





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2015-II



DIFESA DELLE PIANTE  
MEDIANTE BIOTECNOLOGIE

Firenze, 10 dicembre 2015



EDIZIONI POLISTAMPA

*Con il contributo di*



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2016  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»  
Anno 2015 - Serie VIII - Vol. 12 (191° 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 978-88-596-1597-2

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

PIERO CRAVEDI <i>Introduzione</i>	7
IGNAZIO FLORIS, LUCA RUIU, ALBERTO SATTA <i>Prospettive di controllo microbiologico degli insetti</i>	9
GIUSEPPE ROTUNDO, GIACINTO S. GERMINARA <i>I semiochimici in agricoltura</i>	25
FELICE SCALA, MATTEO LORITO <i>Applicazione di microorganismi antagonisti per il controllo delle malattie delle piante e prospettive di sviluppo</i>	43
FRANCESCO FARETRA, RITA MILVIA DE MICCOLIS ANGELINI, STEFANIA POLLASTRO, GIANFRANCO ROMANAZZI, ILARIA PERTOT <i>Attualità e prospettive degli induttori di resistenza nella protezione sostenibile delle colture</i>	63
GRAZIELLA BERTA, NADIA MASSA, ELISA GAMALERO <i>Uso di microrganismi benefici del suolo (funghi micorrizici arbuscolari e batteri rizosferici) come agenti di contenimento delle malattie delle piante</i>	75
GIOVANNI P. MARTELLI, LUISA RUBINO <i>La resistenza transgenica indotta dal patogeno: un'applicazione biotecnologica poco utilizzata</i>	81
SERGIO FRANCESCHINI, VITTORIO VERONELLI <i>Problematiche connesse all'autorizzazione all'impiego dei mezzi biotecnici</i>	91



## Introduzione

La trasformazione, che ha caratterizzato la difesa antiparassitaria negli ultimi decenni, è avvenuta prevalentemente grazie alla progressiva valorizzazione di biotecnologie. Tali applicazioni tecnologiche, che si basano sull'impiego di organismi viventi o di loro derivati, hanno reso concretamente possibile l'attuazione su larga scala dei concetti di agricoltura sostenibile su cui si fondano sia la produzione integrata sia quella biologica.

Un primo sostanziale contributo alla razionalizzazione dell'uso degli insetticidi si è avuto con l'impiego dei feromoni per il monitoraggio di alcune specie di Lepidotteri dannosi. Egualmente importante è stata la disponibilità di preparati microbiologici efficaci contro alcuni insetti e varie malattie delle piante.

I nuovi mezzi hanno progressivamente conquistato un ruolo di rilievo. Questa evoluzione può essere chiaramente percepita consultando le successive edizioni di Prontuari dei prodotti fitosanitari e degli Atti delle Giornate Fitosanitarie. Si è così assistito a una continua diminuzione dei tradizionali insetticidi di sintesi e alla comparsa di una molteplicità di altri mezzi "biotecnologici".

La diffusa, anche se non sempre giustificata, avversione dell'opinione pubblica verso i fertilizzanti e gli antiparassitari di sintesi ha contribuito a una tumultuosa crescita di nuovi mezzi che le biotecnologie rendono disponibili.

L'odierna Giornata di Studio, organizzata a cura del Comitato Consultivo dei Georgofili sui problemi della difesa delle piante, si propone di approfondire alcuni argomenti che presentano aspetti scientifici rilevanti e potrebbero consentire l'avvio di strategie di difesa innovative. I maggiori esperti dei di-

\* *Presidente del Comitato Consultivo dei Georgofili sui problemi della difesa delle piante*

versi settori interessati sono stati chiamati a illustrare le attuali applicazioni in campo, lo stato della ricerca e la prevedibile evoluzione futura. La parte conclusiva della Giornata di Studio è stata dedicata all'esame degli aspetti normativi che risultano determinanti per il passaggio dal livello scientifico a quello applicativo. Si ritiene che un'adeguata evoluzione della regolamentazione sia indispensabile per il corretto impiego dei nuovi mezzi biotecnici.



## Prospettive di controllo microbiologico degli insetti

### IL CONTESTO GENERALE E DI MERCATO

L'interesse della comunità scientifica nel settore della *discovery* e nello sviluppo di soluzioni alternative e a basso impatto ambientale per il contenimento degli organismi nocivi in agricoltura è in continua crescita. Significativi sono anche gli investimenti industriali in questo ambito, con particolare riguardo al settore dei cosiddetti agenti di controllo biologico (BCA) da impiegare a integrazione ai sistemi tradizionali basati sull'uso di agrofarmaci di origine sintetica.

All'interno del mercato globale dei pesticidi (BCC Research LLC, CHM029E, 2014) il segmento dei biopesticidi segna il maggior tasso di crescita, con stime che si approssimano su valori del + 10-15% annuo (Global Industry Analysts, Inc., MCP-1573, 2012). Questo interesse è legato a vari fattori, tra i quali il ritiro dal mercato di agrofarmaci di largo impiego; i costi relativamente elevati di sviluppo di nuovi formulati sintetici; la riduzione dei livelli di residui (*Maximum Residue Level*, MRL) ammessi nei prodotti agrari e zootecnici; il trend positivo degli alimenti biologici; l'introduzione nel mercato di formulazioni bioinsetticide sempre più efficaci e con più ampio spettro di attività biologiche contro organismi bersaglio, tali da risultare competitive e di facile applicabilità, alla stregua di normali insetticidi convenzionali (Copping e Menn, 2000; Chandrasekaran et al., 2012; Senthil-Nathan, 2013); i limitati effetti indesiderati nei confronti di insetti utili, dei problemi della farmaco resistenza (Copping e Menn, 2000; Goettel et al., 2001; EPA 2006) o della contaminazione dell'aria e dell'acqua, quindi anche dei rischi per la salute umana e per l'ambiente.

\* Dipartimento di Agraria, Sezione di Patologia vegetale ed Entomologia, Università di Sassari

Nell'ambito del recente contesto normativo sulla gestione integrata dei parassiti (IPM), l'implementazione dei nuovi regolamenti comunitari favorisce sempre più lo sviluppo e la registrazione pre-commerciale di sostanze a minore impatto ambientale efficaci per il controllo degli organismi nocivi (Direttiva CE 2009/128; Reg. CE N. 1107/2009).

Un ruolo importante è ricoperto dagli insetticidi di origine microbica, rappresentati da numerosi microrganismi associati agli insetti e che si comportano da agenti entomopatogeni, tra cui batteri, funghi, virus, protozoi, nematodi (Vega e Kaya, 2012).

## I PRINCIPALI AGENTI ENTOMOPATOGENI

### *Batteri*

I batteri sono largamente diffusi nell'ambiente e, nel tempo, hanno instaurato un'ampia varietà di interazioni con gli insetti, inclusi i rapporti di simbiosi. Benché molte specie batteriche siano utili per gli stessi insetti, alcune di queste si comportano come agenti patogeni. Questi ultimi hanno evoluto una molteplicità di strategie per superare le difese dei loro ospiti, incluso lo sviluppo di tossine insetticide spesso ad azione molto specifica.

I batteri costituiscono gli agenti entomopatogeni più importanti, con specie soprattutto sporigene ma anche non sporigene (Ruiu, 2015).

Il genere *Bacillus* include le specie con maggiore interesse applicativo. La ricerca degli ultimi decenni è stata dominata da *Bacillus thuringiensis* (Bt), che agisce come insetticida sia sulle larve di Lepidotteri, ma anche nei riguardi di Ditteri e Coleotteri (Palma et al., 2014), ed è utilizzato in commercio da più di 40 anni (Gelernter e Schwab, 1993).

Nella sua forma vegetativa è debolmente tossico, ma durante la sporulazione produce pro-tossine di natura proteica che tipicamente si aggregano in corpi parasporali (cristalli), caratterizzati da una specifica azione insetticida. Questi cristalli, ingeriti dagli insetti insieme al cibo, si dissolvono nell'intestino medio, se sufficientemente basico nel caso dei lepidotteri, e rilasciano proteine con peso molecolare variabile (range 30 - 160 kDa), che, a opera di enzimi digestivi (es. tripsina), liberano tossine attive in grado di interagire con le cellule epiteliali della superficie intestinale, provocandone la degenerazione, seguita dalla paralisi e morte dell'insetto.

Diversi ceppi di Bt producono differenti tossine, di cui le più note sono l' $\alpha$ -esotossina, (termolabile), la  $\beta$ -esotossina o Turingiensina (termostabile), le

tossine Vegetative Insecticidal Proteins (VIP) prodotte durante la fase vegetativa, e le più note  $\delta$ -endotossine. Queste ultime, definite anche proteine Cry, sono in grado di legarsi selettivamente a specifici recettori localizzati nell'epitelio intestinale delle larve di specie suscettibili di insetti. Il legame della proteina con i recettori è seguita da un meccanismo che determina la formazione di pori catione-specifici che, distruggendo il flusso ionico dell'epitelio intestinale, portano alla morte le larve in pochi giorni. A oggi si conoscono più di 700 geni che codificano per proteine Cry che risultano suddivisi in diverse famiglie secondo un sistema di nomenclatura quaternario (es. Cry1Aa1), appartenenti a differenti ceppi di Bt, che esibiscono un'elevata specificità di azione nei confronti dei diversi insetti. Questa specificità è legata al meccanismo di riconoscimento a livello dei recettori di membrana nelle specie di insetti target. Recettori che non sono presenti in altri animali e nell'uomo, che dunque non sono sensibili all'azione di queste proteine. I geni che codificano per queste proteine possono essere impiegati nella trasformazione di determinate specie vegetali per conferirle resistenza nei confronti di un particolare tipo di insetto. In tal modo la pianta sarà in grado di sintetizzare la proteina Cry direttamente nella forma attiva, che esplicherà la sua funzione bioinsetticida quando l'insetto dannoso attacca la pianta cibandosi dei suoi tessuti. Geni codificanti per le tossine di Bt sono stati ormai geneticamente inseriti in diverse piante di interesse agrario (es. mais), ampiamente diffuse nelle aree geografiche in cui è consentita la coltivazione di piante geneticamente modificate (OGM).

La Turingiensina, che ha una natura nucleotidica, ha un più ampio spettro d'azione, ed è stata in passato impiegata contro le mosche domestiche. Tuttavia, essa presenta una leggera tossicità anche per i mammiferi, per cui, con qualche eccezione, il suo impiego non è consentito in agricoltura biologica, e i ceppi di Bt che la producono sono stati ritirati dal commercio nei paesi occidentali.

Ceppi del gruppo *Lysinibacillus sphaericus* (precedentemente *Bacillus sphaericus*) sono caratterizzati dalla produzione di una endospora di forma sferica, strettamente associata a corpi parasporali che contengono in rapporto equimolare delle tossine proteiche binarie (BinA and BinB). Le modalità di azione anche in questo caso per ingestione, includono modificazioni nella membrana peritrofica e danneggiamento dell'epitelio intestinale. I principali insetti target delle formulazioni basate su ceppi di *L. sphaericus* sono le zanzare, i simuli e i chironomidi.

Il batterio sporigeno *Paenibacillus popilliae* è l'agente eziologico della cosiddetta "milky disease" di larve di Coleotteri fitofagi. Ceppi appartenenti a

questa specie producono inclusioni parasporali, anche se l'effetto insetticida è maggiormente legato a una azione setticemica del batterio.

Tra gli altri batteri di interesse nella produzione di bioinsetticidi ricordiamo le specie di Actinobacteria *Streptomyces* spp. e *Saccharopolyspora* spp. che hanno guadagnato grande interesse commerciale per la produzione di una varietà di metaboliti che agiscono come potenti insetticidi (i.e avermectine, spinosad). Rilevante anche il caso del *Brevibacillus laterosporus*, batterio entomopatogeno caratterizzato dalla produzione di un tipico corpo parasporale a forma di canoa associato a un lato della spora. Tossine ad azione insetticida prodotte da diversi ceppi appartenenti a questa specie sono attive nei confronti di larve di coleotteri e di ditteri come zanzare e mosche (Ruiu, 2013).

Di recente scoperta e introduzione nei mercati del Nord America, sono alcuni ceppi di Betaproteobacteria appartenenti ai generi *Burkholderia* e *Chromobacterium*, il cui ampio spettro di attività e una modalità di azione sia per ingestione che per contatto, ne consente un utilizzo nei confronti sia di insetti con apparato boccale masticatore (es. coleotteri, lepidotteri) che di fitomizi (es. eterotteri) e acari (Martin et al., 2007).

## *Virus*

I virus, a differenza dei batteri, hanno avuto uno sviluppo applicativo più limitato. Interessano particolarmente tre tipi di virus: i virus delle poliedrosi citoplasmatiche; i virus delle poliedrosi nucleari e i virus delle granulose.

I baculovirus si distinguono in virus della poliedrosi nucleare (NPV) e in granulovirus (GV); sono in grado di infettare una grande varietà di artropodi e in particolar modo le larve di Lepidotteri, Coleotteri, Ditteri, Imenotteri, Neutotteri, Sifonatteri, Tisanuri e Tricotteri. Il nome baculo è riferito alla forma bastoncellare del capsido di queste particelle virali, all'interno del quale il DNA è condensato in una struttura nucleoproteica. Alcune applicazioni importanti di questi virus hanno riguardato il controllo di *Limantria*, *Proctionaria* e *Carpocapsa*, per i quali sono stati sviluppati insetticidi virali. I baculovirus sono di solito altamente patogeni e sono utilizzati efficacemente anche nella loro forma naturale come agenti di biocontrollo contro numerosi insetti nocivi (Moscardi, 1999). In Italia, pioniere nell'impiego di baculovirus fu Magnoler (1967, 1968) il quale sperimentò delle valide applicazioni per la protezione delle sugherete sarde da attacchi del Lepidottero defogliatore *Lymantria dispar*, usando macerati di larve raccolte in natura della stessa *L. dispar* e di *Malacosoma neustria* infettate da virus della poliedrosi nucleare.

I baculovirus devono essere ingeriti per provocare l'infezione. Dopo l'ingestione, entrano attraverso l'intestino medio e da lì si diffondono in tutto il corpo dell'insetto, anche se su alcuni ospiti, l'infezione può essere limitata all'intestino o al tessuto adiposo. Una caratteristica comune ai baculovirus è che le particelle virali sono incorporate in una matrice proteica. La presenza di corpi di occlusione gioca un ruolo fondamentale nella loro potenziale applicazione in strategie di lotta biologica in quanto permette al virus di sopravvivere fuori dell'ospite (Cory, 2000).

Recentemente, è stato dimostrato che sostanzialmente i baculovirus non sono infettivi per vertebrati e piante. Anche all'interno degli insetti, il loro spettro d'azione è limitato all'ordine da cui sono stati isolati; alcuni sembrano specie-specifici, altri infettano una serie di ospiti (Barber et al., 1993; Cory et al., 2000).

La maggior parte dei nuovi baculovirus ricombinanti impiegano tossine selettive. La modificazione genetica è stata per lo più effettuata sul virus della poliedrosi nucleare dell'*Autographa californica* (AcNPV), che rappresenta a oggi uno dei virus per cui sono disponibili più informazioni molecolari, tra cui la sequenza di DNA completo (Cory, 2000). Ultimamente, un baculovirus naturale ad azione multipla è stato isolato da *Agrotis ipsilon* (AgipMNPV) (Prater et al., 2006).

Numerose formulazioni virali sono disponibili principalmente per il controllo di larve di Lepidotteri (Arthurs e Lacey, 2004; EPA, 2006). Tra i prodotti registrati in Italia è di rilievo il caso del virus della granulosi di *Cydia pomonella* CpGV.

### *Funghi*

I funghi entomopatogeni sono rappresentati da diversi generi e specie, che sono state oggetto di sperimentazioni per il controllo biologico nei confronti di vari insetti con successi e insuccessi che si sono nel tempo alternati, spesso in relazione al verificarsi di variabili condizioni ambientali (es. temperatura e umidità) che regolano la germinazione dei conidi fungini.

Una delle prime applicazioni significative riguarda la specie *Beauveria bassiana*, a partire dalla fine XIX secolo, la cui azione insetticida si esplica in seguito al contatto dei suoi conidi con il tegumento dell'insetto bersaglio, sul quale, se le condizioni sono idonee, germinano e producono ife fungine che perforano la cuticola e invadono il corpo dell'insetto. Questa "azione meccanica" determina perdita di acqua e disidratazione della vittima, concorrendo a causarne la morte (Pekrul e Grula, 1979).

*Metarhizium anisopliae* è l'altro fungo entomopatogeno essenziale con una vasta gamma di specie di insetti ospiti. Attualmente diversi ceppi sono stati isolati da varie aree geografiche (Fegan et al., 1993; Roberts e St. Leger, 2004) con tossicità estremamente variabile (Goettel e Jaronski, 1997). *M. anisopliae* è utilizzato su larga scala in Paesi come il Brasile, dove 100.000 ha di canna da zucchero sono trattati tutti gli anni (Faria e Magalhães, 2001).

Lo sviluppo e l'applicazione di agenti microbici fungini per il biocontrollo di insetti nocivi implica test per valutare i possibili rischi sull'uomo e gli animali (Goettel et al., 2001).

Diversamente dai batteri, i funghi infettano gli insetti non solo attraverso l'apparato boccale e l'intestino, ma anche attraverso la cuticola. Essi sono pertanto insetticidi di contatto, non veleni per ingestione. L'invasione dell'ospite avviene tramite rottura della cuticola a opera di una miscela di lipasi, proteasi e chitinasi. Dopo l'invasione dell'ospite, possono produrre tossine. In ambiente umido sporulano sia immediatamente prima che l'insetto muoia, che subito dopo. Le spore (o conidi aeriferi) sul corpo dell'insetto possono diffondersi nell'ambiente e infettare insetti sani, provocando epidemie (chiamate epizootiche). Il principale svantaggio al loro impiego è il ristretto intervallo di condizioni ambientali e climatiche adatte: quasi tutti richiedono elevata umidità e temperature moderate. Inoltre, va precisato che l'uso di trattamenti fungicidi nella gestione fitosanitaria di una coltura può pregiudicare l'impiego dei funghi entomopatogeni.

### *Protozoi*

I protozoi entomopatogeni possono infettare una vasta gamma di insetti (Maddox, 1987; Brooks, 1988). Alcuni possono uccidere gli insetti rapidamente, ma la maggior parte sono noti per gli effetti cronici: debilitanti, inducenti inappetenza, agenti sulla longevità, la fecondità e la prolificità. I più importanti patogeni per gli insetti sono i microsporidi, che sono patogeni obbligati, polifagi. Secondo recenti studi di biologia molecolare, i microsporidi sarebbero veri funghi (Vossbrinck e Debrunner-Vossbrinck, 2005). In confronto ad altri agenti patogeni, i microsporidi hanno avuto poco successo perché presentano difficoltà nella coltura in vitro e nella conservazione. Se si potessero manipolare più agevolmente sarebbero utilissimi come fattori di regolazione di popolazioni dannose.

La loro attività biologica è complessa, crescono solo nell'ospite vivo e alcune specie richiedono un ospite intermedio. Come agenti di controllo micro-

bico, tuttavia, alcune specie sono state applicate con discreto successo (Solter e Becnel, 2000).

Un caso è quello di *Nosema locustae* contro le cavallette (Henry e Oma, 1981). Le spore di *Nosema* spp. vengono ingerite dall'ospite e si sviluppano nell'intestino medio, dove germinando invadono le cellule inducendo l'infezione di massa e la distruzione di organi e tessuti. Naturalmente, parassitoidi e predatori di insetti fungono da vettori di distribuzione della malattia provocata da microsporidi (Brooks, 1988).

### *Nematodi*

I nematodi entomopatogeni (Kaya e Gaugler, 1993; Grewal et al., 2005) rappresentano un particolare gruppo di agenti di controllo biologico caratterizzato da una regolamentazione più permissiva per l'uso in agricoltura. Questi microrganismi, normalmente penetrano attivamente nel corpo degli insetti attraverso le cavità naturali o mediante azione combinata enzimatica (chitinasi, proteasi) e meccanica (Bedding e Molyneux, 1982). Raggiunto l'emocele, rilasciano i loro batteri simbiotici che trovano così un "brodo di coltura" idoneo allo sviluppo e alla proliferazione. In questa fase i batteri rilasciano tossine che indeboliscono l'ospite e producono una varietà di metaboliti che creano le condizioni adatte alla proliferazione dei nematodi che si avvantaggiano così dell'azione batterica. L'ospite in breve tempo viene condotto a morte.

Batteri dei generi *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* rappresentano i principali endosimbionti di nematodi entomopatogeni. I primi sono tipicamente associati a nematodi del genere *Heterorhabditis*, mentre i secondi al genere *Steinernema*. Un'ampia varietà di fattori di virulenza sono stati caratterizzati. Fra questi i complessi proteici (Tc) ad azione insetticida e le proteine PIR (Shapiro-Ilan et al., 2012).

### PROBLEMATICHE

Uno degli interrogativi principali che si pongono al momento dell'uso di un preparato a base di entomopatogeni è relativo all'effetto sugli entomofagi e su altri insetti utili, come le api o il baco da seta, e sull'uomo.

Per quanto riguarda i batteri ad esempio, il Bt, che rappresenta anche la specie più studiata, può provocare la morte delle larve del baco da seta in

caso di deriva di applicazioni su lepidotteri dannosi, per cui in Giappone e in Cina, dove la sericoltura è praticata in modo intensivo, viene usato solo in casi di estrema necessità e in zone ben lontane dagli allevamenti. Per le api invece diversi studi ne dimostrano l'innocuità, per cui i trattamenti si possono fare anche nel periodo di volo di questi imenotteri. Limitata è anche la suscettibilità delle formiche e altri insetti predatori e parassiti, e come precedentemente ricordato, è stata ampiamente dimostrata anche l'assoluta innocuità per l'uomo.

I virus poliedrici hanno elevata specificità rispetto all'ospite per cui il baco da seta è poco suscettibile alle virosi che attaccano gli altri lepidotteri e le api lo sono rispetto a quelle che attaccano altri imenotteri. Infine, nessuna tossicità significativa è stata osservata sugli animali a sangue caldo, incluso l'uomo.

I funghi presentano un'ampia gamma di tossicità in relazione sia alle specie che ai ceppi, passando da condizioni di assoluta innocuità fino a casi di patogenicità per gli animali superiori, che evidentemente non riguardano le specie fungine entomopatogene in commercio.

I protozoi entomopatogeni finora studiati, infine, non sembrano essere dannosi per l'uomo.

Nonostante il successo di differenti prodotti, l'impiego del controllo microbiologico è ancora relegato a contesti di nicchia, in relazione al meccanismo di azione spesso molto specifico. Ulteriori studi e ricerche sono necessari per sviluppare soluzioni innovative che possano rispondere alle richieste degli utilizzatori finali e del legislatore in termini sia di efficacia che di sostenibilità ambientale. Al presente stato dell'arte, questi bioinsetticidi sono ancora lontani dalle loro potenzialità d'impiego a causa della mancanza di tecnologie a essi associate che ne incrementino l'efficacia (Glare et al., 2012).

Nel caso più importante dei batteri entomopatogeni, ad esempio, l'efficacia è spesso associata con una loro corretta applicazione. Nel caso di prodotti che agiscono per ingestione (es. prodotti a base di Bt), la tempistica (timing) è fondamentale per garantire che le tossine batteriche rimangano stabili nell'ambiente finché non vengono ingerite dall'insetto bersaglio. Un altro aspetto è quello di garantire una copertura adeguata dei substrati (ad esempio, foglie) frequentati o mangiati dagli insetti. Questo ha portato allo sviluppo di formulazioni con l'obiettivo di massimizzare la *shelf life* e la persistenza, migliorando la dispersione e l'adesione, l'efficienza e, soprattutto, l'efficacia del trattamento. Una varietà di coadiuvanti e additivi per formulazioni microbiche sono stati sviluppati dall'industria. Questi includono disperdenti,



tensioattivi, tamponi di pH, agenti antischiuma, vettori, fagostimolanti e attrattivi. A seconda dell'applicazione e delle condizioni ambientali, una scelta di formulazioni solide e liquide è disponibile. Le prime comprendono polveri, granuli, pellets e polveri bagnabili (WP), mentre sospensioni liquide possono consistere in sospensioni concentrate (SC), emulsioni e incapsulazioni. Le tecnologie avanzate volte ad aumentare gli effetti residui comprendono microincapsulazioni e microgranuli.

La disponibilità delle moderne biotecnologie “omiche” permette lo sviluppo di nuovi approcci molecolari che stanno conducendo alla scoperta di nuovi geni e tossine di origine microbica implicati nei meccanismi bioinsetticidi, generando preziose informazioni per ottimizzare il loro impiego nel controllo biologico e creare nuove prospettive di difesa eco-compatibile.

#### ESEMPI APPLICATIVI

##### *Ambito agrario*

Un'applicazione estesa e importante in campo frutticolo riguarda l'impiego del virus della granulosi (CpGV) della Carpocapsa (*Cydia pomonella*). Viene applicato in sospensione acquosa poco prima e/o durante la schiusa delle uova con dosaggi da 50 a 100 ml/ha, da solo o in associazione con semiochimici (kairomone) (Pasqualini et al., 2005) o lieviti (Knight et al., 2013). Le larve neonate ingeriscono i corpi di occlusione (granuli), i quali si dissolvono rapidamente nelle condizioni alcaline dell'intestino e rilasciano dei virioni che passano attraverso la membrana peritrofica (infezione transitoria) prima di invadere la maggior parte dei principali tessuti del corpo (Federici, 1997). Numerose prove sperimentali hanno dimostrato la buona attività di CpGV in una varietà di condizioni in Europa, Sud Africa, Australia, Nuova Zelanda, Sud America e Nord America (Falcon e Huber, 1991; Guillon e Biache, 1995; Huber, 1986; Jaques, 1990; Vail et al., 1991). La specificità di CpGV per Carpocapsa e alcune specie strettamente collegate, nonché la sicurezza per gli organismi non bersaglio è stata accuratamente documentata (Gröner, 1986). Nonostante la sua promessa, lo sviluppo commerciale e l'adozione di CpGV è stata limitata (Cross et al., 1999). Le principali preoccupazioni espresse dai coltivatori sono: la breve attività residua e la necessità di utilizzare più applicazioni; la bassa velocità d'azione, la scarsa efficacia in condizioni di alta densità di popolazione; gli elevati costi delle formulazioni (Glen e Clark, 1985; Jaques et al., 1987) e il rischio di resistenza (Zingg, 2008). Tuttavia,

più di recente, una serie di prodotti di nuova formulazione sul mercato sono stati registrati in Nord America e approvati per l'uso in frutteti biologici, i quali attenuano alcuni dei limiti segnalati.

### *Ambito forestale*

Le applicazioni di *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk) nei biotopi forestali sono numerose, anche in Italia. Una sintesi dei risultati e delle prospettive di utilizzo per il controllo della processionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*) è stata ad esempio riportata da Battisti et al. (1998).

In Toscana, nel 2003-2004, nel complesso boschivo del Demanio Regionale nella Foresta di Santa Luce (PI), a prevalenza di *Quercus cerris*, sono stati trattati 1.640 ha all'inizio di una progradazione di *Thaumetopoea processionea* con Btk (FORAY 48 B a 12.7 BIU/l). Il trattamento realizzato sulle giovani larve con 4,5 l/ha, a fine aprile, mediante elicottero, ha determinato una mortalità larvale superiore al 96% (Roversi et al., 2008).

