

I nematodi nel suolo

Biocontrollo dei nematodi fitoparassiti

A cura di

Vincenzo Michele Sellitto,
Elisabetta Dallavalle



edagricole

1ª edizione: giugno 2023



5648

© Copyright 2023 by «Edagricole - Edizioni Agricole di New Business Media srl», via Eritrea, 21 - 20157 Milano - Redazione: p.zza G. Galilei, 6 - 40123 Bologna - Vendite: tel. 051/6575833; fax: 051/6575999 - e-mail: libri.edagricole@newbusinessmedia.it - www.edagricole.it

Proprietà letteraria riservata - Printed in Italy

La riproduzione con qualsiasi processo di duplicazione delle pubblicazioni tutelate dal diritto d'autore è vietata e penalmente perseguibile (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n. 633). Quest'opera è protetta ai sensi della legge sul diritto d'autore e delle Convenzioni internazionali per la protezione del diritto d'autore (Convenzione di Berna, Convenzione di Ginevra). Nessuna parte di questa pubblicazione può quindi essere riprodotta, memorizzata o trasmessa con qualsiasi mezzo e in qualsiasi forma (fotomeccanica, fotocopia, elettronica, ecc.) senza l'autorizzazione scritta dell'editore. In ogni caso di riproduzione abusiva si procederà d'ufficio a norma di legge.

Realizzazione grafica: Emmegi Group, via F. Confalonieri, 36 - 20124 Milano
Impianti e stampa: Kosmo S.r.l., Via A. Novella, 15 - 47922 Rimini (RN)

Finito di stampare nel giugno 2023

ISBN-978-88-506-5648-6

Introduzione

È difficile comprendere l'importanza dei nematodi del suolo e dei sistemi di biocontrollo delle specie fitoparassite senza aver chiaramente compreso che cosa sia il suolo, quali siano le sue caratteristiche e quali importanti implicazioni abbia sullo sviluppo e sul mantenimento di una società florida, che genera abbondanza biologica e, di conseguenza, alimentare, economica e di benessere delle popolazioni umane che vivono il territorio. La storia e l'etimologia ci insegnano il legame indissolubile che esiste fra l'uomo e la terra: la parola «uomo» significa infatti creatura generata dalla terra, dall'humus. E quindi non possono esistere una civiltà e una cultura sane e fertili senza un suolo altrettanto sano e fertile; dobbiamo prenderne atto, acquisire conoscenza e consapevolezza e prenderci la responsabilità delle nostre scelte, come ricercatori, come tecnici, come divulgatori e, infine e soprattutto, come agricoltori e come consumatori.

Dal punto di vista ecologico il suolo costituisce un immenso ecotono, cioè una zona margine in cui avviene la sovrapposizione di due diversi ambienti confinanti: la superficie minerale terrestre e l'atmosfera circostante. Al suo interno troviamo: l'acqua nelle sue varie forme, le radici delle piante e tutta la molteplicità di macro e microrganismi ad esse collegate e la sostanza organica di varia origine che rimane inglobata al suo interno o che, più frequentemente, si deposita sulla sua superficie. Lo possiamo immaginare come un immenso laboratorio biochimico, in cui tutti gli elementi che lo compongono si scambiano materia, la trasformano e la cedono a un'altra specie, come una sorta di danza ciclica e armonica, composta a sua volta da una miriade di ulteriori micro- e sotto-cicli. Questa complessità di relazioni utili che si creano fra le varie specie ci mostra il suolo non come un insieme lineare e privo di collegamenti di elementi che lo compongono, ma come un macrorganismo in cui ogni specie svolge una funzione specifica, per contribuire a mantenere l'equilibrio e la stabilità dell'intero sistema e che lo rende habitat fertile e ottimale per lo sviluppo delle radici delle piante.

Il suolo è quindi caratterizzato da questa doppia natura minerale e organica, dove prevalgono legami chimici deboli che si stabiliscono attorno alle sue componenti colloidali principali: argilla e humus. Tale aspetto lo rende sì un sistema molto dinamico, ma altrettanto fragile. La modifica o l'introduzione di un elemento esterno, infatti, potrebbero essere deleterie per una specie o per un gruppo di specie che svolge una specifica funzione; la continuità di un ciclo potrebbe così interrompersi, con conseguenze a catena che porterebbero a degradare l'intero organismo.

Introduzione

Fortunatamente negli ultimi decenni questa consapevolezza è diventata sempre più forte ed evidente da parte di tutti i componenti attivi che ruotano attorno al mondo agricolo: ricercatori, tecnici e agricoltori. Via via che le molteplici componenti biologiche del sistema vengono studiate, si comprendono sempre più le relazioni esistenti fra i diversi gruppi biotici o le singole specie, sia fra loro che nei confronti delle radici delle piante; funghi e batteri *in primis*, ma poi attinomiceti e alghe sono fra gli esseri viventi che popolano il suolo e che sono maggiormente coinvolti in questo processo di conoscenza.

E i nematodi? Purtroppo, molto spesso la loro presenza viene ancora considerata solo in modo negativo a causa della pericolosità delle specie che si nutrono delle radici delle piante. E così, la maggior parte delle ricerche sui nematodi del suolo si è concentrata sulle specie fitoparassite, che provocano danni alle colture sia direttamente che come vettori di virus. Eppure, se pensiamo che i nematodi nel loro insieme, come viene più volte ricordato, rappresentano una delle categorie viventi più numerose dell'ambiente tellurico, ci sorgono alcune domande tutte lecite e interessanti. **Qual è il loro ruolo ecologico? Perché sono così numerosi? Cosa succederebbe se non ci fossero? Qual è il rapporto che instaurano con gli esseri viventi che abitano nel suolo?** Se poi pensiamo che i prodotti chimici con cui normalmente si combattono le specie fitoparassite hanno un'azione devastante anche sugli altri nematodi che vivono liberi nel terreno, allora dobbiamo chiederci che cosa stiamo distruggendo con questi trattamenti abbattenti e cercare di analizzare e di comprendere altre strategie di contenimento più selettive o che mirino a considerare il ripristino dell'equilibrio del sistema. Spunti di riflessione e soluzioni pratiche di gestione dei nematodi fitoparassiti rappresentano, in estrema sintesi, gli obiettivi che ci siamo posti nella realizzazione di questo volume.

I nematodi fanno parte di una categoria biologica chiave dell'ecosistema suolo poiché occupano una **posizione centrale nella catena trofica**, svolgendo, allo stesso tempo, il ruolo di consumatori e di produttori di energia. Come consumatori, per soddisfare il loro metabolismo, hanno necessità di nutrirsi in prevalenza di materiale organico vivo e con alto contenuto di sostanze proteiche. Una possibile e funzionale classificazione dei nematodi viene fatta sulla base delle loro abitudini alimentari che si possono generalmente dedurre dalla struttura dell'apparato boccale e che ci permettono di distinguere cinque **categorie trofiche**.

I *fitofagi* o *fitoparassiti* si nutrono delle componenti cellulari delle radici delle piante, perforandone la superficie esterna oppure penetrando all'interno dei tessuti per completarne il ciclo e rappresentano la categoria di nematodi più nota e studiata, a causa dei danni anche piuttosto ingenti che possono causare alle colture, soprattutto in determinate aree geografiche. Tuttavia, nella lotta contro tali organismi, non è ipotizzabile un azzeramento totale delle popolazioni infestanti, ma è importante mantenere tali parassiti al di sotto della soglia minima di danno; danno che generalmente è variabile in funzione della tolleranza della specie e della varietà e delle caratteristiche fisiche e biologiche del suolo di coltivazione.

I *batterivori* o *microfagi*, costituiscono la categoria più numerosa e sono rappresentati da quasi tutte le specie prive di stiletto che vivono libere nel suolo. Si sviluppa-

no sulla sostanza organica in decomposizione, nutrendosi però prevalentemente di batteri e svolgendo un ruolo importante nel diffonderli e nel contenerne le popolazioni. Questi ultimi si depositano esternamente sulla cuticola o all'interno dell'apparato digerente, per poi essere liberati nell'avanzare del nematode nel substrato. I nematodi *fungivori* si nutrono di funghi saprotrofi, fitopatogeni e, in minor misura, micorrizici. È stato osservato che i funghi, al pari delle radici delle piante, emettono sostanze attrattive per i nematodi. Il nematode è in grado di predare soltanto ife fungine con un diametro compreso fra 1/3 e 1/4 rispetto al diametro del loro corpo, servendosi di uno stiletto con cui perforano per azione meccanica o enzimatica la parete del micelio e ne risucchiano il contenuto; altri nematodi, sprovvisti di stiletto, sono invece in grado di nutrirsi di sclerozoi o di lieviti.

I *predatori* comprendono specie dotate di un apparato boccale fornito di denti, stiletto o di altre strutture atte a trattenere le prede e a succhiarne il contenuto; predano le popolazioni di piccoli organismi, come rotiferi, tardigradi, oligocheti, protozoi e altre specie di nematodi, svolgendo una funzione ecologica molto importante nel contenere le specie fitoparassite.

Fra gli *onnivori* possiamo trovare specie che hanno abitudini alimentari diversificate o che variano nei diversi stadi del ciclo biologico o che non sono ancora ben note o studiate. Si possono cibare di funghi o di altre specie di origine animale o vegetale; fra queste, una certa importanza assumono le specie *algovore* che si nutrono di alghe pluricellulari e diatomee e che sono dotati di stiletto oppure no, a seconda delle diverse modalità di assunzione del cibo.

Nel suolo i nematodi abitano l'ambiente interstiziale superficiale, muovendosi all'interno dei microfilm d'acqua. Rispetto ad altri gruppi di viventi, come biomassa totale, non occupano molto spazio; dal punto di vista della copiosità delle specie e per l'abbondanza di individui, però, manifestano un ruolo ecologico di grande ricchezza e importanza. Vengono conteggiati come numero di esemplari per unità di superficie di suolo e il loro ammontare è molto variabile, in funzione della tipologia del substrato e delle sue caratteristiche fisiche, chimiche, biologiche e agronomiche, della vegetazione di copertura e della sostanza organica presente.

I nematodi **incidono sulla velocità di mineralizzazione** dei residui organici, facilitando la moltiplicazione e la diffusione dei funghi e dei batteri nei residui da degradare. Quando si nutrono di tali decompositori primari assorbono notevoli quantitativi di sostanze e in quantità superiori rispetto alle loro reali necessità, che in seguito mineralizzano e rilasciano nell'ambiente in forma prontamente disponibile per le piante. Per esempio, per quanto riguarda l'azoto, costituiscono una notevole riserva di materiale di facile utilizzazione e di rapida circolazione, sotto forma di ione ammonio (NH_4^+), soprattutto nei sistemi agricoli che si basano sull'impiego di ammendanti.

I nematodi risultano anche molto sensibili ai cambiamenti e alle perturbazioni microambientali, mutano con facilità nelle relazioni con le altre specie, svolgendo un ruolo di equilibrio. In presenza di sostanze inquinanti reagiscono rapidamente a causa della loro cuticola permeabile, ma possono conservarsi in forma latente in attesa del ripristino delle condizioni ottimali di crescita; sono ubiquitari e sono gli

Introduzione

ultimi organismi a scomparire in caso di variazioni all'interno dell'habitat terricolo in cui vivono. Da quanto detto finora si può capire che i nematodi rappresentano degli eccellenti **bioindicatori ambientali**, in grado di fornire informazioni sulla sanità, sulla stabilità e sui cambiamenti dell'ecosistema di un suolo. È stata infatti ampiamente riscontrata la corrispondenza biunivoca fra una determinata composizione faunistica di specie di nematodi e determinati ambienti naturali o coltivati. In presenza di scarsa biodiversità ambientale, come nei terreni agricoli lavorati e trattati con sostanze di sintesi, risultano di minor entità anche le comunità dei nematodi. I batterivori, i fungivori, i predatori e gli onnivori sono più numerosi nei terreni poco disturbati dalle lavorazioni e dai trattamenti chimici. Prendendo in esame le categorie trofiche nel loro complesso, si può vedere che le specie batterivore, ad alta capacità riproduttiva, capaci di vivere in ambienti asfittici e con elevata pressione osmotica (Rhabditidae), sono prevalenti in presenza di abbondante sostanza organica derivante da sovesci o dall'apporto di sostanze ammendanti. I Dorylaimida, invece, si nutrono prevalentemente di alghe e hanno un ciclo biologico lento e vivono in ambienti stabili e non disturbati dall'attività umana o dagli animali al pascolo. I nematodi fungivori sono maggiormente presenti nei sistemi agricoli perenni e meno disturbati dalle lavorazioni; anch'essi contribuiscono al rilascio di azoto e altri elementi inorganici provenienti dalla digestione dei miceli fungini ingeriti, ma in minor misura rispetto a quelli rilasciati dai batterivori.

