con difficoltà di collocazione sul mercato e prezzi non remunerativi; d'altra parte i trasporti su gomma, ferrovia, mare o tramite aerei permettono a tutte le merci, compresi frutta e ortaggi, di raggiungere mercati molto distanti, venendo incontro alle richieste del consumatore, che sempre di più preferisce prodotti freschi. Come noto, infatti, i prodotti vegetali freschi forniscono nutrienti essenziali e costituiscono una delle maggiori fonti di importanti sostanze per il benessere e la salute dell'uomo, come carboidrati, antiossidanti, sostanze anticancerogene, ecc. (Lampe, 1999). Per poter differire nel tempo e nello spazio tali produzioni è necessario sottoporle a un periodo più o meno lungo di conservazione in relazione alle caratteristiche del prodotto e alle richieste del mercato. Inoltre, alcune specie, come le fragole e i piccoli frutti, si conservano per pochi giorni (2-3) prima di essere poste sul mercato, altre, come pere, mele e actinidia, sopportano periodi di conservazione più lunghi (fino a 7 mesi), anzi, talora, tendono a incrementare nel tempo le loro caratteristiche organolettiche. Durante la conservazione i frutti, ricchi di acqua ed elementi nutritivi, rappresentano un substrato ideale per lo sviluppo di microrganismi patoge-

\* Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-alimentare, Università degli Studi di Bologna

\*\* Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari

ni che, instaurando processi di marcescenza, provocano la non commerciabilità dei frutti infetti e la conseguente perdita di prodotto. I consumatori ben conoscono questo problema, quando frutti freschi appena comprati ammuffiscono nell'arco di pochi giorni. Le perdite in questa fase vanno da un minimo del 10-15% nei paesi a tecnologia avanzata, a oltre il 50% nei paesi in via di sviluppo (Coursey e Booth, 1972; Wilson e Wisniewski, 1989); in Italia esse si aggirano mediamente intorno al 10% (Alvisi, 1987). Il danno economico determinato dagli scarti è elevato e cumulativo, poiché si verifica su un prodotto che per il concorso dei costi di produzione, raccolta, selezione, conservazione, confezionamento, trasporto, distribuzione, ecc. ha un valore aggiunto via via più elevato e il danno risulta tanto più grave quanto più il deterioramento si verifica nelle ultime fasi della filiera. Il solo passaggio dal campo al consumatore può portare a un incremento del valore iniziale di 2-3 volte; a esso, nel caso di non idoneità alla vendita, deve essere aggiunto l'onere per il ritiro e l'eventuale rilavorazione o smaltimento del prodotto stesso.

È dall'inizio degli anni 60 che, attraverso nuovi fungicidi e lo studio di nuove tecnologie di conservazione (atmosfera controllata, atmosfera modificata, atmosfera a basso livello di ossigeno) è stato possibile estendere la vita postraccolta dei frutti riducendo in maniera significativa le perdite.

Le infezioni fungine rappresentano la principale causa di deterioramento degli ortofrutticoli in postraccolta (Sommer et al., 1992). Sebbene la difesa chimica assuma una posizione di rilievo nell'ambito della protezione post-raccolta, la possibilità di intervenire mediante agrofarmaci è rigidamente regolamentata dalla legislazione Comunitaria e Nazionale degli Stati membri dell'UE (DM 19/05/2000 - Recepimento delle direttive n. 97/41 CE; n. 1999/65 CE; n. 1999/71 CE); attualmente sono pochissimi i principi attivi utilizzabili contro le alterazioni postraccolta e per alcuni prodotti, come le drupacee e l'uva, non è consentito l'uso di alcuna sostanza di sintesi. La situazione appena descritta, nonché la necessità di progettare un'agricoltura rispondente alle nuove sfide aperte dall'allargamento dell'Unione Europea, ma anche la crescente attenzione dei consumatori che richiedono prodotti ortofrutticoli privi di residui di antiparassitari, le restrizioni legislative che mirano a una maggiore sicurezza alimentare, le problematiche tecniche legate allo sviluppo di ceppi di patogeni resistenti ai pochi fungicidi ammessi e la necessità di prodotti di elevata qualità globale, hanno indirizzato la ricerca verso la messa a punto di sistemi di difesa alternativi a quelli chimici. Nell'ambito di questa nota si cercherà di esaminare criticamente quanto è stato fatto in rela-

zione allo sviluppo di mezzi alternativi di lotta contro le malattie postraccolta degli ortofrutticoli freschi mettendo in risalto i punti di forza e quelli che ne hanno limitato l'applicabilità, allo scopo di fornire spunti di riflessione per raggiungere risultati pratici.

## 2. MEZZI DI LOTTA

Tra le numerose tecnologie alternative ai fungicidi di sintesi, messe a punto nel corso di oltre 20 anni di ricerca, alcune hanno ottenuto interessanti risultati, in particolare: 1) l'uso di microrganismi antagonisti, 2) i trattamenti con composti di origine naturale, 3) i trattamenti con additivi alimentari dotati di attività antifungina e 4) l'applicazione di mezzi fisici.

### 2.1 *Microrganismi antagonisti*

La ricerca in questo settore vanta un numero considerevole di esperienze sia su piccola scala che su scala più ampia, ed è giunta alla registrazione di prodotti commerciali, come i biofungicidi: Aspire® (Ecogen, Inc., Languore, PA) a base di *Candida oleophila*, utilizzato soprattutto contro *Penicillium* sugli agrumi; BioSave® 100 e 110 (JET Harvest Solutions, Longwood, PL) a base di due ceppi di *Pseudomonas syringae*, utilizzato principalmente per controllare malattie delle patate; YeldPlus® (Anchor Yeast, Cape Town) a base di *Cryptococcus albidus*, per contrastare malattie delle pomacee; Shemer® (AgroGreen, Asgdod) a base di *Metschnikovia fruticola*, commercializzato in Israele contro malattie delle patate dolci e delle carote. Aspire® e YeldPlus®, tuttavia, non sono più in commercio, mentre, in Canada la Neova Technologies (Abbotsford, British Columbia) sta sviluppando un prodotto a base di *C. saitoana*. In Europa l'impiego di questi biofungicidi non è ancora autorizzato; solo recentemente è stata ottenuta la registrazione di CandiFruit (Sipcam Inagra, S.A. Valencia) a base di *C. sake*, ma limitatamente alla Spagna, mentre in Belgio la BioNext sta sviluppando un prodotto a base di *C. oleophila*. La Comunità Europea ha finanziato due importanti progetti di ricerca sull'impiego di mezzi alternativi ai fungicidi in postraccolta, il primo (Biopostharvest) è terminato nel 2004, mentre il secondo (Isafruit: [www.isafruit.org](http://www.isafruit.org)) terminerà nel 2009. Nonostante tutti questi sforzi gli agenti di lotta biologica non sono ancora entrati nella routine delle normali pratiche di lavorazione postraccolta. I motivi di questa situazione sono molteplici ma possono essere ricondotti

fondamentalmente a tre: 1) insufficiente e incostante attività antifungina degli antagonisti, 2) difficoltà nell'ottenere una adeguata formulazione, 3) difficoltà di controllare quei patogeni che causano infezioni latenti, insediandosi nei frutti prima della raccolta. I risultati a livello semi-commerciale su agrumi e su mele mostrano una capacità di inibizione delle infezioni naturali da parte degli antagonisti a livelli non accettabili, inferiori al 50%. Infatti, a differenza di quanto accade nella difesa in campo, un frutto raccolto deve essere protetto dalle alterazioni postraccolta con tecniche, metodi e mezzi che assicurino un'efficacia non inferiore al 95-98% (Droby, 2001). Inoltre, un diverso livello di efficacia è stato osservato quando lo stesso antagonista è applicato su frutti provenienti da frutteti diversi. Questo, probabilmente, è da mettere in relazione alla densità di inoculo del patogeno nel frutteto, al livello di suscettibilità dei frutti al patogeno stesso, al tempo trascorso tra l'infezione e il trattamento, alla possibile presenza di infezioni latenti. Anche la formulazione gioca un importante ruolo, non solo sull'efficacia dell'antagonista ma anche sulla facilità di applicazione e sul costo. Lo sviluppo di una formulazione è un processo fondamentale che si articola in diverse fasi. La prima prevede l'individuazione di un substrato che consenta di ottenere la massima produzione di cellule dell'antagonista a costo limitato; successivamente deve essere garantita nel tempo la stabilità della formulazione con una attività dell'antagonista simile a quella svolta dalle cellule fresche. Dati riportati da Torres et al. (2006) evidenziano come su sette formulazioni liquide o in polveri bagnabili del lievito *C. sake*, saggiate nei confronti di *P. expansum* su pomacee, solo una è stata selezionata, in quanto prodotta a basso costo e facilmente sospendibile in acqua. I principali patogeni del postraccolta, come *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *Monilinia* spp. e *Botrytis cinerea*, richiedono la presenza di una ferita e un ambiente ricco di nutrienti per la germinazione e la colonizzazione dell'ospite. Questo tipo di ambiente è anche particolarmente adatto all'antagonista che può immediatamente svilupparsi e colonizzare la ferita. Diverso è il caso di patogeni quali *B. cinerea*, *Monilinia* spp. e *Phyctema vagabunda* che causano infezioni latenti; le possibilità di lotta contro questi patogeni sono assai scarse in quanto richiedono più applicazioni in campo per poterne prevenire l'insediamento. Al fine di superare questi inconvenienti è stata suggerita l'integrazione degli antagonisti con altri metodi che non prevedono l'utilizzo di fungicidi tradizionali, sfruttando un eventuale effetto additivo o sinergico. A tal riguardo sono state studiate diverse combinazioni: con additivi alimentari, che sono sostanze chimiche ritenute sufficientemente sicure per l'uomo in quanto ampiamente usate nella preparazione di vari alimenti; con aria e acqua calda; con elicitori di resistenza. L'attività svolta da questi

