

Abstract della relazione del Dr. A. Ciano al convegno sulle "Alternative all'utilizzo del Bromuro di Metile"

Alternative e tecnologie biologiche: microrganismi antagonisti di nematodi.



Fumigazione alternative

I **nematodi fitoparassiti** coesistono nel terreno con numerosi antagonisti naturali a diverso grado di specializzazione che includono **funghi acquatici, ifomiceti, batteri, amebe** o piccoli invertebrati predatori come **nematodi, tardigradi e acari**. La maggior parte di essi svolge funzioni come la decomposizione o il riciclo dei nutrienti, e nei terreni non coltivati è anche possibile rinvenire una grande diversità di antagonisti. L'**attività agricola** prima e quindi l'uso indiscriminato di nematocidi e fumiganti poi comportano, nei terreni agricoli, l'estinzione di molte specie, incluso quelle utili, con un generale impoverimento sia dal punto di vista della densità che della biodiversità.

I **batteri antagonisti** includono *Pasteuria penetrans*, parassita di nematodi galligeni, (*Meloidogyne* spp.) e altre specie riportate su nematodi cisticoli e su quasi tutti i gruppi ecologici di fitoparassiti. Le specie di sono provviste di un'endospora infettiva e durevole dotata di fibre parasporali adesive. L'endospora è sia una forma di resistenza che un propagulo infettivo, è molto resistente alle alte temperature ed alla disidratazione e resta vitale per molto tempo. Le fibre parasporali consentono l'adesione all'ospite, che è molto specifica. L'infezione è passiva, per adesione dell'endospora al nematode grazie ai movimenti di quest'ultimo nel terreno. Dopo l'attivazione, il processo germinativo penetra nella cuticola e origina la fase parassitaria con la diffusione di un tallo dicotomico nell'ospite. Il ciclo termina con la sporulazione e la formazione di nuove endospore all'interno dell'ospite, disperse nel terreno alla morte di quest'ultimo.

Altri **batteri Gram-negativi** sono stati recentemente individuati e mostrano una similitudine col ciclo parassitario di *Pasteuria*. Essi aderiscono alle larve di *Meloidogyne* spp. e germinano al loro interno, originando una fase infettiva che si conclude con la morte del nematode.

Numerose prove sperimentali con hanno mostrato interessanti potenzialità pratiche per questi batteri. Recenti progressi indicano che la coltivazione in vitro è possibile, e la produzione di endospore è attualmente nella fase di passaggio dal laboratorio all'industria. Negli **Stati Uniti** è in corso di registrazione un prodotto a base di endospore di ottenute su substrati artificiali, per il controllo di *Belonolaimus longicaudatus*. Con la produzione di endospore a basso costo e su larga scala, lo sfruttamento di questi batteri sarà possibile. Resta da chiarire il ruolo dell'elevata specificità di attacco, da bilanciare con l'uso di più isolati.

Fra i **funghi** che attaccano i nematodi, solo un ridotto numero di specie ha un interesse pratico. Gli organi di cattura di alcuni ifomiceti (per esempio le trappole di *Arthrobotrys* spp.) sono strutture sofisticate ma non specifiche. In altri casi è invece la biologia degli stessi funghi a non renderli adatti ad uno scopo pratico, come per *Catenaria anguillulae*, un comune fungo acquatico. Altre specie, pur provviste di veri organi di attacco (le cellule "cannone" di *Haptoglossa* o le spore ad uncino di *Harposporium*) hanno un ruolo minore nel terreno, sono coltivabili con difficoltà o interessano solo i nematodi di vita libera.