Come produttori di energia a vantaggio di altre specie, i nematodi costituiscono essi stessi una **fonte di cibo** e possono essere predati da sporozoi, ciliati, amebe, microartropodi tartigradi, enchitridi oligocheti, acari, collemboli, insetti (coleotteri stafilinidi), nonché da altre specie di nematodi e parassitizzati da funghi e da batteri, con grande impatto nell'equilibrio dei sistemi agricoli.

La **complessità del sistema suolo** può generare rapporti fra i suoi diversi componenti biotici, attivando relazioni altrettanto complesse, che possono anche coinvolgere più di una specie, evolvere nel tempo e che possiamo molto brevemente tentare di riassumere:

- relazioni dirette di parassitismo, di mutualismo o di commensalismo;
- fenomeni sinergici o soppressivi;
- effetti indiretti legati a particolari comportamenti o alla produzione di determinate sostanze.

A titolo di esempio, per comprendere meglio questa schematizzazione, si possono riportare alcuni esempi. Per quanto riguarda i comportamenti dei nematodi batterivori, abbiamo già visto come essi contribuiscano a diffondere i batteri, ma purtroppo questo fenomeno può riguardare sia le specie fitoparassite che quelle cosiddette "buone", come i cianobatteri e gli azotofissatori. In tema di effetti sinergici o soppressivi, è stato osservato che la colonizzazione da parte di un fungo micorrizico viene inibita quando le radici di una pianta sono già invase da un nematode fitoparassita; ma se la simbiosi fra fungo e radice è già avvenuta, allora la pianta micorrizzata sviluppa una resistenza alla penetrazione del fitoparassita stesso. Effetti analoghi possono avvenire da parte di alcune specie fitoparassite in grado

di ostacolare la simbiosi fra le radici delle piante e i batteri azotofissatori. È noto, invece, che gli attinomiceti sono in grado di difendere le piante dai nematodi mediante produzione di metaboliti secondari, come l'avermectina prodotta da *Streptomyces avermitilis*, sostanza che viene utilizzata nella produzione industriale di alcuni preparati ad azione nematocida. Fenomeni sinergici possono generarsi da parte di alcuni nematodi fitoparassiti in grado di favorire le infezioni nelle piante di fitopatogeni di debolezza non specializzati. Questo è il caso che si osserva in molte piante orticole e ornamentali, dove la penetrazione all'interno delle radici e lo sviluppo dell'infezione da parte di alcune forme specifiche di *Fusarium oxysporum*, viene veicolata e accelerata a opera di nematodi del genere *Meloidogyne*. Altro effetto sinergico fra funghi e nematodi avviene quando i processi di infezione operati dai miceti rilasciano elevati quantitativi di CO₂ e provocano un effetto attrattivo nei confronti degli stessi nematodi. In altri casi è stata riscontrata una demolizione della resistenza alle malattie in alcune cultivar resistenti, a seguito dell'infestazione delle radici da parte di nematodi. Tipica associazione complessa fra nematodi, batteri e insetti è quella che coinvolge l'Ordine Rhabditida: gli stadi giovanili di tali nematodi sono in grado di penetrare nel corpo degli insetti, rilasciando i batteri che si svilupperanno all'interno dell'ospite, portandolo alla morte. Ma tutti questi sono solo alcuni esempi.

L'argomento principale di questo volume è incentrato sui nematodi fitoparassiti e sul loro biocontrollo all'interno del sistema suolo. Per prima cosa, dunque, è importante imparare a conoscerli attraverso la lettura del capitolo d'esordio in cui viene trattata l'anatomia dei nematodi fitofagi, le diverse tipologie di fitoparassitismo che esprimono e la descrizione dei principali generi e specie. Particolare attenzione viene posta al ciclo biologico, ai sintomi e ai danni che sviluppano nelle colture e a tutti quelli aspetti che possono essere di utilità per impostare le più opportune tecniche di difesa.

Le tematiche legate alla gestione delle strategie di contenimento e di protezione delle colture sono sviluppate in un capitolo dedicato alle tecniche di controllo dei nematodi fitoparassiti a basso impatto ambientale. Viene effettuata una panoramica generale e, per quanto possibile, completa e organica, sulle molteplici sostanze naturali allelopatiche e i relativi meccanismi di azione, attraverso la restituzione dei risultati di innumerevoli ricerche e sperimentazioni. Sono stati altresì presi in esame i possibili mezzi genetici, fisici e agronomici che mirano al mantenimento dell'equilibrio biologico nel suolo di coltivazione, attraverso un approccio integrato, e alla conservazione della catena trofica fra le diverse specie. È stato approfondito in modo particolare il tema delle colture da sovescio e di copertura e del loro impiego. L'approccio proposto nel riportare le diverse strategie di contenimento è di tipo pratico, utilizzando anche schede tecniche ed esempi concreti, con l'intento di fornire utili indicazioni all'agricoltore.

Abbiamo già sottolineato che i nematodi, in quanto elementi intermedi della catena trofica, costituiscono anche una fonte di cibo per numerose specie di microrganismi in grado di parassitizzarli. In uno specifico capitolo vengono passati in rassegna i principali gruppi di antagonisti: batteri, funghi e virus, con alcuni cenni

Introduzione

sulle loro più significative caratteristiche biologiche, sul meccanismo di azione e sul loro potenziale impiego come agenti di biocontrollo. In un successivo capitolo, allo scopo di approfondire questo argomento, viene focalizzata l'attenzione su alcuni aspetti pratico-applicativi, descrivendo i principali microrganismi dei prodotti attualmente in commercio in Italia e di quelli potenzialmente utili, sempre fornendo indicazioni sulla biologia, sul meccanismo d'azione e sulle modalità di impiego. Abbiamo anche accennato alle associazioni complesse che coinvolgono i nematodi con altri gruppi di esseri che abitano il suolo e, fra queste, quelle che vedono i nematodi appartenenti alle famiglie Steinernematidae e Heterorhabditidae in grado di portare alla morte gli insetti ospiti, attraverso un'azione simbiotica con diversi generi di batteri entomoparassiti. Tali associazioni vengono sfruttate attraverso la realizzazione di preparati commerciali come organismi di controllo di svariati insetti nocivi. Questo tema viene trattato in un capitolo dedicato, dove vengono prese in esame le diverse specie di nematodi e di batteri coinvolti, descrivendone il ciclo, l'approccio di attacco all'ospite e le conseguenti reazioni degli insetti, le tecniche di allevamento, le strategie e le modalità di impiego in campo.

Il ruolo ecologico dei nematodi liberi come specie chiave del sistema suolo e del loro conseguente utilizzo come bioindicatori è stato ripetutamente ricordato all'interno di questa introduzione. Pertanto, non poteva mancare un capitolo dedicato a questo tema, dove vengono descritti diversi indici e rappresentazioni grafiche utilizzati per questa tipologia di analisi e che costituiscono strumenti di lettura e di comprensione della qualità edafica ambientale e della sua evoluzione, procurandoci valide informazioni per la gestione agronomica delle colture.

Le diverse tecniche molecolari attualmente utilizzate nella diagnosi nematologica vengono trattate in un distinto capitolo, attraverso la descrizione di approcci molecolari diversi, di cui si analizzano le finalità, i principali metodi e le relative caratteristiche. La classificazione delle specie fitoparassite è un argomento di enorme importanza al fine di monitorarne la diffusione e di gestire le strategie di contenimento e di protezione delle colture, nonché di descrivere e identificare nuove specie o quelle invasive che provengono da differenti areali geografici. Il riconoscimento per via anatomica, attraverso l'isolamento e l'osservazione al microscopio, però, comporta diverse difficoltà, come quelle legate alla capacità tassonomica dell'osservatore e all'esistenza di specie criptiche e polimorfiche nei fitoparassiti. Le tecniche biomolecolari, quindi, oltre a integrare l'approccio morfologico, in molti casi possono superarne i limiti, fornire diagnosi più veloci e accurate e risultare funzionali agli studi di metagenomica.

Il volume si conclude con un capitolo che ha come scopo quello di delineare le potenzialità, i limiti e i possibili aspetti migliorabili nell'impiego degli agenti di controllo biologico dei fitonematodi. Vengono inoltre formulate alcune delle possibili linee di ricerca nel settore della nematologia, che potranno permetterci di conoscere e di comprendere, in maniera sempre più approfondita, questo complesso mondo dei nematodi e delle loro relazioni all'interno dell'ecosistema suolo e di aprire, così, nuove e interessanti prospettive.

Vincenzo Michele Sellitto, Elisabetta Dallavalle

Gli Autori

Aurelio Ciancio, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR, Bari

Mirella Clausi, Dipartimento di Scienze Biologiche Geologiche e Ambientali, Università di Catania

Giovanna Curto, Settore Fitosanitario Regione Emilia-Romagna, Bologna

Giada d'Errico, Università di Napoli Federico II, Dipartimento di Agricoltura

Elisabetta Dallavalle, Agronomo fitopatologo, Bologna

Francesca de Luca, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR, Bari

Elena Fanelli, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR, Bari

Silvia Landi, CREA- Centro di ricerca Difesa e Certificazione, Firenze

Barbara Manachini, Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali, Università degli Studi di Palermo

Catello Pane, CREA-Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo, Pontecagnano Faiano (SA)

Vincenzo Michele Sellitto, Project Leader in BIOLCHIM Spa, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Banat, Timișoara (Romania)

Eustachio Tarasco, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR, Bari

Alberto Troccoli, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR, Bari

Alessio Vovlas, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante-CNR, Bari

Indice

Introduzione	III
Gli Autori	IX
1 Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti (A. Troccoli, E. Fanelli, A. Voulas, M. Clausi, E. Tarasco e F. de Luca)	1
1.1 Anatomia	2
1.2 Tipologie di parassitismo e gruppi trofici	6
1.2.1 Ectoparassitismo	6
1.2.2 Semi-endoparassitismo	7
1.2.3 Endoparassitismo	8
1.3 I principali generi di nematodi fitoparassiti	10
1.3.1 Genere <i>Aphelenchoides</i> Fischer, 1894	10
1.3.2 Genere <i>Bursaphelenchus</i> Fuchs, 1937	11
1.3.2.1 <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Steiner & Buhrer) Nickle, 1970	11
1.3.3 Genere <i>Ditylenchus</i> , Filipjev, 1936	12
1.3.4 Genere <i>Heterodera</i> Schmidt, 1871	15
1.3.4.1 Principali specie	17
1.3.5 Genere <i>Globodera</i> Skarbilovich, 1959	18
1.3.6 Genere <i>Meloidogyne</i> Göldi, 1887	19
1.3.6.1 Principali specie	21
1.3.7 Genere <i>Anguina</i> Scopoli, 1777	24
1.3.7.1 <i>Anguina tritici</i> Steinbuch, 1799	24
1.3.8 Genere <i>Pratylenchus</i> Filipjev, 1936	24
1.3.8.1 <i>Pratylenchus penetrans</i> (Cobb, 1917) Filipjev and Schuurmans Stekhoven, 1941	26
1.3.8.2 <i>P. vulnus</i> Allen & Jensen, 1951	26
1.3.9 Nematodi semi-endoparassiti (Generi <i>Rotylenchulus</i> e <i>Tylenchulus</i>)	26
1.3.9.1 Genere <i>Rotylenchulus</i> Linford & Oliveira, 1940	26
1.3.9.2 Genere <i>Tylenchulus</i> Cobb, 1913	27
1.3.10 Genere <i>Tylenchorhynchus</i> Cobb, 1913	28