additivi alimentari sarebbe essenzialmente fungistatica, ritardando la germinazione delle spore e creando uno spazio nel processo infettivo del patogeno del quale si avvantaggerebbe l'antagonista nella competizione per le sostanze nutritive. Un esempio pratico di integrazione dell'antagonista con elicitatori di resistenza è dato da due prodotti commercializzati dalla Neova Technologies, costituiti da cellule di *Candida saitoana* in combinazione con chitosano (InnovaCoat) oppure lisozima (InnovaCure): le sostanze naturali che mostrano un effetto diretto sul patogeno (protettivo ed eradicante) e induzione di resistenza dell'ospite permettono di incrementare l'attività dell'antagonista con un livello di efficacia dei formulati paragonabile ai fungicidi di sintesi attualmente disponibili (El Ghaouth e Wilson, 2002). In un'ipotetica linea di trattamento, l'applicazione dell'antagonista dovrebbe essere preceduta dal trattamento con un additivo alimentare o calore o elicitore di resistenza. Nel caso di utilizzazione di formulazioni contenenti il solo antagonista il controllo delle infezioni latenti risulterebbe possibile con l'impiego di una strategia che preveda l'applicazione in preraccolta (Ippolito e Nigro, 2000); numerose esperienze hanno confermato la validità della strategia (Lima et al., 1997; Teixidò et al., 1998; Larena et al., 2005) e formulati come Shemer® e Serenade® (a base di *Bacillus subtilis*, AgraQuest, registrato in USA per l'uso sia in pre- che in postraccolta), applicati nelle fasi critiche di insediamento delle infezioni latenti in campo (fioritura, accrescimento dei frutti) hanno fornito risultati soddisfacenti contro *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Aspergillus* su fragola, uva e agrumi (Karabulut et al., 2004; Blachinsky et al., 2007).

## 2.2 *Composti di origine naturale*

Le piante possiedono un ampio corredo di metaboliti secondari associati al sistema di difesa, molti dei quali funzionano anche come inibitori di patogeni fungini (Grayer e Kokubun, 2001). Questi composti sono generalmente concentrati negli strati cellulari più esterni degli organi vegetali e possono essere costitutivi o prodotti successivamente in seguito a un danno inferto da cause biotiche o abiotiche. L'uso di questi composti come possibili sostanze per la lotta contro le malattie del postraccolta è stato preso in considerazione dai ricercatori in tempi relativamente recenti (Ippolito et al., 2003; Tripathi e Dubey, 2004). L'attività antifungina di alcuni composti presenti nelle componenti aromatiche dei prodotti vegetali o negli oli essenziali di spezie ed erbe comunemente usate per l'alimentazione umana sono da considerarsi estremamente interessanti a causa della loro scarsa tossicità alle basse concen-

trazioni. Inoltre, l'elevata volatilità accompagnata dalla scarsa solubilità in acqua rendono alcuni di questi composti particolarmente adatti a un'applicazione in fase di vapore. L'attività delle sostanze estratte dalle piante è stata ampiamente saggiata *in vitro*, ma meno *in vivo*, adottando differenti forme di applicazione (liquida o in fase vapore) e diverse metodiche di valutazione dell'inibizione del patogeno (crescita del micelio o germinazione dei conidi), rendendo particolarmente difficile la comparazione delle concentrazioni minime inibitorie (Caccioni e Guizzardi, 1994; Neri et al., 2006).

Gli estratti vegetali, la propoli, i jasmonati, i glucosinolati, gli oli essenziali, i composti fenolici e i composti volatili rappresentano le sostanze antimicrobiche maggiormente studiate.

L'efficacia nei confronti dei patogeni fungini ottenuta con questi composti in prove *in vitro* non sempre ha trovato conferma nei risultati delle prove *in vivo* e questo dimostra come le condizioni di trattamento (concentrazione, modalità di applicazione, formulazione, tempo di esposizione, ecc.) debbano essere stabilite in relazione non solo alla sostanza usata e al patogeno, ma anche alla risposta dei frutti al trattamento. I composti volatili hanno normalmente un odore intenso e possono essere assorbiti e metabolizzati dai prodotti freschi alterando il loro sapore e soprattutto, se usati ad alte concentrazioni, possono risultare fitotossici per i tessuti vegetali. Pertanto, un probabile limite nell'utilizzo dei composti di origine naturale potrebbe essere la comparsa di sapori anomali e di fitotossicità nei frutti trattati.

## Derivati da piante

Le prime applicazioni documentate sull'attività di estratti vegetali risalgono alla fine degli anni '50 con l'applicazione di estratti acquosi deodorizzati di polvere di aglio contro il marciume bruno delle pesche, causato da *Monilinia* spp. (Ark and Thompson, 1959). Estratti di specie appartenenti al genere *Allium* inibiscono *in vitro* la crescita di *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus* e molti altri funghi patogeni di grano e legumi; possono, inoltre, ridurre lo sviluppo della muffa verde-azzurra degli agrumi causata da *P. digitatum* e *P. italicum* (Obagwu e Korsten, 2003). L'attività antimicrobica dell'aglio (*A. sativum*) e di altre specie di *Allium*, come cipolla (*A. cepa*) e porro (*A. porrum*) è dovuta principalmente all'allicina, composto ottenuto per azione dell'enzima allinasi sull'alliina quando il bulbo viene schiacciato.

Numerosi estratti (acquosi o etanolici) di varie piante [Wilson et al. (1997) ne hanno saggiate ben 345] anche spontanee (Gatto et al., 2006; Di Venere et

al., 2008) sono stati saggiati *in vitro* e *in vivo* per valutarne l'attività nei confronti di vari patogeni postraccolta. Generalmente, in questi saggi solo una piccola percentuale di estratti ha mostrato una significativa attività antifungina; inoltre, alcuni di questi, pur non attivi *in vitro*, hanno completamente inibito lo sviluppo del patogeno quando applicati *in vivo* (Bautista-Baños et al., 2000; Sanzani et al., 2009). La presenza di composti attivi negli estratti di piante non è costante nel tempo e in genere è massima in condizioni ambientali estreme: nella stagione fredda o in quella calda e secca. Anche l'organo da cui è effettuata l'estrazione può influire sulla composizione; risultano infatti spesso più efficaci gli estratti da steli rispetto a quelli da foglie e fiori. Questa elevata variabilità nella composizione e nella concentrazione delle sostanze attive rende difficile ottenere un prodotto standard per una eventuale formulazione da impiegare nella lotta alle malattie postraccolta. Al riguardo, pertanto, sembra auspicabile lo studio e l'impiego degli estratti di piante purificati, anche solo parzialmente, per ottenere categorie di composti standardizzati da utilizzare sia per lo studio delle sostanze attive sia per una applicazione immediata nella fase postraccolta.

Tra le sostanze antimicrobiche presenti nelle piante, gli isotiocianati evidenziano interessanti prospettive di applicazione nella fase postraccolta. Questo gruppo di sostanze fitochimiche comprendono una miscela di più di 130 differenti composti largamente distribuiti soprattutto nella famiglia delle *Cruciferae* (cavolfiori, cavoletti di Bruxelles, broccoli, ecc.) ma anche in quelle delle *Capparaceae* e delle *Caricaceae*. Da un punto di vista chimico sono costituiti da un glicone comune, caratterizzato da un  $\beta$ -tioglucoside e da una ossima sulfonata, e da un aglicone derivato da un aminoacido, in particolare metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano. In seguito alla rottura del tessuto i glucosinolati contenuti nella cellula sono rapidamente idrolizzati dalla mirosinasi (tioglucosidasi) a intermediari instabili che si riarrangiano spontaneamente in isotiocianati, tiocianati o nitrili a seconda del pH del substrato. Questi prodotti di idrolisi sono tossici nei confronti dei microrganismi e con ogni probabilità giocano un ruolo importante nella resistenza delle piante alle malattie, nella difesa contro gli erbivori e sicuramente contribuiscono all'aroma. L'attività degli isotiocianati nei confronti di un'ampia gamma di patogeni è ampiamente documentata (Delaquis e Mazza, 1995). Alcuni di questi sono sostanze volatili e potrebbero essere impiegati con successo in trattamenti in fase di vapore di frutti e ortaggi prima della conservazione tramite un nuovo processo chiamato 'biofumigazione'. Questo termine originariamente descriveva solo trattamenti per la lotta a insetti e funghi del terreno tramite

piante contenenti glucosinolati (Kirkegaard et al., 1998) ma ora ha acquisito un significato più ampio contemplando anche altre applicazioni, inclusa la tecnologia postraccolta (Mari et al., 2002). In particolare l'allyl-isotiocianato e altri isotiocianati, pur essendo disponibili come composti sintetici, possono essere anche prodotti in modo naturale partendo da farine disoleate di *Brassica*, con efficacia del tutto simile nei confronti dei patogeni fungini (Mari et al., 2008). L'uso di molecole biologicamente attive ottenute da risorse naturali rinnovabili rientra tra gli obiettivi della piattaforma tecnologica europea 'Plants for the Future' e, inoltre, studi farmacologi riportano come gli isotiocianati producano effetti benefici sulla salute umana (Stoner et al., 1999). Negli ultimi anni, infatti, sono stati oggetto di rinnovato interesse in medicina umana, sia per gli effetti fisiologici che esercitano sia per la potenziale attività anticancerogena.