Applicazioni con prodotti industriali a base di micelio sono note per , *A. oligospora* e *Dactylellina dactyloides*, specie che formano trappole con ife adesive o anelli costrittori per la cattura dei nematodi. Risultati di maggior interesse sono riferiti per formulati a base d'ifomiceti quali *Pochonia chlamydosporia*, o per *Dactylellina ellipsospora* (syn. *Monacrosporium ellipsosporum*). *Pochonia* ha mostrato interessanti risultati applicativi come parassita di uova di nematodi galligeni e

cisticoli. *Dactylellina ellipsospora* forma sulla radice delle reti di ife con dei bottoni adesivi che immobilizzano i nematodi prima di essere digeriti dal predatore, impedendo l'attacco alla radice. Un altro parassita interessante è *Hirsutella rhossiliensis*, i cui conidi germinano in seguito all'adesione passiva all'ospite, sviluppando un micelio al suo interno. Numerose sperimentazioni hanno chiarito per queste specie il rapporto di densità dipendenza con l'ospite e i fattori biotici e abiotici in grado d'influenzarne l'attività.

Alcuni **funghi nematofagi** mostrano caratteristiche favorevoli allo sviluppo di prodotti applicativi. Per *P. chlamydosporia* è accertata la specializzazione parassitaria dovuta a una serinproteasi (VCP1) attiva nella penetrazione nell'uovo, con varianti dovute a polimorfismi che ne alterano la conformazione molecolare e la funzionalità. La VCP1 mostra, negli isolati provenienti da nematodi galligeni, maggiore efficacia nella lisi della loro cuticola, mentre altre varianti presenti in isolati provenienti da nematodi cisticoli, mostrano maggior efficacia sulla cuticola di queste ultime specie. La specializzazione parassitaria, molto utile, esige però la conoscenza degli isolati da utilizzare e dei nematodi bersaglio, prima di avviare un programma applicativo con questi funghi.

Altri fattori devono essere considerati nella selezione dei **funghi nematofagi** da applicare, come la presenza di clamidospore, che conferisce una maggiore longevità del preparato e un dosaggio più facile. Questo fattore favorisce *P. chlamydosporia* rispetto ad altri fomiceti, per via del gran numero di clamidospore che produce. In *H. rhossiliensis* la trasmissione della spora al nematode è influenzata dal potenziale della soluzione circolante nel terreno: essa può estinguersi in assenza dell'ospite e sviluppa epidemie locali in tempi molto lunghi. Un fattore importante è la dimensione dei pori del terreno, poichè il diametro dei pori del terreno in cui l'ifa e le fialidi sono esposte influenza il parassitismo. In terreni sabbiosi, con pori di grandi dimensioni, la probabilità del parassitismo è inferiore rispetto a quanto osservabile in terreni con pori di minor diametro, dato che un ampio volume aumenta la probabilità dell'ospite di evadere l'infezione.

Un fattore importante da considerare nell'applicazione riguarda la conoscenza approfondita della biologia degli antagonisti. Per *P. chlamydosporia*, oltre la specificità parassitaria, è nota la variabilità degli isolati nella capacità di colonizzare terreno e rizosfera, fattore che risente della presenza degli apparati radicali delle piante utilizzate nella rotazione. Per ragioni pratiche ed applicative, anche il monitoraggio di un isolato dopo l'introduzione nell'ambiente è un fattore importante: sono oggi disponibili tecnologie basate sulla PCR di geni specifici e sul riconoscimento di particolari regioni del DNA presenti in una sola specie o isolato. E' possibile monitorare quindi *P. chlamydosporia* dopo il suo inoculo, estraendo il DNA dal terreno con tecniche d'ibridazione (dot-blot) o PCR in tempo reale.

Infine, lo studio degli **antagonisti di nematodi** si basa sull'osservazione nel tempo di un microcosmo (rizosfera), rilevando le variazioni di parassitismo e densità, per ospiti e antagonisti. Per interpretare le dinamiche di popolazione è necessario disporre di un quadro teorico sulla regolazione in natura operata dagli antagonisti. L'insieme costituito da nematodi fitoparassiti, antagonisti e altre componenti biotiche del terreno costituisce un sistema complesso, con componenti caotiche che rendono difficile prevederne l'evoluzione. I modelli sono usati pertanto come strumenti interpretativi in grado di spiegare i meccanismi di regolazione delle popolazioni in natura.