1.3.11	Nematodi ectoparassiti sedentari (generi: <i>Cacopaurus</i> e <i>Paratylenchus</i>)	29
1.3.11.1	Genere <i>Cacopaurus</i> Thorne, 1943	29
1.3.11.2	Genere <i>Paratylenchus</i> (Micoletzky, 1922) Raski 1976	29
1.3.12	Genere <i>Helicotylenchus</i> Steiner, 1945	30
1.3.13	Genere <i>Rotylenchus</i> Whithead, 1958	31
1.3.14	I nematodi ad anello: generi <i>Criconemoides</i> e <i>Ogma</i>	31
1.3.14.1	Genere <i>Criconemoides</i> (Taylor, 1936) Loof & de Grisse, 1989	31
1.3.14.2	Genere <i>Ogma</i> Southern, 1914	32
1.3.15	Genere <i>Xiphinema</i> Cobb, 1913	33
1.3.16	Genere <i>Longidorus</i> Micoletzky, 1922	34
1.3.17	Genere <i>Paralongidorus</i> Siddiqi, Hooper & Khan, 1963	34
1.3.18	Genere <i>Trichodoros</i> Cobb, 1913	35
1.3.19	Genere <i>Paratrichodoros</i> Siddiqi, 1974	36
	Bibliografia	36
2	Tecniche di controllo dei nematodi fitoparassiti a basso impatto ambientale (<i>E. Dallavalle, G. Curto</i>)	39
2.1	Sostanze naturali allelopatiche e meccanismi di azione nei confronti di nematodi fitoparassiti	40
2.1.1	Tossine specifiche	41
2.1.2	Prodotti di degradazione	43
2.1.3	Potenziamento e/o introduzione di organismi con funzione di controllo biologico	45
2.1.4	Induzione di tolleranza e resistenza delle piante	48
2.2	Mezzi tecnici e normativa	50
2.3	Miglioramento genetico	51
2.4	Mezzi fisici	54
2.4.1	Solarizzazione	54
2.4.2	Biosolarizzazione e Disinfezione Anaerobica del Suolo (DAS)	55
2.4.3	Vapore surriscaldato	56
2.5	Mezzi agronomici	57
2.5.1	Avvicendamento colturale	57
2.5.2	Anticipo o ritardo dell'epoca di semina/trapianto	58
2.5.3	Non coltura (Maggese)	59
2.5.4	Lotta alle erbe infestanti	59
2.5.5	Floating (Allagamento)	59
2.5.6	Lavorazioni del terreno e concimazioni organiche	59
2.5.7	Colture di copertura e sovescio	60
2.5.7.1	Famiglia Brassicaceae - Glucosinolati	64
2.5.7.2	Famiglia Poaceae - Glucosidi cianogenici	70

2.5.7.3	Alcaloidi	72
2.5.7.4	Conclusioni	72
2.6	Strategie di contenimento dei nematodi	74
2.6.1	Coltura protetta	74
2.6.2	Pieno campo	75
	Bibliografia	77
3	Antagonisti di nematodi e controllo biologico (A. Ciancio)	87
3.1	La biodiversità microbica del terreno e la produzione vegetale	87
3.1.1	Le strategie degli antagonisti	88
3.2	Batteri	89
3.2.1	Patogeni obbligati: <i>Pasteuria</i>	89
3.2.2	Altri batteri obbligati	93
3.2.3	Batteri non specializzati	94
3.3	Funghi	95
3.3.1	Funghi trappola	95
3.3.2	Endoparassiti	96
3.4	Virus	99
3.5	Conclusioni	99
	Bibliografia	100
4	Biocontrollo dei nematodi fitoparassiti mediante microrganismi nematofagi registrati in Italia (S. Landi, V.M. Sellitto, C. Pane)	107
4.1	Ecologia microbica nei sistemi naturali associata alla soppressione dei nematodi fitoparassiti	107
4.2	Microrganismi nematofagi registrati in Italia: meccanismi di azione e modalità di impiego	108
4.2.1	<i>Bacillus firmus</i> ceppo I-1582	109
4.2.1.1	Biologia e meccanismo d'azione	109
4.2.1.2	Modalità d'impiego	109
4.2.2	<i>Purpureocillum lilacinus</i> ceppo 251 (precedentemente <i>Paecilomyces lilacinus</i> ceppo 251)	109
4.2.2.1	Biologia e meccanismo d'azione	110
4.2.2.2	Modalità d'impiego	110
4.3	Nuovi microrganismi potenzialmente utili per il biocontrollo dei nematodi	110
4.4	Innovazioni e prospettive per aumentare l'efficacia del controllo biologico	112
	Bibliografia	113
5	Utilizzo dei nematodi entomopatogeni in agricoltura (E. Tarasco, F. de Luca, A. Troccoli, G. Curto, E. Fanelli, M. Clausi)	115
5.1	Biologia ed etologia di Steinernematidae e Heterorhabditidae	116

5.1.1	Batteri simbiotici	117
5.1.2	Strategie di attacco e Reazioni degli insetti	118
5.2	Campionamento, allevamento e conservazione di EPN	119
5.3	Sistematica dei nematodi entomopatogeni	121
5.3.1	Genere <i>Steinernema</i>	121
5.3.2	Genere <i>Heterorhabditis</i>	122
5.3.3	Presenza e distribuzione degli EPN in Italia	122
5.4	Strategie di lotta biologica con nematodi entomopatogeni	124
5.4.1	Esempi di strategie di lotta biologica con EPN	125
5.5	Metodi di distribuzione dei nematodi entomopatogeni	126
5.6	Regolamentazione dell'utilizzo dei nematodi entomopatogeni	127
	Bibliografia	128
6	I nematodi a vita libera del suolo e loro utilità come bioindicatori (<i>M. Clausi, E. Tarasco, F. de Luca, E. Fanelli, A. Troccoli</i>)	129
6.1	Introduzione	129
6.2	Nematodi a vita libera, nel suolo	130
6.3	Analisi della composizione faunistica dei nematodi: Indici di Maturità (MI) e Indice dei Parassiti delle Piante (PPI)	135
6.4	Analisi della composizione faunistica dei nematodi: rappresentazione grafica della nematofauna e gilde nematologiche	138
6.5	L'impronta metabolica della comunità nematologica sull'ambiente: il metabolismo del carbonio	142
6.6	Conclusioni	144
	Bibliografia	144
7	Tecniche molecolari per la diagnosi di nematodi fitoparassiti (<i>E. Fanelli, A. Troccoli, M. Clausi, A. Vovlas, E. Tarasco, F. De Luca</i>)	147
7.1	Introduzione	147
7.2	Identificazione dei nematodi fitoparassiti mediante analisi del DNA	148
7.3	Real-time PCR	151
7.4	Metodi di amplificazione isoterma	151
7.4.1	<i>Loop-mediated isothermal AMPlification (LAMP)</i>	151
7.4.2	<i>Recombinase Polymerase Amplification (RPA)</i>	152
7.5	Sequenziamento	153
7.6	Marcatori molecolari	157
7.7	Analisi filogenetiche di sequenze	158
	Bibliografia	160
8	Limiti, esigenze di ricerca e prospettive future nell'impiego degli agenti di controllo biologico dei fitonematodi (<i>B. Manachini, G. d'Errico</i>)	165
8.1	Agenti biologici di contenimento	166

8.2	Esigenze di ricerca per incrementare il successo degli agenti biologici di contenimento	167
8.2.1	Prezzo ottimale	168
8.2.2	Reperibilità	169
8.2.3	Applicazione	169
8.3	La chemical ecology nel controllo dei nematodi fitoparassiti	169
8.3.1	Sostanze chimiche emesse dai nematodi	169
8.3.2	Semiochimici emessi dalle piante ed interazioni con i nematodi fitoparassiti	170
8.3.3	Sostanze chimiche attrattive derivate da agenti patogeni e loro applicazione nel biocontrollo dei nematodi parassiti delle piante	172
8.4	Bioeconomia, controllo dei nematodi fitoparassiti e controllo di insetti infestanti	173
8.5	Nanomateriali e prodotti di origine vegetale nella gestione dei fitonematodi	174
8.6	La complessità della difesa integrata (IPM)	174
8.7	Conclusioni e possibili prospettive future	175
	Bibliografia	176
	Indice dei nomi	181

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

*Alberto Troccoli, Elena Fanelli,
Alessio Vovlas, Mirella Clausi,
Eustachio Tarasco e Francesca de Luca*

L'intensità dei danni provocati dai nematodi, che in alcuni casi può determinare l'azzeramento delle produzioni, varia in funzione delle caratteristiche pedoclimatiche dell'areale considerato, delle specie e colture interessate, e dalla quantità di nematodi presenti (Figg. 1.1-1.2). I nematodi fitoparassiti sono organismi vermiformi non metamerici, lunghi 0,4-2 mm, generalmente trasparenti (Fig. 1.3).



Figura 1.1 – Campo coltivato a cipolla gravemente infestato dal nematode *Ditylenchus dipsaci* (Foto: cortesia del dott. Nicola Greco).



Figura 1.2 – A) Danni da *Globodera pallida* su patata, in Puglia; B) Campo di grano con estesi ingiallimenti per l'attacco della specie cisticola *Heterodera avenae* (Foto: cortesia del dott. Nicola Greco).

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti



Figura 1.3 – *Nematodi in sospensione acquosa appartenenti a diversi generi, fotografati allo stereo microscopio.*

Essi sono cilindrici o fusiformi, rotondi in sezione trasversale, con diametri compresi tra 10 e 35 μm . Possono inoltre presentare un forte dimorfismo sessuale: le femmine assumono forme diverse a seconda della specie (vermiforme, piriforme, sferica, limoniforme, ecc.). Una caratteristica comune è quella di avere una struttura anatomica e uno sviluppo basati su un ciclo vitale di 4 stadi giovanili e 4 mute, prima di raggiungere lo stadio adulto. Le modalità di riproduzione sono generalmente anfimittiche, con maschi e femmine presenti in percentuali variabili tra il 50% per entrambi o con i maschi percentualmente molto meno numerosi delle femmine. Piuttosto comune, tra i nematodi, è anche la riproduzione partenogenetica: in questo caso i maschi sono generalmente assenti, o rari.

1.1 Anatomia

I nematodi fitoparassiti possiedono un'anatomia di base simile a quella di tutti gli altri nematodi, con un corpo per lo più vermiforme a simmetria bilaterale, diviso in regione labiale, cui segue una regione faringea, un intestino, che occupa la maggior parte del corpo e, infine, una regione caudale (Fig. 1.4). I nematodi fitoparassiti, tuttavia, presentano alcuni adattamenti morfo-funzionali che sono la conseguenza diretta del loro *habitus* parassitario e che consistono, anzitutto, nella differenziazione di uno **stiletto** (una struttura rigida, aghiforme e cava), un **faringe** variamente conformato e composto di fibre mioepiteliali e da una porzione ghiandolare terminale, che spesso si allunga posteriormente a ricoprire il primo tratto di intestino e, infine, una assenza pressoché totale di appendici o setole, che caratterizzano invece, per es., le specie marine.

L'elemento caratterizzante dei nematodi fitoparassiti è lo stiletto che, a seconda della sua origine e conformazione, può essere uno stomatostilo (nei Tylencho-

morpha) o un odontostilo (nei Dorylaimida, Longidoridae) o ancora, sebbene con un termine più desueto, un onchiostilo (nei Trichodoridae) (Fig. 1.5). Il primo è composto tipicamente da tre parti, una anteriore (*conus*) e una posteriore, cilindrica (asta), che termina con tre appendici rotondeggianti basali (o “bottoni”)

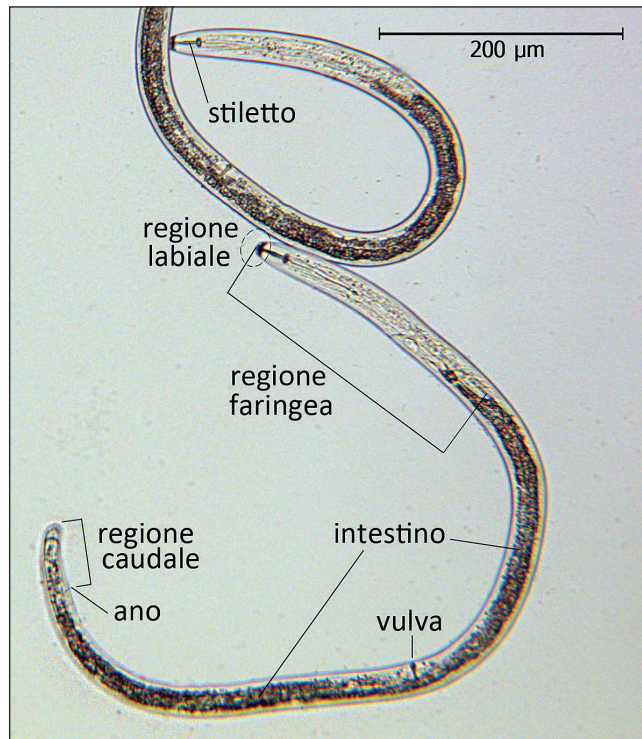


Figura 1.4 – *Femmine di nematodi fitoparassiti.*

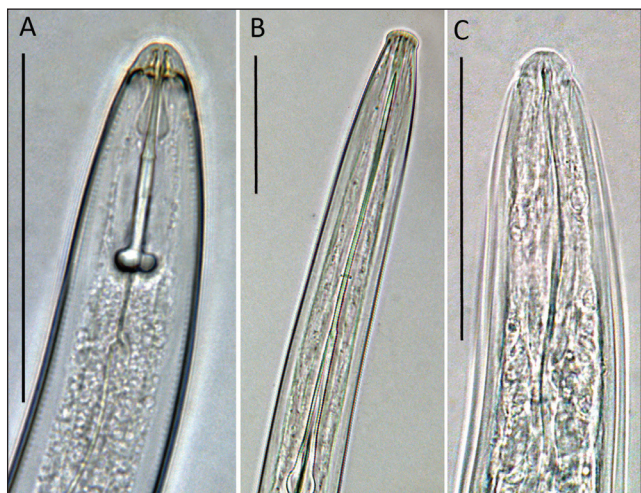


Figura 1.5 – *Tipologie di stiletti nei diversi nematodi fitoparassiti. A: stiletto di un Tylenchomorpha; B: odontostilo di un Longidoridae; C: onchiostilo di Trichodoridae (Scala delle barre = 50 µm).*