Un'altra sostanza particolarmente studiata è il *trans*-2-esenale, composto aromatico presente in molti prodotti vegetali come tè, olio di oliva e numerosi frutti. La sua produzione aumenta rapidamente nei tessuti vegetali danneggiati o feriti in seguito all'attacco di un patogeno fungino o di un insetto e può giocare un interessante ruolo nel controllo dell'espressione dei geni di difesa (Farmer, 2001). Il composto ha evidenziato una interessante attività fungicida nei confronti di *P. expansum* (Neri et al., 2006), *Monilinia laxa* (Neri et al., 2007), *Alternaria alternata*, *B. cinerea* (Hamilton-Kemp et al., 1992). In particolare, su mele Golden Delicious nei confronti di *P. expansum* il *trans*-2-esenale ha confermato la sua efficacia già evidenziata in prove *in vitro*. Infatti, un trattamento effettuato dopo 24 ore dall'inoculazione ha ridotto significativamente non solo la percentuale di frutti infetti ma anche il contenuto in patulina, senza peraltro causare effetti negativi sulle qualità organolettiche dei frutti trattati (Neri et al., 2007). Al contrario, il trattamento con *trans*-2-esenale su albicocche, nettarine, pesche e fragole, pur evidenziando una buona attività antifungina, ha provocato effetti fitotossici (Neri et al., 2007). Pertanto, la valutazione delle caratteristiche organolettiche dei frutti sottoposti a trattamento appare di fondamentale importanza al fine di individuare una strategia di lotta applicabile a livello operativo.

L'acido jasmonico e il suo estere volatile, il metil-jasmonato, sono composti lipidici naturalmente presenti nelle membrane cellulari delle piante e derivano dalla ossidazione ossigeno-dipendente di acidi grassi attraverso la via della lipossigenasi. Essi possiedono effetti inibitori o promotori di molti processi fisiologici delle piante, spesso simili a quelli dell'acido abscissico. Fra gli effetti vi è la stimolazione di vari processi biosintetici associati a stress abiotici



e biotici, come le ferite e le infezioni da parte di patogeni. Infatti, l'applicazione di acido jasmonico e metil-jasmonato alle piante induce l'espressione di geni coinvolti nelle reazioni di difesa codificanti la fenilalanina-ammonio-liasi (PAL), enzima chiave nella via dei fenilpropanoidi, proteine ad attività antifungina, fitoalessine, inibitori delle proteinasi, ecc. (González-Aguilar et al., 2004). Non sembra avere un effetto diretto sui patogeni (Droby et al., 1999). Applicazioni di metil-jasmonato su ortofrutticoli in postraccolta hanno fornito risultati spesso contrastanti ma con attività interessante su agrumi, fragola e lamponi contro *B. cinerea* e *Penicillium* spp. (Moline et al., 1997), mentre su ciliegie non sono risultati efficaci (Tsao e Zhou, 2000). Dato il meccanismo di azione è probabile che i diversi risultati siano da imputare alle differenti risposte dei tessuti all'applicazione delle sostanze.

Una particolare categoria di composti naturali degna di attenzione nel campo del postraccolta è rappresentata dagli oli essenziali o oli eterici. Essi sono miscele di sostanze aromatiche presenti in qualsiasi parte della pianta: fiori, foglie, gemme, semi, buccia dei frutti, corteccia, legno. Oltre che per la diversa composizione chimica e diverse caratteristiche fisiche, questi oli si differenziano dai grassi contenuti nei vegetali perché sono volatili, cioè, con facilità tendono a passare allo stato gassoso; infatti, vengono ricavati dalle piante per distillazione. Negli ultimi anni vi è stato un rinnovato interesse all'applicazione di queste sostanze nei confronti di microrganismi che danneggiano i prodotti ortofrutticoli in postraccolta, sia per la bassa tossicità per l'uomo, sia per la loro potenziale capacità di raggiungere facilmente qualsiasi parte del frutto nella confezione o nel magazzino. Gli oli essenziali sono sostanze aromatiche costituite essenzialmente da terpeni, ma anche da aldeidi, chetoni, acidi grassi, fenoli, esteri, alcoli, nitrati e solfuri (Skočibušić et al., 2006). Il ruolo di queste sostanze nelle piante non è ancora ben noto, tuttavia, è probabile che esse siano coinvolte nei meccanismi di difesa biochimica delle piante nei confronti dei patogeni. Inoltre, gli oli essenziali esercitano la loro attività anche nell'ambiente esterno alle piante influenzando gli insetti e la composizione microbica della fillosfera e della carposfera. Per questi motivi, queste sostanze sono considerate composti in grado di contenere le alterazioni microbiche postraccolta degli ortofrutticoli freschi. Il loro meccanismo di azione sembra sia correlato alla loro capacità di accumularsi nelle membrane cellulari dei microrganismi, danneggiandole e alterandone la permeabilità. Un gran numero di oli essenziali è stato saggiato *in vitro* nei confronti dei principali patogeni postraccolta (Schena et al., 2008). Gli oli essenziali di timo (*Thymus vulgaris*, *T. capitatus*, *T. zygis*, *T. glandulosus*, ecc.), origano (*Origanum* spp.) e agrumi, sono fra quelli più studiati. La loro attivi-

tà dipende dalla concentrazione e dal tempo di esposizione; tuttavia, in molti casi, l'attività anticrittogamica degli oli essenziali osservata *in vitro* non è stata riprodotta *in vivo* a causa della natura volatile dei costituenti. Inoltre, il più grande limite nell'utilizzazione di questi composti nella lotta contro malattie postraccolta degli ortofrutticoli è l'induzione di fenomeni di fitotossicità alle dosi efficaci e il loro forte aroma.

Molte altre sostanze volatili naturali con azione antimicrobica potrebbero risultare interessanti per il postraccolta degli ortofrutticoli freschi e rappresentano un campo di indagine che meriterebbe maggiore attenzione. L'acetaldeide, un composto volatile che si accumula naturalmente nei tessuti dei frutti durante la maturazione, manifesta effetti fungicidi nei confronti di numerosi patogeni postraccolta. La resistenza della fragola conservata in presenza di elevate concentrazioni di anidride carbonica è stata attribuita alla produzione di alti livelli di acetaldeide e di acetato di etile da parte della infruttescenza, in risposta a queste condizioni di conservazione. Somministrazioni di acetaldeide allo 0,1-1% hanno permesso l'inibizione della germinazione delle spore e ridotto lo sviluppo degli agenti di marciumi in postraccolta di fragole, lamponi, mele, uva e ciliegie. Il meccanismo di azione dell'acetaldeide sembra basato sulla alterazione della permeabilità cellulare con perdita di elettroliti, zuccheri riducenti e amminoacidi. Il problema maggiore nell'uso di questo composto volatile naturale, come negli oli essenziali, è che alle dosi efficaci spesso è fitotossico e altera il sapore dei frutti. Questo inconveniente probabilmente è alla base della mancanza di applicazione pratica del composto, nonostante siano state svolte numerose prove sperimentali.

Anche l'acido acetico, il principale composto volatile dell'aceto, appare un composto interessante nel controllo di patogeni postraccolta quando usato in fase di vapore. Esso è stato considerato fin dall'inizio del secolo scorso (Roberts and Dunegan, 1932) dimostrando la sua efficacia nel controllo di *M. fructicola* su pesche. Quantità di pochissimi mg/l di acido acetico ha inibito lo sviluppo di *M. fructicola*, *R. stolonifer*, *B. cinerea* e *P. expansum* su vari ortofrutticoli senza modificarne le caratteristiche organolettiche (Sholberg et al., 2004). Tuttavia, l'acido acetico, come molti altri acidi organici a catena corta, può indurre effetti fitotossici. Inoltre, un limite all'uso dell'acido acetico come di altre sostanze volatili è la scarsa o nulla penetrazione nei frutti e quindi l'impossibilità di controllare le infezioni latenti.

Fra le sostanze volatili appare infine interessante l'uso di vapori di etanolo. Apprezzabili risultati sono stati ottenuti nel controllo di marciumi postraccolta di pesche, uva da tavola e arance (Romanazzi et al., 2007; Zang et al., 2007). Recentemente è stato proposto sul mercato un pannello impregnato di

etanolo da utilizzare alla stessa stregua dei pannelli contenenti metabisolfito di sodio. Uno dei limiti nell'uso dell'etanolo è la sua elevata infiammabilità.