In Sardegna, a partire dai primi anni '80, è stata condotta una lunga esperienza di sperimentazione e applicazione di formulati a base di Btk per il controllo dei Lepidotteri defogliatori delle sugherete: *Lymantria dispar*, *Malacosoma neustria* e *Tortrix viridana* L. (Luciano e Lentini, 2012). Dal 2001 al 2010 sono stati trattati oltre 100 mila ettari di bosco con mezzi aerei, conseguendo elevati livelli di mortalità larvale (dal 56,4 al 97,1%) in funzione delle differenti formulazioni impiegate. In generale, i risultati sono stati soddisfacenti in termine di protezione delle sugherete. Le difficoltà hanno riguardato alcuni aspetti tecnici e soprattutto di carattere burocratico e amministrativo con ripercussioni, talvolta, sulla tempestività e sull'efficienza degli interventi aerei. Ad esempio solo dal 2009 gli elicotteri impiegati per la distribuzione delle formulazioni di Bt sono stati dotati di efficienti sistemi di GPS per i trattamenti spray (AG NAV INC.), tali da garantire un uniforme copertura. In alcuni casi non è stato possibile acquisire in tempo utile i formulati sperimentali per i ritardi nell'erogazione dei finanziamenti, considerato che sono necessari, nel caso del Foray circa 90 giorni per la produzione e il trasporto dagli USA alla Sardegna. Tuttavia, l'ostacolo principale è risultato di carattere legislativo, in relazione all'autorizzazione all'impiego dei formulati e al ricorso ai mezzi aerei per i trattamenti.

Un altro ambito di impiego di agenti di controllo biologico per il contenimento dei defogliatori forestali è rappresentato dal caso del fungo *Entomophaga maimaiga*, un agente entomopatogeno specie-specifico per la *L. dispar*.

Questo fungo attualmente non è presente nell'Europa occidentale, ma la sua introduzione dagli areali di origine permetterebbe di contenere lo sviluppo delle popolazioni della specie dannosa. I promettenti risultati di questi studi, svolti da un gruppo di ricercatori in Sardegna ha permesso di mettere in evidenza l'efficacia di ceppi del fungo di origine balcanica su popolazioni di *L. dispar* di diverse aree geografiche della penisola italiana e delle maggiori isole (Contarini et al., 2015).

### *Ambito zootecnico*

I prodotti a base di microrganismi entomopatogeni impiegati in ambito zootecnico sono soggetti a una differente regolamentazione e vengono definiti biocidi. Benché ceppi di *B. thuringiensis israelensis* (Bti) manifestino attività nei confronti delle larve di insetti di interesse zootecnico come le mosche, essi non hanno trovato significativo impiego in questo ambito in relazione alla limitata efficacia di trattamenti sui substrati organici di sviluppo degli stadi pre-immaginali di questi insetti. Diverse sono per contro le sperimentazioni condotte. Si riporta il caso di una sperimentazione condotta in Sardegna con una formulazione batterica contenente spore di *Brevibacillus laterosporus* ceppo UNISS 18, noto per la sua tossicità nei confronti di *Musca domestica*. Indagini preliminari in laboratorio hanno permesso di individuare una concentrazione di  $1 \times 10^8$  spores /g come concentrazione letale sugli stadi giovanili. La stessa formulazione e concentrazione, è stata in seguito applicata a un dosaggio di 2 l/m<sup>2</sup> sulle letamaie e nei paddock di aziende bovine intensive, ottenendo un significativo contenimento dello sviluppo larvale in questi siti (Ruiu et al., 2008). I promettenti risultati ottenuti sono stati anche confrontati con altri biopesticidi di origine botanica (azadiractina) che hanno confermato l'elevata potenzialità di questo microrganismo per l'impiego nel controllo integrato delle mosche in aziende zootecniche (Ruiu et al., 2011).

### RIASSUNTO

L'interesse per lo sviluppo di soluzioni alternative e a basso impatto ambientale per il contenimento degli organismi nocivi in agricoltura è in continua crescita e riguarda particolarmente il settore dei cosiddetti agenti di controllo biologico. In questo ambito, un ruolo importante è ricoperto dagli insetticidi a base di microrganismi che si comportano da agenti entomopatogeni, tra cui batteri, funghi, virus, protozoi e nematodi. I batteri costituiscono gli agenti più importanti con il genere *Bacillus* e, in particolare, il *Bacillus*

*thuringiensis*, che rappresenta la specie di maggiore interesse applicativo, utilizzata in commercio da più di 40 anni. Tra i virus, hanno avuto sviluppo applicativo quelli delle poliedrosi citoplasmatiche, delle poliedrosi nucleari e delle granulosi. I funghi sono rappresentati da diversi generi e specie, ma le applicazioni più significative riguardano *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Altri agenti importanti sono i microsporidi (*Nosema* spp.). Infine, i nematodi, rappresentano un particolare gruppo di “microorganismi”, che agiscono in associazione con batteri simbiotici. Diverse applicazioni su vasta scala con formulazioni a base di tali agenti microbiologici di controllo hanno riguardato negli ultimi decenni anche l'Italia.

#### ABSTRACT

*Perspectives in the microbial control of insects.* The growing interest in the development of alternative and eco-sustainable pest management solutions in agriculture is associated to a significant development of the biological control agent sector. In this context, microbial based insecticides play a major role and include entomopathogenic bacteria, fungi, virus, protozoa, and nematodes. Bacteria are the most exploited group of entomopathogens and are well represented by the genus *Bacillus* which includes *Bacillus thuringiensis*, the most studied and employed species, with more than 40 years commercial use. Among viruses, agents of cytoplasmic polyhedrosis, nuclear polyhedrosis and the granulosis feature the main cases of application. Fungi include a variety of genera and species, but the most important applications relate to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Other important biological control agents are microsporidia (*Nosema* spp.). Finally, nematodes, are a particular group of “microorganisms” acting in association with symbiotic bacteria. Several large-scale applications of formulations based on these microbial control agents have been made in the last decades also in Italy.

#### BIBLIOGRAFIA

- ARTHURS S.P., LACEY L.A. (2004): *Field evaluation of commercial formulations of the codling moth granulovirus: persistence of activity and success of seasonal applications against natural infestations of codling moth in Pacific Northwest apple orchards*, «Biol Control», 31, pp. 388-397.
- BATTISTI A., LONGO S., TIBERI R., TRIGGIANI O. (1998): *Results and perspectives in the use of Bacillus thuringiensis Berl. var. kurstaki and other pathogens against Thaumatopoea pityocampa (Den. et Schiff.) in Italy (Lep., Thaumatopoeidae)*, «Anz. Schadlingskde, Pflanzenschutz, Umweltschutz», 71, pp. 72-76.
- BARBER K.N., KAUPP W.J., HOLMES S.B. (1993): *Specificity testing of the nuclear polyhedrosis virus on the gypsy moth, Lymantria dispar (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae)*, «Can Entomol», 125, pp. 1055-1066.
- BCC RESEARCH LLC, CHM029E (June 2014): <http://www.bccresearch.com/market-research/chemicals/biopesticides-chm029e.html>.
- BEDDING R., MOLYNEUX A. (1982): *Penetration of insect cuticle by infective juveniles of Heterorhabditis spp. (Heterorhabditidae: Nematoda)*, «Nematologica», 28, pp. 354-359.

- BROOKS F.M. (1988): *Entomogenous protozoa*, in Ignoffo CM, Mandava MB (eds), *Handbook of natural pesticides*, vol. V, Microbial Insecticides, Part A, Entomogenous Protozoa and Fungi, CRC Press Inc. Boca Raton, pp. 1-149.
- CHANDRASEKARAN R., REVATHI K., NISHA S., KIRUBAKARAN S.A., SATHISH-NARAYANAN S., SENTHIL-NATHAN S. (2012): *Physiological effect of chitinase purified from Bacillus subtilis against tobacco cutworm Spodoptera litura*, «Fab Pestic Biochem Physiol», 104, pp. 65-71.
- CONTARINI M., RUIU L., PILARSKA D., LUCIANO P. (2015): *Different susceptibility of indigenous populations of Lymantria dispar to the exotic entomopathogen Entomophaga maimaiga*, «Journal of Applied Entomology», article first published online: 4 SEP 2015 DOI: 10.1111/jen.12267.
- COPPING G.L., MENN J.J. (2000): *Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy*, «Pest Manag. Sci.», 56, pp. 651-676.
- CORY J.S. (2000): *Assessing the risks of releasing genetically modified virus insecticides: progress to date*, «Crop Prot», 19, pp. 779-785.
- CORY J.S., HIRST M.L., STERLING P.H., SPEIGHT M.R. (2000): *Native host range nucleopolyhedric virus for control of the browntail moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*, «Environ Entomol», 29, pp. 661-667.
- CROSS J.V., SOLOMON M.G., CHANDLER D., JARRETT P., RICHARDSON P.N., WINSTANLEY D., BATHON H., HUBER J., KELLER B., LANGENBRUCH G.A., ZIMMERMANN G. (1999): *Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe: 1. Microbial agents and nematodes*, «Biocontrol Sci. Technol.», 9, pp. 125-149.
- DIRETTIVA CE 2009/128: *Quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi*, «Gazzetta ufficiale dell'Unione europea», L 309/71, 24.11.2009.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2006): *New biopesticides active ingredients*, [www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product\\_lists](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/product_lists).
- FARIA M.R., MAGALHÃES B.P. (2001): *O uso de fungos entomopatogenicos no Brasil*, «Biotecnol Cienc Desenvolvimento», 22, pp. 18-21.
- FALCON L.A., HUBER J. (1991): *Biological control of the codling moth*, in van der Geest, L.P.S., Evenhuis, H.H. (Eds.), *Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control*, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp. 355-369.
- FEDERICI B.A. (1997): *Baculovirus pathogenesis*, in Miller LK (ed.), *The Baculoviruses*, Plenum Press, New York, pp. 33-59.
- FEGAN M., MANNERS J.M., MACLEAN D.J., IRWIN J.A.G., SAMUELS K.D.Z., HOLDOM D.G., LI D.P. (1993): *Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae var. anisopliae*, «Microbiology», 139, pp. 20175-2081.
- GELERNTER W., SCHWAB G.E. (1993): *Transgenic bacteria, viruses, algae and others microorganisms as Bacillus thuringiensis toxin delivery systems*, in Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, (eds), *Bacillus thuringiensis, an environmental pesticide: theory and practice*, Wiley, Chichester, pp. 89-124.
- GLARE T., CARADUS J., GELERNTER W., JACKSON T., KEYHANI N., KOHL J., MARRONE P., MORIN L., STEWART A. (2012): *Have biopesticides come of age?*, «Trends Biotechnol.», 30, pp. 250-258.
- GLEN D.M., CLARK J. (1985): *Death of Cydia pomonella larvae and damage to apple fruit, after field application of codling moth granulosis virus*, «Entomol. Exp. Appl.», 38, pp. 93-96.
- GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS (2012): *Biopesticides - a global strategic business report*, Global Industry Analysts Research Report, MCP-1573.

- GOETTEL M.S., JARONSKI S.T. (1997): *Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts*, in Goettel M.S., Johnson D.L. (eds), *Microbial control of grasshopper and locusts*, «Memoirs of Entomological Society of Canada», vol 171, pp. 83-99.
- GOETTEL M.S., HAJEK A.E., SIEGEL J.P., EVANS H.C. (2001): *Safety of fungal biocontrol agents*, in Butt TM, Jackson C, Magan N (eds), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, CAB International, Wallingford, pp. 347-375.
- GREWAL P.S., EHLERS R.-U., SHAPIRO-ILAN D.I. (2005): *Nematodes as Biocontrol Agents*, CABI, New York, NY.
- GRÖNER A. (1986): *Specificity and safety of baculoviruses*, in Granados, R.R., Federici, B.A. (Eds.), *The Biology of Baculoviruses*, vol. I, *Biological Properties and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 177-202.
- GUILLON M., BIACHE G. (1995): *IPM strategies for control of codling moth (Cydia pomonella L.) (Lepidoptera Olethreutidae) interest of CmGV for long term biological control of pests complex in orchards*, «Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.», 60, pp. 695-705.
- HENRY J.E., OMA E.A. (1981): *Pest control by Nosema locustae, a pathogen of grasshoppers and crickets*, in *Microbial Control Of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, ed. H.D. Burges, Academic Press, New York, pp. 573-586.
- HUBER J. (1986): *Use of baculoviruses in pest management programs*, in Granados, R.R., Federici, B.A. (Eds.), *The Biology of Baculoviruses*, vol. II, *Practical Application for Insect Control*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 181-202.
- KAYA H.K., GAUGLER R. (1993): *Entomopathogenic nematodes*, «Annual Review of Entomology», 38, pp. 181-206.
- KNIGHT A., WITZGALL P. (2013): *Combining mutualistic yeast and pathogenic virus. A novel method for codling moth control*, «J. Chem. Ecol.», 39, pp. 1019-1026. doi: 10.1007/s10886-013-0322-z. [PubMed: 23881444].
- JAQUES R.P. (1990): *Effectiveness of the granulosis virus of the codling moth in orchard trials in Canada*, in Proceedings of the V International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Adelaide, Australia, 20-24 August 1990, pp. 428-430.
- JAQUES R.P., LAING J.E., LAING D.R., YU D.S.K. (1987): *Effectiveness and persistence of the granulosis virus of the codling moth Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae) on apple*, «Can. Entomol.», 119, pp. 1063-1067.
- LUCIANO P., LENTINI A. (2012): *Ten years of microbiological control program against lepidopterous defoliators in Sardinian cork oak forests*, «IOBC/wprs Bulletin», vol. 76, pp. 175-178.
- MADDOX J.V. (1987): *Protozoan diseases*, in Fuxa JR and Tanada Y (eds), *Epizootiology of insect diseases*, Wiley, New York.
- MAGNOLER A. (1967): *L'applicazione di un virus poliedrico nucleare nella lotta contro larve di Lymantria dispar L.*, «Entomophaga», 12, pp. 199-207.
- MAGNOLER A. (1968): *The differing effectiveness of purified and nonpurified suspensions of the nuclear-polyhedrosis virus of Portetria dispar*, «Journal of Invertebrate Pathology», 11, pp. 326-328.
- MARTIN P.A.W., HIROSE E., ALDRICH J.R. (2007): *Toxicity of Chromobacterium subtugae to southern sink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)*, «J. Econ. Entomol.», 100, pp. 680-684.
- MOSCARDI F. (1999): *Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera*, «Annual Review of Entomology», vol. 44, pp. 257-289.
- PALMA L., MUÑOZ D., BERRY C., MURILLO J., CABALLERO P. (2014): *Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity*, «Toxins», 6, pp. 3296-3325.

- PASQUALINI E., SCHMIDT S., ESPINHA I., CIVOLANI S., DECRISTOFARO A., MOLINARI F., VILLA M., LADURNER E., SAUPHANOR B. AND IORIATTI C. (2005): *Effects of the Kairomone Ethyl (2E, 4Z)-2,4- Decadienoate (DA 2313) on the Oviposition Behaviour of Cydia pomonella: Preliminary Investigations*, «Bulletin of Insectology», 58, 119124.
- PEKRUL S., GRULA E.A. (1979): *Mode of infection of the corn earworm (Heliothis zea) by Beauveria bassiana as revealed by scanning electron microscopy*, «Journal of Invertebrate Pathology», v. 34, pp. 238-247.
- PRATER C.A., REDMOND C.T., BARNEY W., BONNING B.C., POTTER D.A. (2006): *Microbial Control of Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Turfgrass Using Agrotis ipilon Multiple Nucleopolyhedrovirus*, «J. Econ. Entomol.», 99 (4), pp. 1129-1137.
- REG. CE N. 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 309/1, 24.11.2009.
- ROBERTS D.W., St. LEGER R.J. (2004): *Metarizhium spp., Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects*, «Advances in Applied Microbiology», vol. 54, pp. 51.
- ROVERSI P.F., MARIANELLI L., MARZIALI L., TOCCAFONDI P. (2008): *Controllo di Thaumetopoea processionea (L.) su ampie superfici forestali (Lepidoptera Thaumetopoeidae)*, «Notiziario sulla Protezione delle Piante», 22, pp. 165-169.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I. (2008): *Immature house fly (Musca domestica) control in breeding sites with a new Brevibacillus laterosporus formulation*, «Environmental Entomology», 37, pp. 505-509.
- RUIU L. (2013): *Brevibacillus laterosporus, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species*, «Insects», 4, pp. 476-492.
- RUIU L. (2015): *Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management*, «Insects», 6, pp. 352-367.
- SENTHIL-NATHAN S. (2013): *A review of biopesticides and their mode of action against of insect pest*, in Thangavel P, Sridevi G. (eds), *Environmental sustainability: Role of green technologies*, Springer, pp. 49-63.
- SHAPIRO-ILAN D.I., HAN R., DOLINKSI C. (2012): *Entomopathogenic nematode production and application technology*, «Journal of Nematology», 44, pp. 206-217.
- SOLTER L.F., BECNEL J.J. (2000): *Entomopathogenic Microsporidia*, in Lacey LA (ed), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 231-254.
- RUIU L., SATTÀ A., FLORIS I. (2011): *Comparative applications of Azadirachtin- and Brevibacillus laterosporus-based formulations for house fly management experiments in dairy farms*, «J. Med. Entomol.», 48, pp. 345-350.
- VAIL P.V., BARNETT W., COWAN D.C., SIBBETT S., BEEDE R., TEBBETS J.S. (1991): *Codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) control on commercial walnuts with a granulosis virus*, «J. Econ. Entomol.», 84, pp. 1448-1453.
- VEGA F.E., KAYA H.K. (2012): *Insect Pathology*, Second Edition, Elsevier Inc., 512 pp.
- VOSSBRINCK C.R., DEBRUNNER-VOSSBRINCK B.A. (2005): *Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations*, «Folia Parasitologica», 52, pp. 131-142.
- ZINGG D. (2008): *Madex Plus and Madex I12 overcome virus resistance of codling moth*, in Proceedings 13th International Conference on Organic Fruit Growing Ecofruit (ed. FOEKO), pp. 256-260. Weinsberg: FOEKO.





## I semiochimici in agricoltura

I semiochimici (Gk. *semeon* = segnale) sono sostanze naturali a basso peso molecolare (< 250), coinvolte nella comunicazione chimica tra gli organismi viventi, che possono indurre modificazioni soprattutto di carattere etologico, talvolta anche fisiologico o perfino anatomico. I semiochimici sono generalmente classificati in feromoni e allelochimici; i primi favoriscono la comunicazione all'interno della specie (semiochimici intraspecifici), i secondi, invece, mediano la comunicazione tra specie e regni di esseri viventi diversi (semiochimici interspecifici).

### SEMIOCHIMICI INTRASPECIFICI

Il termine feromone (Gk. *pherein* = trasportare e *ormao* = stimolo) venne introdotto dal biochimico tedesco Peter Karlson e dall'entomologo svizzero Martin Lüscher (1959) per evitare confusione con gli ormoni. Successivamente, nell'ambito dei semiochimici intraspecifici, Koene e Ter Maat (2001) introdussero il termine di allormone indicando con esso sostanze attive che bypassano gli organi di senso, come ad esempio i composti che inducono l'ovideposizione in *Drosophila funebris* (F.) (Baumann 1974a, 1974b) o che inibiscono il riaccoppiamento, attraverso il blocco della recettività della femmina, in *Musca domestica* (L.) (Riemann et al. 1967; Leopold et al., 1971a, 1971b).

I feromoni sono sostanze in grado di indurre reazioni specifiche di tipo fisiologico e/o comportamentale. In base alla risposta si distinguono feromoni

\* Dipartimento di Agricoltura, Ambiente ed Alimenti, Università degli Studi del Molise

\*\* Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di Foggia

sessuali, di allarme, traccia, marcanti, inibitori, di aggregazione, ecc. Alla percezione di un feromone può seguire una risposta comportamentale immediata (effetto releaser), o un complesso di risposte fisiologiche e/o morfologiche (formazione di una casta e/o maturità sessuale) a cui in un secondo momento possono conseguire manifestazioni comportamentali (effetto primer) (Wilson e Bossert, 1963). L'entomologo inglese Colin G. Butler nel 1961, mediante studi comportamentali, individuò in *Apis mellifera* (L.) il primo feromone primer che regola lo sviluppo di un insetto.

I feromoni sessuali possono essere diffusi nell'aria o in altro mezzo disperdente (feromoni olfattivi) o depositati direttamente sull'organo di ricezione del partner (feromoni di contatto).

#### FEROMONI OLFATTIVI

Il naturalista francese Jean-Henry Fabré nel 1870 osservò, per la prima volta, che una femmina di *Saturnia pyri* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera, Saturnidae) è in grado di attrarre decine di maschi, anche a notevole distanza (Fabrè, 1911). Successivamente, l'utilizzo di stimoli olfattivi per l'incontro tra i sessi è stato dimostrato in numerose specie appartenenti a diversi Ordini di insetti. I feromoni sono generalmente rilasciati dalla femmina, ma anche il maschio (es. *Galleria mellonella* L.) (Finn e Payne, 1977) o entrambi i sessi possono emettere l'attrattivo (es. *Ceratitis capitata* Wiedemann e *Bactrocera oleae* Rossi) nelle fasi di ricerca del partner, corteggiamento e accoppiamento (Ohinata et al., 1977; Canale et al., 2015).

I feromoni sessuali sono complesse miscele di messaggeri chimici in cui il componente principale, dotato di elevata attività biologica, può fungere inizialmente da attrattivo e successivamente, a concentrazione più elevata, come quella che un maschio avverte in prossimità della femmina, anche da arrestante e spesso da stimolante sessuale. Tale sostanza di richiamo agisce su lunghe distanze (anche oltre 7,5 km) inducendo l'individuo ricevente a orientarsi verso la sorgente e stimolandolo a volare controvento. Il componente principale di un feromone di richiamo è in genere poco specifico se non accompagnato dai componenti secondari come dimostrato dal fatto che una trappola innescata con il componente principale può attirare maschi di più specie, anche di gruppi diversi, mentre l'attrazione diventa altamente specifica se attivata con una femmina vergine di una delle specie attratte. I composti del blend feromonico sono emessi in un preciso rapporto che consente la "sinergia intraspecifica", ossia il completamento ottimale del messaggio "ri-

chiamo – arresto – eccitazione”. Il chimico americano Robert Silverstein e l'entomologo americano David Wood dimostrarono nel 1966 che sono necessari tre componenti del feromone di aggregazione per attrarre gli adulti di *Ips confusus* LeConte (Silverstein, 1977).

Nella miscela feromonica può essere presente un isomero dell'attrattivo che funge da inibitore del richiamo (antiferomone) per altre specie, anche gemelle. Tuttavia, la miscela feromonica è caratteristica della specie e gioca un ruolo fondamentale nell'isolamento riproduttivo. Altri composti, presenti nel feromone sessuale, agiscono a breve distanza e stimolano i partners al corteggiamento e/o all'accoppiamento e, per tale ragione, sono denominati afrodisiaci. I maschi di alcuni Lepidotteri espongono vistosissimi ciuffi odorosi (*coremata* o *hair tufts* o *hair pencils*) allo scopo di placare la femmina e indurla alla copula.

Quando una sostanza chimica svolge la medesima attività attrattiva di un feromone ma non è rilasciata dall'organismo è chiamata paraferomone (Chambers, 1977). Generalmente queste sostanze sono meno potenti dei feromoni ai quali corrispondono; un ottimo esempio è il trimedlure che attira i maschi di *C. capitata*.

I feromoni sessuali sono generalmente molecole volatili alifatiche ( $C_{10}$  -  $C_{23}$ ), con doppi legami (1-3) e un gruppo terminale (acetato, alcol, aldeide o raramente chetone), oppure epossidi, catene laterali metiliche o piccole molecole monoterpenoidi cicliche. Il chimico tedesco Adolf Budenandt, dopo 30 anni di studi e aver triturato mezzo milione di femmine di baco da seta, alla fine del 1959 identificò il primo feromone sessuale che attira i maschi di *Bombyx mori* (L.) battezzandolo “bombicolo” (Butenandt et al., 1959), dal nome del lepidottero e per la natura alcolica.

L'emissione e la ricezione dei feromoni sessuali sono influenzate da condizioni intrinseche o fisiologiche (es. età, tipo di bioritmo, monogamia o poligamia, ecc.) ed estrinseche o ambientali (temperatura, velocità del mezzo disperdente, intensità luminosa e vegetazione). Lo scambio di informazioni mediante feromoni tra una coppia di Lepidotteri notturni può avvenire in un periodo della notte, in cui la temperatura è ottimale per l'attività muscolare, e per una durata che può dipendere dalla velocità dell'aria. Per alcune specie, il rilascio del feromone può essere condizionato dalla presenza o assenza del vegetale preferito (es. specie monofaghe) e dalle sue fasi fenologiche o da intensità luminose (es. insetti notturni) superiori a quella della luna piena (0,3 lux).

I feromoni vengono generalmente emessi da punti diversi del corpo degli insetti e sono percepiti da sensilli chemiorecettori presenti soprattutto sulle

antenne. I chemiocettori sono in grado di rilevare e riconoscere i singoli componenti di un blend chimico secondo il modello 'chiave-serratura' (interazione substrato-recettore). L'interazione del substrato con il recettore è possibile se la loro forma è esattamente complementare per permetterne un incastro perfetto.

I feromoni penetrano attraverso i submicroscopici pori dei sensilli e giungono ai dendriti delle cellule recettrici sulla cui membrana determinano una variazione della carica elettrica, rilevabile attraverso tecniche elettrofisiologiche (Single Sensillum Recording - SSR, Single Cell Recording - SCR) che visualizzano il fenomeno sottoforma di variazione della frequenza dei potenziali di azione (spikes) delle singole cellule sensoriali. La somma delle risposte di tutti i sensilli olfattivi, raggiunti dallo stimolo, è registrata mediante la tecnica elettroantennografica (EAG). L'ampiezza della risposta elettrofisiologica è in genere correlata con la concentrazione delle sostanze attive.

Gli stimoli elettrici generati a seguito della percezione di sostanze attive vengono sommati e integrati nel sistema nervoso centrale, e la parziale amputazione dell'antenna diminuisce l'intensità della risposta olfattiva.

Le ghiandole odorifere sono, generalmente, delle membrane intersegmentali modificate poste, nel caso dei Lepidotteri, fra il settimo e l'ottavo segmento addominale oppure fra l'ottavo e il nono, e possono essere presenti a livello dorsale, ventrale, o sotto forma di anelli.

L'elettromicrografia delle sacche odorifere ha rilevato che le membrane cellulari si presentano ripiegate, aumentando così la superficie della cellula di 60-70 volte; la presenza di tali pieghe potrebbe essere correlata con l'emissione del feromone.

La comprensione dei meccanismi di controllo che governano la produzione, il rilascio e la percezione del feromone sono attuali argomenti di studio.

#### FEROMONI DI CONTATTO

Sono sostanze presenti sulla superficie del corpo degli insetti ed esplicano la loro attività a corta distanza, completando l'attrazione dei feromoni sessuali o di aggregazione.

I feromoni di contatto, spesso utilizzati per il riconoscimento della specie nell'incontro tra i sessi, sono idrocarburi saturi o insaturi ( $C_{23} - C_{29}$ ) con una diramazione terminale costituita da monometilalcheni, o interna da monometil-, dimetil-, trimetil- e tetrametilalcani. La variabilità della struttura di questi idrocarburi consente la diversità dei feromoni necessaria per

la loro specificità; la stabilità chimica e la bassa volatilità li rendono adatti a espletare l'attività di feromoni di contatto. Tali composti, in genere presenti su un sesso, possono esserlo anche sulla cuticola di entrambi, ma più abbondanti su uno di essi. In entrambi i sessi di *Musca autumnalia* De Geer (Diptera, Muscidae) sono presenti (Z)-14-nonacosene, (Z)-13-nonacosene e (Z)-13-eptacosene ma più abbondanti sulla femmina (Uebel et al., 1975). Stesso comportamento è stato osservato in *Xylotrechus colonus* F. (Coleoptera, Cerambycidae) i cui sessi presentano n-pentacosane, ma in quantità maggiore sulla femmina (Ginzel et al., 2003). In *Danaus gilippus* Cramer (Lepidoptera, Nymphalidae), il maschio estroflette un ciuffo di setole che spruzzano il feromone sulle antenne della femmina inducendo atterraggio, ripiegamento delle ali e disponibilità all'accoppiamento (Brower et al., 1965).

Tali feromoni "close-range" sono stati osservati e/o identificati in diversi Ordini di insetti tra cui Ditteri, Imenotteri, Coleotteri, Isotteri e Lepidotteri.