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

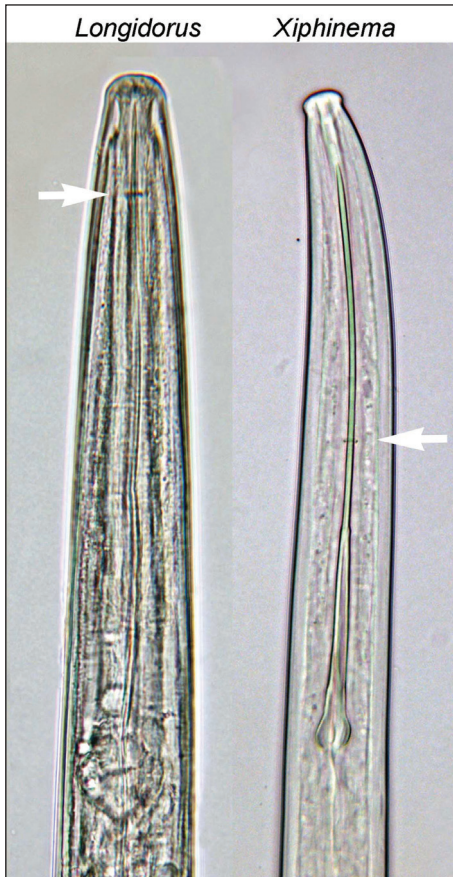


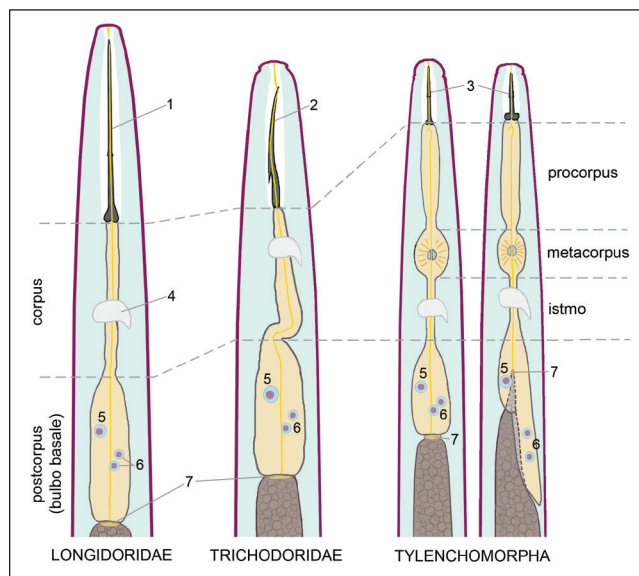
Figura 1.6 – Regione anteriore di femmine di *Longidorus* e *Xiphinema* mostrando la diversa posizione dell'anello guida (freccia).

disposte una dorsalmente e due ventro-lateralmente. Lo stiletto dei longidoridi si compone di due parti, l'anteriore (*odontostilo*) e la posteriore (*odontoforo*) che presenta nella parte terminale tre espansioni (*flange*), sulle quali prendono inserzione i muscoli protrattori dello stiletto. Caratteristica dei longidoridi è anche la presenza di un **anello guida**, posizionato nei *Longidorus* in posizione anteriore, poco al di sotto del faringostoma, mentre negli *Xiphinema* questo è posizionato ca. alla base dell'odontostilo (Fig. 1.6). L'*onchiostilo* dei Trichodoridae invece, ha la forma di un ago ricurvo ventralmente, con una porzione basale sclerotizzata (*onchioforo*) ed una parte anteriore sottile e appuntita (*onchiostilo*). La funzione dello stiletto è quella di perforare la parete cellulare delle cellule corticali della radice, iniettare all'interno della cellula ospite le secrezioni prodotte dalle cellule ghiandolari del faringe per iniettare secrezioni salivari funzionali al processo di nutrizione del nematode parassita. Una tale diversità di morfologie degli stiletto riflette le diverse attitudini trofiche e studi recenti hanno inoltre confermato che tali strutture, avendo origini distinte, rappresentano un tipico esempio di evoluzione parallela (Quist *et al.*, 2015). Sembra ormai accertato che

il parassitismo delle piante abbia avuto origine indipendentemente almeno tre volte tra i diversi *taxa*.

L'altro carattere distintivo dei nematodi parassiti di piante è costituito dalle grandi cellule delle ghiandole faringee, una dorsale e due ventro-laterali, in grado di produrre secrezioni enzimatiche e ormonali tali da modificare il contenuto citoplasmatico delle cellule ospiti per renderlo assimilabile e adatto al nutrimento del parassita. La natura di queste secrezioni e della serie di reazioni che si innestano all'atto del nutrimento sono oggetto di studi da diversi anni e, per certi aspetti non ancora del tutto chiariti. Il faringe dei nematodi fitoparassiti può essere sostanzialmente di due tipi. Il primo tipo, tipico dei Longidoridae (*Xiphinema* e *Longidorus*), è cilindroide e diviso in una parte anteriore tubulare, più sottile, che si innesta su un bulbo basale muscolare-ghiandolare, di diametro maggiore (Fig. 1.7). Il faringe dei trichodoridi è molto simile a quello dei longidoridi, ma con una parte anteriore più corta che si espande gradualmente in un bulbo basale più grande, muscolo-ghiandolare. Il secondo tipo di faringe è quello tipico dei Tylenchomorpha, con una parte anteriore (*procorpus*) muscolare, cui segue un bulbo mediano (*metacorpus*), rotondeggiante e muscolare, un *istmo* non muscolare di lunghezza variabile e un bulbo posteriore ghiandolare, composto dalla fusione di 3 ghiandole, che può estendersi posteriormente a ricoprire il primo tratto di intestino. Il faringe è connesso all'intestino da una valvola faringo- (o esofago-) intestinale detta *cardia*, cui segue l'intestino, semplice e tubolare, che occupa i 2/3 del corpo e termina a sua volta con il retto, un breve tubicino che sbocca nella parte ventrale terminale del corpo con il poro anale. L'istmo faringeo è solitamente cerchiato da un manicotto di tessuto nervoso che costituisce il **sistema nervoso centrale**. Da esso si dipartono diversi gangli o nervi

Figura 1.7 – Rappresentazione schematica delle tipologie di faringe nei nematodi fitoparassiti: 1: odontostilo; 2: onchio-stilo; 3: stiletto; 4: anello nervoso; 5: nucleo della ghiandola dorsale faringea; 6: nuclei delle ghiandole ventro-sublaterali; 7: *cardia*.



1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

longitudinali che si connettono anteriormente ai sensilli della regione cefalica e, posteriormente, decorrono dorso-ventralmente e lateralmente per raggiungere tutti gli organi del corpo.

I nematodi fitoparassiti hanno un **apparato riproduttore** ben sviluppato. Le femmine possono essere didelfiche (una condizione considerata di base, da un punto di vista evolutivo) o monodelfiche, in cui uno solo dei due tratti genitali è sviluppato (in genere quello anteriore) essendo l'altro ridotto ad un abbozzo rudimentale, se non addirittura assente; nel primo caso, la vulva è posizionata circa al 50% della lunghezza totale del corpo, mentre nel secondo, è più spostata verso la parte terminale (>70%, come nei *Pratylenchus*) o immediatamente anteriore all'apertura anale (come nei criconematidi). I maschi possono avere una singola gonade (o testicolo), come nella maggior parte dei Tylenchomorpha, o due gonadi, che, tramite il *vaso deferente*, trovano sbocco all'esterno con una "cloaca", una cavità in comune con il tratto terminale del canale digestivo. I nematodi infine, non hanno un vero e proprio apparato circolatorio e neanche un apparato respiratorio. Nel primo caso, questa funzione è svolta dal liquido pseudocelomatico, nel quale tutte le strutture e gli apparati sono immersi, all'interno del corpo, mentre, nel secondo caso, è la **cuticola** che assolve agli scambi gassosi intra-extra corporei.

1.2 Tipologie di parassitismo e gruppi trofici

I nematodi mostrano una certa varietà di attitudini trofiche. Molto abbondanti e pressoché ubiquitari sono i **microfagi**, per lo più appartenenti alla famiglia dei Rhabditidae, che si nutrono di batteri o microrganismi del terreno, fornendo un importante contributo alla decomposizione e al riciclo della sostanza organica. Vi sono poi i **fungivori**, la maggior parte dei quali appartenenti alla superfamiglia Aphelenchoidea, i nematodi **saprofagi** (questi ultimi si nutrono di materia organica in decomposizione), gli **onnivori**, in grado di cibarsi di alghe, funghi e altri organismi (diversi generi, appartenenti all'ordine Dorylaimida), i **predatori**, che si nutrono di altri nematodi o animali tellurici (ad es. nematodi dell'ordine Mononchida) e, infine, i nematodi **fitofagi**, che si nutrono di parti vegetali (la maggior parte dei nematodi fitoparassiti delle superfamiglie Tylenchoidea e Aphelenchoidea e un paio di famiglie dei Dorylaimoidea). Questi ultimi mostrano tre tipi di fitoparassitismo: ectoparassitismo, semi-endoparassitismo ed endoparassitismo.

1.2.1 Ectoparassitismo

I nematodi ectoparassiti rappresentano una forma primitiva di parassitismo e comprendono nematodi in grado di perforare la rigida parete delle cellule radicali, mediante l'uso dello stiletto, rimanendo al di fuori della radice. I nematodi ectoparassiti possono essere suddivisi in **migratori** e **sedentari**. Gli ectoparassiti migratori, come i nematodi appartenenti ai generi *Xiphinema*, *Tricho-*

1.2 Tipologie di parassitismo e gruppi trofici

dorus e *Longidorus*, rimangono al di fuori della radice e si spostano nel terreno lungo la superficie radicale limitandosi a pungere, più o meno in profondità (a seconda della lunghezza dello stiletto) le cellule epidermiche o corticali da cui traggono il nutrimento. Gli ectoparassiti sedentari, invece, rimangono sempre all'esterno della radice, ma localizzati sul medesimo sito trofico da cui traggono nutrienti. Tra questi ultimi, possiamo citare *Cacopaurus*, *Criconemoides* e *Hemicycliophora*. Quest'ultimo gruppo di nematodi inducono galle terminali quando si cibano all'estremità della radice. Alcune specie di *Hoplolaimus*, di *Ogma* e di *Helicotylenchus* possono comportarsi come semi-endoparassiti o ectoparassiti migratori a seconda della pianta ospite. Tale categoria di nematodi, che conserva l'aspetto vermiforme per tutta la durata del ciclo vitale, non determina profonde alterazioni della radice ma produce severi danni indiretti facilitando l'attacco di altri microrganismi patogeni del terreno.