I vantaggi nell'uso di composti volatili naturali come fumiganti antimicrobici potrebbero essere notevoli poiché negli ambienti confinati del postraccolta (cella frigorifera, confezionamento con film plastici, imballaggi funzionali "active and intelligent packaging") tali sostanze diffonderebbero facilmente fra i frutti, non vi sarebbe apporto di acqua sotto forma liquida o di umidità e non vi sarebbero acque reflue da dover eliminare. Accanto alla ricerca di sostanze volatili a provata attività antifungina è necessario mettere a punto sistemi idonei di somministrazione per mantenere tale efficacia, evitare dannosi fenomeni di fitotossicità e retrogusti anomali del prodotto.

La propoli è una miscela di sostanze resinose di origine vegetale che le api (*Apis mellifera*) raccolgono dalle gemme e dalla corteccia delle piante. Questo materiale, arricchito di secrezioni salivari ed enzimatiche, è usato dalle api per la costruzione e la manutenzione degli alveari, come sigillante generale, come antibiotico e come sostanza imbalsamatoria per coprire le carcasse degli invasori. La composizione chimica, il colore e l'aroma variano secondo l'aerea di produzione. Nelle zone temperate, specialmente in Europa, la propoli contiene soprattutto composti fenolici, tra i quali quelli maggiormente presenti sono gli idrochinoni, l'acido caffeico e i suoi esteri e la quercetina (Fu et al., 2005). Molte delle sostanze identificate nella propoli sono impiegate come additivi alimentari, essendo considerate sostanze a bassa tossicità o, usando un termine inglese, GRAS (Generally Recognized As Safe), cioè sostanze non pericolose per la salute dell'uomo, secondo una nomenclatura della Food and Drug Administration (FDA) Americana. Queste caratteristiche rendono il prodotto interessante per l'impiego in postraccolta, quando cioè i frutti sono prossimi a essere consumati. Nonostante la propoli abbia spiccata attività antifungina, sono poche le ricerche documentate riguardanti le sue applicazioni nel controllo delle malattie delle piante in genere e del postraccolta in particolare. Saggi *in vitro* hanno dimostrato l'attività antifungina della propoli nei confronti di *B. cinerea* (La Torre et al., 1990); d'altra parte saggi mirati ad accertare la compatibilità di microrganismi antagonisti con additivi e composti chimici al fine di migliorarne l'attività, hanno messo in evidenza che la propoli inibisce i patogeni (*B. cinerea* e *P. expansum*) ma anche lieviti antagonisti quali *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* e *Cryptococcus laurentii* (Lima et al., 1998). Quando applicata su fragola contro la muffa grigia, la propoli non ha dato risultati soddisfacenti (Antoniacci et al., 2000). L'attività antibatterica e antifungina della propoli sembra dovuta

soprattutto ai flavonoidi, agli acidi fenolici e loro esteri; la galangina, la pinocembrina e la pinostrobinina tra i flavonoidi, gli acidi ferulici e caffeico tra gli acidi fenolici sembrano i composti con maggiore attività antimicrobica. Come prima accennato, la composizione della propoli varia in relazione alla flora presente nella zona di alimentazione delle api, all'andamento stagionale, alle condizioni ambientali, ecc.; la sua mutevole composizione rende variabile anche l'attività nei confronti dei patogeni. Questo spiegherebbe il suo scarso impiego in agricoltura, sebbene sia contemplata fra le sostanze utilizzabili su piante allevate in regime di agricoltura biologica (informativa n. 9890634 del 6/5/'98).

### Derivati di origine microbica o animale

I derivati di origine microbica o animale sono sostanze ottenute per estrazione da alcuni microrganismi o metaboliti prodotti dagli stessi, aventi attività inibitoria nei confronti di un'ampia gamma di funghi patogeni (Tripathi e Dubey, 2004). Un interessante studio è stato condotto sulle molecole prodotte da un fungo endofita, *Muscodora albus*. Queste molecole svolgono un'azione antifungina nei confronti di un'ampia gamma di patogeni: *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* e *Rhizopus* (Mercier e Jimenez, 2004). Il fungo, sviluppandosi su semi di riso disseccati e precedentemente colonizzati, produce almeno 28 composti volatili e questa miscela può essere più efficace che i singoli componenti la miscela stessa. L'applicazione di *M. albus* come biofumigante è ancora in fase di studio, in quanto sono a tutt'oggi non risolti alcuni aspetti negativi quali la scarsa efficacia del fungo quando cresce a basse temperature (3°C). D'altra parte atmosfere particolarmente ricche di anidride carbonica sembrano non influenzare l'efficacia dell'antagonista. Una probabile soluzione potrebbe essere lo sviluppo di *M. albus* in un ambiente riscaldato al di fuori della cella di conservazione e il successivo convogliamento dei prodotti volatili all'interno della cella refrigerata (Schotsmans et al., 2007). Altri esempi di metaboliti di origine microbica sono rappresentati dall'iturina, un antibiotico prodotto da diversi ceppi di *B. subtilis*, efficace nella lotta contro il marciume bruno delle drupacee (Gueldner et al., 1988) e la pirrolnitrina, sintetizzata da ceppi di *Pseudomonas cepacia*, attiva contro *B. cinerea* su lamponi e fragola e *B. cinerea* e *P. expansum* su mele e pere (Goulart et al., 1992). Tuttavia, la possibile insorgenza di ceppi batterici resistenti agli antibiotici scoraggia l'uso sia della sostanza di per sé sia dei batteri che la producono; la pirrolnitrina, è stata comunque usata come modello

per la sintesi di nuovi fungicidi a basso impatto ambientale. Fra le sostanze di origine animale il chitosano (poly-N-acetylglucosamina), un polimero biodegradabile ottenuto commercialmente per deacetilazione della chitina (abbondante nell'esoscheletro di artropodi quali aragoste, gamberetti, granchi, ecc., nonché nella parete di funghi come *A. niger*, *M. rouxii*, *P. notatum*, ecc.), è stato ampiamente sperimentato nella lotta contro malattie postraccolta degli ortofrutticoli freschi. Il chitosano è utilizzato in svariati campi: come agente filtrante delle acque, flocculante per rimuovere sostanze grasse e particelle da liquidi, chiarificante dei vini e della birra, idratante nella cosmetica, farmaco nelle diete dimagranti e, più recentemente, in agricoltura come film edibile e come composto naturale antimicrobico capace di indurre risposte di difesa nell'ospite. Applicato agli ortofrutticoli freschi, il chitosano, per la sua capacità di formare un sottile film, agisce da barriera alla diffusione dei gas e dell'umidità riducendo la perdita in peso e ritardando la senescenza. Ma, più importante, il polimero è risultato in grado di ridurre i marciumi di uva da tavola, mango, ciliegie, papaia, agrumi, carote, fragola, ecc. quando applicato in pre- o in postraccolta (Romanazzi et al., 2007; Hernandez-Munoz et al., 2008). L'attività del polimero dipende dall'acido in cui viene disciolto (l'acido acetico è preferibile) e dalle sostanze con cui si complessa (per esempio lo zinco migliora notevolmente la sua attività antimicrobica diretta). L'interessante attività del chitosano può essere ascritta ai suoi meccanismi di azione, a oggi non del tutto chiariti, con cui esplica attività diretta e indiretta sul patogeno. Circa l'azione diretta, in *B. cinerea*, *R. stolonifer*, *F. oxysporum* e *Phytophthora nicotianae* il polimero ha causato una alterazione della permeabilità delle membrane e della morfologia del micelio, con ramificazioni e disintegrazione degli apici. Molto marcate sono apparse le sue capacità elicitrici, messe in evidenza in numerosi studi su ortofrutticoli freschi: induzione di  $\beta$ -1,3- glucanasi, chitinasi e chitosanasi è stata osservata in fragola, pomodoro e peperone, di PAL in uva da tavola, di fitoalessine in carote, di fitoalessine in carote, di vari geni coinvolti nei meccanismi di difesa in agrumi, ecc. (Romanazzi et al., 2002; Trullo et al., 2008). Inoltre, è in grado di stimolare la produzione di varie barriere difensive nei tessuti dell'ospite, come ispessimento della parete cellulare, formazione di papille e deposito negli spazi intercellulari di sostanze fenoliche antimicrobiche (Wilson et al., 1994; El Ghaouth et al., 1997). Interessanti risultano vari studi sulla applicazione pre-raccolta di questo polimero, dove, grazie alla capacità di indurre resistenza nell'ospite, permette un ritardo nella riattivazione delle infezioni latenti e quiescenti nel frutto giunto a maturità, con prolungamento della shelf-life (Ippolito e Nigro, 2000). Varie formulazioni per combattere malattie fogliari e dell'apparato radicale sono

presenti sul mercato; non altrettanto si può dire per le malattie postraccolta dove l'unico formulato proposto è "InnovaCoat" della Neova Technologies (Canada) contenente il composto in combinazione con un antagonista.