#### SEMIOCHIMICI INTERSPECIFICI

I semiochimici interspecifici, noti con il termine di allelochimici (Gk. *allelon* = reciproco), sono messaggeri chimici che consentono la comunicazione tra specie e regni viventi diversi (Whittaker e Feeny, 1971). Gli allelochimici si classificano in base a una valutazione della comunicazione, individuando la specie che trae vantaggio, e comprendono gli allomoni, cairomoni, sinomoni, apneumoni e antiiferomoni (Brown et al., 1970; Dicke e Sabelis, 1992).

Gli ALLOMONI (Gk. *allos* = altro) sono sostanze chimiche di tipo difensivo, più o meno volatili, che sollecitano l'allontanamento di altre specie a vantaggio di quella che le emette; esempi sono i secreti delle cimici, l'acido formico delle formiche, il falso feromone di allarme di alcune specie di formiche schiaviste (es. *Formica subintegra* Emery e *F. pergandei* Emery), utilizzato per mettere in fuga le operaie dai propri nidi e rapirne larve e pupe (Regnier e Wilson, 1971), il secreto repellente di alcuni Imenotteri Vespoidei, impiegato per impedire alle formiche di saccheggiare il proprio nido (Jeanne, 1970; Pardi e Turillazzi, 1985).

Anche le piante producono un'ampia varietà di allomoni che utilizzano per proteggersi da insetti fitofagi e altri erbivori. Generalmente sono metaboliti secondari che scoraggiano gli attacchi dei fitofagi. Alcuni allomoni sono

tossici (alcaloidi, glicosidi ecc.) altri hanno attività disappetente temporanea o deterrente permanente.

I CAIROMONI (Gk. *kairos* = momento giusto o opportuno) sono composti volatili favorevoli all'organismo che riceve il segnale come, ad esempio, quelli emessi dalle piante e che risultano attrattivi per i fitofagi, la melata degli afidi che attira le crisope, gli odori presenti sulle uova che richiamano i parassitoidi oofagi (Celli e Maini, 1988). Tra i cairomoni si può annoverare l'acido eptanoico emesso dalla larva della Tignola della patata *Phthorimaea operculella* Zeller, e utilizzato dal suo parassitoide, l'Imenottero *Orgilus lepidus* Muesebeck, per localizzarla nelle gallerie scavate nei tuberi (Hendry et al., 1973).

I SINOMONI (Gk. *sin* = con, insieme) sono sostanze volatili utili sia all'organismo che le emette che al ricevente; esempi sono l'odore emesso dai fiori che attira insetti pronubi (vantaggio sia per la pianta che ottiene la fecondazione incrociata che per l'insetto che trova nettare e polline) (Celli e Maini, 1988) e i composti volatili rilasciati da piante infestate che attirano i nemici naturali dei fitofagi. Foglie di pomodoro, *Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex. Farw e fagiolo, *Phaseolus lunatus* L., rispettivamente infestate da *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach) e *L. sativae* (Blanchard), attirano rispettivamente i Braconidi *Dacnusa sibirica* Telenga (Dicke e Minkenberg, 1991) e *Opius dissitus* Muesebeck (Petitt et al., 1992).

Gli APNEUMONI (Gk. *ápnoia* = mancanza di respiro) sono emessi da sostanze non viventi e avvantaggiano l'organismo ricevente; svolgono funzione di messaggeri in specie sociali predatrici o parassitoidi. Questo termine è stato proposto da Nordlund e Lewis (1976), ma pochi casi di questo tipo di allelochimici sono segnalati in letteratura.

Gli ANTIFEROMONI, infine, sono sostanze utilizzate per l'isolamento riproduttivo, in grado di inibire i maschi eterospecifici.

La classificazione di un particolare composto, tuttavia, dipende dal contesto ecologico nel quale è considerato e una stessa sostanza può essere utilizzata per molti scopi. Il feromone di allarme 6-metil-5-epten-2-one della formica carnivora *Eridomyrmex purpureus* F. Smith, per esempio, è usato anche dal ragno *Habronestes bradleryi* Walckenaer per localizzare la preda. In questo caso il composto è utilizzato, nello stesso tempo, da una specie come feromone e dall'altra come cairomone.

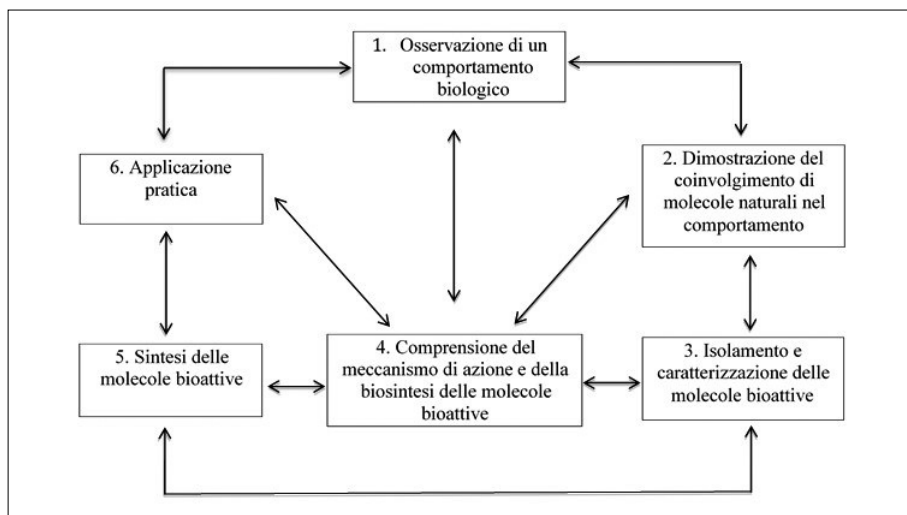


Fig. 1 *Fasi della ricerca sui semiochimici e possibili interazioni*

#### RICERCA DI SEMIOCHIMICI

La ricerca di un semiochimico si sviluppa attraverso varie fasi e interessa diverse competenze (fig. 1). Essa inizia con l'osservazione di un comportamento biologico e la dimostrazione del coinvolgimento di una sostanza chimica nello specifico fenomeno. Successivamente il composto bioattivo deve essere isolato e la sua struttura chimica determinata. Seguono ulteriori indagini chimiche e biochimiche per individuare la biosintesi della molecola e il meccanismo di azione. Nello stesso tempo si può procedere a sintetizzare composti analoghi e derivati e determinare la loro attività biologica mediante opportuni saggi comportamentali e fisiologici. Infine, diverse formulazioni dei composti attivi sintetizzati sono valutate mediante osservazioni di campo per una loro applicazione pratica in agricoltura.

Di seguito si riportano le attività in genere necessarie per l'identificazione dei semiochimici e in particolare dei feromoni sessuali.

- Osservazioni comportamentali sull'incontro dei sessi o sull'accoppiamento. È importante acquisire conoscenze sul comportamento dell'insetto nelle condizioni naturali in cui abitualmente vive, onde evitare false interpretazioni. È necessario definire le condizioni ambientali e fisiologiche in cui l'insetto emette il segnale chimico e il sesso coinvolto nel rilascio dell'attrattivo. Le risposte a tale domande possono notevolmente aiutare il ricercatore a progettare opportuni esperimenti di laboratorio.

- Allevamento dell'insetto. La messa a punto di un allevamento continuo di un insetto non è sempre necessario, ma può considerevolmente accelerare l'avanzamento della ricerca. In particolare, il lavoro del chimico è imprevedibile, poiché dipende dalla complessità del blend feromonico e dalle quantità di sostanze che possono essere estratte, e non può essere facilmente sincronizzato con la disponibilità dell'insetto in campo.
- Messa a punto di un biosaggio. Un saggio biologico, in genere in olfattometro, dovrebbe essere progettato per misurare il comportamento dell'insetto ed eseguito nelle condizioni ottimali osservate in campo. Esso dovrebbe essere semplice, di facile ripetibilità e in grado di predire la risposta dell'insetto in natura.
- Estrazione dell'attrattivo. Utilizzando le conoscenze biologiche acquisite nelle precedenti fasi della ricerca, l'insetto deve essere posto, da solo o in gruppo, in un ambiente confinato e nelle condizioni ottimali per l'emissioni delle sostanze naturali da estrarre mediante solvente, adsorbente, trappola fredda, ecc.
- Valutazione delle risposte comportamentali e/o fisiologiche dell'insetto verso gli estratti. Per verificare se la sostanza attiva è stata estratta o si è modificata durante la procedura di estrazione è utile valutare l'attività biologica dell'estratto verso la specie oggetto della ricerca.
- Analisi chimiche degli estratti e suo frazionamento. Analisi gascromatografiche (GC) possono essere utilizzate per determinare la varietà di composti presenti nell'estratto ed eventualmente suddividerlo in frazioni.
- Selezione delle frazioni attive. Le frazioni collezionate sono valutate mediante EAG e olfattometria per individuare quelle biologicamente attive.
- Analisi chimiche e strumentali delle frazioni attive. I composti presenti nelle frazioni attive sono identificati mediante microanalisi, gascromatografia abbinata a spettrometria di massa (GC-MS), risonanza magnetica nucleare (RMN).
- Sintesi dei composti identificati. La sintesi dei composti può essere un processo complesso e complicato, soprattutto se non sono stati identificati e sintetizzati in precedenza.
- Valutazione delle risposte comportamentali e/o fisiologiche dell'insetto verso i composti sintetici. Questa fase coinvolge saggi di laboratorio e di campo con opportune trappole innescate con dispensatori attivati con le sostanze sintetizzate.
- Sintesi di enantiomeri. Gli insetti a volte rispondono a una miscela racemica, ma questo non preclude la possibilità che essi possono ri-



spondere in modo ottimale a un enantiomero. Pertanto, i composti da utilizzare nei biosaggi devono essere sintetizzati in una forma estremamente pura.

- Prove di campo utilizzando opportuni dispensatori a lento rilascio. Completate le fasi suddette, si può essere certi di avere a disposizione un feromone simile a quello naturale che può essere utilizzato per gestire il controllo dell'insetto dannoso. Tuttavia, per una sua applicazione pratica, è necessario mettere a punto un dispensatore che rilasci la sostanza o le sostanze attive nelle quantità e nei rapporti ottimali per settimane o mesi.

È da evidenziare che in molte fasi della ricerca sui semiochimici il saggio biologico riveste un ruolo importante, per tal motivo deve essere correttamente progettato per avere risposte chiare e altamente discriminanti al fine di evitare false interpretazioni.

In letteratura si ritrovano casi di errata identificazione di feromoni dovuti a un minore potere risolutivo delle strumentazioni analitiche disponibili ma anche all'inadeguatezza del saggio biologico utilizzato. Nello studio dei feromoni sessuali di Lepidotteri, per esempio, il battito delle ali nel maschio è stato più volte assunto come comportamento sufficiente per dimostrare una risposta positiva al feromone; successivamente si è constatato che la stessa risposta può essere indotta da diversi altri composti o anche dalla semplice esposizione a un determinato flusso d'aria.

In un saggio biologico è importante individuare un evento del comportamento di facile registrazione e in grado di prevedere la risposta finale dell'organismo. Non tutti gli eventi di una sequenza comportamentale sono utilizzabili per tale scopo, in generale, quelli vicini al livello della ricezione sensoriale hanno minore valore predittivo.

La maggior parte dei saggi biologici consistono nel registrare i cambiamenti comportamentali e utilizzano apparecchiature che possono essere disposte in condizioni standard di laboratorio. Particolari saggi biologici consistono, invece, nel registrare cambiamenti nell'attività fisiologica. Il più conosciuto e più comunemente usato di tali metodi, in cui solo una parte dell'animale può essere utilizzato, coinvolge la registrazione neurofisiologica da nervi sensoriali. Nello studio dei semiochimici è necessario individuare l'organo coinvolto nella comunicazione, nei feromoni, generalmente, è l'antenna. La registrazione può essere effettuata dall'intero organo o da singole cellule sensoriali (EAG, SCR). La registrazione da muscoli è effettuata occasionalmente.

## APPLICAZIONI DEI SEMIOCHIMICI

I semiochimici, sia interspecifici che intraspecifici, pur regolando aspetti diversi della vita di relazione degli insetti, hanno la caratteristica comune di agire come modificatori del comportamento. Essendo sostanze naturali, biologicamente attive a dosi molto basse, altamente specifiche e a impatto pressoché nullo sulle specie non bersaglio, sono utilizzati per la messa a punto di metodi di lotta innovativi ed ecosostenibili che mirano a manipolare opportunamente il comportamento di insetti dannosi di interesse agrario, forestale, merceologico e medico-veterinario.

In generale, i semiochimici trovano applicazione sia come mezzi indiretti (catture spia) che diretti di controllo (cattura massale, lotta attratticida, confusione sessuale, disorientamento del maschio). Tali applicazioni riguardano principalmente i semiochimici intraspecifici, e in particolare i feromoni sessuali, e in minor misura alcuni semiochimici interspecifici, cairomoni e allomoni.

## I SEMIOCHIMICI COME MEZZI INDIRETTI DI CONTROLLO

I semiochimici, formulati in opportuni erogatori e in combinazione con diversi modelli di trappola, sono utilizzati per rilevare la presenza di una specie in un nuovo ambiente, per definire l'attività di volo di una specie bersaglio e, meno frequentemente, per stimare la densità di popolazione di un fitofago al fine di individuare la soglia di intervento. In tali casi, il contributo dei semiochimici al controllo della specie è indiretto in quanto esso rimane affidato ad altri mezzi di lotta (es. insetticidi).

Negli ultimi anni, l'impiego dei semiochimici per il monitoraggio delle specie dannose ha acquisito un'importanza sempre maggiore sia per le recenti disposizioni legislative che per le caratteristiche dei moderni insetticidi. La lotta integrata è stata resa obbligatoria dal 1° gennaio 2014, dal Piano di Azione Nazionale che recepisce la Direttiva UE 128/2009 relativa a "Uso sostenibile degli agrofarmaci". L'adozione di validi strumenti di monitoraggio dei parassiti rientra tra le azioni obbligatorie da adottare, prima di qualsiasi misura di lotta. Diversi insetticidi attualmente in commercio sono caratterizzati da un'attività ovo-larvicida e, a differenza di molte molecole utilizzate in passato, da una ridotta capacità di penetrazione nei tessuti della pianta; essi, pertanto, devono essere applicati tempestivamente sin dall'inizio della presenza in campo degli adulti della specie dannosa. A tal fine, in un'ottica di difesa

sostenibile, l'adozione di strumenti di monitoraggio efficaci e specifici, quale quelli basati sull'uso dei feromoni, diventa fondamentale per la riuscita e per limitare il numero dei trattamenti.

L'impiego di feromoni per il monitoraggio è in teoria possibile per le numerose specie di cui sono noti attrattivi di questo tipo (El-Sayed, 2014). Nella pratica, gli attrattivi maggiormente utilizzati per il monitoraggio sono i feromoni sessuali di diverse specie di Lepidotteri e i feromoni di aggregazione di alcuni Coleotteri, tra cui specie dannose alle derrate e scolitidi di interesse forestale (Phillips e Throne, 2010; El-Sayed, 2014). Per alcune specie, tuttavia, i componenti dei feromoni sessuali attualmente noti non sono sempre in grado di assicurare un'elevata efficacia e specificità attrattiva. Ciò può dipendere da una limitata conoscenza del feromone sessuale oppure dall'esistenza di variazioni geografiche nella composizione del blend feromonico di una stessa specie. In alcuni casi, il feromone sessuale è stato definito molti anni fa con tecniche analitiche poco sensibili oppure sulla base di saggi di attrattività in campo con molecole a presunta attività feromonica che hanno consentito di individuare il solo componente principale. Il basso potere selettivo delle relative formulazioni commerciali, per la mancanza di componenti secondari, può indurre a errori di valutazione dei risultati quando il controllo delle catture è affidato a personale non specializzato. Per molte specie, il feromone sessuale rappresenta uno dei principali meccanismi pre-zigotici coinvolti nell'isolamento riproduttivo. Tuttavia, è stato più volte osservato che popolazioni geograficamente isolate di una stessa specie possono aver evoluto blend feromonici diversi, probabilmente come risultato dell'adattamento a contesti ecologici differenti (Groot et al., 2009). Tale osservazione, può avere importanti ricadute sull'applicazione pratica dei feromoni e suggerisce l'opportunità di valutare attentamente le formulazioni commerciali quando applicate su popolazioni geograficamente lontane da quelle su cui sono stati effettuati gli studi di identificazione.

La rivisitazione dei blend feromonici di alcune specie con tecniche avanzate di indagine chimica, elettrofisiologica e comportamentale ha portato all'identificazione di ulteriori componenti del feromone sessuale di specie di rilevante interesse economico anche in Italia e a un significativo miglioramento dell'attrattività e della specificità dei formulati in commercio (Klun et al., 1975; Rotundo et al., 2001; Germinara et al., 2007).

Tra i principali semiochimici interspecifici utilizzati per il monitoraggio di specie dannose meritano una particolare menzione i sali di ammonio, attivi verso ditteri tefritidi tra cui la mosca delle olive *B. oleae*, e l'estere (*E,Z*)-2,4-decadienoato di etile, attrattivo verso i maschi e le femmine della carpocapsa

delle mele *Cydia pomonella* L. (Light et al., 2001) e delle tortrici delle castagne (Schmidt et al., 2007). Dal punto di vista pratico, la possibilità di monitorare le femmine con caïromoni appare ancora più interessante, rispetto al monitoraggio dei maschi con feromoni sessuali, essendo esse più direttamente responsabili dei danni derivanti dalle larve della generazione successiva. Un'interessante applicazione di (*E,Z*)-2,4-decadienoato di etile riguarda la possibilità di catturare le femmine della carpocapsa nei campi gestiti con la confusione sessuale che permette di accertare agevolmente lo stato fisiologico delle femmine (accoppiate o meno) e, quindi, di verificare l'efficacia del metodo.

#### I SEMIOCHIMICI COME MEZZI DIRETTI DI CONTROLLO

L'inquinamento ambientale, i rischi per la salute di operatori e consumatori e l'insorgenza di fenomeni di resistenza nelle popolazioni degli insetti dannosi, generati dall'uso irrazionale degli insetticidi di sintesi ad ampio spettro, da anni indirizza la ricerca alla messa a punto di nuovi mezzi di lotta alternativi e a basso impatto. In tale ambito, soprattutto i feromoni sessuali, hanno trovato applicazione pratica come mezzi diretti di controllo di specie dannose attraverso tecniche che mirano a interferire con la loro attività riproduttiva quali cattura massale, lotta attratticida, confusione sessuale, disorientamento del maschio.

La cattura massale ha come obiettivo l'eliminazione dall'ambiente del maggiore numero possibile di maschi, se realizzata contro lepidotteri mediante feromoni sessuali, o di maschi e femmine, se attuata contro coleotteri con feromoni di aggregazione, al fine di limitare al massimo le possibilità di accoppiamento e, quindi, di conseguire una graduale diminuzione della popolazione nel tempo. La tecnica si è dimostrata efficace contro popolazioni isolate, quali quelle che vivono in ambienti confinati, contro specie non eccessivamente poligame e in presenza di basse densità di popolazione. Per queste caratteristiche, la cattura massale, se supportata da un'elevata efficacia degli attrattivi, potrebbe essere utilizzata per l'eradicazione di specie esotiche che subito dopo l'introduzione in un nuovo ambiente vivono in popolazioni isolate e a basse densità (El Sayed et al., 2006).

La lotta attratticida rappresenta una variante della cattura massale in cui gli individui anziché essere catturati all'interno di apposite trappole, sono attratti su un supporto trattato con un insetticida ad ulticida di contatto. L'insetto contaminato dall'insetticida ha la possibilità di allontanarsi dalla super-

ficie trattata e, prima di morire, potrebbe contaminare propri conspecifici (es. la femmina in caso di accoppiamento). La lotta attratticida è stata ideata inizialmente per specie per le quali la cattura massale era poco efficace a causa della non completa conoscenza del feromone sessuale che permetteva solo l'avvicinamento degli insetti alla sorgente attrattiva. Rientra nella lotta attratticida anche l'uso di esche proteiche avvelenate con insetticidi, anche biologici, attivi per ingestione e che attualmente trovano applicazione per il controllo di ditteri tefritidi.

La confusione sessuale, applicata per il controllo di alcuni Lepidotteri, ha l'obiettivo di interferire sulla percezione e sulla risposta comportamentale del maschio al feromone sessuale emesso dalla femmina. Il meccanismo di azione della confusione sessuale non è ancora del tutto definito ma è probabile che esso sia il risultato di una serie di meccanismi concomitanti che possono assumere una rilevanza diversa a secondo della specie considerata (Miller et al., 2006a, 2006b).

Essa viene realizzata applicando in campo un adeguato numero di diffusori (500-700) attivati con poche centinaia di milligrammi di feromone. Tra i meccanismi più frequentemente ipotizzati vi sono il mascheramento del messaggio feromonico, la desensibilizzazione del maschio, lo sbilanciamento del messaggio feromonico. Secondo la prima ipotesi, il maschio non riesce a localizzare la femmina in quanto i margini del "corridoio odoroso", creato dall'emissione del feromone naturale, sono oscurati dalla presenza del feromone sintetico per cui esso, pur conservando la capacità di percepire il feromone, non riesce a compiere il tipico movimento a zig-zag che gli consente di seguire la traccia odorosa della femmina. La seconda ipotesi si basa sull'osservazione che maschi esposti a una dose elevata di feromone subiscono una riduzione della capacità di percepirla e di risposta comportamentale, anche dopo aver ristabilito la capacità percettiva, indicando sia un meccanismo di saturazione dei recettori antennali che di assuefazione del sistema nervoso centrale. Infine, lo sbilanciamento del messaggio feromonico sarebbe determinato dall'immissione in ambiente di un'elevata quantità di uno dei componenti, in genere il principale, del feromone sessuale della specie da controllare che alterando il rapporto ottimale tra i diversi componenti, non permetterebbe al maschio di riconoscere il messaggio proveniente dalla femmina conspecifica. Questi possibili meccanismi sono stati definiti non-competitivi, in quanto il feromone sessuale immesso in ambiente non compete con l'emissione naturale delle femmine nell'attrazione del maschio.

Un meccanismo di tipo competitivo è considerato alla base della tecnica del disorientamento del maschio o delle false tracce di volo. Questo metodo,

infatti, ha l'obiettivo di simulare l'emissione del feromone naturale attraverso il posizionamento in campo di un elevato numero di erogatori (1000-2000) attivati con una quantità di feromone di circa dieci volte minore rispetto a quella utilizzata per la confusione sessuale (Anfora et al., 2008).

Nel 2010, in tutto il mondo, gli ettari sottoposti a confusione sessuale per il controllo biotecnico di specie fitofaghe sono stati circa 770.000 e ha riguardato principalmente il controllo di *Lymantria dispar* (L.), di *C. pomonella*, *Cydia molesta* (Busck), *Lobesia botrana* (Dennis & Schiffermüller) (Witzgall et al., 2010). Negli ultimi anni, l'impiego della confusione sessuale è in continua espansione anche grazie alla messa a punto di nuove tecnologie, come quella dei diffusori temporizzati (puffers), che permettono di ottimizzare l'impiego del feromone e di ridurre tempi di applicazione e costi.

#### RIASSUNTO

I semiochimici, per molti organismi e in particolare per gli insetti, sono importanti sostanze naturali che condizionano profondamente la loro sopravvivenza, riproduzione e organizzazione sociale. Negli ultimi 50 anni, sono state condotte intense ricerche in laboratorio e in campo che hanno consentito di identificare numerose sostanze naturali e di classificarle, in base al ruolo biologico, in semiochimici interspecifici (allelochimici) e intraspecifici (feromoni).

La natura, qualità e quantità del segnale emesso determinano nell'individuo ricevente una risposta centripeta o centrifuga, a cui corrisponde un comportamento di attrazione, aggregante, arrestante o repellente. La caratterizzazione delle strutture, funzioni e biosintesi dei semiochimici hanno permesso non solo di sviluppare strategie innovative ed ecosostenibili per il controllo di insetti dannosi, ma anche di capire aspetti importanti di biologia. In questa recensione, si descrivono le fasi della ricerca e le diverse tecniche analitiche utilizzate per l'identificazione dei semiochimici e si presentano, nel contesto della Direttiva europea 128/2009 sull'uso sostenibile degli agrofarmaci, alcune applicazioni pratiche divenute componenti importanti dei programmi di controllo integrato (IPM) degli insetti dannosi.

#### ABSTRACT

Semiochemicals are important natural substances that deeply affect the survival, reproduction, and social organization of many organisms, particularly insects. Over the past five decades, extensive laboratory and field research has allowed for the identification of several insect semiochemicals which were classified in the two main categories of allelochemicals (interspecific) and pheromones (intraspecific), according to their biological role. The nature, quality and quantity of the odor signal emitted by one organism elicit a centripetal or centrifugal response in the receiving individual corresponding to

an attraction, aggregation, arrestant or repellent behaviour. The characterization of semiochemical structures, functions and biosynthesis allowed to develop innovative and sustainable control strategies of insect pests and also to understand important aspects of their biology. In this review, the research steps and main analytical techniques used to identify semiochemicals are described. Moreover, some practical applications of semiochemicals that have become important components of IPM strategies are presented in the context of Directive 128/2009 EC on the sustainable use of plant protection products (PPPs).

## BIBLIOGRAFIA

- ANFORA G., BALDESSARI M., DE CRISTOFARO A., GERMINARA G.S., IORIATTI C., REGGIORI F., VITAGLIANO S. ANGELI G. (2008): *Control of Lobesia botrana (Lepidoptera: Tortricidae) by biodegradable Ecodian sex pheromone dispensers*, «Journal of Economic Entomology», 101, pp. 444-450.
- BAUMANN H. (1974a): *The isolation, partial characterization, and biosynthesis of paragonial substances PS-1 and PS-2, of Drosophila funebris*, «Journal of Insect Physiology», 20, pp. 2181-2194.
- BAUMANN H. (1974b): *Biological effects of paragonial substances PS-1 and PS-2, in females of Drosophila funebris*, «Journal of Insect Physiology», 20, pp. 2347-2362.
- BROWN W.L., EISNER T., WHITTAKER R.H. (1970): *Allomones and kairomones: transpecific chemical messengers*, «BioScience», 20, pp. 21-22.
- BROWER, L.P., BROWER J.V. Z., CRANSTON F.P. (1965): *Courtship Behaviour of the queen butterfly, Danaus gilippus berenice (Cramer)*, «Zoologica», 50, pp. 1-39.
- BUTENANDT A., BECKMANN R., STAMM D., HECKER E. (1959): *Über den sexual-lockstoff des seidenspinners Bombyx mori*, «Reindarstellung und konstitutionsermittlung, Zeitschrift für Naturforschung», 14, pp. 283-284.
- BUTLER C.G. (1961): *The scent of queen honey bees (Apis mellifera) that causes partial inhibition of queen rearing*, «Journal of Insect Physiology», 15, pp. 237-244.
- CANALE A., GERMINARA G.S., CARPITA A., BENELLI G., BONSIGNORI G., STEFANINI C., RASPI A., ROTUNDO G. (2015): *Behavioural and electrophysiological responses of the olive fruit fly, Bactrocera oleae (Rossi) (Diptera: Tephritidae), to male- and female-borne sex attractants*, «Chemoeology», 25, pp. 147-157.
- CELLI G., MAINI S. (1988): *Lotta biologica integrata in agricoltura*, Cestaat, Ministero Agricoltura e Foreste, S.E.P.E., Roma, pp. 196.
- CHAMBERS D.L. (1977): *Attractants for fruit fly survey and control*, in *Chemical control of insect behavior*, in H.H. Shorey & J.J. Mckelvey jr Ed., J. Wiley N.Y., pp. 327-344.
- DICKE M., MINKENBERG O.P.J.M. (1991): *Role of volatile infochemicals in foraging behaviour of the leafminer parasitoid Daenusa sibirica (Diptera: Agromizidae)*, «Journal of Natural History», 33, pp. 1089-1105.
- DICKE M., SABELIS M.W. (1992): *Cost and benefits of chemical information conveyance: proximate and ultimate factors*, in *Insect Chemical Ecology*, Chapman & Hall, New York and London, pp. 122-155.
- EL-SAYED A.M. (2014): *The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals*. <<http://www.pherobase.com>>.