1.2.2 Semi-endoparassitismo

I nematodi che si nutrono come semi-endoparassiti penetrano parzialmente (generalmente per circa 1/3 della lunghezza del loro corpo) all'interno della radice (Fig. 1.8) e con l'estremità anteriore stabiliscono un *sito di nutrimento* permanente. Tipici rappresentanti di questa modalità di parassitismo sono i nematodi dei generi *Rotylenchulus*, detti anche nematodi reniformi (Fig. 1.9) e *Tylenchulus*, che per un breve periodo del loro ciclo vitale si trovano nel terreno allo stato libero, nutrendosi come ectoparassiti, finché gli stadi giovanili di 2^a età e le femmine immature, che rappresentano il cosiddetto "stadio infettivo" rispettivamente per il *Tylenchulus* e per il *Rotylenchulus*, penetrano nei tessuti radicali con l'estremità

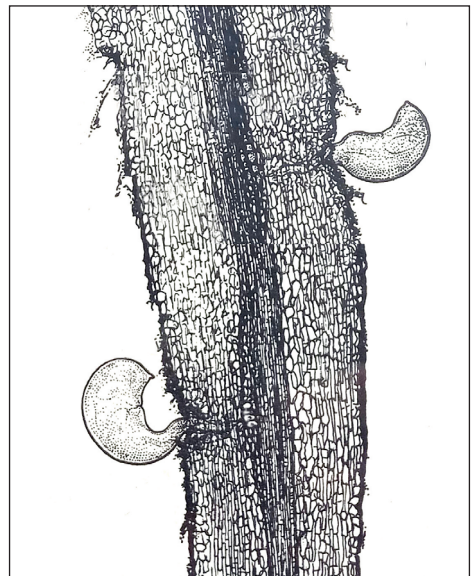


Figura 1.8 – *Disegno illustrante due femmine di Rotylenchulus reniformis infisse nella radice e sporgenti all'esterno per 2/3.*

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

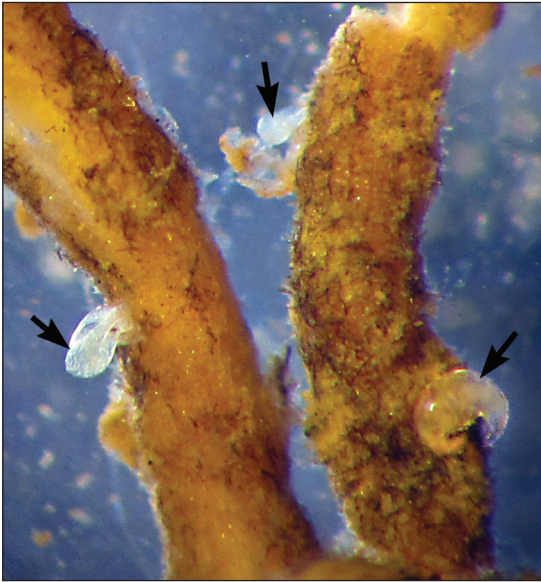


Figura 1.9 – Femmine di *Rotylenchulus* sp. infisse su radici di olivo.

tà anteriore del corpo e stabiliscono un sito di nutrizione permanente, che assicura una maggiore assunzione di cibo e un aumento del potenziale riproduttivo.

1.2.3 Endoparassitismo

I nematodi endoparassiti, hanno sviluppato maggiori capacità invasive poiché penetrano all'interno della pianta ospite, con l'ausilio dello stiletto, e causano severi danni alla struttura stessa della radice. Anche i nematodi endoparassiti possono essere ulteriormente distinti in **migratori** e **sedentari**. I nematodi endoparassiti migratori (generi *Pratylenchus*, *Hirschmanniella* e *Radopholus*) si muovono intercellularmente all'interno della radice stabilendo diversi siti di contatto e nutrendosi di volta in volta del contenuto delle cellule corticali con le quali vengono in contatto durante la loro "migrazione" tissutale (Fig. 1.10). Così facendo, molte cellule vengono distrutte compromettendo l'organizzazione del tessuto radicale, nel quale si può vedere, man mano che il ciclo biologico del nematode si compie, la formazione di necrosi e cavità nello spessore del parenchima corticale delle cellule della radice (Fig. 1.11). Oltre ai danni diretti, quindi, causati dall'azione di nutrimento e migrazione attraverso i tessuti, ci sono anche i danni indiretti, in quanto la penetrazione nelle radici e le lacerazioni tissutali costituiscono una via di ingresso per gli altri microrganismi patogeni tellurici. Tra gli endoparassiti migratori si possono annoverare anche i nematodi del genere *Aphelenchoides* che, sfruttando lo strato sottile di acqua lasciato sulla superficie degli steli e delle foglie, sono in grado di muoversi ectoparassiticamente dal terreno alle parti aeree della pianta e di penetrare attraverso gli stomi per nutrirsi e riprodursi nei tessuti fogliari. Gli endoparassiti sedentari

Figura 1.10 – *Femmina di Pratylenchus sp. all'interno del parenchima corticale della radice, mostrante porzioni di parete cellulare in necrosi e nuclei ipertrofici (frecche) di cellule parenchimatose. (n = nematode).*

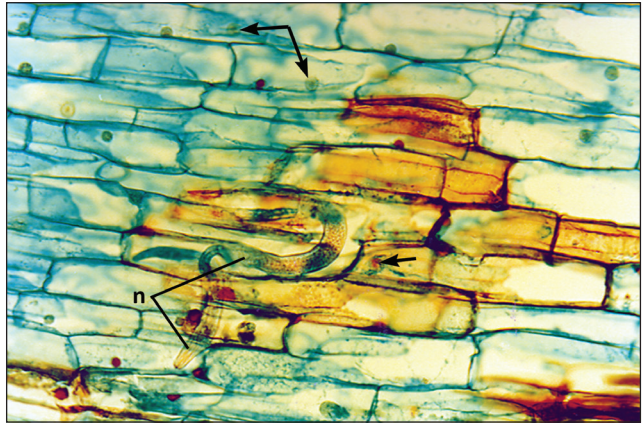
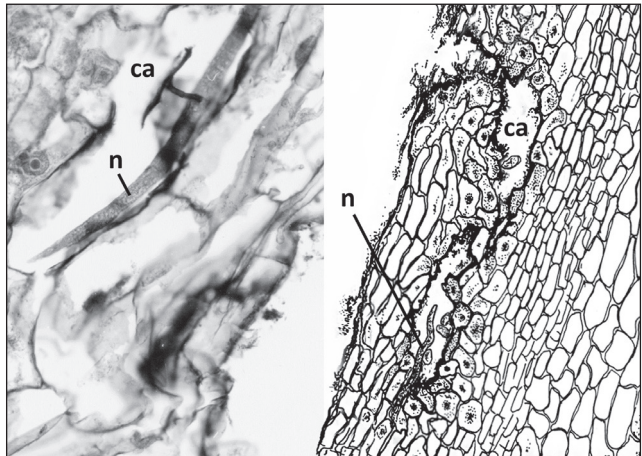


Figura 1.11 – *Foto di sezione longitudinale di radice (a sinistra) mostrandone un nematode (n) delle lesioni all'interno di una cavità (ca). A destra, il disegno illustra la sezione longitudinale di radice con un nematode (n) all'interno di una cavità (ca) scavata dall'azione trofica e dalla migrazione dello stesso nello spessore del tessuto corticale della radice.*



comprendono i nematodi più importanti dal punto di vista agrario ed economico e rappresentano la forma di parassitismo più evoluta del phylum Nematoda. Tipici rappresentanti sono i nematodi “galligeni” (*Meloidogyne* spp.) ed i nematodi “cisticoli” (*Globodera* e *Heterodera* spp.). Nell'endoparassitismo sedentario, gli stadi infettivi, rappresentati dal secondo stadio larvale o, meglio, giovanile, si localizzano in siti specifici dell'apparato radicale, in prossimità della regione del cilindro vascolare, inducendo la formazione di strutture di approvvigionamento di nutrienti specializzate o *feeding sites*. I *feeding sites*, a seconda della specie di endoparassita sedentario, prendono il nome di “cellule giganti”, nel caso dei nematodi galligeni (*Meloidogyne*), o di “sincizi”, nel caso dei cisticoli (*Globodera* e *Heterodera*). Entrambe le strutture sono costituite da cellule multinucleate, ma l'origine è diversa. Le cellule giganti derivano da numerose mitosi non seguite da citodieresi, mentre i sincizi derivano dalla dissoluzione della parete cellulare tra cellule adiacenti con fusione dei citoplasm, ma

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

non dei nuclei. L'endoparassitismo sedentario offre molti vantaggi da un punto di vista evolutivo. Il tessuto della pianta ospite protegge ed isola il parassita dall'ambiente esterno. Inoltre, il mantenimento di un unico *feeding site* richiede meno energia rispetto a quella necessaria all'endoparassita migratore che deve costituirlo di volta in volta e, al contempo, assicura al parassita ricchezza di nutrimento e fecondità.

1.3 I principali generi di nematodi fitoparassiti

1.3.1 Genere *Aphelenchoides* Fischer, 1894

Questo genere comprende un gruppo piuttosto ampio di specie, presenti in tutto il mondo, la maggior parte delle quali sono a vita libera, presenti nel terreno o in materiale vegetale in decomposizione e con attitudini trofiche per lo più micetofaghe. Poche specie sono fitoparassite e alcune di esse sono in grado di causare danni seri alle piante ospiti. Sono comunemente note come "nematodi fogliari" in quanto attaccano le parti aeree delle piante (non le radici). Tra le specie più importanti possiamo ricordare *A. besseyi* Christie, 1942, è un importante parassita del riso, sul quale causa il cosiddetto "apice bianco", ma attacca anche diverse graminacee; altre specie di rilievo sono *A. ritzemabosi* (Fig. 1.12) e *A. fragariae*. Quest'ultimo è un tipico nematode della fragola ma entrambe le specie possono danneggiare altre piante ornamentali (felce, geranio e altre bulbose fiorali). Queste ultime specie si comportano sia da ecto- che da endo-parassiti. L'infezione è favorita da condizioni di elevata umidità ambientale. *Aphelenchoides ritzemabosi* è noto per i danni che arreca alle coltivazioni di crisantemo, fragola e, in Liguria, al basilico al quale causa annerimenti e disseccamenti delle foglie (Fig. 1.13).

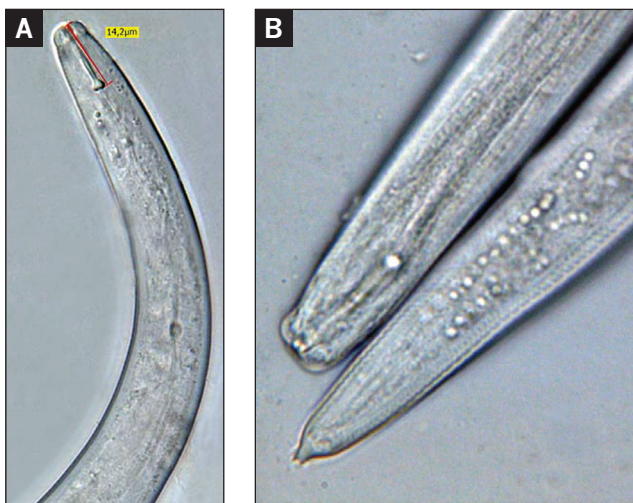
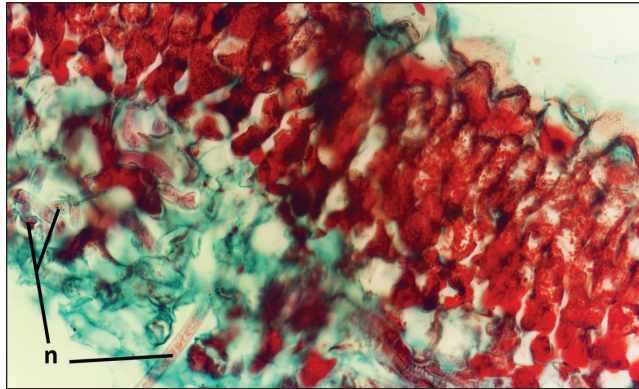


Figura 1.12 – A) Regione anteriore di femmina di *Aphelenchoides ritzemabosi* con misura dello stiletto; B) Estremità cefalica e caudale, quest'ultima con il caratteristico mucrone stellato a 4 punte.