### 2.3 *Additivi alimentari con attività antifungina*

Queste sostanze chimiche (carbonato e bicarbonato di sodio e potassio, cloruro di calcio, potassio sorbato, calcio propionato, ecc.), definite anche GRAS, hanno suscitato un certo interesse nell'ambito della lotta contro i patogeni del postraccolta in quanto possiedono peculiari caratteristiche tra le quali: bassa tossicità, elevata solubilità, costo relativamente contenuto. Sono inoltre ormai comunemente usate per preservare numerosi alimenti (formaggi, ortaggi lavorati, salse e carne) da alterazioni microbiche e sono in grado di inibire la produzione di micotossine da parte di funghi tossigeni quali *A. flavus*, *A. parasiticus* (Bullerman, 1983), *P. expansum* e *P. patulum* (Lennox e McElroy, 1984). Numerose sono le ricerche in merito all'uso di alcuni sali: carbonato e bicarbonato di sodio e potassio e cloruro di calcio su vari ortofrutticoli freschi (Nigro et al., 2006); da soli o in combinazione con altri mezzi alternativi di lotta (Ippolito et al., 2005b). Questi sali non sono ancora registrati come agrofarmaci, nonostante la loro provata efficacia ne auspicherebbe un'applicazione pratica in varie realtà produttive. Al riguardo si ricorda che il bicarbonato di potassio è stato recentemente (regolamento CE n. 404/2008) aggiunto alla lista delle sostanze utilizzabili in agricoltura biologica (allegato II del regolamento CE n. 889/2008) anche se non è registrato per l'uso in postraccolta. Alcune sperimentazioni hanno messo in evidenza una buona attività del potassio sorbato nei confronti di *Monilinia* sp. su pesche e nettarine (Gregori et al., 2008), di *P. digitatum* su agrumi (Smilanick et al., 2008) e di *B. cinerea* su uva da tavola (Karabulut et al., 2005). Analogamente il sodio bicarbonato ha ridotto significativamente le infezioni di *P. expansum* su mele (Janisiewicz et al., 2008).

### 2.4 *Mezzi fisici*

Sono rappresentati da termoterapia, condizionamento termico, raggi UV-C, trattamenti con pressioni diverse da quella atmosferica, ozono, ecc. Lo stress fisico ha un duplice effetto sui frutti, da una parte disinfetta la superficie e dall'altra induce una risposta di difesa nei confronti di eventuali patogeni (Wilson et al., 1994). In particolare, la termoterapia, che può essere effettuata

con l'acqua, con l'aria, con il vapore, consente di inibire numerosi patogeni del postraccolta ed è stata ampiamente documentata (Fallik, 2004). Gli effetti positivi di un trattamento con acqua calda possono essere riassunti in 4 punti: 1) di facile attuazione; 2) inibiscono la germinazione delle spore fungine sulla superficie del frutto; 3) sono relativamente economici; 4) salubri per l'ambiente e l'uomo. D'altra parte, la risposta fisiologica dei frutti può differenziarsi a seconda della varietà, della stagione e della localizzazione della coltura, pertanto è fondamentale stabilire un giusto tempo e una corretta temperatura di trattamento. Il calore, inoltre, può inibire il patogeno localizzato negli strati sottoepidermici dell'epicarpo (Ben-Yehoshua et al., 1998) o all'interno delle lenticelle come nel caso di *P. vagabunda* (Neri et al., 2009). In prospettiva, i trattamenti con il calore acquistano un'importanza fondamentale per le produzioni biologiche che, prive di trattamenti fungicidi, sono fortemente penalizzate nella fase postraccolta.

Il calore non solo riduce le infezioni, ma sembra abbia un benefico effetto sulla resistenza ai danni da freddo. Una riduzione di alcune fisiopatie legate alla conservazione refrigerata è stata messa in evidenza su avocado (Woolf, 1997) susine (Abu-Kpawoh, 2002) e mele cv 'Pink Lady' (Mari, dati non pubblicati). Interessanti sono le ipotesi formulate da Paull e Chen (2000) in merito alla risposta a livello citologico e fisiologico dei frutti trattati con il calore. Frutti trattati con temperature inferiori a 42°C evidenziano una risposta normale con riduzione della sensibilità al freddo accompagnata da un rallentamento o ritardo nella maturazione e con lievi modifiche delle caratteristiche organolettiche; diversamente, frutti trattati a temperature superiori ai 42°C manifestano una perdita da parte delle cellule di capacità di recupero e vari processi che caratterizzano la maturazione sono distrutti. Il limite tra le due risposte è molto ravvicinato, pertanto è fondamentale approfondire le conoscenze sugli effetti dei trattamenti con il calore al fine di evitare esiti fitotossici e mantenere inalterate le caratteristiche qualitative dei frutti trattati, ma nello stesso tempo addivenire a un controllo efficace dei patogeni.

Fra i mezzi fisici l'uso dei raggi ultravioletti a corta lunghezza d'onda (UV-C, lunghezza d'onda inferiore a 280 nm) mostra interessanti prospettive di applicazione grazie alla duplice attività che si esplica nei confronti dei patogeni (attività germicida) e dell'ospite, per la capacità di indurre resistenza (ormesi da radiazione) (Terry e Joice, 2004). L'attività germicida, tuttavia, è evidente solo ad alte dosi che, peraltro, determinano danni ai tessuti vegetali (Mercier et al., 2001). Le dosi ottimali per la riduzione dei marciumi sono solitamente basse (0,25-5 kJ/m<sup>2</sup>), ma variano a seconda della specie ortofrutticola. Ad es. per uva e fragola dosi rispettivamente di 0,125-0,5 kJ m<sup>2</sup> e 0,5-1 kJ m<sup>2</sup> sono

risultate efficaci contro la muffa grigia (Nigro et al., 1998, 2000); mentre dosi più elevate sono necessarie per il contenimento dei marciumi delle pesche causati da *M. fructicola* e per quelli delle mele causati da *Alternaria* spp. e *Monilinia* spp. (Lu et al., 1991). Oltre a indurre resistenza nell'ospite, la luce UV-C a basse dosi sembra sia in grado di favorire l'incremento della popolazione di microrganismi antagonisti (batteri, lieviti e funghi lievitoformi) presenti sulla superficie dei frutti (Nigro et al., 1998). Sebbene in numerosi prodotti vegetali la luce UV-C abbia evidenziato la capacità di ridurre lo sviluppo delle malattie, non può considerarsi sostitutiva delle tecniche di lotta attualmente consigliate, in quanto caratterizzata da una minore efficacia.

Fra i mezzi fisici anche i trattamenti ipobarici e iperbarici potrebbero offrire prospettive di utilizzo come mezzi alternativi di lotta alle malattie postraccolta. Non sono note applicazioni su larga scala in postraccolta di trattamenti iperbarici, ma in prove sperimentali preliminari questi hanno determinato riduzioni significative dei marciumi in ciliegie e uva da tavola anche se i meccanismi alla base del fenomeno non sono del tutto chiari (Romanazzi et al., 2008). D'altra parte, trattamenti ipobarici (0,1-0,7 atm) possono determinare nell'ospite condizioni di debole stress associate a fenomeni di induzione di resistenza (Romanazzi et al., 2001), così come riportato per altri mezzi fisici, ma principalmente rallentano indirettamente i processi di maturazione e di senescenza dei frutti a causa della bassa pressione parziale dell'O<sub>2</sub>, favorendo tra l'altro l'allontanamento dell'etilene e di altre sostanze volatili prodotte dal metabolismo dei frutti. Trattamenti ipobarici di breve durata (4-24 ore) alle pressioni di 0,25, 0,5 e 0,75 atm, sono risultati efficaci nel contenere i marciumi postraccolta di fragole, ciliegie e uva da tavola (Romanazzi et al., 2001), soprattutto quando applicati in combinazione con chitosano (Romanazzi et al., 2003).

I trattamenti con pressioni diverse da quella atmosferica offrirebbero il grande vantaggio che i frutti non vengono trattati con alcun tipo di prodotto (microrganismo, sostanza naturale, sostanze GRAS, ecc.) che, per quanto siano innocui, suscitano sempre qualche perplessità nel consumatore. Tuttavia, i costi delle attrezzature e di funzionamento e l'efficacia non sempre a livelli apprezzabili, rende l'utilizzazione di questa tecnologia lontana dall'applicazione pratica su larga scala.

### 3. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'aumentato interesse verso metodi alternativi ai fungicidi di sintesi nella lotta contro i patogeni del postraccolta ha prodotto numerose ricerche nelle ultime due



decadi. I risultati ottenuti appaiono incoraggianti, in quanto è evidente la possibilità di lotta ai patogeni del postraccolta senza l'uso dei fungicidi tradizionali. D'altra parte tutti i mezzi fin qui esposti, considerati singolarmente, non riescono a ottenere una riduzione delle perdite di prodotto economicamente accettabile; pertanto, sono in corso numerosi studi per migliorarne l'efficacia. Nel caso dei biofungicidi la formulazione rappresenta ancora un aspetto chiave, come anche la compatibilità con le normali pratiche di lavorazione e conservazione dei frutti. Importante risulta inoltre, come già citato, l'integrazione dei biofungicidi con GRAS, acqua calda o elicitori di resistenza al fine di sfruttare eventuali fenomeni additivi o sinergici tra le varie strategie di lotta. La ricerca ha evidenziato, inoltre, alcuni punti critici che possono essere così sintetizzati: difficoltà (in termini di costo e tempo) nella registrazione a livello europeo dei biofungicidi; eventuale tossicità per l'uomo e l'ambiente delle molecole cosiddette naturali e loro possibile fitotossicità se usate a concentrazioni elevate; esigenza di uno studio dettagliato del destino ambientale degli antagonisti. La ricerca e lo sviluppo dei fungicidi naturali deve prevedere indagini approfondite sulla loro degradazione nei cibi o nei sistemi biologici (Tripathi e Dubey, 2004), sebbene la loro origine naturale li renda relativamente biodegradabili e senza residui apprezzabili (Beye, 1978).