- EL-SAYED A.M., SUCKLING D.M., WEARING C.H., BYERS J.A. (2006): *Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species*, «Journal of Economic Entomology», 99, pp. 1550-1564.
- FABRE' J.H. (1911): *Social life in the insect world*, Harmondsworth, UK, Penguin.
- FINN W.E., PAYNE T.L. (1977): *Attraction of Greater Wax Moth females to male-produced pheromones*, «Southwest Entomology», 2, pp. 62-65
- GERMINARA G.S., ELGARGOTI A., DE CRISTOFARO A., ROTUNDO G. (2007): *Female sex pheromone of Sesamia cretica: chemical and behavioural evidence for a three-component blend*, «Entomologia Experimentalis et applicata», 124, pp. 213-219.
- GINZEL M.D., BLOMQUIST G.J., MILLAR J.G., HANKS L.M. (2003): *Role of contact pheromones in mate recognition in Xylotrechus colonus*, «Journal of Chemical Ecology», 29, pp. 533-545.
- GROOT A. T., INGLIS O., BOWDRIDGE S., SANTANGELO R. G., BLANCO C., LOPEZ J. D., VARGAS A. T. GOULD F., SCHAL C. (2009): *Geographic and temporal variation in moth chemical communication*, «Evolution», 63, pp. 1987-2003.
- HENDRY L.B., GREANY P.D., GILL R.J. (1973): *Kairomone mediated host-finding behavior in parasitic Wasp Orgilus lepidus*, «Entomologia Experimentalis et applicata», 16, pp. 471-477.
- JEANNE R.L. (1970): *Chemical defense of brood by a social Wasp*, «Science», 168, pp. 1465-1466.
- KARSON P., LÜSCHER M. (1959): *Pheromones: a new term for a class of biologically active substances*, «Nature», 183, pp. 55-56.
- KLUN J.A., I.W.G.O. COOPERATORS (1975): *Insect sex pheromones: intraspecific pheromonal variability of Ostrinia nubilalis in North America and Europe*, «Environmental Entomology», 4, pp. 891-894.
- KOENE J.M., TER MAAT A. (2001): *Allohormone: a class of bioactive substances favoured by sexual selection*, «Journal of Comparative Physiology, Part A», 187, pp. 323-326.
- LEOPOLD R.A., TERRANOVA A.C., SWILLEY E.M. (1971a): *Mating refusal in Musca domestica: effects of repeated mating and decerebration upon frequency and duration of copulation*, «Journal of Experimental Zoology», 176, pp. 353-360.
- LEOPOLD R.A., TERRANOVA A.C., THORSON B.J., DEGRUGILLIER M.E. (1971b): *The biosynthesis of the male housefly accessory secretion and its fate in the mated female*, «Journal of Insect Physiology», 17, pp. 987-1003.
- LIGHT D.M., KNIGHT A.L., HENRICK C.A., RAJAPASKA D., LINGREN B., DICKENS J.C., REYNOLDS K.M., BUTTERY R.G., MERRIL G., ROITMAN J., CAMPBELL B.C. (2001): *Ethyl (2E, 4Z)-2,4-decadienoate: a pear-derived kairomone with pheromonal potency that attracts male and female codling moth, Cydia pomonella (L.)*, «Naturwissenschaften», 88, pp. 333-338.
- MILLER J.R., GUT L.J., DE LAME F.M., STELINSKI L.L. (2006 a): *Differentiation of competitive vs. non-competitive mechanisms mediating disruption of moth sexual communication by point sources of sex pheromone (Part 1): theory*, «Journal of Chemical Ecology», 32, pp. 2089-2114.
- MILLER J.R., GUT L.J., DE LAME F.M., STELINSKI L.L. (2006 b): *Differentiation of competitive vs. non-competitive mechanisms mediating disruption of moth sexual communication by point sources of sex pheromone (Part 2): case studies*, «Journal of Chemical Ecology», 32, pp. 2115-2143.
- NORDLUND, D.A., LEWIS, W.J. (1976): *Terminology of chemical releasing stimuli in intra-specific and interspecific interactions*, «Journal of Chemical Ecology», 2, pp. 211-220.



- OHINATA K., JACOBSON M., NAKAGAWA S., FUJIMOTO M., HIGA H. (1977): *Mediterranean fruit fly: laboratory and field evaluation of synthetic sex pheromone*, «Journal of Environmental Science and Health - Part A Environmental Science and Engineering», 12, pp. 67-78.
- PARDI L., TURILLAZZI S. (1985): *Biologia delle Stenogastrinae*, «Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Rendiconti», 30-32, pp. 25-43.
- PETITT F.L., TURLINGS T.C.J., WOLF S.P. (1992): *Adult experience modifies attraction of the leafminer parasitoid Opius dissitus (Hymenoptera: Braconidae) to volatile semiochemicals*, «Journal of Insect Behavior», 5, pp. 623-634.
- PHILLIPS T.W., THRONE J.E. (2010): *Biorational approaches to managing stored-product insects*, «Annual Review of Entomology», 55, pp. 375-397.
- REGNIER F.E., WILSON E.O. (1971): *Chemical communication and «propaganda» in slave-maker ants*, «Science», 172, pp. 267-269.
- RIEMANN J.G., MOEN D.J., THORSON B.J. (1967): *Female monogamy and its control in houseflies*, «Journal of Insect Physiology», 13, pp. 407-418.
- ROTUNDO G., GERMINARA G.S., DE CRISTOFARO A. (2001): *Sex pheromone extraction methods from individual females of Lepidoptera Sesamia nonagrioides (Lefèbvre) (Lep.: Noctuidae)] by solid-phase microextraction*, «Redia», 84, pp. 7-18.
- SCHMIDT S., ANFORA G., IORIATTI C., GERMINARA G.S., ROTUNDO G., DE CRISTOFARO A. (2007): *Biological activity of ethyl (E,Z)-2,4-decadienoate on different tortricid species: electrophysiological responses and field tests*, «Environmental Entomology», 36, pp. 1025-1031.
- SILVERSTEIN R.M. (1977): *Complexity, diversity, and specificity of behavior-modifying chemicals: axamples mainly from Coleoptera and Hymenoptera*, in *Chemical control of insect behaviour. Theory and application*, ed. H.H. Shorey e J.J.J. Mckelvey, Plenum Press, New York, pp. 231-251.
- UEBEL E.C., SONNET P.E., MILLER R.W., BEROZA M. (1975): *Sex pheromone of the face fly, Musca autumnalis De Geer (Diptera: Muscidae)*, «Journal of Chemical Ecology», 1, pp. 195-202.
- WHITTAKER R.H., FEENY P. (1971): *Allelochemicals: chemical interactions between species*, «Science», 171, pp. 757.
- WILSON E.O., BOSSERT W.H. (1963): *Chemical communication among animals, recent progress*, «Hormone Research», 19, pp. 673-716.
- WITZGALL P., KIRSCH P., CORK A. (2010): *Sex pheromones and their Impact on pest management*, «Journal of Chemical Ecology», 36, pp. 80-100.



## Applicazione di microorganismi antagonisti per il controllo delle malattie delle piante e prospettive di sviluppo

### STATO DELL'ARTE SUI PRODOTTI A BASE DI AGENTI DI CONTROLLO BIOLOGICO

Il numero di prodotti a base di microorganismi e sostanze naturali autorizzati a oggi in Italia per il controllo delle malattie delle piante è ancora abbastanza limitato. Complessivamente si hanno una ventina di prodotti contenenti microorganismi e circa venticinque prodotti con sostanze naturali di origine botanica e semiochimici. Se si considera che tra questi prodotti vi sono anche quelli utilizzati per il controllo biologico degli insetti dannosi, appare chiaro che il numero di prodotti biologici disponibili per il controllo delle malattie è ben lungi dal poter rispondere in modo adeguato alle esigenze fitosanitarie del nostro Paese. Anche se in Europa i prodotti biologici autorizzati sono di più (vedi tabella sotto), il loro numero è, comunque, inferiore a quello di altri paesi, come gli Stati Uniti, che in questo settore hanno un mercato più sviluppato, anche in virtù di procedure autorizzative più snelle e rapide. Attualmente sul mercato mondiale sono disponibili qualche centinaio di prodotti registrati nei vari paesi come “Plant Protection Products” a base di microorganismi antagonisti che sono impiegati per il controllo di svariate malattie delle piante. Si tratta di una quantità ancora lontana da quella dei prodotti fitosanitari di sintesi: è stato stimato che i prodotti fitosanitari biologici hanno un mercato di alcuni miliardi di dollari mentre i prodotti di sintesi superano i 110 miliardi di dollari (de Vrieze, 2015).

\* *Dipartimento di Agraria, Università di Napoli Federico II*

## PRINCIPI ATTIVI: CEPPI E/O MOLECOLE BIOATTIVE

*Prodotti commerciali*

Per completare uno sviluppo commerciale, ceppi antagonisti e molecole bioattive vengono sottoposti, nella maggior parte dei casi, a un processo di selezione laborioso e complesso. Innanzitutto devono essere soddisfatti criteri di sicurezza in termini di tossicità verso animali, piante, organismi indicatori, ecc. e di effetti collaterali indesiderati. Ad esempio, buoni candidati per il mercato devono possedere una efficacia accettabile contro i patogeni da controllare, essere attivi in aree geografiche diverse e durante gran parte della stagione, rimanere stabili durante la conservazione e avere costi competitivi con gli agrofarmaci di sintesi. Identificare ceppi e molecole che rispettino i principali requisiti di selezione è compito piuttosto arduo. Molti dei formulati attualmente in commercio contengono ceppi che sono stati selezionati senza tener conto di tutti o gran parte di questi criteri e, spesso, si rivelano inefficaci a causa di fattori legati al tipo di suolo, al clima e all'ecosistema. Altri problemi possono riguardare l'affidabilità e la ripetibilità dei risultati, aspetti relativi alla formulazione, il controllo qualità dell'inoculo, ecc.

La ricerca è fortemente impegnata nel trovare soluzioni a questi problemi. Kohl et al. (2011) hanno proposto di selezionare i microorganismi per il biocontrollo di malattie batteriche e fungine con uno screening basato sulla valutazione di vari criteri contro uno o più patogeni. Questi criteri, oltre naturalmente all'efficacia, includono le caratteristiche ecologiche necessarie per una buona attività in pieno campo, il profilo tossicologico, i costi di una produzione massiva e, non da ultimi, gli aspetti relativi ai diritti di proprietà e al marketing (Blum, 2007). Lo screening si realizza attraverso una serie di passaggi successivi impostati inizialmente su una valutazione poco costosa e rapida di molti microorganismi e, successivamente, su quella complessa e costosa di pochi candidati.

*Cepi multifunzionali*

Per rendere i prodotti biologici più competitivi rispetto agli agrofarmaci di sintesi, molti studi sono stati condotti per la selezione di ceppi con più funzioni utili sia per lo sviluppo e sia per la protezione delle piante.

Funghi antagonisti del genere *Trichoderma* rappresentano una buona fonte per la ricerca di ceppi multifunzionali. Molti di essi possiedono un'elevata

“competenza rizosferica”, cioè la capacità di colonizzare e crescere in associazione con le radici della pianta (Harman, 2000), sono in grado di produrre colonie micoparassitiche e litiche, degradano gli inquinanti del suolo. Essi stabiliscono un rapporto simbiotico con la pianta durante il quale producono una quantità di segnali chimici tra cui piccole proteine, peptidi, metaboliti, composti volatili, ecc. Questi segnali sono di tipo sistemico perché, pur interagendo solo con le radici, producono effetti che si rilevano su tutta la pianta. I ceppi più efficaci possono conferire una serie di benefici quali:

- aumento della crescita della pianta, specialmente delle radici e in condizioni di stress (Harman, 2000; Shores et al., 2010);
- induzione di resistenza sistemica della pianta alle malattie, anche attraverso meccanismi diversi da quelli descritti per la resistenza sistemica indotta (ISR) e la resistenza sistemica acquisita (SAR) (Bae et al., 2011; Lorito et al., 2010);
- induzione di resistenza sistemica agli stress abiotici tra cui la siccità, la salinità e la temperatura (Mastouri et al., 2010; Shores et al., 2010);
- aumento del vigore di semi di scarsa qualità (Mastouri et al., 2010; Shores et al., 2010);
- aumento dell’efficienza della pianta nell’uso dell’azoto (Mastouri et al., 2010; Shores et al., 2010).

Oltre ai funghi del genere *Trichoderma*, effetti benefici simili a quelli sopra riportati possono essere indotti anche da altri microorganismi che vivono in associazione con le radici come i rizobatteri promotori della crescita della pianta (PGPR), i funghi micorrizici e il fungo endofita *Piriformaspora indica*.

### *Nuovi metodi di selezione*

La selezione di ceppi con le caratteristiche sopra riportate oggi è possibile perché si dispone di nuove tecnologie che consentono di eseguire protocolli sperimentali che fino a poco tempo fa erano impensabili. Attraverso la tecnica dell’high throughput, per esempio, è possibile effettuare in poco tempo lo screening di centinaia di ceppi per individuare quelli dotati di una particolare caratteristica come la capacità di secernere un determinato metabolita o quella di aumentare la crescita delle piante. Tecniche di genomica funzionale come la metabolomica e altre “omics”, sono impiegate per migliorare l’applicazione dei microbi benefici (Lorito et al., 2010). La selezione di ceppi più efficaci può essere, per esempio, condotta sulla base a) delle informazioni relative all’identificazione dei geni che si esprimono in differenti condizioni di inte-

razione; b) dell'individuazione di metaboliti coinvolti nel micoparassitismo, nella degradazione di tossine, nell'aumento della resistenza della pianta ai patogeni e agli stress abiotici, nella promozione della crescita, ecc.; c) della caratterizzazione molecolare della risposta della pianta ai microorganismi benefici e dell'identificazione delle migliori combinazioni ceppi-cultivar di pianta in termini di produttività (Harman, 2000). In particolare, la metabolomica e la proteomica possono fornire informazioni sulla possibilità di utilizzare estratti colturali contenenti miscele di metaboliti bioattivi per ottenere effetti simili a quelli causati dal microorganismo benefico che li produce (Lorito, 2010).

Negli anni più recenti, è stato messo in evidenza il ruolo cruciale che le comunità microbiche hanno per la fisiologia e lo sviluppo della pianta. Il microbioma della rizosfera contiene microorganismi benefici per la crescita, ma anche patogeni che sono in grado di superare le difese della pianta e causare malattia. Il benessere della pianta e la sua produttività dipendono molto dalla composizione del microbioma rizosferico ed endofita, e dalle interazioni tra i suoi componenti. Rispetto alle strategie tradizionali che hanno studiato le interazioni principalmente tra la pianta e uno o due gruppi di microorganismi, la ricerca attuale cerca di chiarire le relazioni tra pianta e la sua intera comunità microbica e di come quest'ultima possa aumentare la produttività. È noto che la composizione e l'abbondanza dei microorganismi che costituiscono il microbioma rizosferico dipendono dal genotipo della pianta e, quindi, dai suoi essudati radicali e dal tipo di suolo. La possibilità di modificare l'assetto complessivo della comunità microbica residente nella rizosfera in favore dei microorganismi che migliorano la produttività è diventato un obiettivo di grande interesse anche per l'industria (Mendes et al., 2013). Una possibile strategia per modificare positivamente il microbioma rizosferico è quella di introdurre nel suolo comunità sintetiche di microorganismi benefici in grado di recuperare la diversità microbica e la soppressività generale. È stato osservato, comunque, che quando sono introdotti in un ambiente nuovo, molti ceppi microbici non sopravvivono a lungo, oppure non sono in grado di proliferare raggiungendo livelli di densità nella rizosfera tali da controllare i patogeni (Raaijmakers et al., 2009). Per superare questo ostacolo, si sta sperimentando la possibilità di somministrare al suolo consorzi microbici, cioè, comunità costituite da diversi microorganismi con tratti complementari o sinergici. Questi consorzi possono consentire al microbioma di rafforzarsi per escludere competitivamente i patogeni (Bakker et al., 2012). Il problema principale nell'assemblaggio di questi consorzi risiede nella selezione di ceppi compatibili fra loro. Spesso sono stati utilizzati microorganismi che erano già noti come antagonisti e capaci di controllare da soli, con meccanismi diversi,

i patogeni. È importante osservare, però, che anche microorganismi che da soli non sono antagonisti, quando si trovano a far parte di un consorzio possono esplicare attività antimicrobiche e di stimolo della crescita e resistenza agli stress (Garbeva e de Boer, 2009). Alcuni studi hanno messo in evidenza che nei suoli soppressivi sono presenti batteri appartenenti ad alcuni generi e che la soppressività non dipende dalla presenza esclusiva di certi gruppi ma è determinata dalla loro abbondanza relativa. Sulla base delle informazioni sulla composizione dei microbiomi rizosferici di piante in diversi agrosistemi e sull'impatto che essi hanno sulle malattie è possibile disegnare microbiomi formati da set di microorganismi in grado di proteggere la pianta dai patogeni (Mendes et. al., 2013). Nella pratica, anche per semplificare la composizione del set, questi microbiomi sintetici possono essere disegnati per proteggere la pianta contro singoli gruppi di patogeni (batteri, oomiceti o funghi) e non contro i patogeni in generale.

Per le applicazioni pratiche sono stati messi a punto dei metodi che consentono di selezionare i microorganismi che sono accumulati dalle piante nei suoli dove esse crescono. Scegliendo le piante con il fenotipo migliore per il tratto desiderato (maggiore crescita e produttività, resistenza più alta, ecc.) è possibile identificare mediante un high throughput screening i microorganismi a esse associati e utilizzarli per formare dei consorzi con cui effettuare i trattamenti.

### *Nuovi specie utili*

Oltre alla selezione di ceppi multifunzionali di specie già note, molte ricerche sono state indirizzate verso l'individuazione di nuove specie microbiche per la realizzazione di prodotti che possono essere utili anche contro patogeni di nuova introduzione. È noto, per esempio, che i funghi endofiti in associazione con la pianta ne migliorano la fitness e lo sviluppo, la tolleranza agli stress e la resistenza alle malattie (Achatz et al., 2010; Deshmukh et al., 2006; Redman, et al., 2011; Rodriguez et al., 2008; Saari e Faeth, 2012; Yue et al., 2000).

Tra gli endofiti, sono stati recentemente descritti i funghi appartenenti all'ordine *Sebacinales* (Selosse et al., 2007; Weiß et al., 2004, 2011) che sono in grado di colonizzare un gran numero di specie di piante tra cui anche quelle di grande rilevanza economica come grano, mais, soia e pomodoro (Riess et al., 2014). I *Sebacinales* sono caratterizzati da una notevole diversità filogenetica e possono avere un ruolo importante negli ecosistemi delle

piante. Poiché possono produrre effetti positivi sulle piante con cui sono in associazione (Barazani, 2005; Oberwinkler et al., 2013; Waller et al., 2005), essi rappresentano una promettente fonte di ceppi utili sia per la protezione e sia per lo sviluppo delle piante.

Anche la selezione di ceppi di microorganismi benefici ottenuti da suoli soggetti a climi desertici o freddi può essere di grande aiuto per la protezione delle piante da stress abiotici come la siccità, il caldo, le gelate, ecc. In un recente studio (Marasco et al., 2012) condotto in aziende agricole situate in zone desertiche, è stato dimostrato che anche una pianta molto sensibile al caldo come il peperone, riesce a sopravvivere e a produrre, arricchendo la propria rizosfera con batteri promotori della crescita che aumentano la capacità fotosintetica e la sintesi di biomassa in condizioni di siccità.

### *Molecole bioattive*

Come sopra accennato, anche estratti colturali di microorganismi antagonisti possono essere utilizzati per proteggere le piante dalle malattie o per favorirne lo sviluppo. I filtrati colturali contengono miscele di molecole bioattive (proteine, metaboliti secondari, ecc.) che possono essere purificate e utilizzate sia da sole, sia in associazione con altre sostanze o con microorganismi. Le molecole bioattive possono agire inibendo la crescita dei patogeni direttamente e/o attraverso la risposta di difesa indotta nella pianta. Gli enzimi degradativi della parete cellulare dei funghi patogeni e delle piante prodotti dagli antagonisti possono attivare entrambi i meccanismi: da un lato bloccano lo sviluppo delle strutture di diffusione e moltiplicazione del patogeno e dall'altro, consentono, durante la lisi della lamella mediana e della parete primaria del tessuto vegetale, il rilascio di oligonucleotidi che sono noti induttori di resistenza (Hanson e Howell, 2004; Lorito et al., 1994, 1996). I funghi antagonisti del genere *Trichoderma* sono tra i produttori più attivi di molecole con proprietà antimicrobiche. Tra queste, diverse sono risultate coinvolte nei meccanismi di induzione della resistenza: a) proteasi, cellulasi e xilanasi (Martinez et al., 2001; Collen et al., 2005; Hanson e Howell, 2004); elicitori proteici (Djonovic et al., 2006; Seidl et al., 2006; Wang et al., 2013); una proteina espansina-simile (Brotman et al., 2008); metaboliti secondari come il 6-pentil-alfa-pirone e l'harzianolide (Malmierca et al., 2012; Vinale et al., 2012); una idrofobina di tipo II (Ruocco et al., 2014). Quest'ultima, prodotta da *Trichoderma longibrachiatum*, ha mostrato di avere una diretta attività antifungina, di funzionare



da MAMP e di promuovere la crescita di una varietà di piante quando è stata usata a dosi basse. Interessante anche la sua capacità di stimolare la formazione di radici. La distruzione del gene che la codifica ha ridotto significativamente la capacità antagonistica del fungo e la sua attività come promotore della crescita (Ruocco et al., 2014).

Per l'impiego commerciale di metaboliti secondari prodotti da microrganismi antagonisti, è necessario procedere a un'attenta analisi per valutare i possibili effetti tossici che questi composti potrebbero avere sull'ambiente e sulla salute dell'uomo. Tuttavia, diversi metaboliti prodotti sia da funghi, sia da batteri antagonisti sono attualmente in valutazione per essere impiegati come potenziali nuovi biopesticidi (Vinale et al., 2012).

#### MIGLIORAMENTO DELLE FORMULAZIONI

L'efficacia di un ceppo selezionato per il controllo di uno o più patogeni non è sufficiente a garantirne il successo fino a che non se ne registrano le prestazioni in condizioni commerciali. Solo quando l'agente di biocontrollo è prodotto su larga scala e utilizzato come formulato in prove di campo è possibile valutarne pienamente la validità.

Per mettere a punto una formulazione efficace è necessario avere una conoscenza profonda dell'agente di biocontrollo, del patogeno, dell'ambiente e delle interazioni con altri organismi. Lo sviluppo commerciale di un prodotto richiede anche la conoscenza delle pratiche di applicazione e degli strumenti con cui esse si eseguono. In linea di massima, un buon prodotto industriale dovrebbe conservare le caratteristiche iniziali del/i ceppo/i in esso contenuto/i quali la vitalità delle cellule microbiche, la purezza, la stabilità genetica, la capacità di colonizzare l'ospite, ecc. Queste proprietà, infatti, possono subire delle alterazioni durante i processi di produzione, formulazione, confezione, conservazione e in fase di applicazione (Leggett et al., 2011).

A differenza dei prodotti fitosanitari di sintesi che normalmente hanno una shelf-life piuttosto lunga, i prodotti biologici possono diventare inattivi perdendo la vitalità dei microorganismi in essi contenuti. Ciò, naturalmente, costituisce un serio ostacolo alla commercializzazione del prodotto che deve avere una shelf-life di almeno un anno a temperatura ambiente. La shelf-life dipende, oltre che dalla temperatura, dall'umidità. A basse temperature e in ambienti secchi, i processi metabolici di crescita dei propagoli del microrganismo conservato si rallentano, prevenendo anche l'accumulo di sostanze tossiche e il consumo di nutrienti. Se la formulazione è liquida, la vitalità dei

microorganismi deve essere preservata con la refrigerazione, il congelamento o la deidratazione se si vuole prolungare la shelf-life del prodotto. La liofilizzazione funziona anche meglio, ma è piuttosto costosa. Altri metodi includono l'incapsulazione delle cellule microbiche attraverso il loro mescolamento con materiali polisaccaridici o lipidici. È stato osservato che formulazioni ottenute con pellet di grano o caolino in gel di alginato contenente spore, conidi o biomassa di diversi isolati di *Trichoderma* aumentano la vitalità di questi nel prodotto conservato (Narayanasamy, 2013).

Le formulazioni possono variare considerevolmente in rapporto all'uso a cui sono destinate, ma devono presentarsi in una forma facilmente somministrabile e non essere tossiche. In generale, per i prodotti commerciali a base di antagonisti fungini (ceppi del genere *Trichoderma*, *Coniothyrium minitans*, *Ampelomyces quisqualis*, ecc.) sono state messe a punto diverse preparazioni sotto forma di granuli disperdibili in acqua, polvere bagnabile, polvere, microgranuli e pellets. Per gli agenti di biocontrollo batterici (ceppi dei generi *Bacillus* e *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*), le formulazioni più comuni si trovano sotto forma di granuli disperdibili in acqua, liquido, polvere bagnabile, concentrato di spore liquido, massa batterica sospesa in acqua clorurata, polvere secca, pasta, ecc.

Le formulazioni contenenti Pseudomonadi fluorescenti perdono rapidamente la loro efficacia perché questi batteri non producono endospore, cioè le strutture che assicurano una vitalità più lunga. Per questo motivo l'attenzione si è concentrata su ceppi del genere *Bacillus* che producono endospore in grado di resistere ad avverse condizioni ambientali di temperatura, pH e siccità. Ceppi di *Pseudomonas* sono, comunque, selezionati e commercializzati per la loro capacità di indurre resistenza e promozione della crescita nelle piante.

## APPLICAZIONE

I metodi per somministrare i prodotti biologici per il controllo delle malattie delle piante, in molti casi sono gli stessi che si utilizzano per distribuire gli agrofarmaci di sintesi e, cioè, quelli che si basano sull'uso di irroratori, spruzzatori, sistemi per i trattamenti a immersione, ecc. Le esigenze per distribuire un prodotto biologico che contiene spore, conidi e/o micelio vivi sono, comunque, diverse. Occorrono sistemi di irrorazione a bassa pressione per salvaguardare la vitalità dei microorganismi e modalità di applicazione che possano assicurare una copertura ottimale della superficie vegetale da proteggere.

La somministrazione dei prodotti biologici può effettuarsi attraverso trattamenti dei semi, del suolo, delle radici e della parte aerea. Ognuno di questi trattamenti ha le sue specificità e dipende da opportune formulazioni dei prodotti. Per il trattamento dei semi, il coating è uno dei metodi più semplici ed efficaci e si effettua con formulazioni in polvere o in liquido. I propagoli dei microorganismi germinano sulla superficie del seme e, successivamente, colonizzano le radici delle piantine e la rizosfera svolgendo la propria attività proteggente e di promozione della crescita. È anche possibile, dopo il trattamento con l'agente di biocontrollo, incubare i semi a temperature più calde e in presenza di umidità fino a poco prima della germinazione. Questa tecnica ha il vantaggio rispetto al semplice coating di indurre una rapida e uniforme emergenza delle piantine. Inoltre, i semi così trattati sono in grado di tollerare meglio le avverse condizioni del suolo. In alcuni casi per il coating si fa ricorso a particolari sostanze che migliorano l'adesività dell'agente di biocontrollo. Per esempio, la carbossimetilcellulosa e la metilcellulosa sono state molto utili per applicare diversi agenti di biocontrollo a tuberi di patata e a semi di piante come barbabietola, grano, pomodoro, ecc. (Burges, 1998).