Le **dinamiche di popolazione** rappresentano la base quantitativa dell'analisi delle relazioni densità-parassitismo nel tempo e/o nello spazio. Uno degli obiettivi dei modelli è valutare gli effetti di medio e lungo termine dei trattamenti inondativi ovvero dei semplici inoculi, effettuati con la trasmissione dell'infezione nella popolazione ospite, da parte dei microrganismi citati. Essi utilizzano diverse costanti come il tasso di moltiplicazione dell'ospite, il tasso di declino dovuto all'antagonista (o prevalenza), quello di crescita dell'antagonista (o prevalenza), o la riduzione del parassita (o prevalenza) per la sua mortalità naturale.

In questi modelli è possibile osservare la relazione fra due specie su un solo piano cartesiano chiamato "spazio delle fasi". Nel solo caso di relazioni stabili, le fluttuazioni dei valori delle dinamiche simulate tendono a formare dei cicli intorno a punti chiamati "punti d'equilibrio". Se dinamiche reali delle popolazioni studiate ricadono nei cicli simulati dai modelli, questi forniscono informazioni utili circa i meccanismi di regolazione, a seconda della loro complessità e ricchezza di dettagli analitici.

Utilizzando i modelli è possibile simulare, noti i valori delle costanti e le densità iniziali delle specie, le loro dinamiche di popolazione, per ottenere informazioni utili sul sistema, per es. sulle quantità di propaguli dell'antagonista (per esempio, clamidospore) da introdurre per incrementare le probabilità di estinzioni locali. Le **popolazioni dei nematodi**, infatti, sono confinate in un microcosmo che corrisponde al volume di terreno esplorato dalle radici, e la mobilità delle larve è limitata alla ricerca del sito di penetrazione sulla radice. I movimenti su distanze maggiori risultano dall'azione dell'uomo o dal

microcosmo, al cui interno vanno eseguite le osservazioni ripetute nel tempo. Poiché il **campionamento** è spesso di tipo distruttivo, per poter analizzare la relazione densità-dipendenti è utile riportare, per ciascuna osservazione temporale, le densità dei due organismi nello spazio della fasi rappresentato dalle densità di ospite e parassita. E' possibile anche effettuare un solo campionamento nello spazio con numerose ripetizioni, per ricavare un quadro delle relazione densità-parassitismo senza effettuare uno studio prolungato nel tempo. Ciò è possibile poiché le diverse associazioni ospite-parassita non sono sincrone. La rappresentazione nel piano delle fasi di un numero sufficiente di osservazioni consente quindi la ricostruzione dei cicli.

Le **simulazioni realizzate con i modelli** ci consentono di conoscere il funzionamento della regolazione in natura. Sulla base di queste informazioni è possibile ricavare indicazioni pratiche utili, per esempio stimare le dosi dei trattamenti di lotta biologica a base di funghi, i tempi richiesti per ottenere l'effetto desiderato, ovvero valutare come introdurre gli antagonisti.

Abbiamo oggi a disposizione un ampio ventaglio di **conoscenze, suscettibili di sviluppo applicativo e/o industriale** per esplorare ed integrare strategie di controllo dei nematodi fitoparassiti basate sugli antagonisti biologici. I prodotti e le tecnologie devono però caratterizzarsi per costi di produzione contenuti, ma anche per efficacia, facilità d'uso e innocuità nei confronti dell'uomo e dell'ambiente. Le tecnologie per la **protezione "biologica" delle colture** potranno integrare in futuro altri metodi avanzati, come la prevenzione o certificazione, ovvero metodi innovativi come il **"precision farming"**. E' possibile anche ipotizzare futuri scenari di monitoraggio per informare il produttore o consumatore sullo stato fitosanitario e la protezione di una coltura. Sono molteplici i vantaggi per l'economia, l'ambiente e la società legati a prodotti e processi di gestione biologica dei nematodi fitoparassiti.

Grazie **all'integrazione con altre tecnologie come l'uso di piante resistenti o principi attivi di origine naturale**, è possibile attendersi un'auspicabile e diffusa riduzione dell'impatto derivante dai trattamenti con fitofarmaci, con una maggior sicurezza per operatori e consumatori.
A. Ciancio, IPP CNR, Bari