Per quanto riguarda, poi, i tempi di registrazione dei biofungicidi, l'Europa appare penalizzata nei confronti degli Stati Uniti; infatti l'EPA, l'ente americano che sovrintende alla loro registrazione, impiega circa 2 anni per immettere sul mercato un biofungicida. Lo stesso prodotto impiega in Europa almeno 7 anni e anche in Italia segue la stessa lunga procedura. Per questo motivo è stato finanziato dalla comunità un progetto denominato REBECA ([www.rebeca-net.de](http://www.rebeca-net.de)), che si prefigge, tra l'altro, di esaminare i possibili rischi degli agenti di lotta biologica e di confrontare la regolamentazione europea e quella americana. Esso prende in considerazione non solo microrganismi antagonisti, ma anche insetti, acari e nematodi, nonché feromoni ed estratti di piante da utilizzare nella lotta contro i patogeni dei vegetali; propone, inoltre, alternative meno burocratiche e procedure di regolamentazione più efficienti, pur mantenendo lo stesso livello di sicurezza per la salute dell'uomo e dell'ambiente, accelerando l'accesso al mercato e abbassando i costi di registrazione.

#### RIASSUNTO

Negli ultimi anni sono stati studiati mezzi di lotta alternativi ai tradizionali fungicidi di sintesi al fine di prevenire perdite di prodotto negli ortofrutticoli durante la fase postraccolta. In questo ambito, alcuni mezzi che prevedono l'utilizzazione di (a) microorganismi antago-

nisti, (b) sostanze naturali ad attività antimicrobica e (3) trattamenti chimico-fisici hanno evidenziato interessanti risultati, che purtroppo, sono ancora lontani da applicazioni pratiche a causa, soprattutto, di una modesta efficacia. Inoltre, prodotti commerciali a base di microrganismi antagonisti da impiegare nella lotta contro i patogeni del postraccolta sono stati registrati negli Stati Uniti, Israele e Sud Africa, ma non ancora in Europa. L'attività antifungina evidenziata da alcuni composti naturali estratti dalle piante è risultata influenzata in maniera determinante dalle condizioni di trattamento (concentrazione, modo di applicazione, formulazione, tempo di esposizione, durata del trattamento, ecc.). Nel corso di numerose prove, sono emerse risposte differenti al trattamento che indicano possibili interazioni tra la sostanza saggiata, il patogeno e l'ospite. Un probabile ostacolo all'uso delle sostanze naturali può essere quindi non tanto l'efficacia, quanto l'eventuale fitotossicità e la formazione di odori o sapori anomali. Per superare taluni aspetti negativi inerenti l'uso di microrganismi antagonisti o sostanze naturali è stata proposta una strategia di applicazione integrata con altri mezzi quali l'uso di prodotti chimici a bassa tossicità (come taluni additivi alimentari), il calore, gli elicitatori di resistenza, ecc. al fine di produrre un effetto additivo o sinergico che consenta un controllo soddisfacente delle malattie.

#### ABSTRACT

Alternative methods to fungicide treatments have been studied in order to prevent fruit losses in the postharvest phase. Within these methods the applications of: (a) biological control agents (BCAs), (b) plant bioactive compounds and (c) physico-chemical treatments showed interesting results but still far from a practical application in Europe. So far, despite the substantial progress obtained with BCAs, no biofungicide has been registered in Europe to control postharvest pathogens, also because of insufficient and inconsistent performance. The use of plant bioactive compounds has shown that the treatment conditions (concentration, form of application, formulation, exposure time, time of treatment, etc.) can strongly influence their efficacy. The different responses found in many studies indicate a cultivar specificity in the product-pathogen-volatile interaction. A barrier to the use of plant bioactive compounds may not be the efficacy, but rather the off-odours caused in fruits and vegetables and/or the phytotoxicity. To overcome the drawbacks that have arisen with these methods, the integration of the antagonist with other treatments such as low toxic substances (GRAS), heat, etc. has been proposed; this strategy could produce an additive or synergic effect on disease control and obtain satisfactory levels of disease reduction.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABU-KPAWOH J.C., XI Y.F., ZHANG Y.Z., JIN Y.F. (2002): *Polyamine accumulation following hot-water dips influences chilling injury and decay in 'Friar' plum fruit*, «Journal of Food Science», 67, pp. 2649-2653.
- ALVISI F. (1987): *Incidenza degli scarti dopo la raccolta nel settore ortofrutticolo: considerazioni generali. Strategie nella difesa postraccolta dei prodotti ortofrutticoli freschi*, Mac Fruit, Cesena (Fo), Italy, pp. 5-14.

- ANTONIACCI L., COBELLI L., DE PAOLI E., GENGOTTI S. (2000): *Prove di difesa antibiotrica su fragola in pieno campo*, «Informatore Fitopatologico», 50, pp. 45-51.
- ARK P.A., THOMPSON J.P. (1959): *Control of certain diseases of plants with antibiotics from garlic* (*Allium sativum* L.), «Plant Disease Report», 43, pp. 276-282.
- BAUTISTA-BAÑOS S., HERNANDEZ-LOPEZ M., DIAZ-PEREZ J.C., CANO-OCHA C.F. (2000): *Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce Rhizopus stolonifer of 'ciruela' fruit* (*Spondias purpurea* L) during storage, «Postharvest Biology and Technology», 20, pp. 99-106.
- BEN-YEHOSHUA S., RODOV V., PERETZ J. (1998): *The constitutive and induced resistance of citrus fruit against pathogens*, in Disease Resistance in Fruit a cura di G.I. Hohnson, E. Highly e D.C. Joyce, ACIAR Proc. Canberra, Australia, 30, pp. 78-92.
- BEYE F. (1978): *Insecticides from vegetable kingdom*, «Plant Research and Development», 7, pp. 13-31.
- BLACHINSKY, D., ANTONOV, J., BERCOVITZ, A., ELAD, B., FELDMAN, K., HUSID, A., LAZARE, M., MARCOV, N. SHAMAI, I., KEREN-ZUR, M., DROBY, S. (2007): *Commercial applications of "Shemer" for the control of pre and postharvest diseases*, «IOBCWPRS Bulletin», 30, pp. 75-78.
- BULLERMAN L.B. (1983): *Effect of potassium sorbate on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus and Aspergillus flavus*, «Journal of Food Protection», 46, pp. 940-942.
- CACCIONI, D.R.L., GUIZZARDI M. (1994): *Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components*, «Journal of Essential Oil Research», 6, pp. 174-179.
- COURSEY D.G., BOOTH R.H. (1972): *The postharvest phytopathology of perishable tropical produce*, «Review of Plant Pathology», 51, pp. 751-765.
- DELAQUIS PJ, MAZZA G. (1995): *Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation*, «Food Technology», 49, pp. 73-84.
- DI VENERE D., GATTO M., LINSALATA V., LATTANZIO V., SOLFRIZZO M., CASCARANO N., NIGRO F., IPPOLITO A. (2008): *Antifungal activity of phenolic extracts from broomrape* (*Orobancha crenata* Forsk.), Atti XXIV International Conference on Polyphenols, Salamanca, Spagna, 8-11 July, 33 (abstract).
- DROBY S., PORAT R., COHEN L., WEISS B., SHAPIRO B., PHILOSOPH-HADAS S., MEIR S. (1999): *Suppressing green mould decay in grapefruit with postharvest jasmonate application*, «Journal American Society Horticultural Science», 124, pp. 184-188.
- DROBY S. (2001): *'Enhancing biocontrol activity of microbial antagonists of postharvest diseases'*, in Vurro M., Gressel J., Butt T., Harman G., Pilgeram A., St Leger R., Nuss D., *Enhancing biocontrol agents and handling risks*, Nato Science Series, vol. 339, IOS Press, Amsterdam, pp. 77-85.
- EL GHAOUTH A., ARUL J., WILSON C., BENHAMOU N. (1997): *Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and Botrytis cinerea in bell pepper fruit*, «Postharvest Biology and Technology», 12, pp. 183-194.
- EL GHAOUTH A., WILSON C.L. (2002): *Candida saitoana compositions for biocontrol of plant postharvest decay*, U.S. Patent No. 6, pp. 419-922.
- FALLIK E. (2004): *Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing)*, «Postharvest Biology and Technology», 32, pp. 125-134.
- FARMER E.E. (2001): *Surface-to-air signals*, «Nature», 411, pp. 854-856.
- FU S.H., YANG M.H., WEN H.M., CHERN J.C. (2005): *Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis*, «Journal Food and Drug Analysis», 13, pp. 43-50.