I trattamenti al suolo per il controllo di numerosi patogeni terricoli si possono condurre con svariati tipi di formulazioni sia solide che liquide. Le radici delle piantine possono essere trattate con spore o cellule di antagonisti in sospensione sia immergendovi le radici prima del trapianto, sia bagnando a saturazione i letti del vivaio su cui saranno allevate le piantine (Singh e Zaidi, 2002). Contro alcuni patogeni quali *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Botryodiplodia theobromae*, *A. alternata* and *R. solani* è stato osservato che l'applicazione dell'agente di biocontrollo risulta più efficace se effettuata in associazione con sostanza organica (Mustafa et al., 2009). Per i trattamenti aerei, bisogna tener presente che l'attività di microorganismi vivi dipende molto dalle condizioni climatiche come le variazioni di temperatura, l'umidità relativa, la pioggia, il vento, ecc. Questi parametri variano anche su piccola scala come, ad esempio, tra le foglie situate al centro della pianta e quelle che si trovano nelle zone più esterne. Formulati sotto forma di sospensioni liquide o di polvere sono i più adatti per questo tipo di trattamenti (Sharma et al., 2012). In alcuni casi si possono effettuare anche trattamenti multipli, per esempio ai semi e alle foglie, per controllare malattie come l'alternariosi (Singh et al., 2013). Per migliorare la somministrazione degli agenti di biocontrollo si può ricorrere anche ad altre tecniche. Per esempio, un sistema di veicolazione a base di lignite è stato utilizzato per applicazioni al suolo di *T. harzianum* contro il damping-off causato da *Rhizoctonia solani* su arachidi. Il

vantaggio di questa tecnica risiede nel fatto che mentre altri carrier come la vermiculite e la torba sono costituiti da particelle di grandezza non adatta alla somministrazione meccanica, la lignite può essere frantumata in particelle della dimensione voluta, consentendo di applicare il prodotto a una densità maggiore (Jones et al., 1984). Gli agenti di biocontrollo, in un'ottica di lotta integrata, possono essere utilizzati in combinazione con altri prodotti quali biostimolanti, ammendanti, compost soppressivi, ecc. Risultati migliori si possono ottenere associando l'uso degli antagonisti a pratiche agronomiche adottate per la protezione delle piante contro i patogeni come l'impiego di piante e portainnesti resistenti, l'eliminazione di residui vegetali infetti, il controllo dei parametri agro-meteorologici, ecc.

Attualmente sono in corso ricerche per migliorare alcuni aspetti legati alla distribuzione dei prodotti con i metodi spray e di immersione e alle modalità di applicazione.

#### REGISTRAZIONE

Anche la registrazione di prodotti a base di sostanze naturali e organismi e microorganismi da impiegare per il biocontrollo delle malattie delle piante, al pari degli prodotti fitosanitari di sintesi, è soggetta al Regolamento (CE) 1107/2009, che è entrato in vigore dal 14 giugno 2011. Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati tutti i macro e microorganismi e le sostanze naturali attualmente registrate per il controllo biologico in Europa e in Italia.

#### PROSPETTIVE FUTURE

La richiesta sempre più forte di alimenti privi di residui da prodotti fitosanitari e di un ridotto impatto di questi ultimi sull'ambiente impone un maggiore impiego di tecniche di produzione e difesa ecosostenibili. Tali esigenze sono alla base della nuova normativa europea che con la Direttiva 2009/128/CE ha predisposto una serie di misure per il corretto uso dei prodotti fitosanitari. Questa Direttiva è stata recepita in Italia con DL del 14 agosto 2012 e ha portato all'adozione del Piano d'Azione Nazionale (PAN) sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari (DL del 22 gennaio 2014). In sintesi, con il PAN ci si prefigge di *“assicurare lo sviluppo e la promozione di metodi di produzione agricola a basso apporto di prodotti fitosanitari, realizzare un uso sostenibile dei prodotti fitosanitari riducendone i rischi e gli impatti sulla salute umana e*

ANTAGONISTI MICROBICI E VIRUS IN EUROPA E IN ITALIA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
Agrobacterium radiobacter K84	
Adoxophyes orana GV strain BV-0001	
Agrotis segetum granulosis virus	
<i>Ampelomyces quisqualis</i> strain AQ10	1
<i>Aureobasidium pullulans</i> (strains DSM 14940 and DSM 14941)	1
Bacillus amyloliquefaciens MBI 600	
Bacillus amyloliquefaciens strain FZB24	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747	1
<i>Bacillus firmus</i> I-1582	1
Bacillus pumilus QST 2808	
Bacillus sphaericus	
<i>Bacillus subtilis</i> str. QST 713	1
Bacillus subtilis strain IBE 711	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> strains ABTS-1857 and GC-91	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Israeliensis</i> (serotype H-14) strain AM65-52	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i> strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA12 and EG 2348	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i> strain NB 176 (TM 14 1)	1
Baculovirus GV	
Beauveria bassiana strain 147	
Beauveria bassiana strain NPP111B005	
<i>Beauveria bassiana</i> strains ATCC 74040 and GHA	1
Beauveria brongniartii	
Candida oleophila strain O	
<i>Coniothyrium minitans</i>	1
<i>Cydia pomonella</i> Granulovirus (CpGV)	1
Equisetum arvense L.	
<i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus (HearNPV)	1
<i>Lecanicillium muscarium</i> (formerly <i>Verticillium lecanii</i> ) strain Ve6	1
Mamestra brassica nuclear polyhedrosis virus	
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> strain BIPESCO 5/F52	1
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Apopka strain 97	
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> strain Fe9901	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain 251	1
Pepino Mosaic Virus, CH2 strain, isolate 1906	
Phlebiopsis gigantea (several strains)	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain MA342	1
<i>Pseudomonas</i> sp. Strain DSMZ 13134	
Pseudozyma flocculosa	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain LAS02	
Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus	

Tab. 1 Macro- e Microorganismi (inclusi i virus) antagonisti registrati in Europa e in Italia (segue)

ANTAGONISTI MICROBICI E VIRUS IN EUROPA E IN ITALIA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
<i>Spodoptera littoralis</i> nucleopolyhedrovirus	1
<i>Streptomyces</i> K61 (formerly <i>S. griseoviridis</i> )	1
<i>Streptomyces</i> lydicus WYEC 108	
<i>Trichoderma asperellum</i> (formerly <i>T. harzianum</i> ) strains ICC012, T25 and TV1	1
<i>Trichoderma asperellum</i> (strain T34)	
<i>Trichoderma atroviride</i> (formerly <i>T. harzianum</i> ) strains IMI 206040 and T11	1
<i>Trichoderma atroviride</i> strain I-1237	
<i>Trichoderma atroviride</i> strain SC1	
<i>Trichoderma gamsii</i> (formerly <i>T. viride</i> ) strain ICC080	1
<i>Trichoderma harzianum</i> strains T-22 and ITEM 908	
<i>Trichoderma polysporum</i> strain IMI 206039	
<i>Verticillium albo-atrum</i> (formerly <i>Verticillium dahliae</i> ) strain WCS850	
Zucchini Yellow Mosaik Virus, weak strain	
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV mild strain)	
PIANTE	
<i>artemisia absinthium</i> L.	
<i>Artemisia vulgaris</i> L.	
<i>Rheum officinale</i>	
<i>Tanacetum vulgare</i> L.	

Tab. 1 *Macro- e Microorganismi (inclusi i virus) antagonisti registrati in Europa e in Italia*

sull'ambiente, promuovendo l'uso della difesa integrata e di approcci o tecniche alternativi, quali il metodo dell'agricoltura biologica e le alternative non chimiche ai prodotti fitosanitari". In un siffatto contesto sociale e legislativo, lo sviluppo di metodi alternativi a quelli fondati sull'uso di prodotti di sintesi per la difesa delle colture sta subendo un notevole impulso destinato ad aumentare sempre più. Inoltre, è stata attuata la revisione europea delle registrazioni delle sostanze attive adoperate per la difesa fitosanitaria in agricoltura, operata con la direttiva 91/414/CEE: delle circa 1000 sostanze attive utilizzabili negli anni '90, solo il 26% di esse è stato incluso nel cosiddetto Allegato I, condizione necessaria per l'immissione in commercio dei formulati. Una tale drastica riduzione delle sostanze attive di sintesi e la contemporanea difficoltà a commercializzarne di nuove con i requisiti richiesti dalla recente normativa hanno ovviamente reso molto più problematica la difesa fitosanitaria e necessario ricorrere a metodi alternativi a quelli basati sull'uso degli agrofarmaci di sintesi. In questa ottica, sostanze naturali, microorganismi antagonisti e loro derivati costituiscono importanti risorse per sviluppare nuovi strumenti biotecnici utili per far fronte ai problemi fitosanitari. La registrazione di nuovi prodotti, comunque, rimane uno dei problemi più seri da affrontare

SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
(4Z-9Z)-7,9-Dodecadien-1-ol	
(E)-10-Dodecen-1-yl acetate	
(E)-11-Tetradecen-1-yl acetate	
(E)-2-Methyl-6-methylene-2,7-octadien-1-ol (myrcenol)	
(E)-2-Methyl-6-methylene-3,7-octadien-2-ol (isomyrcenol)	
(E)-5-Decen-1-ol	1
(E)-5-Decen-1-yl acetate	1
(E)-8-Dodecen-1-yl acetate	1
(E)-9-Dodecen-1-yl acetate	
(E,E)-7,9-Dodecadien-1-yl acetate	
(E,E)-8,10-Dodecadien-1-ol	1
(E,E)-8,10-Dodecadien-1-yl acetate	
(E,Z)-2,13-Octadecadien-1-yl acetate	1
(E,Z)-4,7-Tridecadien-1-yl acetate	
(E,Z)-7,9-Dodecadien-1-yl acetate	1
(E,Z)-8,10-Tetradecadien-1-yl	
(E,Z)-8-Dodecen-1-yl acetate	1
(E,Z)-9-dodecen-1-yl acetate; (E,Z)-9-Dodecen-1-ol; (Z)-11-Tetradecen-1-yl acetate	
(IR)-1,3,3-Trimethyl-4,6-dioxatricyclo[3.3.1.0 <sup>2,7</sup> ]nonane (lineatin)	
(Z)-11-Hexadecen-1-ol	
(Z)-11-Hexadecen-1-yl acetate	
(Z)-11-Hexadecenal	
(Z)-11-Tetradecen-1-yl acetate	1
(Z)-13-Hexadecen-11-yn-1-yl acetate	
(Z)-13-Octadecenal	
(Z)-3-Methyl-6-isopropenyl-3,4-decadien-1-yl acetate	
(Z)-3-Methyl-6-isopropenyl-9-decen-1-yl acetate	
(Z)-5-Dodecen-1-yl acetate	
(Z)-7-Tetradecanole	
(Z)-7-Tetradecenal	
(Z)-8-Dodecen-1-ol	1
(Z)-8-Dodecen-1-yl acetate	1
(Z)-9-Dodecen-1-yl acetate	1
(Z)-9-Hexadecenal	
(Z)-9-Tetradecen-1-yl acetate	1
(Z)-9-Tricosene (formerly Z-9-Tricosene)	
(Z,E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol ( aka Farnesol)	
(Z,E)-7,11-Hexadecadien-1-yl acetate	
(Z,E)-9,12-Tetradecadien-1-yl acetate	
(Z,Z)-7,11-Hexadecadien-1-yl acetate	

Tab. 2 Sostanze naturali (di origine botanica e semiochimici) attive registrate in Europa e in Italia (segue)

SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
(Z,Z)-Octadien-1-yl acetate	
(Z,Z,Z,Z)-7,13,16,19-Docosatetraen-1-yl isobutyrate	
1,7-Dioxaspiro-[5.5]-undecane	
1-Decanol	
Ascorbic acid	
Biohumus	
Blood meal	
Bone Oil	
Capric acid (CAS 334-48-5)	1
Caprylic acid (CAS 124-07-2)	1
Casein	
Cerevisane	
Chinin hydrochlorid	
Citrus extract	
Citrus extract/grapefruit extract	
Citrus extract/grapefruit seed extract	
Conifer needle powder	
Dodecan-1-ol	1
Dodecyl acetate	1
Extract from Menta piperita	
Extract from Plant Red oak, Prickly pear cactus, Fragrant sumac, Red mangrove	
Extract from tea tree	
FEN 560 (Fenugreek seed powder)	1
Garlic extract	
Garlic pulp	
Gelatine	
Gentian violet	
Geraniol	
Grease (bands, fruit trees)	
Hydrolysed proteins	1
Lactic acid	
Lactofen	
Laminarin	1
Lanolin	
Lauric acid (CAS 143-07-7)	
Lecithin	
Lecithins	
Maleic hydrazide	1
Maleic hydrazide and its salts, other than its choline, K and Na salts	
Maltodextrin	

Tab. 2 Sostanze naturali (di origine botanica e semiochimici) attive registrate in Europa e in Italia (segue)



SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
Milk albumin	
Mimosa tenuiflora extract	
Onion extract	
Orange oil	
Papaine	
Pepper	
Plant oils / Blackcurrant bud oil	
Plant oils / Citronella oil	
Plant oils / Citronellol	
<i>Plant oils / Clove oil</i>	1
Plant oils / Coconut oil	
Plant oils / Daphne oil	
Plant oils / Eucalyptus oil	
Plant oils / Gaiac Wood oil	
Plant oils / Garlic oil	
Plant oils / Lemongrass oil	
Plant oils / Maize oil	
Plant oils / Marjoram oil	
Plant oils / Olive oil	
Plant oils / Peanut oil	
Plant oils / Pinus oil	
Plant oils / Soya oil	
Plant oils / Soybean oil, epoxylated	
<i>Plant oils / Spear mint oil</i>	1
Plant oils / Sunflower oil	
Plant oils / Ylang-Ylang oil	
<i>Plant oils/ Rape seed oil</i>	1
Propolis	
Putrescine (1,4-Diaminobutane))	
Repellent (by taste) of vegetal and animal origin/extract of food grade/ phosphoric acid and fish flour	
Repellents by smell of animal or plant origin/ fish oil	
<i>Repellents by smell of animal or plant origin/ sheep fat</i>	1
Repellents by smell of animal or plant origin/ tall oil crude	
Repellents by smell of animal or plant origin/ tall oil pitch	
Repellents: Essential oils	
Repellents: Fatty acids, fish oil	
Repellents: Tall oil crude (CAS 93571-80-3)	
Rescalure	
Resins	
Resins and polymers	

Tab. 2 Sostanze naturali (di origine botanica e semiochimici) attive registrate in Europa e in Italia (segue)

SOSTANZA ATTIVA	NUMERO DI FORMULATI IN ITALIA
Reynoutria sachalinensis extract Sea-algae extract (formerly sea-algae extract and seaweeds) Sebacic acid Soybean extract <i>Straight Chain Lepidopteran Pheromones</i> Streptomycin Strychnine Sucrose Tagetes oil Tar acids Tar oils Trichloronat cis-Zeatin delta-endotoxin of <i>Bacillus thuringiensis</i>	1

Tab. 2 *Sostanze naturali (di origine botanica e semi chimici) attive registrate in Europa e in Italia*

sia a livello europeo, sia in Italia per le difficoltà tecniche da superare, per la complessità dell'iter autorizzativo e per i costi. Alla fine, bisogna ottenere prodotti biologici che possano competere con i tradizionali e meno costosi prodotti chimici, per produrre più derrate, limitando o annullando l'impatto sull'ambiente e sulla salute dell'uomo. Le piante, come gli altri esseri viventi dipendono dai microbi: la sfida da affrontare nel futuro sarà quella di selezionare ceppi efficaci e commercialmente validi, specialmente perché molti di essi sono pianta-specifici e la composizione del rizobioma può variare rapidamente (Lorito, 2015).

#### RIASSUNTO

Le riserve dell'opinione pubblica sull'uso dei prodotti fitosanitari di sintesi e il ruolo centrale che l'Unione Europea ha assegnato alla lotta integrata alle malattie delle piante (IPM) con l'emissione della Direttiva 2009/128 hanno dato un forte impulso alla ricerca di nuovi strumenti biotecnici per far fronte alle problematiche fitosanitarie.

I microorganismi antagonisti e le molecole naturali con proprietà antimicrobiche sono tra le fonti più utili per lo sviluppo di prodotti commerciali alternativi da impiegare in programmi di protezione delle piante a minore impatto sulla salute dell'uomo e sull'ambiente. In questo lavoro sono riportate e discusse le principali strategie adottate ai nostri giorni per ottenere prodotti fitosanitari migliori rispetto a quelli attualmente in commercio, selezionando ceppi più efficaci in diverse condizioni ambientali, ottimizzando la produzione e le formulazioni, usando più efficienti sistemi di somministrazione.

Sono prese brevemente in considerazione anche le difficoltà legate alla registrazione dei prodotti biologici per la loro immissione sul mercato.

## ABSTRACT

Public concern about the use of synthetic chemical pesticides and the central place that the European Union assigned to IPM within its 2009/128 Directive on the Sustainable use of pesticides are among the most important factors that require new alternative tools to control plant diseases. Antagonistic microbes and natural antimicrobial molecules represent a good source for the development of biopesticides which can be useful to make plant protection more sustainable. In this paper we report and discuss the main issues concerning the strategies adopted today to select strains more effective under different conditions, improve production and formulations, and use more efficient delivery systems. Finally, registration difficulties to commercialize microbial biopesticides are also considered.

## BIBLIOGRAFIA

- ACHATZ B., VON RUDEN S., ANDRADE D., NEUMANN E., PONS-KUHNEMANN J., KOGL K.H., FRANKEN P., WALLER F. (2010): *Root colonization by Piriformospora indica enhances grain yield in barley under diverse nutrient regimes by accelerating plant development*, «Plant Soil», 333, pp. 59-70.
- BAE H., ROBERTS D.P., LIM HS, STREM M.D., PARK S.C., RYU C.M., MELNICK R.L., BAILEY B.A. (2011): *Endophytic Trichoderma isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against Phytophthora capsici in hot pepper using multiple mechanisms*, «Molecular Plant Microbe Interactions», 24, pp. 336-51.
- BAKKER M.G., MANTER D.K., SHEFLIN A.M., WEIR T.L., VIVANCO J.M. (2012): *Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management*, «Plant Soil», 360, pp. 1-13.
- BARAZANI O., BENDEROTH M., GROTEN K., KUHLEMEIER C., BALDWIN I.T. (2005): *Piriformospora indica and Sebacina vermifera increase growth performance at the expense of herbivore resistance in Nicotiana attenuata*, «Oecologia», 146, pp. 234-243.
- BLUM B.J. (2007): *Concepts and Strategies for a successful product development: the industry's development concept*, in Cost Action 850 – Conference Schloss.
- BROTMAN Y., BRIEF E., VITERBO A., CHET I. (2008): *Role of swollenin, an expansin-like protein from Trichoderma, in plant root colonization*, «Plant Physiology», 147, pp. 779-89.
- BURGES, H.D. (1998): *Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*, ed. by Burges, H.D, Kluwer, Dordrecht, pp. 383.
- COLLÉN A., SALOHEIMO M., BAILEY M., PENTTILÄ M., PAKULA T.M. (2005): *Protein production and induction of the unfolded protein response in Trichoderma reesei strain Rut-C30 and its transformant expressing endoglucanase I with a hydrophobic tag*, «Biotechnology and Bioengineering», 89, pp. 335-44.
- DE VRIEZE J. (2015): *The littlest farmhands*, «Science», 349, pp. 680-683.
- DESHMUKH S., HÜCKELHOVEN R., SCHÄFER P., IMANI J., SHARMA M., WEISS M., WALLER F., KOGL K.-H. (2006): *The root endophytic fungus Piriformospora indica*

- requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley, «Proceedings of National Academy of Sciences USA», 103, pp. 18450-18457.
- DJONOVIC S., POZO M.J., DANGOTT L.J., HOWELL C.R., KENERLEY C.M. (2006): *Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus Trichoderma virens induces plant defense responses and systemic resistance*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 19, pp. 838-853.
- GARBEVA P., DE BOER W. (2009): *Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression*, «Soil Microbiology», 58, pp. 36-46.
- HANSON L.E., HOWELL C.R. (2004): *Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of Trichoderma virens*, «Phytopathology», 94, pp. 171-176.
- HARMAN G.E. (2000): *Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on Trichoderma harzianum T-22*, «Plant Disease», 84, pp. 377-93.
- JONES R.W., PETTIT R.E., TABER R.A. (1984): *Lignite and stillage: carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil*, «Phytopathology», 74, pp. 1167-1170.
- KOHL J., POSTMA, J., NICOT, P., RUOCCO M., BLUM B. (2011): *Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria*, «Biological Control», 57, pp. 1-12.
- LEGGETT M., LELAND J., KELLAR K., EPP B. (2011): *Formulation of microbial biocontrol agents- an industrial perspective*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 33, pp. 101-107.
- LORITO M. (2015): *The littlest farmhands*, «Science», 349, pp. 680-683.
- LORITO M., PETERBAUER C., HAYES C.K., HARMAN G.E. (1994): *Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination*, «Microbiology», 140, pp. 623-629.
- LORITO M., WOO S.L., D'AMBROSIO M., HARMAN G.E., HAYES C.K., KUBICEK C.P., SCALA F. (1996): *Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 9, pp. 206-213.
- LORITO M., WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E. (2010): *Translational research on Trichoderma: from 'omics to the field*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 395-417.
- MALMIERCA M.G., CARDOZA R.E., ALEXANDER N.J., MCCORMICK S.P., HERMOSA R., MONTE E., GUTIÉRREZ S. (2012): *Involvement of Trichoderma trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes*, «Applied Environmental Microbiology», 78, pp. 4856-68.
- MARASCO R., ROLLI E., ETTOUMI B., VIGANI G., MAPELLI F., BORIN S., ABOU-HADID A.F., EL-BEHAIRY U.A., SORLINI C., CHERIF A., ZOCCHI G., DAFFONCHIO D. (2012): *A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming*, «PLOS ONE», 7, e48479. doi:10.1371/journal.pone.0048479
- MASTOURI F., BJORKMAN T., HARMAN G.E. (2010): *Seed treatments with Trichoderma harzianum alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings*, «Phytopathology», 100, pp. 1213-1221.
- MENDES R., GARBEVA P., RAAIJMAKERS J. M. (2013): *The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms*, «FEMS Microbiology Reviews», 37, pp. 634-663.
- NARAYASAMI P. (2013): *Mechanisms of action of fungal biological control agents*, in Nayarassami P. (ed), *Biological management of diseases of crops*, vol. 1, *Characteristics of biological control agents*, Springer, Dordrecht, pp. 99-200.
- OBERWINKLER F., RIESS K., BAUER R., SELOSSE M.-A., WEISS M., GARNICA S., ZUCCARO A. (2013): *Enigmatic Sebaciales*, «Mycol Progress», 12, pp. 1-27.

- RAAIJMAKERS J.M., PAULITZ T.C., STEINBERG C., ALABOUVETTE C., MOENNE-LOCCHOZ Y. (2009): *The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms*, «Plant and Soil», 321, pp. 341-361.
- REDMAN R.S., KIM Y.-O., WOODWARD C.J.D.A., GREER C., ESPINO L., DOTY S.L., RODRIGUEZ R.J. (2011): *Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change*, «PLoS ONE», 6, e14823. doi:10.1371/journal.pone.0014823.
- RIESS K., OBERWINKLER F., BAUER R., GARNICA S. (2014): *Communities of endophytic sebacinales associated with roots of herbaceous plants in agricultural and grassland ecosystems are dominated by Serendipita herbamans sp. nov.*, «PLoS ONE», 9, e94676. doi:10.1371/journal.pone.0094676.
- RODRIGUEZ R.J., HENSON J., VAN VOLKENBURGH E., HOY M., WRIGHT L., BECKWITH F., KIM Y.O., REDMAN R.S. (2008): *Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis*, «The ISME Journal», 2, pp. 404-416.
- RUOCO M., LANZUISE S., LOMBARDI N., WOO S.L., VINALE F., MARRA R., VARLESE R., MANGANIELLO G., PASCALE A., SCALA V., LORITO M. (2015): *Multiple roles and effects of a novel Trichoderma hydrophobin*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 28, pp. 167-179.
- SAARI S., FAETH S.H. (2012): *Hybridization of Neotyphodium endophytes enhances competitive ability of the host grass*, «New Phytologist», 195, pp. 231-236.
- SELOSSE M.-A., SETARO S., GLATARD F., RICHARD F., URCELAY C., WEISS M. (2007): *Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae*, «New Phytologist», 174, pp. 864-878.
- SEIDL V., SCHMOLL M., SCHERM B., BALMAS V., SEIBOTH B., MIGHELI Q., KUBICEK C.P. (2006): *Antagonism of Pythium blight of zucchini by Hypocrea jecorina does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolite derepression*, «Fems Microbiology Letters», 257, pp. 145-151.
- SHARMA B., SHARMA A., ARORA S., GUPTA S., BISHNOI M. (2012): *Formulation, optimization and evaluation of atorvastatin calcium loaded microemulsion*, «Journal Pharmaceutics & Drug Delivery Research», 1:3. Doi:10.4172/2325-9604.1000109.
- SHORESH M., MASTOURI F., HARMAN G. (2010): *Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 21-43.
- SINGH R.B., SINGH H.K., ARPITA PARMAR. (2014): *Yield loss assessment due to Alternaria blight and its management in linseed*, «Pakistan Journal Of Biological Sciences», 17, pp. 511-516.
- SINGH U.S., ZAIDI N.W. (2002): *Current Status of formulation and delivery of fungal and bacterial antagonists for disease management in India*, pp 168-179, in *Microbial Biopesticide Formulations and Application* (Eds Rabindra R.J., Hussaini S.S., Ramanujam B.), Project Directorate of Biological Control, Bangalore, pp. 269.
- VINALE F., SIVASITHAMPARAM K., GHISALBERTI E.L., RUOCO M., WOO S.L., LORITO M. (2012): *Trichoderma secondary metabolites that affect plant metabolism*, «Natural Product Communication», 7, pp. 1545-1550.
- WALLER F., ACHATZ B., BALTRUSCHAT H., FODOR J., BECKER K., FISCHER M., HEIER T., HÜCKELHOVEN R., NEUMANN C., VON WETTSTEIN D., FRANKEN P., KOGEL K.H. (2005): *The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield*, «Proceedings of National Academy of Sciences USA», 102, pp. 13386-13391.
- WANG J.W., WU J.Y. (2013): *Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures*, «Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology», 134, pp. 55-89.

- WEISS M., SELOSSE M.-A., REXER K.-H., URBAN A., OBERWINKLER F. (2004): *Sebacinales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential*, «Mycological Research», 108, pp. 1003-1010.
- WEISS M., SÝKOROVÁ Z., GARNICA S., RIESS K., MARTOS F., KRAUSE C., OBERWINKLER F., BAUER R., REDECKER D. (2011): *Sebacinales everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes*, PLoS ONE 6(2): e16793. doi:10.1371/journal.pone.0016793
- YUE C., MILLER C.J., WHITE J.E.J., RICHARDSON M. (2000): *Isolation and characterization of fungal inhibitors from Epichloa festucae*, «Journal of Agricultural Food Chemistry», 48, pp. 4687-4692.

FRANCESCO FARETRA\*, RITA MILVIA DE MICCOLIS ANGELINI\*,  
STEFANIA POLLASTRO\*, GIANFRANCO ROMANAZZI\*\*, ILARIA PERTOT\*\*\*

## Attualità e prospettive degli induttori di resistenza nella protezione sostenibile delle colture

Le piante coltivate sono state addomesticate e geneticamente migliorate nel tempo, mirando alla quantità e qualità delle produzioni. Di conseguenza, queste sono più suscettibili delle piante selvatiche a numerosi patogeni, per limitare i quali è necessario l'impiego di prodotti fitosanitari cui si contrappone, nell'opinione pubblica, una crescente preoccupazione riguardo l'impatto ambientale e i rischi a esso connesso per la salute di operatori e consumatori. Una riduzione dell'impiego di prodotti fitosanitari potrebbe certo derivare dalla diffusione dell'agricoltura biologica, dalla lotta biologica e dallo sfruttamento delle resistenze genetiche. Ciascuna di queste alternative presenta però limiti per le possibili applicazioni su larga scala.