Figura 1.13 – *Esemplari del nematode (n) Aphelenchoides ritzemabosi all'interno del mesofillo fogliare di una foglia di basilico che mostra cavità e cellule alterate nella struttura (cellule del tessuto a palizzata, colorate con fucsina acida) (Foto: cortesia del dott. Nicola Voulas).*



1.3.2 Genere *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937

I nematodi di questo genere appartengono, come gli *Aphelenchoides*, alla famiglia degli Aphelenchoididae Skarbilovich, con i quali condividono la particolarità di attaccare le parti aeree delle piante (non le radici). Il genere comprende circa un centinaio di specie, due sole delle quali, tuttavia, sono parassite di piante e precisamente *Bursaphelenchus xylophilus*, conosciuto come “il nematode del legno del pino” e *B. cocophilus*, che causa la malattia dell’anello rosso delle palme. Entrambe le specie sono veicolate da insetti coleotteri, del genere *Monochamus*, nel primo caso e *Rhynchophorus palmarum* nel secondo. Gli insetti vettori, infatti, sono l’elemento caratterizzante del ciclo vitale della maggior parte dei nematodi appartenenti a questo genere e, sebbene solo per poche specie, la duplice attitudine trofica, in quanto sono in grado di comportarsi sia da micetofaghi sia da fitoparassiti. La morfologia di questi nematodi è simile agli *Aphelenchoides*, con femmine di dimensioni da 0,4 mm (ad es. *B. minutus*), a 1,5 mm, regione cefalica separata dal resto del corpo da una leggera costrizione, stiletto generalmente lungo 12-20 μm , faringe con bulbo mediano molto sviluppato e lobo ghiandolare che si sovrappone all’intestino dorsalmente, vulva in posizione piuttosto posteriore (70-80% della lunghezza del corpo), apparato genitale mono-prodelfico (ossia la sola gona-de anteriore è sviluppata), sacco post-uterino (gonade posteriore atrofica) lunga da tre a sei volte il diametro corporeo alla vulva e coda di lunghezza variabile, conoide. Il maschio è simile alla femmina, generalmente un po’ più piccolo e con una coda fortemente incurvata ventralmente, terminante con una piccola espansione cuticolare, o **bursa**, da cui deriva il nome del genere. Le specie fitoparassite rappresentano appena il 2% del totale degli appartenenti al genere, ma sono di importanza quarantena poichè in grado di causare danni di notevole entità.

1.3.2.1 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle, 1970

Questa specie è estremamente invasiva e distruttiva per le foreste di pini. Iscritta nelle liste di quarantena di oltre 40 Paesi (Tóth, 2011), è una specie ritenuta

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

nativa del Nord America da dove, agli inizi del XX secolo, è stata dapprima introdotta in Giappone tramite legname d'importazione infestato e, successivamente, si è diffusa in Asia sudorientale e da qui, nel 1999 in Portogallo, infettando in una decina d'anni le pinete dell'intero territorio. Il ciclo vitale di questo parassita è diviso in due fasi: una di dispersione (fase fitofaga), che rappresenta la trasmissione primaria (da un albero infetto ad uno sano) e una di propagazione (fase micetofaga) o trasmissione secondaria (moltiplicazione e diffusione all'interno dell'ospite). La prima fase, che abbraccia il periodo primaverile-estivo, inizia con il IV stadio giovanile ("stadio durevole"), che non si nutre ma viene trasportato sotto le elitre o nell'addome dell'insetto vettore (*Monochamus* spp.) e penetra nei tessuti della pianta ospite (solitamente *Pinus* spp.) attraverso le ferite prodotte dall'insetto durante la nutrizione o l'ovideposizione di questo; da qui, muta in adulto entro 48 h e riproducendosi attivamente mediante numerosi cicli biologici, colonizza rapidamente i canali resiniferi e si diffonde all'interno dell'ospite. In conseguenza di questa attività, appaiono i primi sintomi nella pianta ospite, che si manifestano con disseccamenti repentini della chioma, ridotta produzione di resina, per arrivare, nell'arco di uno o un paio di mesi (a seconda delle zone climatiche) al totale disseccamento dell'albero (periodo tardo estivo-autunnale). Dall'inverno alla primavera successiva, si entra nella seconda fase del ciclo, quella micetofaga, nella quale il nematode arresta il suo ciclo biologico al III stadio larvale e si nutre dei funghi (*Ceratocystis*) presenti nel tronco, fino a che, col depauperarsi delle risorse di cibo, il nematode si approssima alle camere pupali dalle larve di *Monochamus* in diapausa. Quando le larve del coleottero si trasformano in pupe, il nematode muta nel IV stadio e le penetra. Poco prima dell'emergenza dell'adulto dal tronco, ulteriori stadi di 4^a età del nematode penetrano nelle tracheidi o sotto le elitre del coleottero o, attaccati alle ife fungine presenti nelle camere pupali, vengono veicolati dall'insetto per raggiungere i giovani germogli di un nuovo albero (non infetto) e ricominciare il ciclo.

Indicazioni per la lotta. *Bursaphelenchus xylophilus* è un organismo di quarantena che si è diffuso con il commercio di legname infestato; oggi il rischio maggiore di una sua introduzione è dato dalla circolazione dei materiali da imballaggio in legno (*Wood Packaging Material*), con cui si proteggono e si trasportano gran parte delle merci negli scambi commerciali internazionali.

1.3.3 Genere *Ditylenchus*, Filipjev, 1936

Appartengono a questo genere oltre una sessantina di specie, ma solo alcune di esse sono fitoparassite. Tra le più importanti, sia per l'ampia distribuzione che per l'elevata polifagia, vi è il *Ditylenchus dipsaci*. È un nematode endoparassita migratore distruttivo delle parti aeree delle piante. Non attacca le radici ma danneggia tuberi, bulbi e fittoni ingrossati. Possiede un *range* di oltre 500 piante ospiti ed è in grado di riprodursi anche su moltissime piante spontanee che crescono dall'autunno alla primavera. In Italia i danni sono particolarmente gravi su cipolla, aglio, fragola, carota, fava e sedano. Di *D. dipsaci* sono note molte

1.3 I principali generi di nematodi fitoparassiti

razze, tanto che essa è considerata una “species complex”, ognuna specializzata su una più ristretta cerchia di piante ospiti. Questa specie si riproduce al meglio con temperature di 15-20 °C e molta umidità; pertanto nebbie, rugiade, piogge e irrigazioni a pioggia favoriscono l'infezione del nematode mentre temperature elevate e condizioni di siccità ambientale la deprimono.

Sopravvive nel terreno e specialmente negli organi infetti delle piante come quarto stadio giovanile quiescente. Non appena sopravvivono condizioni favorevoli, il quarto stadio diviene attivo, inizia l'infezione, dopo alcuni giorni diviene adulto e le femmine iniziano a deporre le uova nei tessuti infetti, potendone deporre ognuna circa 500 nell'arco di 2 mesi. Gli esemplari adulti dei due sessi sono simili (Fig. 1.14), sebbene i maschi appaiano più esili, rassomigliano a degli aghi e misurano poco più di 1 mm di lunghezza. Dalle uova emergono esemplari del secondo stadio giovanile (quelli del primo stadio mutano all'interno dell'uovo) in grado di iniziare una nuova generazione che a 18 °C si completa in circa 20 giorni; se ne possono completare diverse durante un ciclo colturale raggiungendo tassi di riproduzione molto alti, anche di oltre 1000 volte il livello di popolazione ad inizio ciclo colturale. Quando le condizioni ambientali tendono a divenire sfavorevoli e la pianta ospite si avvia a completare il ciclo, il nematode arresta il suo sviluppo al quarto stadio (stadio durevole) ed entra in quiescenza sia nel terreno che negli organi infetti. Il declino del nematode è rapido nel terreno, specialmente in quello sabbioso, e più lento nei diversi organi della pianta, semi inclusi.

L'entità dei danni è elevata anche quando sono presenti nel terreno pochi esemplari per dm³ di terra, essendo il danno influenzato moltissimo dalle condizioni ambientali dopo la semina o trapianto della pianta ospite. Le infezioni del nematode danneggiano i tessuti parenchimatici degli organi attaccati che divengono piuttosto spugnosi. I sintomi sulle piante attaccate sono abbastanza caratteristici (Fig. 1.15 A-B) e consistono in deformazioni delle foglie (cipolla, aglio e frago-

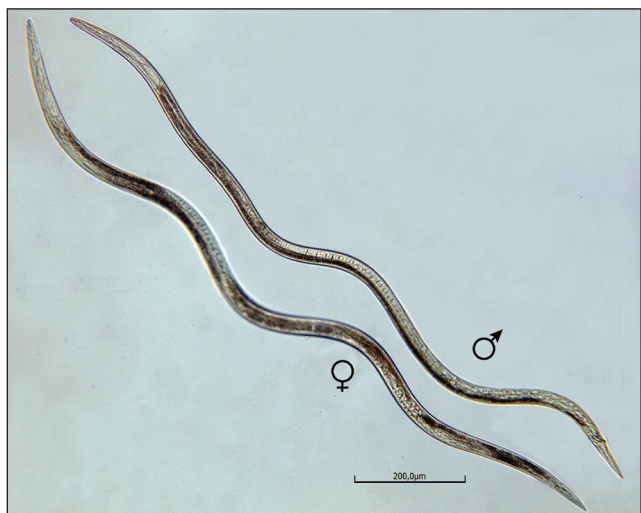


Figura 1.14 – *Esemplari adulti di Ditylenchus dipsaci*.

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

la), degli steli (fava), di infiorescenze e frutti (fragola) (Fig. 1.15D) e marcescenza dei bulbi (cipolla e aglio) (Fig. 1.15C) o del fittone (carota) (Fig. 1.15E) che non sono commerciabili.

La specie *D. gigas*, considerata sin dall'inizio la "razza gigante" del *D. dipsaci*, è stata elevata a rango di specie a seguito di approfondite analisi morfo-biometriche, cariologiche, enzimatiche e molecolari. Morfologicamente è assai simile a *D. dipsaci*, differendo sostanzialmente per le dimensioni maggiori (quasi doppie) rispetto a quest'ultima. Con *D. dipsaci* condivide la biologia e buona parte delle piante ospiti. I danni che causa su fava, uno dei principali ospiti, sono più ingenti rispetto a quelli causati dal *D. dipsaci*, con una più evidente sintomatologia sulle varie parti della pianta e un maggiore percentuale di semi infetti.

Ditylenchus destructor è un importante fitoparassita distruttivo della patata, suo principale ospite. Sulle piante fortemente attaccate, si osservano sintomi di crescita stentata, mentre i tuberi mostrano rugosità e screpolature in superficie, con la polpa imbrunita, con aspetto secco e farinoso. Diversamente dal *D. dipsaci*, attacca solo le parti ipogee della pianta, penetrando attraverso le lenticelle dei tuberi e invadendo progressivamente l'intero tubero. È una specie che si adatta meglio ai terreni freddi e umidi, mal sopportando l'eccessivo disseccamento, ed è in grado di perdurare l'infestazione tanto in campo, quanto nei tuberi in stoccaggio.



Figura 1.15 – Danni da *Ditylenchus dipsaci*. Vistose fallanze in un campo di cipolla (A) e di carota (B). Deformazione di bulbi di cipolla (C) e di piante di fragola (D) e marcescenza (da sinistra a destra) di tuberi di carota (E) (Foto: cortesia del dott. Nicola Greco).

1.3.4 Genere *Heterodera* Schmidt, 1871

I nematodi appartenenti a tale genere sono caratterizzati da uno stadio di sopravvivenza tipico e molto persistente, la **cisti** (Fig. 1.16). Questa non è altro che la femmina che, una volta matura, riempie il corpo di uova e ispessisce la cuticola che alla fine del ciclo vitale diventa bruna e può persistere nel terreno a protezione delle uova almeno per 5-6 anni, a volte anche 20. Sono anch'essi endoparassiti sedentari delle radici, all'interno delle quali formano un **sincizio** durevole, che assicura il nutrimento al parassita per l'intera durata del ciclo biologico. Alcune specie hanno diffusione mondiale mentre altre sono piuttosto localizzate in talune aree geografiche. Sono considerati, globalmente, come i fitonematodi più importanti dopo i nematodi galligeni, in grado di causare seri danni a numerose colture quali cereali, leguminose, riso, carota, soia, solo per citarne alcune. Il genere annovera oltre una ottantina di specie, presenti per lo più in aree temperate, ma alcune specie sono diffuse anche in regioni tropicali e sub-tropicali.

Caratteristica di questi nematodi è che le uova contenute nelle cisti possono andare in diapausa e comunque sono stimolate a schiudersi solo in presenza di adeguate temperature e umidità del terreno e dei diffusati o essudati radicali delle piante ospiti. Il ciclo biologico, simile a quello dei nematodi galligeni, origina dalla schiusura dell'uovo, da cui fuoriesce lo stadio giovanile di 2^a età (il primo stadio muta all'interno dell'uovo) dopo che questo ha rotto il guscio con lo stiletto. Una volta libera nel terreno, la larva di 2^a età migra per raggiungere e penetrare le radici secondarie in prossimità delle zone di accrescimento, quindi raggiunge il cilindro centrale, stabilisce il sito di nutrimento e compie le altre mute, ingrossando il corpo fino al raggiungimento dello stadio adulto.