- GATTO M.A., DI VENERE D., LINSALATA V., VANADIA S., BIANCO V.V., IPPOLITO A. (2006): *Antifungal activity of extracts from wild edible herbaceous species*, «Journal of Plant Pathology», 88, (abstract).
- GONZÁLEZ-AGUILAR G.A., TIZNADO-HERNANDEZ M.E., ZAVALA-GATICA R., MARTINEZ-TELLEZ M.A. (2004): *Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defence response of guava fruits*, «Biochemical and Biophysical Research Communications», 313, pp. 694-701.
- GOULART B.L., HAMMER P.E., EVENSEN K.B., JANISIEWICZ W., TAKEDA F. (1992): *Pyrrolnitrin, captan, benomyl, and high CO<sub>2</sub> enhanced raspberry shelf life*, «Journal American Society Horticultural Science», 117, pp. 265-270.
- GRAYER R., KOKUBUN T. (2001): *Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants*, «Phytochemistry», 56, pp. 253-263.
- GREGORI R., BORSETTI F., NERI F., MARI M., BERTOLINI P. (2008): *Effects of potassium sorbate on postharvest brown rot of stone fruit*, «Journal of Food Protection», 71, pp. 1626-1631.
- GUELDER R.C., REILLY C.C., PUSEY P.L., ARRENDAL R., HIMMELSBACH D.S., CUTLER H.G. (1988): *Isolation and identification of iturin as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with Bacillus subtilis*, «Journal Agricultural Food Chemistry», 36, pp. 366-370.
- HAMILTON-KEMP T.R., MCCracken C.T., LOUGHRIN JR J.H., ANDERSEN R.A., HILDEBRAND D.F. (1992): *Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi Alternaria alternata and Botrytis cinerea*, «Journal of Chemical Ecology», 18, pp. 1083-1091.
- HERNANDEZ-MUNOZ P., ALMENAR E., VALLE V.D., VELEZ D., GAVARA R. (2008): *Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (Fragaria × ananassa) quality during refrigerated storage*, «Food Chemistry», 110, pp. 428-435.
- IPPOLITO A., NIGRO, F. (2000): *Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables*, «Crop Protection», 19, pp. 715-723.
- IPPOLITO A., NIGRO F. (2003): *Natural antimicrobials in postharvest storage of fresh fruits and vegetables*, in *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*, a cura di Roller, Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 201-234.
- IPPOLITO A., NIGRO, F., DE CICCO V. (2005a): *Natural antimicrobials for preserving fresh fruit and vegetables*, in *Improving the safety of fresh fruit and vegetables*, a cura di W. Jongen, Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 513-555.
- IPPOLITO A., SCHENA L., PENTIMONE I., NIGRO F. (2005b): *Control of postharvest rots of sweet cherries by pre- and postharvest applications of Aureobasidium pullulans in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate*, «Postharvest Biology and Technology», 36, pp. 245-252.
- JANISIEWICZ W.J., SAFTNER R.A., CONWAY W.S., YODER K.S. (2008): *Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate*, «Postharvest Biology and Technology», 49, pp. 374-378.
- KARABULUT, O. A., TEZCAN, H., DAUS, A. COHEN, L., WIESS, B., DROBY, S. (2004): *Biological control of preharvest and postharvest rots in strawberries by Metschnikowia fructicola*, «Biocontrol Science and Technology», 14, pp. 513-521.
- KARABULUT O.A., ROMANAZZI G. SMILLANICK J.L. LICHTER A. (2005): *Postharvest ethanol and potassium sorbate treatments of table grapes to control gray mold*, «Postharvest Biology and Technology», 37, pp. 129-134.

- KIRKEGAARD J.A., SARWAR M., MATTHIESSEN J.N. (1998): *Assessing the biofumigation potential of cruciferous*, «Acta Horticulturae», 459, pp. 105-111.
- LA TORRE A., GRUCCIONE M., IMBROGLINI G. (1990): *Indagine preliminare sull'azione di preparati a base di propoli nei confronti di Botrytis cinerea della fragola*, «Apicoltura», 6, pp. 169-177.
- LAMPE J. W. (1999): *Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies*, «American Journal of Clinical Nutrition», 70, pp. 475-490.
- LARENA, I., TORRES, R., DE CAL, A., LINAN, M., MELGAREJO, P., DOMENICHINI, P., BELLINI, A., MANDRIN, J.F., LICHOU, J., OCHOA DE ERIBE, X., USALL, J. (2005): *Biological control of postharvest brown rot (Monilinia spp.) of peaches by field applications of Epicoccum nigrum*, «Biological Control», 32, pp. 305-310.
- LENNOX J.E., McELROY L.J. (1984): *Inhibition and growth of patulin synthesis in Penicillium expansum by potassium sorbate and sodium propionate in culture*, «Applied of Environmental Microbiology», 48, pp. 1031-1033.
- LIMA G., IPPOLITO A., NIGRO F., SALERNO M. (1997): *Effectiveness of Aureobasidium pullulans and Candida oleophila against postharvest strawberry rots*, «Postharvest Biology and Technology», 10, pp. 169-178.
- LIMA G., DE CURTIS F., CASTORIA R., PACIFICO S., DE CICCIO V. (1998): *Additives and natural products against postharvest pathogens and compatibility with antagonistic yeasts*, «Journal Plant Pathology», 80, pp. 259.
- LU J.Y., STEVENS C., KHAN V.A., KABWE M. (1991): *The effect of ultraviolet irradiation on shelf life and ripening of peaches and apples*, «Journal of Food Quality», 14, pp. 299-305.
- MARI M., LEONI O., IORI R., CEMBALI T. (2002): *Antifungal vapour-phase of allyl-isothiocyanate against Penicillium expansum on pears*, «Plant Pathology», 51, pp. 231-236.
- MARI M., LEONI O., BERNARDI R., NERI F., PALMIERI S. (2008): *Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates*, «Postharvest Biology and Technology», 47, pp. 61-67.
- MERCIER J., BAKA M., REDDY B., CORCUFF R., ARUL, J. (2001): *Short-wave ultraviolet irradiation for control of decay by Botrytis cinerea in bell pepper: induced resistance and germicidal effects*, «Journal of American Society of Horticultural Science», 126, pp. 128-133.
- MERCIER J., JIMENEZ J.I. (2004): *Control of fungal decay of apples and paches by the biofumigant fungus Muscodor albus*, «Postharvest Biology and Technology», 31, pp. 1-8.
- MOLINE H.E., BUTA J.G., SAFTNER R.A., MAAS J.L. (1997): *Comparison of three volatile natural products for the reduction of post harvest diseases in strawberries*, «Advanced Strawberry Research», 16, pp. 43-48.
- NERI F., MARI M., BRIGATI S. (2006): *Control of Penicillium expansum by plant volatile compounds*, «Plant Pathology», 55, pp. 100-105.
- NERI F., MARI M., MENNITI A.M., BRIGATI S., BERTOLINI P. (2007): *Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling Monilinia laxa*, «Plant Disease», 91, pp. 30-35.
- NERI F., MARI M., BRIGATI S., BERTOLINI P. (2009): *Control of Neofabra alba by plant volatile compounds and hot water*, «Postharvest Biology and Technology», 51, pp. 425-430.
- NIGRO F., IPPOLITO A., LIMA G. (1998): *Use of UV-C light to reduce Botrytis storage rot of table grapes*, «Postharvest Biology and Technology», 13, pp. 171-181.

- NIGRO F., IPPOLITO A., LATTANZIO V., DI VENERE D., SALERNO M. (2000): *Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry*, «Journal of Plant Pathology», 82, pp. 29-37.
- NIGRO L., SCHENA A., LIGORIO I., PENTIMONE A., IPPOLITO A., SALERNO M. (2006): *Control of table grape storage rots by pre-harvest applications of salts*, «Postharvest Biology and Technology», 42, pp. 142-149.
- OGABWU J., KORSTERN L. (2003): *Control of citrus green and blue molds with garlic extracts*, «European Journal of Plant Pathology», 109, pp. 221-225.
- PAULL R.E., CHEN N.J. (2000): *Heat treatment and fruit ripening*, «Postharvest Biology and Technology», 21, pp. 21-38.
- ROBERTS J.W., DUNEGAN J.C. (1932): *Peach brown rot*, «Technical Bulletin», N° 328, US Dept. of Agric., Washington DC.
- ROMANAZZI G., NIGRO F., IPPOLITO A., SALERNO M. (2001): *Effect of short hypobaric treatments on postharvest rots of sweet cherries, strawberries, and table grapes*, «Postharvest Biology and Technology», 22, pp. 1-6.
- ROMANAZZI G., NIGRO F., IPPOLITO A., DI VENERE D., SALERNO M. (2002): *Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mould of table grapes*, «Journal Food Science», 67, pp. 1862-1867.
- ROMANAZZI G., NIGRO F., IPPOLITO A. (2003): *Short hypobaric treatments potentate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries*, «Postharvest Biology and Technology», 29, pp. 73-80.
- ROMANAZZI G., KARABULUT O.A., SMILANICK J.L. (2007): *Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes*, «Postharvest Biology and Technology», 45, pp. 134-140.
- ROMANAZZI G., NIGRO F., IPPOLITO A. (2008): *Effectiveness of short hyperbaric treatment to control postharvest decay of sweet cherries and table grapes*, «Postharvest Biology and Technology», 49, pp. 440-442.
- SANZANI S. M., DE GIROLAMO A., SCHENA L. A., SOLFRIZZO M., IPPOLITO A., VISCANTI A. (2009): *Control of Penicillium expansum and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone*, «European Food Research and Technology», 228, pp. 381-389.
- SCHENA L., NIGRO F., IPPOLITO A. (2008): *Natural antimicrobials to improve storage and shelf-life of fresh fruit, vegetables and cut flowers*, in *Microbial Biotechnology in Horticulture*, a cura di R.C. Ray, O.P. Ward, vol. 2. Science Publisher, Enfield, NH, USA, pp. 259-303.
- SCHOTSMANS W.C., BRAUN G., DELONG J.M., PRANGE R.K. (2008): *Temperature and controlled atmosphere effects on efficacy of Muscodor albus as a biofumigant*, «Biological Control», 44, pp. 101-110.
- SHOLBERG P.L., SHEPHARD T., RANDALL P., MOYLS L. (2004): *Use of measured concentrations of acetic acid vapour to control postharvest decay in d'Anjou pears*, «Postharvest Biology and Technology», 32, pp. 89-98.
- SKOČIBUŠIĆ M., BEZIĆ N., DUNKIĆ V. (2006): *Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from Satureja subspicata Vis. growing in Croatia*, «Food Chemistry», 96, pp. 20-28.
- SMILANICK J.L., MANSOUR M.F., GABLER F.M., SORENSON D. (2008): *Control of citrus postharvest mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides*, «Postharvest Biology and Technology», 47, pp. 226-238.
- SOMMER N.F., FORTLAGE R.J., EDWARDS D.C. (1992): *Postharvest diseases of selected*