In tale contesto, l'induzione di resistenza nelle piante è un utile approccio. Essa consiste nello stimolare l'attivazione di meccanismi di difesa nelle piante mediante elicitivi, molecole di sintesi o naturali che mimano l'attacco di un patogeno o uno stato di stress (es., Schreiber e Desveaux, 2008; Walters et al., 2013; Aranega-Bou et al., 2014; Gao et al., 2014, 2015; Shah et al., 2014; Stadnik e de Freitas, 2014; Burketova et al., 2015; Faoro e Gozzo, 2015).

### MECCANISMI DI DIFESA

Le piante possiedono sistemi di difesa variegati ed efficienti contro i numerosi patogeni, come batteri, funghi, oomiceti e virus. Oltre ai meccanismi di

\* Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

\*\* Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche

\*\*\* Dipartimento Agroecosistemi Sostenibili e Biorisorse, Fondazione Edmund Mach di San Michele all'Adige

difesa costitutivi strutturali (pareti cellulari, cuticola, ecc.) o biochimici (fitoanticipine), le piante hanno meccanismi di difesa che sono indotti dal riconoscimento del “non sé” mediante recettori in grado di rilevare sostanze conservate nei microrganismi, come la flagellina batterica o la chitina e i glucani della parete cellulare fungina (*microbe/pathogen-associated molecular patterns*, MAMP/PAMP) (Newman et al., 2013). I meccanismi di difesa possono anche essere attivati da segnali derivanti da danni causati da patogeni alla pianta (*damage-associated molecular patterns*, DAMP), come gli oligogalatturonidi derivanti dall’attività di enzimi litici microbici a carico delle pectine (Dodds e Rathjen, 2010).

La trasduzione del segnale di attivazione dei recettori include cascate di eventi, quali flussi ionici dovuti alla depolarizzazione del plasmalemma, produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS), di ossido nitrico (NO) e attivazione di protein-chinasi (Boudsocq et al., 2010). Questi eventi modulano l’attività di fattori di trascrizione, che determinano una profonda ri-programmazione della trascrizione genica. L’attivazione di geni di difesa porta all’accumulo di vari enzimi e metaboliti stress-specifici, quali: i) *pathogenesis-related* (PR) proteine che includono enzimi litici ( $\beta$ -1,3-glucanasi e chitinasi), che degradano le pareti cellulari microbiche, perossidasi, proteinasasi; ii) composti antimicrobici, come le fitoalessine; iii) lignina e callosio che rinforzano le pareti cellulari; iv) produzione di ROS con ruolo di segnale e attività antimicrobica; e anche v) chiusura degli stomi (Dodds e Rathjen, 2010).

Oltre alle risposte di difesa locali, l’infezione induce resistenza sistemica acquisita (*systemic acquired resistance*, SAR): i segnali di allerta sono amplificati e trasmessi sistemicamente all’intera pianta (Conrath, 2011). I meccanismi di difesa sono attivati e regolati da ormoni, quali acido salicilico (SA), acido jasmonico (JA), etilene (ET) e acido abscissico (ABA). Questi sono indipendenti ma interagenti fra loro e con altri ormoni, quali auxine, brassinosteroidi (BR) e gibberelline, e modulano le risposte di difesa (Robert-Seilanianz et al., 2011). L’induzione è un momento critico della SAR e i tessuti indotti sono in uno stato di allerta che permette risposte più pronte e potenziate a stress biotici o abiotici. Le cellule indotte accumulano proteine segnale di difesa, come protein-chinasi (Beckers et al., 2009). Inoltre, possono verificarsi modificazioni istoniche, come acetilazione o metilazione, nelle regioni promotrici di geni di resistenza (Luna et al., 2012). Queste modificazioni epigenetiche possono anche essere trasmesse alle generazioni successive (Slaughter et al., 2012).

SA e analoghi di sintesi sono largamente usati nella protezione delle colture



(Kachroo e Robin, 2013). SA è particolarmente efficace contro patogeni biotrofi (Glazebrook, 2005). La SAR è comunque efficace contro un'ampia gamma di patogeni, nematodi e piante parassite (Gozzo e Faoro, 2013). Sono noti anche induttori di SAR volatili emessi a seguito dell'infezione, che possono trasmettere il segnale di allerta a distanza, quali metilsalicilato (MeSA) (Park et al., 2007) e acido pipecolico (Pip) (Návarová et al., 2012). Altre molecole segnale sono acido dicarbossilico diazelaico (AzA), glicerolo-3-fosfato e alcuni diterpeni (Kachroo e Robin, 2013).

Meccanismi di difesa possono essere indotti da microrganismi associati alle piante, cui spesso si fa riferimento come resistenza sistemica indotta (*induced systemic resistance*, ISR). ISR può essere indotta da *plant growth promoting rhizobacteria* (PGPR), funghi micorrizici, *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. non patogeni. ISR è causata da meccanismi dipendenti da JA e ET (Pieterse et al., 2014) ed è correlata alla difesa da patogeni necrotrofi ed erbivori (Song et al., 2013).

#### INDUTTORI DI SINTESI

Acibenzolar-S-metil o benzothiadiazole (BTH) è un induttore di resistenza ad ampio spettro contro malattie batteriche, fungine, fitoplasmatiche e virali che induce meccanismi di SAR identici a quelli attivati da SA (Romanazzi et al., 2013; Walters et al., 2013). Probenazole è primariamente impiegato su riso contro *Magnaporthe grisea* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e sembra essere efficace su mais contro *Cochliobolus heterostrophus* (Yang et al., 2011). L'acido  $\beta$ -aminobutirrico (BABA) causa un potenziamento dei meccanismi di difesa, determinando resistenza a un largo spettro di patogeni in varie piante ospiti (Gozzo e Faoro, 2013; Walters et al., 2013). Fungicidi di sintesi, quali i fosfonati, sono noti per essere anche induttori di SAR.

#### INDUTTORI MICROBICI

La co-evoluzione ha portato le piante a riconoscere numerose sostanze conservate di origine batterica che possono, quindi, indurre resistenza. Queste possono essere costituenti della capsula o dei flagelli, sostanze secrete (enzimi pectolitici, fattori di virulenza, metaboliti di *quorum sensing*, siderofori, tossine, ecc.), o rilasciate accidentalmente (DNA, fattori di trascrizione e/o traduzione).

Gli endofiti (es. *Burkholderia phytofirmans* in vite; Trdá et al., 2014) inducono risposte di difesa nell'ospite meno spesso di PGPR che, vivendo nella rizosfera, sono meno esposti ai meccanismi di difesa della pianta da essi indotti.

La chitina è un polisaccaride composto da unità di N-acetilglucosamina legate con un legame  $\beta$ -1,4-glicosidico. Etero-polimero molto comune in natura, con vari tassi di deacetilazione e contenuto di glucosamina, è il principale costituente della parete cellulare dei funghi e dell'esoscheletro di crostacei e insetti (Bueter et al., 2013). Il chitosano è un derivato deacetilato della chitina presente in molte specie fungine. La chitina e i suoi oligosaccaridi sono MAMP che attivano meccanismi di difesa in numerose piante, inclusa la produzione di fenilpropanoidi e proteine PR (Boller e Felix, 2009). Il chitosano determina nelle piante una varietà di reazioni che includono sintesi di fitoalessine (Akiyama et al., 1995), produzione di NO e  $H_2O_2$  (Li et al., 2009), di acido abscissico (Iriti e Faoro, 2009) e proteine PR (Chujo et al., 2007; Landi et al., 2014), depositi di callosio (Köhle et al., 1985) e reazione di ipersensibilità (Zuppini et al., 2004).

Poli- e oligo-saccaridi possono migliorare la resistenza delle piante. Molti degli studi sono basati su glucani derivati da cellulosa e laminarina (Aziz et al., 2007), ma anche analoghi fungini possono indurre risposte di difesa, inclusa la sintesi di fitoalessine (Yamaguchi et al., 2000), glucanasi (Wolski et al., 2006), chitinasi e ROS (Shinya et al., 2006), fenilpropanoidi (Nita-Lazar et al., 2004) e proteine PR (Graham et al., 2003).

#### ESTRATTI VEGETALI

Gli oligosaccaridi che agiscono come MAMP non sono limitati ai microrganismi, in quanto anche le alghe contengono sostanze simili e possono indurre meccanismi di difesa contro patogeni (Stadnik e de Freitas, 2014). La laminarina, da alghe brune, elicitava meccanismi di difesa in vite, come attivazione di protein-chinasi e accumulo di fitoalessine, contro *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* (Aziz et al., 2003). Gli ulvani, da alghe verdi del genere *Ulva*, consistono in residui di ramnosio solfato legati ad acido uronico e inducono resistenza contro vari patogeni, inclusi agenti causali di oidi e *Colletotricum* spp. (Stadnik e de Freitas, 2014). Le carragenine, polisaccaridi da alghe rosse, costituite da residui di  $\alpha$ -D-1,3 e  $\beta$ -D-1,4 galattosio solfati fino al 40%, molto usate nell'industria alimentare come gelificanti ed emulsionanti, mostrano efficacia variabile con il livello di solfatazione e il particolare patosistema, e pronunciata contro patogeni biotrofici ed emibiotrofici (Vera et al., 2012). I fucani sono polisaccaridi caratterizzati dalla pre-

senza di L-fucosio solfato derivati da alghe brune. Sono stati usati a lungo come biostimolanti e fertilizzanti ma i dati sulla loro capacità di indurre meccanismi di resistenza nelle piante sono scarsi (Stadnik e de Freitas, 2014).

Le piante sono sempre state fonte di sostanze biologicamente attive utilizzate specialmente a scopo medico, ma estratti vegetali (oggi spesso detti *botanicals*) sono anche stati impiegati per la protezione delle piante. Questi hanno spesso attività antimicrobica ma è ben noto che possono indurre meccanismi di difesa nelle piante. È impossibile definire in modo certo il meccanismo di induzione di resistenza poiché gli estratti sono miscele di DAMP, derivanti dalla omogeneizzazione di tessuti vegetali, composti inorganici, metaboliti secondari, molecole di segnale e oli essenziali, che probabilmente agiscono in modo sinergico. Un estratto etanolic di *Reynoutria sachalinensis* (Milsana®) protegge varie piante (cetriolo, frumento, rosa) da oidi. Questo ha un effetto diretto antimicrobico (anomalie nella differenziazione di appressori e austori) ma causa anche un incremento dell'attività di perossidasi,  $\beta$ -1,3-glucanasi, accumulo di polifenoli, fitoalessine, ROS e lipossigenasi (Vechet et al., 2009). Estratti acquosi di *Azadirachta indica* hanno attività antimicrobica contro batteri e funghi e inducono meccanismi di difesa nelle piante. La protezione di orzo da *Drechslera graminea* è accompagnata da incremento dell'attività di fenilalanina ammonio-liasi (PAL) e tirosina ammonio-liasi (TAL) e accumulo di polifenoli (Paul e Sharma, 2002). Estratti di *Hedera helix* impiegati per la protezione del melo da *Erwinia amylovora* incrementano l'attività di perossidasi e chitinasi (Baysal e Zeller, 2004). Moushib et al. (2013) hanno evidenziato che estratti di cascami di barbabietola da zucchero inducono in patata resistenza a *Phytophthora infestans* mediante incremento di proteine PR.

Anche gli oli essenziali possono essere fonte di induttori di resistenza (Sivakumar e Bautista-Baños, 2014). Ad esempio, oli essenziali di *Gaultheria procumbens* inducono meccanismi di difesa mediati da SA e resistenza a *Colletotrichum higginsianum* in *Arabidopsis thaliana* e ciò è causato dal MeSA presente nell'olio (Vergnes et al., 2014). Von Rad et al. (2005) hanno evidenziato l'attivazione di meccanismi di resistenza modulati da SA e JA di alcuni estratti vegetali disponibili commercialmente (es., Neudo-Vital, W. Neudorff GmbH KG, Germania; Bio-S, Gebruder Schatte KG, Germania).

## COMPOST

I compost sono i prodotti derivati dalla biodegradazione aerobica di vari rifiuti organici primariamente impiegati come sostituti della torba e come

ammendanti. L'effetto soppressivo verso i patogeni è principalmente dovuto all'apporto di popolazione microbica saprofitica antagonista. Numerosi studi hanno, comunque, evidenziato l'induzione di meccanismi di resistenza nelle piante. Ad esempio, compost addizionati di *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* inducono resistenza in cetriolo verso affezioni da *Pythium* spp. e antracnosi (Zhang et al., 1998). Piante di melone e cetriolo allevate in compost da residui di piante di pomodoro mostrano resistenza indotta verso *F. oxysporum* f.sp. *melonis* e *B. cinerea* (Yogev et al., 2010). I meccanismi responsabili della resistenza indotta da compost non sono del tutto chiari, anche se spesso è stato osservato l'incremento di attività enzimatiche (ad es. perossidasi e  $\beta$ -1,3-glucanasi) e il potenziamento di meccanismi di difesa. Segarra et al. (2013) hanno rilevato una modulazione genica in *A. thaliana* coltivata in compost, simile a quelle della SAR o indotte da ABA in risposta a stress abiotici.

La colonizzazione della rizosfera da comunità microbiche influenza marcatamente i segnali di difesa nella pianta (Pieterse et al., 2014). Microrganismi estratti da compost riducono i meccanismi di difesa indotti da SA e incrementano quelli indotti da JA in *A. thaliana* (Carvalhais et al., 2013). Comunque, la sterilizzazione di compost da sansa di olive ha ridotto solo parzialmente la soppressività verso *Verticillium dahliae* indicando che, oltre alla resistenza indotta dal microbioma, altri meccanismi partecipano alla protezione delle piante (Papasotiriou et al., 2013).

## BIOCHAR

Biochar, prodotto derivante dalla pirolisi di biomasse, è utilizzato come ammendante. L'impiego di biochar induce resistenza sistemica in peperone e pomodoro verso *B. cinerea* e *Leveillula taurica* (Elad et al., 2010), in asparago verso *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* e *F. proliferatum* (Elmer e Pignatello, 2011), in giovani piante arboree verso *Phytophthora* spp. (Zwart e Kim, 2012), e in fragola verso *B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum* e *Podosphaera aphanis* (Harel et al., 2012).

## PROSPETTIVE

L'induzione di meccanismi di difesa nelle piante può essere un'utile integrazione e/o alternativa all'uso dei prodotti fitosanitari di sintesi. Negli ultimi

anni, le ricerche su tale approccio alla protezione sono notevolmente aumentate e numerosi ed eterogenei induttori di resistenza sono stati valutati in vari patosistemi. Ciononostante, il trasferimento alla pratica non è semplice. Una delle limitazioni più importanti è di frequente l'efficacia parziale o per periodi brevi degli induttori. Ma di maggior rilievo è che l'efficacia dei trattamenti dipende dal particolare patosistema, dalle condizioni ambientali e di gestione agronomica, e dai genotipi delle piante coltivate. Inoltre, le piante in natura sono già esposte alle interazioni biotiche o abiotiche con l'ambiente e l'attività elicitoria degli induttori può essere minore di quella osservata in condizioni controllate sperimentali (Walters et al., 2013). Inoltre, per l'utilizzazione pratica degli induttori deve essere possibile produrli in grandi quantità e a bassi costi. Numerosi aspetti devono poi essere chiariti nei singoli casi e, in particolare, l'eventuale costo metabolico (*fitness cost*) dell'induzione di resistenza. L'attivazione dei meccanismi di difesa, infatti, implica un re-indirizzamento di energia e metaboliti verso il metabolismo secondario che può essere a detrimento del vigore vegetativo e della produttività (van Hulten et al., 2006). Il costo metabolico è plausibilmente meno marcato quando la pianta è solo preparata (*primed*) a una più forte e pronta reazione di difesa all'attacco del patogeno (Gozzo e Faoro, 2013).

Alcuni elicitori, come chitosano, estratti vegetali e fungicidi, possono agire con un doppio meccanismo di azione grazie all'attività diretta antimicrobica. Ciò può rappresentare un vantaggio per l'impiego pratico. In alcuni casi sono da valutare le eventuali implicazioni tossicologiche per uomo e animali che, del resto, possono sussistere anche a causa dell'accumulo di metaboliti secondari nelle piante indotte (Daniel et al., 1999). Tuttavia, per alcuni di questi prodotti, quali il chitosano, è stato di recente approvato (Reg. UE 563/2014) l'uso come sostanza di base, ai sensi del Reg. UE 1107/2009, per la protezione delle piante e molteplici sono le potenziali applicazioni, sia in campo sia in postraccolta (Romanazzi et al., 2016a, b).

Le tecnologie di sequenziamento massale (*Next Generation Sequencing*, NGS) e di metabolomica consentono oggi di meglio chiarire il fenomeno dell'induzione di resistenza e i relativi meccanismi di rimodulazione dell'espressione genica e del metabolismo in diversi patosistemi e in diversi genotipi di piante coltivate. Ciò costituirà un utile supporto scientifico nella definizione del migliore impiego degli induttori di resistenza e nella loro valutazione nel momento dell'autorizzazione all'impiego. Purtroppo, tema ancora molto dibattuto è se gli induttori di resistenza debbano essere regolamentati come prodotti fitosanitari, biostimolanti, corroboranti o fertilizzanti, che presentano regolamentazioni molto differenti. La confusione al riguardo è eleva-

ta (La Torre et al., 2016) e si spera che possa essere superata al più presto. In ogni caso, è plausibile attendersi che nel prossimo futuro l'elicitazione delle risposte di difesa nelle piante possa divenire un elemento importante della gestione integrata delle malattie, assieme a prodotti fitosanitari di sintesi, agenti di controllo biologico e sostanze di origine naturale, in pieno accordo con la Direttiva 2009/128/EC "Sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari".

#### RIASSUNTO

L'induzione di resistenza consiste nell'attivazione di meccanismi di difesa nella pianta che risulta così più reattiva agli stress di natura biotica o abiotica. L'induzione di resistenza può essere associata alla attivazione di diversi percorsi metabolici (SAR, ISR, BABA-IR) che possono essere studiati mediante analisi dell'espressione genica. Le tecniche di *Next Generation Sequencing* (NGS) sono di particolare utilità al riguardo. Le difese della pianta possono essere elicitate da fattori biotici (microrganismi) o abiotici (stress di natura fisica, pratiche agronomiche, applicazione di composti naturali o di sintesi chimica). È riportata una panoramica dei principali induttori di resistenza e di alcuni casi studio di risposta della pianta a stress abiotici e a trattamenti con elicitori chimici o biologici.

#### ABSTRACT

The plant resistance induction consists in the activation of defence mechanisms resulting in increased plant reactivity to biotic or abiotic stresses. Resistance induction is associated to the activation of different metabolic pathways (SAR, ISR, BABA-IR) which can be studied by gene expression analysis. Next Generation Sequencing (NGS) techniques are particularly useful for this purpose. Plant defences can be elicited by biotic (microorganisms) and abiotic (physical stresses, agronomic practices, applications of natural or synthetic compounds). This review surveys the main plant resistance inducers and some examples of plant responses to abiotic stress and to the applications of chemical and biotic elicitors.

#### BIBLIOGRAFIA

- ARANEGA-BOU P., DE LA O LEYVA M., FINITI I., GARCÍA-AGUSTÍN P., GONZÁLEZ-BOSCH C. (2014): *Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model*, «Frontiers in Plant Science», 5, art. 488, DOI 10.3389/fpls.2014.00488.
- AKIYAMA K., KAWAZU K., KOBAYASHI A. (1995): *Partially N-deacetylated chitin oligomers (pentamer to heptamer) are potential elicitors for (+)-pisatin induction in pea epicotyls*, «Zeitschrift für Naturforschung C», 50, pp. 391-397.

- AZIZ A., POINSSOT B., DAIRE X., ADRIAN M., BÉZIER A., LAMBERT B., JOUBERT J.M., PUGIN A. (2003): *Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola*, «Molecular Plant-Microbe Interactions», 16, pp. 1118-1128.
- AZIZ A., GAUTHIER A., BÉZIER A., POINSSOT B., JOUBERT J.M., PUGIN A., HEYRAUD A., BAILLIEU F. (2007): *Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides*, «Journal of Experimental Botany», 58, pp. 1463-1472.
- BAYSAL Ö., Zeller W. (2004): *Extract of Hedera helix induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against Fire Blight (Erwinia amylovora)*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 65, pp. 305-315.
- BECKERS G.J., JASKIEWICZ M., LIU Y., UNDERWOOD W.R., HE S.Y., ZHANG S., CONRATH U. (2009): *Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in Arabidopsis thaliana*, «The Plant Cell», 21, pp. 944-953.
- BOLLER T., FELIX G. (2009): *A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors*, «Annual Review of Plant Biology», 60, pp. 379-406.
- BOUDSOCQ M., WILLMANN M.R., MCCORMACK M., LEE H., SHAN L., HE P., BUSH J., CHENG S.-H., SHEEN J. (2010): *Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases*, «Nature», 464, pp. 418-422.
- BUETER C.L., SPECHT C.A., LEVITZ S.M. (2013): *Innate sensing of chitin and chitosan*, «PLoS Pathogens», 9, e1003080, DOI 10.1371/journal.ppat.1003080.
- BURKETOVA L., TRDA L., OTT P.G., VALENTOVA O. (2015): *Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens*, «Biotechnology Advances», 33, pp. 994-1004.
- CARVALHAIS L.C., MUZZI F., TAN C.-H., HSIEN-CHOO J., SCHENK P.M. (2013): *Plant growth in Arabidopsis is assisted by compost soil-derived microbial communities*, «Frontiers in Plant Science», 4, art. 235, DOI 10.3389/fpls.2013.00235.
- CHUJO T., TAKAI R., AKIMOTO-TOMIYAMA C., ANDO S., MINAMI E., NAGAMURA Y., KAKUC H., SHIBUYAC N., YASUDAD M., NAKASHITAD H., UMEMURAE K., OKADAA A., OKADAA K., NOJIRIA H., YAMANE H. (2007): *Involvement of the elicitor-induced gene OsWRKY53 in the expression of defense-related genes in rice*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1769, pp. 497-505.
- CONRATH U. (2011): *Molecular aspects of defence priming*, «Trends in Plant Science», 16, pp. 524-531.
- DANIEL O., MEIER M.S., SCHLATTER J., FRISCHKNECHT P. (1999): *Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides*, «Environmental Health Perspectives», 107, pp. 109-114.
- DODDS P.N., RATHJEN J.P. (2010): *Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions*, «Nature Reviews Genetics», 11, pp. 539-548.
- ELAD Y., DAVID D.R., HAREL Y.M., BORENSHTEIN M., BEN KALIFA H., SILBER A., GRABER E.R. (2010): *Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent*, «Phytopathology», 100, pp. 913-921.
- ELMER W.H., PIGNATELLO J.J. (2011): *Effect of biochar amendments on mycorrhizal associations and Fusarium crown and root rot of asparagus in replant soils*, «Plant Disease», 95, pp. 960-966.
- FAORO F., GOZZO F. (2015): *Is modulating virus virulence by induced systemic resistance realistic?*, «Plant Science», 234, pp. 1-13.

- GAO Q.-M., KACHROO A., KACHROO P. (2014): *Chemical inducers of systemic immunity in plants*, «Journal of Experimental Botany», 65, pp. 1849-1855.
- GAO Q.-M., ZHU S., KACHROO P., KACHROO A. (2015): *Signal regulators of systemic acquired resistance*, «Frontiers in Plant Science», 6, art. 228, DOI 10.3389/fpls.2015.00228
- GLAZEBROOK J. (2005): *Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens*, «Annual Review of Phytopathology», 43, pp. 205-227.
- GOZZO F., FAORO F. (2013): *Systemic acquired resistance (50 years after discovery): Moving from the lab to the field*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 61, pp. 12473-12491.
- GRAHAM M.Y., WEIDNER J., WHEELER K., PELOW M.J., GRAHAM T.L. (2003): *Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the Phytophthora sojae cell wall glucan elicitor*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 63, pp. 141-149.
- HAREL Y.M., ELAD Y., RAV-DAVID D., BORENSTEIN M., SHULCHANI R., LEW B., GRABER E.R. (2012): *Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens*, «Plant Soil», 357, pp. 245-257.
- IRITI M., FAORO F. (2009): *Chitosan as a MAMP, searching for a PRR*, «Plant Signaling and Behavior», 4, pp. 66-68.
- KACHROO A., ROBIN G.P. (2013): *Systemic signaling during plant defense*, «Current Opinion in Plant Biology», 16, pp. 527-533.
- KÖHLE H., JEBLICK W., POTEN F., BLASCHEK W., KAUSS H. (1985): *Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a  $Ca^{2+}$ -dependent process*, «Plant Physiology», 77, pp. 544-551.
- LANDI L., FELIZIANI E., ROMANAZZI G. (2014): *Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 62, pp. 3047-3056.
- LA TORRE A., BATTAGLIA V., CARADONIA F. (2016): *An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 96, pp. 727-734.
- LI Y., YIN H., WANG Q., ZHAO X., DU Y., LI F. (2009): *Oligochitosan induced Brassica napus L. production of NO and  $H_2O_2$  and their physiological function*, «Carbohydrate Polymers», 75, pp. 612-617.
- LUNA E., BRUCE T.J.A., ROBERTS M.R., FLORS V., TON J. (2012): *Next-generation systemic acquired resistance*, «Plant Physiology», 158, pp. 844-853.
- MOUSHIB L.I., WITZELL J., LENMAN M., LILJEROTH E., ANDREASSON E. (2013): *Sugar beet extract induces defence against Phytophthora infestans in potato plants*, «European Journal of Plant Pathology», 136, pp. 261-271.
- NÁVAROVÁ H., BERNSDORFF F., DÖRING A.C., ZEIER J. (2012): *Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity*, «The Plant Cell», 24, pp. 5123-5141.
- NEWMAN M.A., SUNDELIN T., NIELSEN J.T., ERBS G. (2013): *MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants*, «Frontiers in Plant Science», 4, art. 139, DOI 10.3389/fpls.2013.00139.
- NITA-LAZAR M., HEYRAUD A., GEY C., BRACCINI I., LIENART Y. (2004): *Novel oligosaccharides isolated from Fusarium oxysporum L. rapidly induce PAL activity in Rubus cells*, «Acta Biochimica Polonica», 51, pp. 625-634.
- PAPASOTIRIOU F.G., VARYPATAKIS K.G., CHRISTOFI N., TJAMOS S.E., PAPLOMATAS E.J.