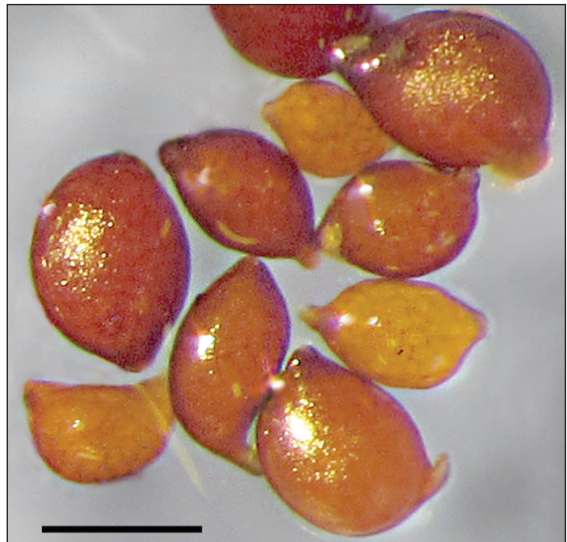


Figura 1.16 – *Cisti di Heterodera sp. al microscopio.*

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

Le femmine adulte, alla maturità, sporgono all'esterno della radice rimanendo con la regione anteriore del corpo conficcata in essa nella zona del cilindro centrale. Queste, dopo essere state fecondate trattengono le uova all'interno del loro corpo. Successivamente la cuticola ispessisce, diviene bruna per effetto di fenomeni di ossidazione di sostanze polifenoliche, dando origine a una cisti che può contenere 100-400 uova. La cisti non si nutre e si lascia cadere facilmente nel terreno ove può permanere per almeno 5-6 anni proteggendo le uova in essa contenute. Nella maggior parte delle specie i maschi sono presenti e in grado di fecondare le femmine. Alla temperatura ottimale (variabile con la specie) una generazione si compie in circa 25-30 giorni, ma il numero di generazioni per ciclo colturale dipende molto dalla specie. I tessuti radicali reagiscono all'infezione del nematode formando intorno alla testa un "sincizio" costituito dalla fusione di diverse cellule per dissoluzione parziale delle loro pareti. Il nematode si nutre a spese delle cellule sinciziali per cui la loro formazione è indispensabile. Vi è un ridotto numero di specie (*H. carotae*, *H. cruciferae*, *H. goettingiana* e *H. glycines*) in cui le femmine depongono le uova prima in un ammasso gelatinoso, come nel caso dei nematodi galligeni, e successivamente le trattengono nel loro corpo trasformandosi poi in cisti. Le uova contenute nelle masse non vanno in diapausa. Le larve di secondo stadio che emergono dalle uova sono leggermente più grosse rispetto a quelle dei nematodi galligeni (Fig. 1.17).

I sintomi sulle parti aeree delle piante ospiti sono simili a quelli dei nematodi galligeni. I danni causati dai nematodi cisticoli sono pure ingenti, sebbene il limite di tolleranza delle diverse colture a questi nematodi sia leggermente più alto (1-2 uova/g di terreno secco) e perdite di produzione di almeno il 50% sono da attendersi in terreni infestati con circa 30 uova/g.



Figura 1.17 - Stadi giovanili di 2^a età (primi 3 a sinistra) di un nematode cisticolo (genere *Heterodera*) in comparazione con giovanili di 2^a età di un nematode galligeno (genere *Meloidogyne*).

1.3.4.1 Principali specie

Delle specie di *Heterodera* che rivestono un certo interesse per l'orticoltura italiana sono da citare la specie *Heterodera carotae*, nota come il nematode cisticolo della carota, che attacca solo la carota coltivata (Fig. 1.18) e quella selvatica, *H. schachtii*, conosciuta come il nematode cisticolo della barbabietola ma che può attaccare anche spinacio, cavoli vari e rapa, *H. goettingiana*, noto come il nematode cisticolo del pisello ma che attacca anche la fava. In un'area piuttosto ristretta della provincia di Pavia è presente *H. glycines*, tipico parassita della soia in tutto il mondo, di importanza quarantenaria, ma che può danneggiare anche fagiolo e fagiolo dall'occhio. In Puglia e Calabria è presente, anche se in aree limitate, *H. cruciferae*, dannoso al cavolo e ad altre crocifere. *Heterodera avenae* è una specie cosmopolita ed un importante parassita di cereali nelle aree temperate. È stata segnalata su frumento in Sardegna, mentre alcune più remote segnalazioni in regioni del sud Italia sarebbero da attribuire alla specie *H. filipjevi*, morfologicamente molto simile alla *H. avenae*. Una specie rinvenuta più di recente nel nostro territorio è *H. elachista*, di origine asiatica, nota per avere come unico ospite il riso. È stata rinvenuta nel 2013 nel terreno e nelle radici di piante di mais in Emilia Romagna (sebbene oggi sia considerata eradicata); tre anni più tardi è stata segnalata su frumento in Lombardia e, sempre nella stessa regione, negli ultimi tre anni è stata rinvenuta anche su mais.

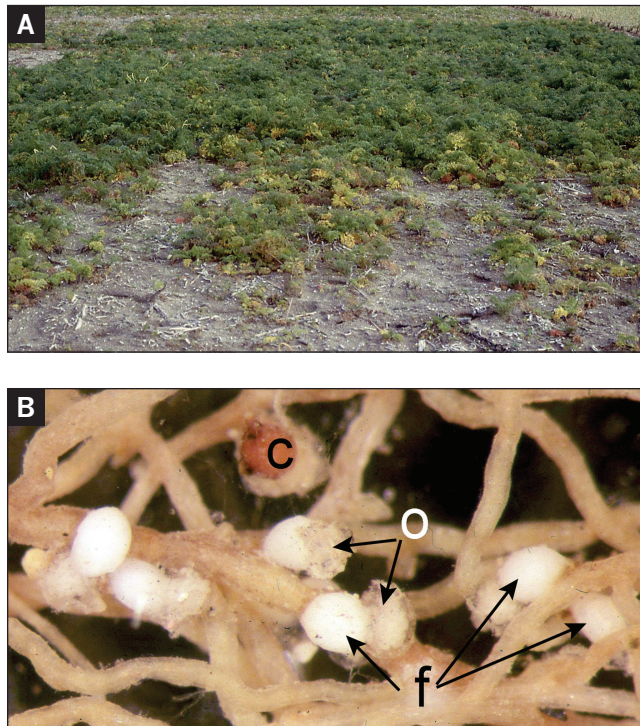


Figura 1.18 – Campo di carota con estesi ingiallimenti e deperimenti dovuti all'attacco di *Heterodera carotae*; in basso, femmine adulte (f) con ovisacchi (o) e cisti (c) su radici capillari.

1. Conosciamo i nematodi: i nematodi fitoparassiti

Tra i nematodi cisticoli, *H. schachtii* e *H. glycines* sono tipici nematodi estivi (25-28 °C) mentre le altre specie preferiscono climi piuttosto freschi (15-22 °C) per cui si riproducono e causano danni soprattutto a specie orticole coltivate dall'autunno alla primavera successiva. Rispetto ai nematodi galligeni la cerchia di piante ospiti delle diverse specie è molto più ristretta e, salvo che per *H. schachtii*, *H. cruciferae* e *H. goettingiana*, la possibilità di riprodursi su piante spontanee è scarsa.

1.3.5 Genere *Globodera* Skarbilovich, 1959

I nematodi appartenenti a questo genere erano un tempo inclusi nel genere *Heterodera*, del quale condividono la biologia e separati poi (nel 1975) da questi ultimi sulla base della morfologia delle cisti, sferiche in *Globodera*, limoniformi, con cono vulvare sporgente in *Heterodera*.

Del genere *Globodera* sono da menzionare le due specie che attaccano la patata, *G. rostochiensis* (nematode cisticolo o nematode dorato della patata) e *G. pallida* (nematode cisticolo pallido o crema della patata) (Fig. 1.19), entrambe annoverate tra i parassiti da quarantena. Le due specie sono biologicamente e morfologicamente molto simili ma sono così denominate perché in *G. rostochiensis* la femmina matura assume una caratteristica colorazione giallo oro (da cui deriva il nome) prima di trasformarsi in cisti, mentre in *G. pallida* la femmina permane di colore bianco-crema. Delle popolazioni di questi nematodi sono noti 5 patotipi di *G. rostochiensis* e 3 di *G. pallida*.

In Campania è presente anche *G. tabacum* nota come nematode cisticolo del tabacco ma che attacca anche la melanzana ma non la patata.

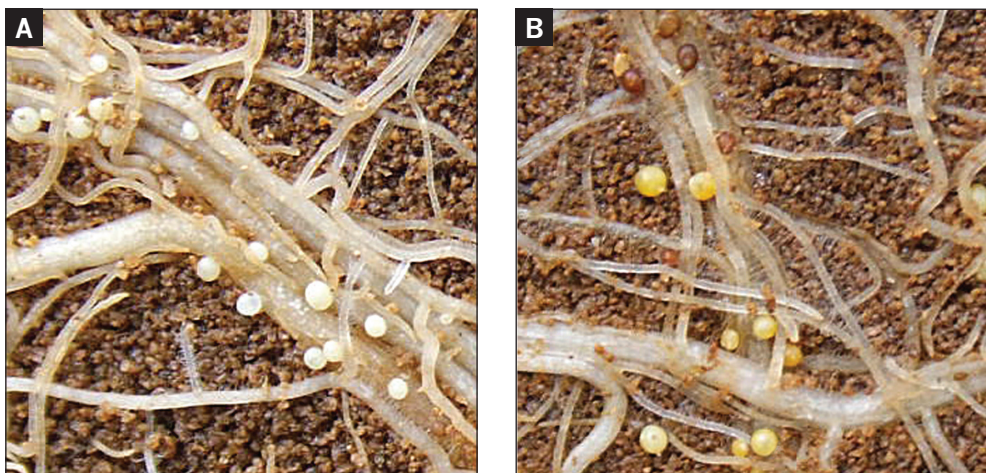


Figura 1.19 – Radici di patata con femmine color bianco crema e cisti di *Globodera pallida* (a sinistra) e femmine di colore giallo e cisti di *G. rostochiensis* (a destra).

5. Utilizzo dei nematodi entomopatogeni in agricoltura

*Eustachio Tarasco, Francesca de Luca,
Alberto Troccoli, Giovanna Curto,
Elena Fanelli, Mirella Clausi*

La maggioranza dei nematodi conduce vita libera o è parassita di piante e animali. Tra questi ultimi ci sono specie “associate” agli insetti con i quali vengono stabiliti rapporti che vanno dalla foresia alla simbiosi, dal commensalismo al parassitismo facoltativo o obbligatorio. In particolare, i nematodi parassiti degli insetti o entomoparassiti (Fig. 5.1) sono frequenti in natura, si rinvencono sull’esoscheletro o nell’emocele, nei sistemi riproduttivo, respiratorio, digestivo e escretore e possono indurre sterilità, ridurre fecondità e longevità, capacità di movimento, ritardarne lo sviluppo o anche causare alterazioni morfologiche e morte dell’ospite. Delle oltre trenta famiglie di nematodi associate in vario modo agli insetti, tra gli entomoparassiti le famiglie Steinernematidae Filipjev, 1934 e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Ordine Rhabditida) sono quelle che rivestono maggiore interesse, da un punto di vista pratico, per il controllo degli esapodi; i nematodi afferenti a queste due famiglie vengono più propriamente detti entomopatogeni poiché esplicano la loro azione in associazione con batteri simbionti (Clausi *et al.*, 2014).

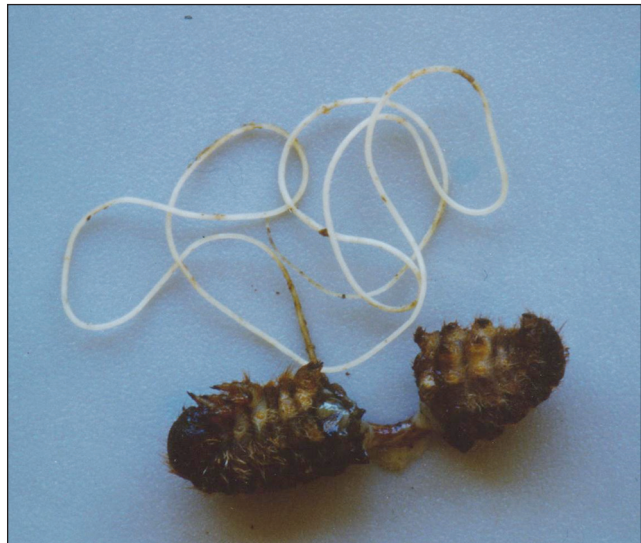


Figura 5.1 – *Hexameris sp.* (Nematoda, Mermithidae), *nematode entomoparassita (ex larva di processionaria del pino)*.