- commodities', in Kader A. A., *Postharvest Technology of Horticultural Crops*, University of California, Div Agriculture and Natural Resources, Publication 3311, pp. 117-160.
- STONER G.D., KRESTY L.A., CARLTON P.S., SIGLIN J.C., MORSE M.A. (1999): *Isothiocyanates and freeze-dried strawberries as inhibitors of oesophageal cancer*, «Toxicological Science», 52, pp. 95-100.
- TEIXIDO N., VINAS I., USALL J., MAGAN N. (1998): *Control of blue mold of apples by pre-harvest application of Candida sake grown in media with different water activity*, «Phytopathology», 88, pp. 960-964.
- TERRY L.A., JOYCE D.C. (2004): *Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review*, «Postharvest Biology and Technology», 32, pp. 1-13.
- TORRES R., TEIXIDO N., VINAS I., MARI M., CASALINI L., GIRAUD M., USALL J. (2006): *Efficacy of Candida sake CPA-1 formulation for controlling Penicillium expansum decay on pome fruit from different Mediterranean regions*, «Journal of Food Protection», 69, pp. 2703-2711.
- TRIPATHI P., DUBEY, N.K. (2004): *Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables*, «Postharvest Biology and Technology», 32, pp. 235-245.
- TRULLO M. C., MERELLO-CREMADES P., SCHENA L., TADEO F.R., GONZÁLEZ-CANDELAS L., TALÓN M., IPPOLITO A. (2008): *Microarray analysis of gene expression profiles in citrus fruit treated with chitosan*, «11th International Citrus Congress, Wuhan, China, October 26-30, pp. 38 (Abstract)
- TSAO R., ZHOU T. (2000): *Interactions of monoterpenoids, methyl jasmonate, and Ca<sup>2+</sup> in controlling postharvest brown rot of sweet cherry*, «HortScience», 35, pp. 1304-1307.
- WILSON C.L., WISNIEWSKI M.E. (1989): *Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables an emerging technology*, «Annual Review of Phytopathology», 27, pp. 425-441.
- WILSON C.L., EL GHAOUTH A., CHALUTZ E., DROBY S., STEVENS C., LU J.Y., KHAN V., ARUL J. (1994): *Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables*, «Plant Disease», 78, pp. 837-844.
- WOOLF A.B. (1997): *Reduction of chilling injury in stored 'Hass' avocado fruit by 38°C water treatments*, «HortScience», 32, pp. 1247-1251.
- ZHANG W., LI X., WANG X., WANG G., ZHENG J., ABEYSINGHE D.C., FERGUSON I.B., CHEN, K. (2007): *Ethanol vapour treatment alleviates postharvest decay and maintains fruit quality in Chinese bayberry*, «Postharvest Biology and Technology», 46, pp. 195-198.





## Considerazioni conclusive

Nella seconda metà del secolo scorso, la diffusione della coltura specializzata, la riduzione del numero di specie coltivate, l'impiego generalizzato della fertilizzazione chimica e di altre pratiche agricole, quali le lavorazioni meccaniche del terreno e l'irrigazione, hanno prodotto un eccezionale aumento della biomassa vegetale. Questo aumento ha consentito un graduale miglioramento quali-quantitativo dell'alimentazione della popolazione umana (almeno di una gran parte di essa), ma ha anche favorito la diffusione ed un maggiore sviluppo degli agenti biotici (funghi, batteri, virus, nematodi, piante infestanti e insetti fitofagi) dannosi alle colture. Per contenere il danno è stato fatto ricorso, spesso in modo indiscriminato, al massiccio impiego di presidi sanitari che hanno contribuito ad alterare i meccanismi omeostatici che garantiscono l'equilibrio biologico anche negli ecosistemi terrestri antropizzati

L'accresciuta sensibilità ambientalistica e la crescente attenzione posta alla salubrità degli alimenti e degli ambienti di lavoro, nonché i limiti d'impiego degli agrofarmaci imposti dalle normative europee e nazionali via, via emanate, hanno dato un forte impulso alla ricerca di tecniche innovative per la difesa delle colture. Caratteristica comune cui tendono tutte le ricerche nel settore è l'individuazione di strategie di lotta efficaci, economiche, a basso impatto ambientale e di facile applicazione. Lo sviluppo delle biotecnologie, nell'accezione più ampia del termine, ha facilitato l'individuazione di strumenti dotati di grandi potenzialità applicative

Gli interventi per il controllo delle infestazioni entomatiche, mirano non alla eliminazione totale degli insetti nocivi, ma al loro contenimento al di sotto di determinati livelli (soglie economiche) di popolazione. I metodi di difesa con

mezzi chimici attualmente in uso, perseguono i principi ecologici ed economici sopra citati mediante l'impiego di strategie (monitoraggio dei livelli di popolazione dei fitofagi, tecnologie di formulazione dell'agrofarmaco, uso di attrattivi e repellenti ecc.) che riducono l'impatto ambientale del presidio sanitario più che con l'uso di principi attivi con ridotta azione biotossica. Infatti le infestazioni entomatiche sono ancora in massima parte controllate dagli insetticidi organici di sintesi ai quali si continua a guardare in attesa di valide innovazioni. Interesse ed aspettative destano, al riguardo, taluni principi attivi di recente formulazione dotati di bassa tossicità per mammiferi ed altri gruppi di animali "non target". Solo l'acquisizione di più complete conoscenze sull'interazione insetto-pianta e sull'etologia entomologica consentirà un maggiore diffusione dell'impiego di mezzi di controllo biologico, biotecnico ed agroecologico.

Data la grande complessità e variabilità delle problematiche fitopatologiche, le strategie di lotta a basso impatto ambientale contro funghi, batteri e nematodi fitoparassiti passano attraverso l'integrazione degli strumenti della gestione delle colture (mantenimento della fertilità biologica del suolo, fertilizzazione chimica, diagnostica fitopatologica, modelli previsionali, ottimizzazione dei sistemi di applicazione degli agrofarmaci ecc.) e quelli diretti di difesa. La ricerca e la sperimentazione hanno consentito di individuare strumenti biotecnici utili o potenzialmente utili per la difesa delle colture in campo e degli ortofrutticoli in post-raccolta. Per lo più si tratta di microrganismi antagonisti, composti biocidi di origine naturale, mezzi fisici, additivi alimentari ecc. Il divieto d'impiego del bromuro di metile per la lotta contro i patogeni tellurici, ha dato grande impulso all'individuazione e verifica in campo di mezzi alternativi quali i biofumiganti (tiocianati) e le matrici organiche complesse (compost, residui colturali e dell'industria agro-alimentare) usate come tali o arricchite con microrganismi competitivi.

La resistenza delle piante alle malattie, che in natura è la norma, è un efficace meccanismo naturale di difesa dai patogeni. Ne consegue che ogni intervento atto ad attivare tale meccanismo bene si inserisce tra i mezzi di lotta a basso impatto ambientale. Molta attenzione viene offerta quindi agli induttori biotici ed abiotici di resistenza e all'ingegneria genetica per la produzione di piante transgeniche (PGM) resistenti alle malattie. Malgrado l'intensa attività sperimentale ed i successi ottenuti in laboratorio, serra e pieno campo nessuna pianta dotata di resistenza transgenica ai batteri ed ai funghi fitopatogeni è oggi presente sul mercato mentre sono disponibili piante transgeniche resistenti a virus, insetti ed erbicidi anche se le colture commerciali di dette piante sono ancora limitate.

Nel complesso esiste oggi un ampio ventaglio di conoscenze suscettibili di sviluppo applicativo. Quelle necessarie per assicurare un più esteso impiego degli strumenti biotecnici sono, però, ancora insufficienti per garantire risultati capaci di conquistare la piena fiducia degli agricoltori.

Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nel luglio 2009