- (2013): *Olive mill wastes: a source of resistance for plants against Verticillium dahliae and a reservoir of biocontrol agents*, «Biological Control», 67, pp. 51-60.
- PARK S.W., KAIMOYO E., KUMAR D., MOSHER S., KLESSIG D.F. (2007): *Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance*, «Science», 318, pp. 113-116.
- PAUL P.K., SHARMA P.D. (2002): *Azadirachta indica leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 61, pp. 3-13.
- PIETERSE C.M., ZAMIOUDIS C., BERENDSEN R.L., WELLER D.M., VAN WEES S.C., BAKKER P.A. (2014): *Induced systemic resistance by beneficial microbes*, «Annual Review of Phytopathology», 52, pp. 347-375.
- ROBERT-SEILANIANTZ A., GRANT M., JONES J.D. (2011): *Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism*, «Annual Review of Phytopathology», 49, pp. 317-343.
- ROMANAZZI G., MUROLO S., FELIZIANI E. (2013): *A new approach to manage phytoplasma diseases: field treatments with resistance inducers to contain grapevine Bois noir*, «Phytopathology», 103, pp. 785-791.
- ROMANAZZI G., MANCINI V., FELIZIANI E., SERVILI A., ENDESHAW S., NERI D. (2016a): *Impact of alternative fungicides on grape downy mildew control and vine growth and development*, «Plant Disease», in stampa, DOI 10.1094/PDIS-05-15-0564-RE.
- ROMANAZZI G., FELIZIANI E., BAUTISTA-BAÑOS S., SIVAKUMAR D. (2016b): *Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment*, «Critical Reviews in Food Science and Nutrition», in stampa, DOI 10.1080/10408398.2014.900474.
- SCHREIBER K., DESVEAUX D. (2008): *Message in a bottle: Chemical biology of induced disease resistance in plants*, «The Plant Pathology Journal», 24, pp. 245-268.
- SEGARRA G., SANTPERE G., ELENA G., TRILLAS I. (2013): *Enhanced Botrytis cinerea resistance of Arabidopsis plants grown in compost may be explained by increased expression of defense-related genes, as revealed by microarray analysis*, «PLoS One», 8, e56075, DOI 10.1371/journal.pone.0056075.
- SHAH J., CHATURVEDI R., CHOWDHURY Z., VENABLES B., PETROS R.A. (2014): *Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance*, «The Plant Journal», 79, pp. 645-658.
- SHINYA T., MÉNARD R., KOZONE I., MATSUOKA H., SHIBUYA N., KAUFFMANN S., MATSUOKA K., SAITO M. (2006): *Novel  $\beta$ -1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from Alternaria alternata 102 for defense responses in tobacco*, «The FEBS Journal», 273, pp. 2421-2431.
- SIVAKUMAR D., BAUTISTA-BAÑOS S. (2014): *A review on the use of essential oils for post-harvest decay control and maintenance of fruit quality during storage*, «Crop Protection», 64, pp. 27-37.
- SLAUGHTER A., DANIEL X., FLORS V., LUNA E., HOHN B., MAUCH-MANI B. (2012): *Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress*, «Plant Physiology», 158, pp. 835-843.
- SONG Y.Y., YE M., LI C.Y., WANG R.L., WEI X.C., LUO S.M., ZENG R.S. (2013): *Priming of anti-herbivore defense in tomato by arbuscular mycorrhizal fungus and involvement of the jasmonate pathway*, «Journal of Chemical Ecology», 39, pp. 1036-1044.
- STADNIK M.J., DE FREITAS M.B. (2014): *Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers*, «Tropical Plant Pathology», 39, pp. 111-118.
- TRDÁ L., FERNANDEZ O., BOUTROT F., HÉLOIR M.-C., KELLONIEMI J., DAIRE X., ADRIAN M., CLÉMENT C., ZIPFEL C., DOREY S., POINSSOT B. (2014): *The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic*

- growth-promoting bacterium Burkholderia phytofirmans and plant pathogenic bacteria*, «New Phytologist», 201, pp. 1371-1384.
- VAN HULTEN M., PELSER M., VAN LOON L.C., PIETERSE C.M.J., TON J. (2006): *Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», 103, pp. 5602-5607.
- VECHET L., BURKETOVA L., SINDELAROVA M. (2009): *A comparative study of the efficiency of several sources of induced resistance to powdery mildew (Blumeria graminis f.sp. tritici) in wheat under field conditions*, «Crop Protection», 28, pp. 151-154.
- VERA J., CASTRO J., CONTRERAS R.A., GONZÁLEZ A., MOENNE A. (2012): *Oligo-carra-geenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi)*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 79, pp. 31-39.
- VERGNES S., LADOUCE N., FOURNIER S., FERHOUT H., ATTIA F., DUMAS B. (2014): *Foliar treatments with Gaultheria procumbens essential oil induce defense responses and resistance against a fungal pathogen in Arabidopsis*, «Frontiers in Plant Science», 5, art. 477, DOI 10.3389/fpls.2014.00477.
- VON RAD U., MUELLER M.J., DURNER J. (2005): *Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology*, «New Phytologist», 165, pp. 191-202.
- WALTERS D.R., RATSEP J., HAVIS N.D. (2013): *Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future*, «Journal of Experimental Botany», 64, pp. 1263-1280.
- WOLSKI E.A., MALDONADO S., DALEO G.R., ANDREU A.B. (2006): *A novel  $\alpha$ -1, 3-glucan elicits plant defense responses in potato and induces protection against Rhizoctonia solani AG-3 and Fusarium solani f.sp. eumartii*, «Physiological and Molecular Plant Pathology», 69, pp. 93-103.
- YAMAGUCHI T., YAMADA A., HONG N., OGAWA T., ISHII T., SHIBUYA N. (2000): *Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean:  $\beta$ -glucan fragments from the rice blast disease fungus Pyricularia oryzae that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells*, «The Plant Cell», 12, pp. 817-826.
- YANG K.-H., HUANG C.-J., LIU Y.-H., CHEN C.-Y. (2011): *Efficacy of probenazole for control of southern corn leaf blight*, «Journal of Pesticide Science», 36, pp. 235-239.
- YOGEV A., RAVIV M., HADAR Y., COHEN R., WOLF S., GIL L., KATAN J. (2010): *Induced resistance as a putative component of compost suppressiveness*, «Biological Control», 54, pp. 46-51.
- ZHANG W., HAN D.Y., DICK W.A., DAVIS K.R., HOITINK H.A.J. (1998): *Compost and compost water extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and Arabidopsis*, «Phytopathology», 88, pp. 450-455.
- ZUPPINI A., BALDAN B., MILLIONI R., FAVARON F., NAVAZIO L., MARIANI P. (2004): *Chitosan induces  $Ca^{2+}$ -mediated programmed cell death in soybean cells*, «New Phytologist», 161, pp. 557-568.
- ZWART D.C., KIM S.-H. (2012): *Biochar amendment increases resistance to stem lesions caused by Phytophthora spp. in tree seedlings*, «HortScience», 47, pp. 1736-1740.

## Uso di microrganismi benefici del suolo (funghi micorrizici arbuscolari e batteri rizosferici) come agenti di contenimento delle malattie delle piante

In condizioni di campo, le piante interagiscono con un gran numero di microorganismi, nocivi o benefici. Questi ultimi comprendono i funghi micorrizici arbuscolari (AM) e i batteri promotori della crescita delle piante (PGPB).

I funghi AM, tutti classificati oggi nel phylum Glomeromycota (Schüëßler e Walker, 2010), stabiliscono un'interazione mutualistica con le radici della maggior parte delle piante vascolari, dalle Pteridofite alle Angiosperme (Smith and Read, 2008). La simbiosi AM è stata ripetutamente messa in relazione con il miglioramento della salute, della crescita e della capacità di tollerare stress abiotici (come la siccità, la scarsa disponibilità di nutrienti, la salinità, la presenza di metalli pesanti, ecc. – Gamalero et al., 2010a; Lingua et al., 2008) e biotici (come i funghi patogeni delle radici e gli insetti – Trotta et al., 1996; Guerrieri et al., 2004; Berta et al., 2005) nell'ospite vegetale. Essi vengono considerati potenziali agenti di biocontrollo, e la riduzione della crescita del patogeno è generalmente ascrivita a fenomeni di competizione e all'induzione di reazioni di difesa da parte della pianta (Pozo et al., 2002). Il nostro gruppo di ricerca si è occupato da tempo di questi aspetti, nell'ambito di numerosi progetti, due dei quali europei, utilizzando come sistema sperimentale il pomodoro, colonizzato o no da un fungo AM, e infettato o no con i funghi patogeni *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* o *Rhizoctonia solani*. In entrambi i casi, il fungo AM riduceva significativamente la malattia indotta dal patogeno, e l'effetto era ancora più evidente in presenza di batteri rizosferici, con una chiara azione sinergica (Trotta et al., 1996; Berta et al., 2005).

\* Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università del Piemonte Orientale

\*\* Mybasol s.r.l., Alessandria

In seguito al rilascio di essudati radicali, numerosi batteri del suolo si localizzano sulle o attorno le radici delle piante, trovando abbondanti fonti di nutrienti. In relazione al grado di intimità con la radice, i PGPB possono formare simbiosi con le piante occupando strutture specializzate (es. i noduli); legarsi alla superficie delle radici; colonizzare i tessuti interni delle radici, comportandosi come endofiti (Vessey, 2003). I PGPB, in aggiunta al miglioramento della crescita, possono esercitare attività soppressiva nei confronti delle malattie che originano dal suolo. La stimolazione diretta è mediata da diversi meccanismi, tra i quali il miglioramento della nutrizione minerale (attraverso la fissazione dell'azoto, la solubilizzazione del fosfato e la chelazione del ferro), la produzione di fitormoni (tra i quali le auxine, le citochinine e le gibberelline) e le modificazioni dell'architettura radicale (Glick, 1995; Gamalero et al., 2002). Alla base del contenimento dei microrganismi patogeni delle piante vi sono la competizione per la colonizzazione di siti o nutrienti, la produzione di antibiotici ed enzimi, e l'induzione di resistenza sistemica nei confronti dei patogeni (Raaijmakers et al., 2009). In aggiunta, anche gli stress biotici e abiotici possono essere meglio tollerati dalla pianta in presenza di batteri che esprimano l'enzima 1-aminocyclopropano-1-carbossilato (ACC) deaminasi. Questo enzima batterico scinde l'ACC di origine vegetale, che è il precursore immediato dell'etilene, prevenendo l'accumulo di livelli di etilene che potrebbero inibire la crescita (Glick, 2014).

L'uso di funghi AM e di PGPB è stato proposto per contrastare le fitoplasmosi. Il primo lavoro in assoluto sull'argomento riguardava il pomodoro colonizzato dal fungo *Glomus mosseae* BEG12 e infettato con un fitoplasma del gruppo Stolbur. Questo studio, condotto dal nostro gruppo di ricerca, dimostrò che le piante micorrizate e infettate dal fitoplasma presentano sintomi meno severi e, soprattutto, che le cellule batteriche mostrano segni di degenerazione, quali l'agglutinazione, il confinamento del citoplasma alla periferia della cellula e un ridotto numero di ribosomi (Lingua et al., 2002). L'effetto positivo dei funghi AM fu successivamente confermato da Garcia-Chapa et al. (2004) in portainnesto di pero e da Kamińska et al. (2010) in pervinca.

Risultati simili sono stati ottenuti, ancora una volta nel nostro laboratorio, inoculando piante di *Chrysanthemum carinatum*, infettate o meno con il fitoplasma del giallume del crisantemo "*Candidatus Phytoplasma asteris*" strain CYP, con *Pseudomonas putida* S1PflRif. Questo ceppo appartiene alle pseudomonadali fluorescenti ed è stato isolato nel suolo adiacente a una vite asintomatica, circondata da piante con chiari sintomi di infezione da fitoplasma (Gamalero et al., 2010b; Sampò et al., 2012). Rimaneva tuttavia da

determinare quale fosse il meccanismo o i meccanismi alla base del fenomeno osservato.

Un ulteriore passo fu compiuto con la simultanea inoculazione di funghi AM e PGPB. Piante di *C. carinatum* sottoposte a doppia inoculazione con *G. mosseae* e *P. putida* S1Pf1Rif, sono state messe in contatto con le cicaline vettore del “*Ca. P. asteris*”. Sebbene i due simbionti non abbiano influenzato la moltiplicazione dei fitoplasmi, e solo in parte la loro vitalità, come dimostrato con nuovi metodi molecolari, essi fornirono alcune forme di resistenza al fitoplasma: le piante trattate con entrambi i simbionti esposte alle cicaline vettore che risultavano sintomatiche erano meno di un terzo rispetto a quelle non trattate (7% contro il 26%). Inoltre, l’inoculazione simultanea dava luogo a un ritardo nella comparsa dei sintomi nelle piante non resistenti, al miglioramento della crescita della porzione aerea delle piante infette e a modificazioni dell’architettura dell’apparato radicale che suggerivano lo sviluppo di un sistema vegetativo più efficiente e attivo (D’Amelio et al., 2011).

Visti i risultati incoraggianti e tenendo presente che il nostro obiettivo era il miglioramento delle condizioni di salute di viti affette da flavescenza dorata, è stato ritenuto opportuno ricorrere a un sistema sperimentale diverso, la pervinca, pianta ornamentale in grado di ospitare il fitoplasma della flavescenza dorata (FDP). In questo caso, il batterio inoculato sulle piante era *Pseudomonas migulae* 8R6 un endofita in grado di colonizzare i tessuti interni delle piante stabilendo quindi una relazione intima con essa, e capace di sintetizzare l’enzima ACC deaminasi. Grazie alla collaborazione con il professor Bernard Glick dell’Università di Waterloo (Canada) abbiamo avuto l’opportunità di disporre di un mutante del ceppo batterico, deficiente nella sintesi dell’enzima. In questo modo è stato possibile verificare l’ipotesi che un batterio produttore di ACC deaminasi potesse indurre una migliore resistenza o tolleranza nella pianta infestata dal fitoplasma della flavescenza dorata. L’effetto più rilevante dell’inoculo delle piante con questo ceppo batterico è stato osservato, come ci si attendeva, a livello dell’espressione dei sintomi. Infatti, il 93% delle piante infettate da FDP ma non inoculate con il ceppo batterico erano sintomatiche. Questo valore si riduceva al 53% nelle piante inoculate con *P. migulae* 8R6 produttore di ACC deaminasi. Al contrario, l’inoculo con il mutante difettivo nella sintesi di ACC deaminasi riduceva in modo non significativo la frequenza di piante sintomatiche. Oltre all’espressione dei sintomi, di sicuro interesse era anche la valutazione della quantità di cellule di fitoplasma all’interno delle foglie della pianta ospite. Grazie a tecniche molecolari abbiamo potuto riscontrare che l’inoculo con il ceppo batterico produttore di ACC deaminasi riduceva in modo non significativo il titolo del fitoplasma. Tuttavia, la non significatività del risultato

era legata al fatto che nel 40% delle piante il quantitativo di DNA del fitoplasma era al di sotto del limite soglia del metodo (Gamalero et al., accettato per pubblicazione).

Alla luce di questi risultati, e di altri presenti in letteratura (Masoero et al., 2015) si è quindi passati alla sperimentazione su vite (cv. Barbera), sia su barbatelle sia su piante adulte, in condizioni di pieno campo e con un programma di monitoraggio a medio termine.

Risultati preliminari ottenuti in vigneti diversi, mostrano che le piante inoculate con funghi AM e batteri PGPB sembrano mantenere stabile la loro condizione sintomatologica, in una situazione in cui il trattamento di controllo presenta un inasprimento dei sintomi da FD; i batteri endofiti hanno un effetto maggiormente benefico nel miglioramento dei sintomi rispetto all'inoculo misto di funghi AM e batteri PGPB: il trattamento con batteri endofiti sembra alleviare la sintomatologia delle piante. Comunque, in entrambi i trattamenti con microorganismi sono stati osservati miglioramenti nella sintomatologia da flavescenza dorata.

È inoltre in corso uno studio metagenomico per identificare i microrganismi presenti nell'apparato radicale e nella porzione epigea delle piante sane e di quelle infettate da fitoplasmi, per valutare le differenze nel microbioma delle piante nelle due condizioni e individuare così microrganismi potenzialmente utili per interventi terapeutici o preventivi.

Questo progetto è stato presentato presso il servizio fitosanitario della Regione Piemonte durante un tavolo tecnico sulla lotta alla flavescenza dorata (11 giugno 2015) e rientra tra quelli esposti nel tavolo regionale per la ricerca sui fitoplasmi presso l'Istituto Penna di Asti il 1 luglio 2015. Inoltre, il presente studio rientra nel lavoro di tesi di Dottorato di Ricerca "Chemistry and Biology", del dottor Gabriele Daglio, dal titolo: "Uso di elicitori biotici di resistenza nella lotta alla flavescenza dorata della vite e metodi innovativi di rilevamento dei sintomi".

#### RIASSUNTO

Sono qui descritti alcuni dei più importanti risultati ottenuti dagli Autori sugli effetti indotti da funghi micorrizici arbuscolari e batteri promotori della crescita, da soli o in combinazione, in piante sottoposte a stress biotici (funghi patogeni e fitoplasmi). Vengono inoltre descritti i possibili meccanismi coinvolti nelle risposte di difesa della pianta nei confronti di patogeni. I risultati presentati suggeriscono e confermano il possibile uso di microrganismi benefici del suolo come agenti di biocontrollo delle malattie delle piante.

## ABSTRACT

The paper presents the most relevant results obtained by the Authors on the effects induced by arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria, alone or in combination, in plants subjected to biotic stresses (pathogenic fungi and phytoplasmas). The mechanisms involved in the plant defense responses are tentatively explained. The results here described confirm and suggest the possible use of soil beneficial microorganisms as biocontrol agents of plant diseases.

## BIBLIOGRAFIA

- BERTA G., SAMPÒ S., GAMALERO E., MASSA N., LEMANCEAU P. (2005): *Suppression of Rhizoctonia root-rot of tomato by Glomus mosseae BEG12 and Pseudomonas fluorescens A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on root morphogenesis*, «European Journal of Plant Pathology», 111, pp. 279-288.
- D'AMELIO R., BERTA G., GAMALERO E., MASSA N., AVIDANO L., CANTAMESSA S., D'AGOSTINO G., BOSCO D., MARZACHÌ C. (2011): *Increased plant tolerance against chrysanthemum yellows phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris') following double inoculation with Glomus mosseae BEG12 and Pseudomonas putida SIPf1Rif*, «Plant Pathology», 60, pp. 1014-1022.
- GAMALERO E., MARTINOTTI M.G., TROTTA A., LEMANCEAU P., BERTA G. (2002): *Morphogenetic modifications induced by Pseudomonas fluorescens A6RI and Glomus mosseae BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions*, «New Phytologist», 155, pp. 293-300.
- GAMALERO E., BERTA G., MASSA N., GLICK B.R., LINGUA G. (2010a): *Interactions between Pseudomonas putida UW4 and Gigaspora rosea BEG9 and their consequences on the growth of cucumber under salt stress conditions*, «Journal of Applied Microbiology», 108, pp. 236-245.
- GAMALERO E., D'AMELIO R., MUSSO C., CANTAMESSA S., PIVATO B., D'AGOSTINO G., DUAN J., BOSCO D., MARZACHÌ C., BERTA G. (2010b): *Effects of Pseudomonas putida SIPf1Rif against chrysanthemum yellows phytoplasma infection*, «Phytopathology», 100, pp. 805-813.
- GARCIA-CHAPA M., BATLLE A., REKAB D., ROSQUETE M.R., FIRRAO G. (2004): *PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas*, «Journal of Microbiological Methods», 56, pp. 231-242.
- GLICK B.R. (1995): *The enhancement of plant-growth by free-living bacteria*, «Canadian Journal of Microbiology», 41, pp. 109-117.
- GLICK B.R. (2014): *Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world*, «Microbiology Research», 169, pp. 30-39.
- GUERRIERI E., LINGUA G., DIGILIO M.C., MASSA N., BERTA G. (2004): *Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour?* «Ecological Entomology», 29, pp. 753-756.
- KAMIŃSKA M., KLAMKOWSKI K., BERNIAK H., SOWIK I. (2010): *Response of mycorrhizal periwinkle plants to aster yellows phytoplasma infection*, «Mycorrhiza», 20, pp. 161-166.
- LINGUA G., D'AGOSTINO G., MASSA N., ANTOSIANO M., BERTA G. (2002): *Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato*, «Mycorrhiza», 12, pp. 191-198.

- LINGUA G., FRANCHIN C., TODESCHINI V., CASTIGLIONE S., BIONDI S., BURLANDO B., PARRAVICINI V., TORRIGIANI P., BERTA G. (2008): *Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones*, «Environmental Pollution», 153, pp. 137-147.
- MASOERO G., GIOVANNETTI G., BERTERO E., CUGNETTO A. (2015): *Il pH della vite e della flavescenza dorata*, «OICCE TIMES», 62, pp. 19-22.
- POZO M.J., SLEZACK-DESCHAUMES S., DUMAS-GAUDOT E., GIANINAZZI S. AND AZCON-AGUILAR C. (2002): *Plant defence responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi*, in: *Mycorrhizal Technology in Agriculture: from Genes to Bioproducts* editors: S. Gianinazzi, H. Schüepp, J.M. Barea, K. Haselwnadter, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 103-112.
- RAAIJMAKERS J.M., PAULITZ T.C., STEINBERG C., ALABOUVETTE C., MOËNNE-LOCCHOZ Y. (2009): *The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms*, «Plant Soil», 321, pp. 341-361.
- SAMPÒ S., MASSA N., CANTAMESSA S., D'AGOSTINO U., BOSCO D., MARZACHI C., BERTA G. (2012): *Effects of two AM fungi on phytoplasma infection in the model plant Chrysanthemum carinatum*, «Agricultural and Food Science», 21, pp. 39-51.
- SCHÜSSLER A., WALKER C. (2010): *The Glomeromycota: a species list with new families and genera*, Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University, pp. 1-58.
- SMITH S.E., READ D.J. (2008): *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 3. Academic Press, New York
- TROTTA A., VARESE G.C., GNAVI E., FUSCONI A., SAMPÒ S., BERTA G. (1996): *Interactions between the soilborne root pathogen Phytophthora nicotianae var parasitica and the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae in tomato plants*, «Plant Soil», 185, pp. 199-209.
- VESSEY J.K. (2003): *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*, «Plant Soil», 255, pp. 571-586.



## La resistenza transgenica indotta dal patogeno: un'applicazione biotecnologica poco utilizzata

### INTRODUZIONE

Secondo le più recenti stime dell'organizzazione internazionale ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, USA), una superficie cumulativa di oltre 1,8 miliardi di ettari (ha) è stata investita nel mondo a colture geneticamente modificate (GM) a partire dal 1996, anno che ha visto la nascita dei primi impianti commerciali. Da allora, tra i 160 e i 180 milioni di ha vengono annualmente destinati nel mondo a questo tipo di coltivazioni, con un incremento annuo di circa il 4% rispetto agli 1,7 milioni di ha del 1996. Nel 2014, 28 diversi Paesi, equamente distribuiti tra industrializzati e in via di sviluppo, hanno adottato colture GM e, nello stesso anno, 18 milioni di agricoltori (7,1 milioni in Cina e 7,7 milioni in India) il 96% dei quali costituiti da piccoli proprietari, hanno coltivato oltre 15 milioni di ha di cotone Bt, mentre 415 mila piccoli coltivatori filippini hanno allevato mais GM.

Tra i Paesi in cui le coltivazioni GM sono liberalizzate, gli Stati Uniti sono in testa con oltre 73 milioni di ha, che forniscono il 93% del mais, il 94% della soia e il 96% del cotone prodotti nel Paese; il Brasile segue dappresso con 40 milioni di ha tra mais, soia e cotone (il 98% della soia prodotta è transgenica); l'Argentina è al terzo posto con 24 milioni di ha tra mais, soia e cotone (la totalità della soia è GM); l'India è quarta con 12 milioni ha di cotone Bt che costituiscono il 95% della coltura globale; il Canada è al quinto posto con 12 milioni ha di colza GM, pari al 95% della coltura globale, e coltiva anche mais e soia GM.

\* Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

\*\* Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, UOS Bari

Questi imponenti dati danno la misura di quanto le biotecnologie abbiano influenzato l'agricoltura mondiale, e come ci si possa ragionevolmente attendere un'ulteriore espansione delle piante GM, sia nei Paesi che già le adottano, che in quelli che ne stanno considerando l'utilizzazione. Infatti, vi è già una lista di oltre 70 nuovi prodotti GM che attendono l'approvazione per entrare nel circuito commerciale (James, 2014).

E la vecchia Europa? Non è improbabile che anch'essa capitoli, ancorché nei tempi non brevi, seguendo l'esempio dei pochi membri UE (Spagna, Portogallo, Repubblica Ceca, Romania, Slovacchia) che hanno "coraggiosamente" iniziato la coltivazione di mais transgenico nel loro territorio (James, 2014), e facendo mente locale alla marchiana incongruenza comunitaria, che permette l'importazione di fibre GM (cotone) e prodotti GM (mais, soia, colza) per uso alimentare umano e animale (le importazioni annue della sola soia ammontano a circa 40 milioni di tonnellate) ma non la coltivazione delle piante che li producono.

#### COLTURE GM: UNA BREVE SINTESI

Da quanto sopra, emerge che le colture GM che attualmente la fanno da padrone sono soia, mais e cotone. La prima resiste ad alcuni erbicidi (glifosate, imidazolinone), le altre due a insetti: piralide e diabrotica (mais), *Helicoverpa armigera* (cotone).

Assai meno frequenti sono le piante ingegnerizzate per la resistenza alle malattie fungine e batteriche. Un elenco relativamente recente di queste (patata, mais, soia, girasole, pioppo, frumento, orzo, riso, tabacco, cotone, pomodoro), dei geni usati per la trasformazione e dei patogeni cui è stata introdotta resistenza è riportato da Collings et al. (2008). Tuttavia questi risultati sperimentali, ancorché promettenti, non hanno ancora dato vita a prodotti commerciali (Anonimo, 2015).

Più incoraggiante, anche per i risultati pratici già conseguiti, è la situazione delle piante GM trasformate per la resistenza ai virus.

Contro questi patogeni non si può contare sulla lotta chimica e gli interventi biologici (protezione incrociata), sperimentati con qualche successo in un recente passato (Zhou e Zhou, 2012) per alcune colture (cacao, papaia, pomodoro, zucchini, agrumi), sono ormai caduti in disuso, eccetto che per la protezione dal ceppo "stem pitting" del virus della tristezza degli agrumi (Roistacher et al., 2010). Ciò rende obbligato il ricorso al miglioramento genetico. Quello tradizionale (reperimento di geni di resistenza in specie

sessualmente compatibili con la coltura da migliorare e loro trasferimento con l'incrocio) è utilizzabile ogniqualvolta esistano i presupposti per poterlo applicare (Gomez et al., 2009). E di ciò non mancano esempi di successo, come quelli, tanto per citarne un paio, relativi alla introgressione di resistenze durevoli ai virus A (PVA), M (PVM), S (PVS), X (PVX) e Y (PVY) (Foxe, 1992) in diverse cultivars di patata, e ai virus del mosaico del cetriolo (CMV), della maculatura anulare della papaia (PRSV), del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV) e della maculatura necrotica del melone (MNSV) nel melone (Blanchard et al., 1991). Tuttavia non è sempre facile trovare fonti di resistenza naturali efficaci o trasferibili nelle specie coltivate da quelle selvatiche che li possiedono. Per superare questa impasse ci si può rivolgere all'uso della "resistenza derivata da patogeno" (pathogen-derived resistance, PDR), un'applicazione biotecnologica basata sul DNA ricombinante, che ha visto la luce una trentina di anni addietro (Sanford e Johnston, 1985) aprendo la via alla resistenza transgenica che rappresenta il più avanzato esempio di resistenza non convenzionale, la cui prima dimostrazione sperimentale va accreditata a Powell-Abel et al. (1986).

Le resistenza transgenica ai virus si esplica attraverso due principali meccanismi denominati "resistenza indotta da proteine" (protein-mediated resistance) e "resistenza indotta da acido ribonucleico" (RNA-mediated resistance).

La prima modalità di protezione è stata accertata in piante trasformate con la proteina capsidica (CP) di alcune entità infettive, tra cui gli agenti del mosaico del tabacco (TMV), del mosaico dell'erba medica (AMV), nonché il virus X della patata (PVX). In questi casi, la resistenza è proporzionale alla quantità di CP virale espressa dalla pianta transgenica ed è superata dalla inoculazione della pianta trasformata con RNA virale totalmente o parzialmente nudo. Si ritiene che il meccanismo che sottende a questo tipo di resistenza sia in qualche modo collegato all'interferenza con la decapsidazione del virus, il cui RNA diventa indisponibile per l'aggancio dei ribosomi e per le susseguenti fasi replicative (Prins et al., 2008).

Il secondo meccanismo, noto come "silenzamento genico post trascrizionale" (PTGS) comporta l'inattivazione dell'RNA genomico virale attraverso un processo degradativo sequenza-specifico. Il PTGS non è un sistema immunitario, ancorché abbia tre caratteristiche in comune con quello dei vertebrati: (i) specificità verso elementi invasori estranei (acidi nucleici nel caso del PTGS); (ii) capacità di sviluppare e amplificare una massiccia risposta contro di essi; (iii) capacità di diffondersi sistemicamente nell'ospite.

La provata efficacia del PTGS non sembra essere condizionata dai geni

virali usati per la trasformazione. Tra questi, i più largamente utilizzati sono quelli che esprimono le proteine capsidiche, replicasiche, di movimento e, con minore frequenza, proteine non strutturali di diversi tipi quali, ad esempio, i geni Rep dei geminivirus e le proteasi NI, proteina P1 e HCPro dei potyvirus. L'adeguatezza di questi transgeni nella induzione di resistenza è stata ampiamente dimostrata mediante la trasformazione di tabacchi (*Nicotiana tabacum* e *N. benthamiana* in particolare) con sequenze geniche di oltre 50 diversi fitovirus, per lo più a RNA, appartenenti a una vasta gamma di raggruppamenti tassonomici (famiglie) con differenti comportamenti epidemiologici (Cillo e Palukaitis, 2014).

Poiché oggetto di trasformazione sperimentale sono state anche piante agrarie di importanza economica (si veda tra gli altri Fuchs et al., 2007), ci si sarebbe atteso che l'imponente sperimentazione condotta nell'ultimo ventennio sfociasse nella produzione e adozione commerciale di piante GM resistenti ai virus. Non è stato così, se non in un numero limitato di casi.

Tra questi, il maggiore successo ha arriso alle papaie (*Carica papaya*) GM trasformate per la resistenza al potyvirus della maculatura anulare (PRSV), che nelle Hawaii ne hanno rimesso in piedi la coltura che era stata praticamente distrutta dal virus in questione (Gonsalves, 1988; Gonsalves et al., 2004), e che si stanno aprendo il varco anche altrove. Altri esempi sono costituiti da: (i) una zucca (crookneck squash) trasformata per la resistenza ai potyvirus del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV) e del mosaico 2 dell'anguria (WMV-2) (Fuchs e Gonsalves, 1995), coltivata negli USA (Tricoli et al., 1995); (ii) il susino 'Honey sweet' resistente al virus della vaiolatura (PPV), sviluppato in Europa (Ravelonandro et al., 1997; 2013) ma ammeso alla coltivazione negli USA; (iii) il fagiolo "EMBRAPA 5.1", resistente al begomovirus del mosaico dorato del fagiolo (BGMV), ottenuto di recente in Brasile (Faria et al., 2014). Assai poco in rapporto al molto lavoro sperimentale effettuato nel mondo (Europa inclusa).

Queste scarse ricadute pratiche sembrano dovute non già alla inefficacia dell'approccio transgenico che, quando ha avuto la possibilità di un riscontro di campo ha finora dimostrato indubbia validità, ma piuttosto alla perdurante ostilità verso le piante GM che ha scoraggiato le ricerca pubblica, che pure qualche successo l'ha conseguito (Fuchs e Gonsalves, 1995; Gonsalves et al., 2004; Ravelonadro et al., 1997).

È sperabile che quanto di seguito riportato contribuisca a contenere la sfiducia dei consumatori nei riguardi della sicurezza degli alimenti di origine GM?

## I TRANSGENI NATURALI

Nel genoma della vite cv. Pinot noir, interamente sequenziato di recente, è stata riscontrata la presenza di frammenti nucleotidici di 200-800 basi appartenenti a diversi “pararetrovirus” della famiglia *Caulimoviridae* (Bertsch et al., 2009). Un reperto, questo, né nuovo né sorprendente, poiché analoghe inserzioni genomiche di origine virale erano state rilevate oltre una decina di anni addietro in altre specie vegetali quali, ad esempio, pomodoro, patata, petunia, tabacchi (*Nicotiana* spp.), orzo e banana (Harper et al., 2002).

I “pararetrovirus” sono virus a DNA, agenti di malattie di rilevanza economica, che infettano in natura un’ampia gamma di piante agrarie e non. Essi sono stati così denominati per distinguerli dai “retrovirus” dei vertebrati, che hanno genoma a RNA e che annoverano temibili rappresentanti quali, ad esempio, il virus dell’immunodeficienza umana (HIV), responsabile dell’AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita).

A parte le differenze nella morfologia delle particelle e nei meccanismi di diffusione naturale (epidemiologia), ciò che distingue i due tipi di virus è, come si è accennato, il diverso tipo di acido nucleico che ne costituisce il patrimonio genetico (RNA o DNA). Ciò che invece li accomuna è: (i) l’intervento nel loro ciclo replicativo di un enzima noto come trascrittasi inversa (o retrotrascrittasi, da cui la denominazione degli agenti infettivi che la posseggono), in grado di sintetizzare molecole di DNA da uno stampo di RNA; (ii) la capacità di integrarsi nel genoma dell’ospite a seguito di ricombinazione genica (trasferimento orizzontale).

Ma anche quest’ultima caratteristica è fonte di differenziazione poiché, mentre nei vertebrati è l’intero genoma virale che si disloca in quello della cellula ospite trasformandola, ciò avviene più di rado nei vegetali, nei quali si conoscono solo tre esempi (banana, petunia e tabacco) di integrazione di un genoma pararetrovirale completo (Staginnus and Richert-Poggeler, 2006). Questi eventi sfociano nella “nascita” di veri e propri virus endogeni che si trasmettono alla progenie (trasferimento verticale) e che di norma sono silenti, ma in grado di attivarsi a seguito di stress (ferita, estremi termici, siccità, modifica del fotoperiodo), dando origine a malattie analoghe a quelle prodotte da infezioni esogene.

Sin qui la similitudine, anche comportamentale, tra virus retroidi degli animali e delle piante. In queste ultime, tuttavia, è stata più di frequente riscontrata la presenza non di interi genomi virali (come nella vite, ad esempio), bensì di loro frammenti, costituiti da sequenze nucleotidiche ripetute che si integrano in loci diversi dei loro cromosomi.

Sembra evidente che queste incomplete inserzioni esogene non possano generare malattie. Ci si è pertanto chiesti se esse abbiano un qualche significato per la pianta che li ospita, e quali funzioni eventualmente svolgano. Una possibile risposta la si è trovata in quanto già detto sul meccanismo che sottende alla “resistenza indotta dal patogeno” che si scatena nelle piante GM trasformate con geni virali. È plausibile infatti che le sequenze pararetrovirali endogene rappresentino dei veri e propri “transgeni naturali” i cui RNA verrebbero individuati dalle cellule ospiti come invasori, mettendo così in moto il sistema di silenziamento genico della pianta, a protezione dall’infezione di virus esogeni dello stesso tipo. E che i “transgeni naturali” non siano una “rara avis”, trova conferma nella recente individuazione di inserti di sequenze di *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* in numerosi genotipi (45 su 217) di patate dolci (*Ipomea batata*) coltivate e selvatiche (Kyndt et al., 2015).

La morale di questa storia è che l’inserimento di geni virali nel genoma delle piante, che determina sviluppo di resistenza alle infezioni da virus omologhi, è un fenomeno naturale che si ritiene abbia preso corpo nel corso del processo co-evolutivo ospite-virus. L’uomo, pertanto, con le recenti applicazioni biotecnologiche (ingegneria genetica), non ha fatto altro che imitare quanto la natura aveva già da lungo tempo messo in opera. E questo, con buona pace di coloro che avversano l’uso dell’ingegneria genetica in agricoltura, ritenendola una manipolazione pericolosa per la salute, nonché innaturale ed eticamente riprovevole.

#### CISGENESI CONTRO TRANSGENESI

La “cisgenesi” è una forma di ingegneria genetica che prevede il trasferimento artificiale di singoli geni tra organismi incrociabili della stessa specie o tra organismi strettamente correlati ma non necessariamente incrociabili tra loro. A essa ci si riferisce come “intragenesi” quando si utilizzano geni ibridi che possiedono elementi genetici derivanti da geni e loci differenti. Questi approcci riducono di molto i tempi richiesti dal miglioramento genetico tradizionale basato su incrocio e reincrocio (Jacobsen e Schouten, 2007).

Pertanto, a differenza dalla “transgenesi”, la cisgenesi non utilizza geni derivati da organismi biologicamente assai distanti tra loro (ad es. virus, batteri e altri microrganismi, mammiferi) ed estranei alle piante per l’introduzione in queste ultime.

Recenti esempi di cisgenesi coronata da successo sono le piante di melo (cv. Gala) che il trasferimento del gene *HcrVf2* da *Malus floribunda* ha reso resistenti alla ticchiolatura (*Venturia inaequalis*) (Belfanti et al., 2004; Vanblaere et al., 2011) e tre differenti cultivars di patata, in cui è stata introdotta una coppia di geni da *Solanum stoloniferum* e *S. venturii* per la resistenza alla peronospora (*Phytophthora infestans*) (Jo et al., 2014).

L'adozione nella UE delle patate cisgeniche potrebbe contribuire a un forte abbattimento delle perdite annualmente inflitte dalla peronospora, valutate in oltre un miliardo di € sui 6 miliardi di € del valore commerciale della produzione (Havenkort et al., 2008). Resta però da vedere sia quale sarà l'atteggiamento della UE che, in base alla direttiva 2001/18/EC sulle colture GM non fa distinzione tra transgeni e cisgeni, sia il grado di accettazione dei prodotti cisgenici da parte dei consumatori che, come già detto, sono per larga parte fortemente avversi alle odierne piante GM.

#### RIASSUNTO

Tra le molteplici applicazioni pratiche della transgenesi, vi è il suo uso per l'induzione di resistenza ai virus mediata da geni virali ("pathogen-derived resistance", resistenza derivata dal patogeno). A tutt'oggi sono state sperimentalmente trasformate molte specie vegetali per la resistenza a una cinquantina di virus diversi ma solo due di esse vengono per il momento coltivate commercialmente su scala relativamente ampia: una varietà di papaia trasformata con la CP del virus della maculatura anulare (PRSV) negli USA e in estremo oriente (Taiwan, Cina, Thailandia) e una zucca resistente al virus del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV) e al virus 2 del mosaico dell'anguria (WMV-2) negli USA. Il susino 'Honey sweet' resistente al virus della vaiolatura dei Prunus (PPV) e un fagiolo resistente al virus del mosaico dorato (BGMV) sono stati approvati per la coltivazione negli USA e in Brasile, rispettivamente. Assai più successo hanno avuto le coltivazioni transgeniche di cinque specie vegetali resistenti a insetti (mais e cotone) o erbicidi (soia, colza, erba medica), che rappresentano la quasi totalità delle piante GM in coltura nel mondo. Nel 2014, 28 diversi Paesi equamente distribuiti tra "industrializzati" e "in via di sviluppo" hanno investito larghissime superfici (circa 180 milioni di ettari) a colture GM. Solo cinque di questi sono europei (Spagna, Portogallo, Repubblica Ceca, Romania, Slovacchia) e coltivano modeste superfici di mais GM. La contrarietà all'uso della trasformazione genetica ritenuta una manipolazione pericolosa per la salute, nonché innaturale ed eticamente riprovevole è ampiamente diffusa in Europa e difficilmente sarà scalfita dalla consapevolezza dall'accertata esistenza di piante transgeniche naturali e dalla possibilità di ricorrere alla cisgenesi, una forma di ingegneria genetica che prevede il trasferimento artificiale di singoli geni tra piante della stessa specie, così come avviene nel totalmente accettato, ma assai più lungo percorso del miglioramento genetico tradizionale.

## ABSTRACT

One of the many practical applications of transgenesis encompasses the introduction into plants of resistance to viruses mediated by viral genes ("pathogen-derived resistance"). A wide number of plant species has currently been transformed for resistance to more than 50 different viruses belonging to diverse families. However, only two transgenic plant species are grown commercially on a relatively large scale: (i) a papaya cultivar transformed with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in the USA and the far east (Taiwan, China, Thailand); (ii) a crookneck squash resistant to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and to *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2) in the USA. The plum cv. Honey sweet resistant to *Plum pox virus* (PPV) and a french bean cultivar resistant to *Bean golden mosaic virus* (BGMV) have been deregulated in the USA and Brazil, respectively, and are ready for marketing. Much more successful have been the transgenic crops of five plant species that resist to insects (maize and cotton) or to herbicides (soybean, canola, alfalfa), which constitute the largest part of GM plants being cropped in the world. In 2014, 28 different countries, equally distributed among the "industrialized" and the "developing" ones, have invested huge surfaces (ca. 180 million hectares) to GM crops growing. Only five of these countries are from Europe (Spain, Portugal, Czech Republic, Romania, Slovakia), giving over to GM maize relatively small surfaces. The widespread antagonism to the use of genetic transformation, which in Europe is regarded as an ethically reproachable and unsafe practice, is unlikely to be placated by the scientifically established existence of naturally transgenic plants nor by the possibility of resorting to the use of cisgenesis, i.e. the transfer of single genes between plants of the same species, as it happens with the unconditionally accepted but much longer course of traditional crossing.

## BIBLIOGRAFIA

- ANONIMO (2015): GMO Compass: [www.gmo-compass.org](http://www.gmo-compass.org).
- BELFANTI E., SILFVERBERG-DILWORTH E., TARTARINI S., PATOCCHI A., BARBIERI M., ZHU J., VINATZER B.A., GIANFRANCESCO L., GESSLER C., SANSAVINI S. (2004): *The HcrVf2 gene, from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety*, «Proceedings National Academy of Sciences USA», 101, pp. 886-890.
- BERTSCH C., BEUVE M., DOLJA V.V., WIRTH M., PELS F., HERRBACH E., LEMAIRE O. (2009): *Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance*, «Biology Direct», 4, pp. 21-32.
- BLANCHARD D., LECOCQ H., PITRAT M. (1991): *Maladies des Cucurbitacées. Observer, Identified, Lutter*, Editions INRA, Paris France.
- CILLO F., PALUKAITIS P. (2014): *Transgenic resistance*, «Advances in Virus Research», 90, pp. 35-146.
- COLLINGS D.B., LUND O.S., THORDAL-CHRISTENSEN H. (2008): *What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants?*, «European Journal of Plant Pathology», 121, pp. 217-231.
- FARIA J.C., VALDISSER P.A.M.R., NOGUEIRA E.O.P.L., ARAGAO F.J.L. (2014): *RNAi-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance*, «Plant Breeding», 133, pp. 649-653.
- FOX E.M. (1992): *Breeding for viral resistance: conventional methods*, «European Journal of Plant Pathology», 98, pp. 13-20.



- FUCHS M., GONSALVES D. (1995): *Resistance of transgenic squash Pavo ZW-20 expressing the coat protein genes of Zucchini yellow mosaic virus and Watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses*, «Nature Biotechnology», 13, pp. 1466-1473.
- 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 R., SILDARELLI P., STUSSI-GARAUD C., VIGNE E., ZAGRAI I. (2007): *Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insight into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance*, «Journal of Plant Pathology», 89, pp. 2-12.
- GOMEZ P., RODRIGUEZ-HERNANDEZ A.M., MOURY B., ARANDA M.A. (2009): *Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability*, «European Journal of Plant Pathology», 125, pp. 1-22.
- GONSALVES D. (1998): *Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 415-437.
- GONSALVES D., GONSALVES C., FERREIRA S., PITS K., FITCH M., MANSHARDT R., SLIGHTOM J. (2004): *Transgenic virus resistant papaya: from hope to reality for controlling Papaya ringspot virus in Hawaii*, APSnet Features. Online. doi:10.1094/APSnetFeature-2004-0704
- HARPER G., HULL R., LOCKHART B., OLSZEWSKI N. (2002): *Viral sequences integrated into plant genomes*, «Annual Review of Phytopathology», 40, pp. 119-136.
- HAVEKORT A.J., BOONEKAMP P.M., HUTTEN R., JACOBSEN E., LOTZ L.A.P., KESSEL G.J.T., VISSER R.G.F., VAN DER VOSSEN E.A.G. (2008): *Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification*, «Potato Research», 51, pp. 47-57.
- JACOBSEN E., SCHOUTEN H.J. (2007): *Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants*, «Trends in Biotechnology», 25, pp. 219-223.
- JAMES C. (2014): *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014*, ISAAA Brief No 46. ISAAA, Ithaca, NY, USA.
- JO K.R., KIM C.J., KIM S.J., KIM T.Y., BERGERVOET M., JONGSMA M.A., VISSER R.G.F., JACOBSEN E., VOSSEN J.H. (2014): *Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking*, «MBC Biotechnology», 14, pp. 50-60.
- KYNDT T., QUISPE D., ZHAI H., JARRET R., GHISLAIN M., LIU Q., GHEYSEN G., KREUZE J.F. (2015): *The genome of cultivated sweet potato contains Agrobacterium T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop*, «Proceedings National Academy of Sciences USA», 112, pp. 5844-5649.
- POWELL ABEL P., NELSON R.S., DE B., HOFFMANN N., ROGERS S.G., FRALEY R.T., BEACHY R.N. (1986): *Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene*, «Science», 232, pp. 738-743.
- PRINS M., LAIMER M., NORIS E., SCHUBERT J., WASSENEGGER M., TEPPER M. (2008): *Strategies for antiviral resistance in transgenic plants*, «Molecular Plant Pathology», 9, pp. 73-83.
- RAVELONANDRO M., SCORZA R., BACHELIER J.C., LABONNE G., LEVY L., DAMSTEEGT V., CALLAHAN A.M., DUNEZ J. (1997): *Resistance of transgenic Prunus domestica to Plum pox virus infection*, «Plant Disease», 81, pp. 1231-1235.
- RAVELONANDRO M., SCORZA R., POLAK J., CALLAHAN A.M., KRŠKA B., KUNDU J., BRIARD P. (2013): *"Honey sweet" plum - a valuable genetically engineered fruit tree cultivar*, «Food and Nutrition Sciences», 4, pp. 45-49.

- ROISTACHER C.N., DA GRACA J.V., MULLER G.W. (2010): *Cross protection against Citrus tristeza virus - a review*, Proceedings 17th Conference IOCV, Adana, Turkey, pp. 1-27.
- SANFORD J.C., JOHNSTON S.A. (1985): *The concept of parasite-derived resistance. Deriving resistance genes from the parasite's own genome*, «Journal of Theoretical Biology», 113, pp. 395-405.
- STAGINNUS C., RICHERT-PÖGGELER K.R. (2006): *Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome*, «Trends in Plant Science», 25, pp. 219-223.
- TRICOLI D., CARNEY K., RUSSELL P., MCMASTER J., GROFF D., HADDEN K., HIMMEL P., HUBBARD J., BOESHORE M., REYNOLDS J., QUEMADA H. (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*, «Nature Biotechnology», 13, pp. 1458-1465.
- VANBLAERE T., SZANKOWSKI I., SCHAARTB J., SCHOUTEN H., FLACHOWSKY H., BROGINI A.L.G., GESSLER C. (2011): *The development of a cisgenic apple plant*, «Journal of Biotechnology», 154, pp. 304-311.
- ZHOU C., ZHOU Y. (2012): *Strategies for viral cross protection in plants*, «Methods in Molecular Biology», 894, pp. 69-81.

## Problematiche connesse all'autorizzazione all'impiego dei mezzi biotecnici

I prodotti fitosanitari sono sostanze attive o miscele di sostanze attive sviluppate per controllare i parassiti delle piante come insetti, funghi patogeni, infestanti e nematodi. Al di là degli innegabili vantaggi, l'uso di queste sostanze può provocare effetti negativi indesiderati sugli organismi non bersaglio, la salute umana e l'ambiente. Per questi motivi tali sostanze sono soggette ad autorizzazione in ciascuno degli Stati membri della Unione Europea.

Il quadro normativo che regola la registrazione e impiego dei prodotti fitosanitari è principalmente composto dal Regolamento europeo N° 1107/2009 "Immissione in commercio" dei prodotti fitosanitari e dalla Direttiva europea 2009/128/CE sul loro "Uso sostenibile".

La procedura di autorizzazione prevede che un prodotto fitosanitario possa essere commercializzato in uno Stato Membro della Unione Europea solo se preventivamente autorizzato dalle Autorità competenti in materia. I prodotti fitosanitari sono autorizzati all'immissione sul mercato solamente qualora non producano effetti nocivi sulla salute umana o degli animali, non risultino pericolosi per l'ambiente, siano sufficientemente efficaci dal punto di vista agronomico e posseggano una conservabilità (shelf-life) tale da garantirne la stabilità per l'impiego. Il tutto deve essere dimostrato tramite una serie di studi e ricerche che saranno valutati da esperti in materia.

Anche gli agrofarmaci di origine biologica, agrobiofarmaci, devono seguire un processo di autorizzazione, perché naturale non significa di per sé non pericoloso.

La normativa per la autorizzazione degli agrobiofarmaci deriva da un sistema autorizzativo realizzato e strutturato per regolamentare le autorizzazioni di

\* IBMA / International Biocontrol Manufacturers Association

prodotti fitosanitari chimici di sintesi con modalità di azione tipicamente tossica e diretta.

Il formato del Dossier che deve essere sottoposto alla valutazione degli organi competenti è simile a quello per le sostanze chimiche di sintesi; prevede infatti la conduzione di una serie di studi, la organizzazione del dossier in riassunti, un approccio TIER, proposte di valutazione e conclusioni.

Vista la diversa natura e caratteristiche delle sostanze attive alcuni aspetti di questa procedura, in particolar modo le linee-guida per la conduzione degli studi, la valutazione del rischio ed efficacia dei prodotti non risultano direttamente e facilmente applicabili. A titolo esemplificativo, ma non esaustivo, basti pensare ai requisiti specifici per i microrganismi quali la biologia, il modo d'azione, la presenza e produzione di metaboliti secondari, la patogenicità, l'infettività, i fenomeni di sensibilizzazione, moltiplicazione e persistenza nell'ambiente, che differiscono completamente da quelli richiesti per una molecola di sintesi. Per contro, ci sono addirittura alcuni agrofarmaci biologici, come feromoni ed estratti vegetali, che sono regolamentati seguendo un approccio molto simile alle sostanze chimiche di sintesi anche se spesso hanno modalità d'azione indiretta e differente.

Il sistema autorizzativo attuale richiede alle aziende una serie di adempimenti che determinano un rallentamento all'ulteriore sviluppo e commercializzazione di metodi alternativi di controllo.

Sono auspicabili una serie di interventi a diversi livelli per facilitare la loro autorizzazione pur sempre garantendo un elevato grado di sicurezza della salute umana e dell'ambiente. Tra questi un approfondimento sulla sicurezza e i rischi legati all'uso degli agrobiofarmaci per aumentare la consapevolezza e la sensibilizzazione degli operatori. Importante sollecitare iniziative legislative per favorire l'introduzione di una normativa specifica per le diverse tipologie di agrofarmaci biologici. Fondamentale è la creazione e formazione di un gruppo di esperti specializzati nella valutazione di questi prodotti. Sarebbe inoltre auspicabile una collaborazione più fattiva tra aziende, enti di ricerca, organi competenti (EFSA, OECD ecc. ) per sviluppare metodiche più adeguate a valutare la reale pericolosità degli agrobiofarmaci.

Molti agricoltori già oggi considerano i prodotti di controllo biologico una valida alternativa e/o integrazione nella difesa delle proprie colture.

Questi prodotti infatti possono essere considerati strumenti estremamente utili per aiutare gli agricoltori a ridurre i livelli di residui nelle produzioni agricole. Inoltre, la combinazione di questi prodotti con quelli chimici

tradizionali in strategie di difesa integrata, permette agli operatori del settore di sviluppare programmi efficienti di gestione della resistenza, e di rispettare altre limitazioni, quali il tempo di rientro, intervallo di pre-raccolta, e le misure di sicurezza dei lavoratori.

Le aziende che operano nel settore del controllo biologico sono diventate consapevoli dell'importante ruolo che possono svolgere nel sistema agricolo europeo per migliorare la qualità dei prodotti alimentari, la tutela della salute pubblica e il raggiungimento di migliori condizioni ambientali. I prodotti fitosanitari utilizzati per il controllo biologico dei parassiti diventeranno sempre più importanti per il raggiungimento di una agricoltura sostenibile.

L'affidabilità dei prodotti fitosanitari biologici, disponibili oggi sul mercato, è notevolmente migliorata. I prodotti di controlli biologico sono ottenuti con l'utilizzo di moderne tecniche di produzione (fermentazione, separazione, estrazione, purificazione) in continua evoluzione e l'applicazione di scrupolosi controlli di qualità da parte delle aziende che operano nel settore del controllo biologico. I processi di produzione e i prodotti ottenuti sono costantemente monitorati per garantire una assoluta sicurezza degli operatori e dei consumatori e una costanza dei risultati di efficacia.

Una maggiore conoscenza sul modo d'azione e potenzialità dei prodotti e sugli effetti collaterali dei prodotti agrochimici sugli agenti di controllo biologico, hanno consentito una migliore integrazione dei mezzi tecnici di origine biologica con quelli chimici di sintesi. L'industria del controllo biologico è in grado di fornire alternative valide e affidabili per un "reale" IPM, quindi non può essere più considerato un mercato di nicchia.

Secondo MarketandMarket (2012) i biopesticidi rappresentano il 3% del mercato mondiale pari a 1.358 milioni di \$. La stessa fonte stima una crescita del 15.8% del mercato globale dei biopesticidi dal 2012 fino al 2017.

I principi attivi autorizzati negli Stati Uniti sono 279 dei quali 151 sono insetticidi mentre in Europa solamente 77 sostanze attive di cui 42 sono insetticidi.

Il periodo per ottenere una registrazione negli Stati Uniti è inferiore ai due anni mentre in Europa il periodo richiesto per la autorizzazione delle sostanze attive a livello europeo è superiore ai 4 anni, con casi in cui sono stati necessari ben 8 anni. Per commercializzare un prodotto è poi necessario chiedere una autorizzazione nel singolo Stato Membro, quindi ulteriori ritardi nella sua commercializzazione. Le indicazioni fornite da aziende associate a IBMA riguardano le tempistiche richieste per le autorizzazioni secondo la

Dir. 91/414/CEE. Uno degli obiettivi principali del Regolamento 1107/2009 è quello di creare una maggiore armonizzazione tra gli Stati Membri e una semplificazione delle procedure di autorizzazione.

Con il regolamento CE 1107/2009, sono state introdotte due nuove categorie di sostanze: quelle di base e quelle a basso rischio. Tuttavia dalla sua entrata in vigore ancora non sono ancora stati definiti i criteri per selezione delle sostanze a basso rischio così come definite nel regolamento, esistono solo criteri di esclusione, né è stata definita una procedura per la loro valutazione. Un gruppo di lavoro Europeo è stato costituito, ma il processo deve essere accelerato per avere questi prodotti sul mercato il prima possibile. In questo modo i prodotti a basso rischio saranno disponibili agli agricoltori e sarà possibile raggiungere gli obiettivi politici definiti dalla direttiva sull'Uso Sostenibile.

Sono disponibili infatti una serie di agrobiofarmaci già autorizzati in Europa che potrebbero essere considerati come sostanze a basso rischio. Secondo il Reg. 1107/2009 la valutazione dei criteri di basso rischio può avvenire solo al momento della ri-registrazione a seguito di una nuova valutazione di tutta la documentazione. Ciò significa che per molte sostanze attualmente approvate sarà necessario un massimo di dieci anni prima di poter essere considerate a basso rischio.

Sarebbe auspicabile un processo di approvazione accelerata per i prodotti a basso rischio tramite una procedura di pre-screening, che conduca ad autorizzazioni provvisorie che permettano la commercializzazione dei prodotti, seguita da una valutazione completa. Come detto in precedenza è fondamentale un adeguamento delle richieste in base alla natura delle diverse categorie di sostanze attive utilizzate nei prodotti a basso rischio.

Inoltre i prodotti a basso rischio potrebbero anche essere approvati per l'uso sicuro e sostenibile al di fuori dell'agricoltura, nelle aree sportive e ricreative, giardini e parchi, e per gli usi non professionali, in questo caso gli agrobiofarmaci potrebbero offrire un'alternativa efficace e sicura.

#### ABSTRACT

Regulation and policies can strongly influence the opportunities for biological control agents to be used as plant protection products. There are a number of driving factors that can favor their use in alternation with or in addition to synthetic agrochemicals in IPM program. They are desirable a number of actions at different levels to facilitate their authorization maintaining a high degree of safety to human health and the environment.

## REFERENCES

- EUROPEAN PARLIAMENT (2009a): COD/2006/0132 Hazardous substances, plant protection products: framework for Community action to achieve a sustainable use of pesticides. <http://www.europarl.europa.eu/oeil/file.jsp?id=5372322>
- EUROPEAN PARLIAMENT (2009b): COD/2006/0136 Plant Protection Products: placing on the market, evaluation of the active substances (repl. Directive 91/414/EEC). <http://www.europarl.europa.eu/oeil/file.jsp?id=5372312>

Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nell'aprile 2016