5. Utilizzo dei nematodi entomopatogeni in agricoltura

5.1 Biologia ed etologia di Steinernematidae e Heterorhabditidae

Il ciclo biologico inizia con le giovani femmine che depongono le uova nel substrato, ma quando esse divengono più vecchie oppure ermafrodite, le uova schiudono nell'utero della madre (*endotokia matricida*). Sia in Steinernematidae che in Heterorhabditidae è il terzo stadio quello infestante anche noto come infettivo IJ (*infective juvenile*). Gli stadi giovanili del terzo stadio abbandonano la vittima nella quale sono stati generati, conservando la cuticola dello stadio precedente che li protegge dalla disidratazione, dall'attacco di funghi patogeni o altro tipo di stress e sono meglio conosciuti come DJ (*dauer juveniles*); questa cuticola di protezione viene successivamente persa con il movimento nel suolo alla ricerca di nuove vittime. Individuato l'ospite bersaglio, gli IJ penetrano nel suo corpo preferibilmente attraverso le aperture naturali (bocca, ano, stigmi) dopo averne perforato le trachee o l'intestino (Fig. 5.2).

Gli *Heterorhabditis*, avendo un dente nella parte anteriore del corpo, sono più avvantaggiati perché riescono ad attraversare anche le membrane intersegmentali. Gli *Steinernema*, pur mancando di tale struttura, sono anch'essi capaci di trapassare il tegumento favoriti dalla elevata pressione idrostatica, caratteristica dei nematodi di piccole dimensioni, dal formato della parte anteriore del corpo (ca. 8-15 μm) e anche utilizzando enzimi istolitici da loro secreti. Così *Steinernema feltiae* supera la barriera del tegumento delle larve dei ditteri *Tipula paludosa* e *T. oleracea*, per l'assenza di uno strato protettivo epicuticolare che altrimenti bloccherebbe l'azione degli enzimi istolitici prodotti dagli IJ. Giunti nell'emolinfa, gli IJ liberano i batteri simbiotici presenti nel loro intestino e, più precisamente, gli *Steinernema* rilasciano *Xenorhabdus* spp. e gli *Heterorhabditis* liberano *Photorhabdus* spp. In pratica il nematode per iniettare i batteri si comporta come una piccola siringa. Nell'emolinfa i batteri si moltiplicano rapidamente e producono un'ampia gamma di tossine ed esoenzimi che uccidono l'ospite trasformandone i tessuti in una sorta di zuppa di cui i nematodi si nutrono per raggiungere, dopo quattro stadi di svi-



Figura 5.2 – Stadio giovanile infettivo di *Steinernema feltiae* che sta penetrando attraverso la bocca in una larveta di *Capnodis tenebrionis* (foto P. Marannino).

5.1 Biologia ed etologia di Steinernematidae e Heterorhabditidae

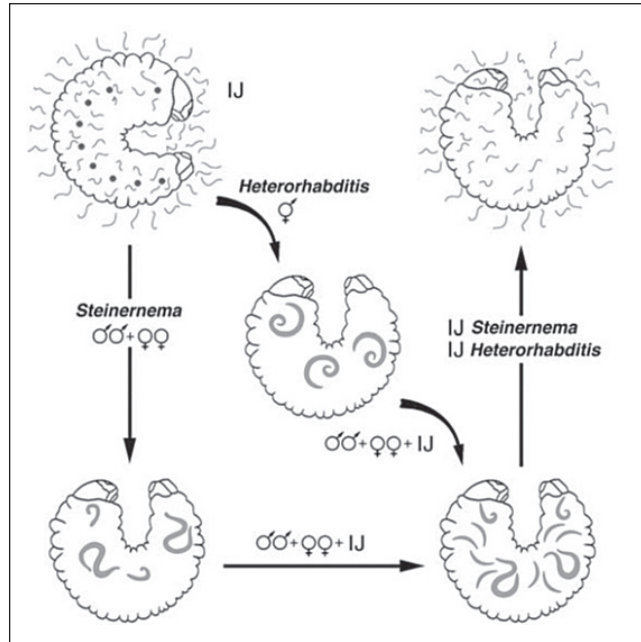


Figura 5.3 – Ciclo biologico di *Steinernema* e *Heterorhabditis*.

luppo, lo stadio adulto. Vengono altresì sintetizzate e secrete sostanze antibiotiche che favoriscono lo sviluppo dei batteri simbiotici. Raggiunto lo stadio adulto, gli *Steinernema* si accoppiano e danno origine a successive generazioni, mentre gli IJ degli *Heterorhabditis* si evolvono in femmine ermafrodite autofertili che nella generazione successiva produrranno maschi e femmine. Il ciclo si completa in alcuni giorni e centinaia di migliaia di nuovi DJ emergeranno dall'ospite, ormai completamente disfatto, alla ricerca di nuove vittime. Un solo *Heterorhabditis* che entri nella vittima è sufficiente a originare una nuova generazione, mentre per *Steinernema* sono necessari almeno due IJ essendo questi gonocorici. Quando la disponibilità di cibo comincia a scarseggiare lo sviluppo dei nematodi si arresta allo stadio di IJ e la vittima viene abbandonata (Fig. 5.3). *Steinernema* ed *Heterorhabditis* parassitizzano un elevato numero di specie di insetti e la durata del ciclo biologico è influenzata sia dalla temperatura ambientale che dalla specie del nematode stesso. Solitamente la morte dell'ospite avviene in tempi brevi dato che sono sufficienti 48 ore perché i batteri agiscano (De Luca *et al.*, 2015)

5.1.1 Batteri simbiotici

La simbiosi con i batteri è la ragione per cui *Steinernematidi* ed *Eterorabditidi* vengono propriamente detti entomopatogeni e non entomoparassiti. *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, simbiotici di *Steinernema* e *Heterorhabditis* rispettivamente, appartengono alla famiglia Enterobacteriaceae e sono batteri asporigeni di forma allungata ($0,5 \times 1-10 \mu\text{m}$ i primi, $0,3-2 \times 2-10 \mu\text{m}$ i secondi) Gram- e anaerobici

5. Utilizzo dei nematodi entomopatogeni in agricoltura



Figura 5.4 – Colorazioni caratteristiche delle larve (*Galleria mellonella* in questo caso) dovute all'azione dei batteri simbiotici: *Photorhabdus conferrisce* alle vittime colore rosso o, in casi rari, verde, *Xenorhabdus* colore grigiastro o giallo-crema.

facoltativi. Numerose specie di *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, su substrati artificiali, producono metaboliti secondari con attività antibiotica verso batteri Gram+ e Gram-, antimicotica, nematocida, antiulcera, antivirale e antitumorale. Il rapporto simbiotico nematode-batterio determina che il nematode protegga il batterio dall'ambiente esterno e lo porti nella vittima, mentre il batterio fornisce cibo al nematode permettendone lo sviluppo. Gli *Xenorhabdus* sono contenuti in una particolare vescicola posta subito dietro il bulbo basale della faringe presente negli stadi infettivi di *Steinernema* mentre i *Phothorabdus* sono alloggiati nella parte mediana dell'intestino degli IJ di *Heterorhabditis*. Sebbene batteri e nematodi possano essere fatti moltiplicare separatamente, è assieme che hanno elevata specificità. Ci sono però alcune eccezioni quali *X. bovienii* che è simbiote oltre che di *S. affine* anche di *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. intermedium* e *S. weiseri*, e *X. kozodoii* associato a *S. arenarium* e *S. apuliae*. Tra i *Photorhabdus*, *P. luminescens luminescens* e *P. luminescens laumondii* sono contemporaneamente presenti in *H. bacteriophora*. Gli insetti uccisi dai batteri assumono colorazioni caratteristiche: le vittime di *Xenorhabdus* diventano grigiastre o giallo-crema mentre quelle che contengono nei loro tessuti *Photorhabdus* sono di colore rosso più o meno intenso o anche verdastre e al buio sono moderatamente luminescenti (Fig. 5.4). Ambedue i batteri, se fatti moltiplicare per molto tempo su substrato artificiale, producono cellule di secondo tipo (o fase II), con proprietà alterate rispetto a quelle isolate dai nematodi (o fase I), e prive di capacità infettive. La fase II non è presente in natura nei nematodi.

5.1.2 Strategie di attacco e Reazioni degli insetti

Le strategie utilizzate dagli IJ per l'approccio alla vittima sono differenti, a seconda della specie del nematode. Esse sono fondamentalmente di due tipi: agguato (*ambush strategy*) e ricerca attiva (*cruiser strategy*). Tra le specie che adottano la *ambush strategy* ci sono *S. carpocapsae* e *S. scapterisci* le quali aspettano la vit-

5.2 Campionamento, allevamento e conservazione di EPN

tima con il corpo in posizione verticale e la raggiungono con un balzo lungo fino a circa 5 mm; la loro azione si concretizza, particolarmente, verso gli artropodi che stazionano e operano sulla superficie del terreno. *Heterorhabditis* spp. e *Steinernema glaseri*, sono più mobili e ricercano attivamente le prede nel terreno (*cruiser strategy*), mentre *S. riobrave* e *S. feltiae* mettono in atto una strategia intermedia. La buona riuscita dell'attacco e anche influenzata dal terreno la cui struttura può ostacolare o favorire il movimento dei nematodi alla ricerca della vittima.

Uno dei sistemi più importanti di difesa degli insetti dai parassiti è l'incapsulazione. Questa però risulta inefficace verso i microrganismi e i parassiti che hanno evoluto strategie per evitare o inattivare il sistema immunitario della vittima. Un esempio è fornito dalle larve del crisomelide *Leptinotarsa decemlineata*, poco suscettibili agli IJ di *S. carpocapsae* i quali sono espulsi dal coleottero con le feci. In altri casi l'azione della potenziale vittima è più diretta e tende a evitare la penetrazione degli IJ. Questo comportamento si riscontra nelle larve di *Popillia japonica* che si liberano degli IJ di *H. bacteriophora* pulendosi il corpo con le zampe e strusciando la parte posteriore dell'addome per evitarne l'ingresso attraverso l'apertura anale. Le larve degli scarabeidi tendano ad allontanarsi velocemente dalle zone ove c'è alta densità di IJ, così le larve di scarabeidi e tentredinidi possono vanificare la penetrazione anale dei IJ con frequenti defecazioni. Strutturalmente è, invece, la barriera rappresentata dalla morfologia degli stigmi e dal calibro delle aperture stigmatiche inferiore a quello degli IJ.

5.2 Campionamento, allevamento e conservazione di EPN

Il metodo più valido per ricavare gli IJ dal suolo si basa sulla raccolta di campioni di terreno rappresentativi del sito, piuttosto che nel prelievo di uno singolo e di grandi dimensioni oppure, nell'utilizzo di una sonda pedologica. Il singolo campione, infatti, riduce la probabilità di ottenere gli EPN. In laboratorio i campioni, del peso di circa 1 kg, sono posti in buste di plastica e se necessario inumiditi con acqua e in essi si inserisce una gabbietta di rete metallica con 2-5 larve del lepidottero *Galleria mellonella* per attrarre i nematodi. Altri ricercatori al posto delle gabbiette, preferiscono utilizzare filtri per il tè di retina metallica per evitare che le larve della *Galleria* si disperdano nel terreno e siano attaccate da eventuali predatori (Fig. 5.5). Tali filtri, essendo dotati di un lungo manico, possono anche essere inseriti direttamente nel terreno in pieno campo. Per la produzione di nematodi *in vivo*, si infestano con sospensioni di IJ larve dell'ultimo stadio di *G. mellonella* in una scatola Petri contenente sul fondo due filtri di carta bibula umida o, in alternativa, uno strato di 2-3 mm di sabbia di mare ben lavata e sterilizzata. Dopo 3-5 giorni le larve morte sono trasferite in "White traps" (Fig. 5.6) per favorire la moltiplicazione degli EPN e successivamente si raccolgono gli IJ. Questi vengono quindi lavati numerose volte in acqua sterile e conservati in frigorifero. Allo scopo si utilizzano pezzetti di spugna imbibiti di sospensioni di IJ in acqua: 500-1000 IJ per cm² di spugna in una bustina di

5. Utilizzo dei nematodi entomopatogeni in agricoltura



Figura 5.5 – Filtro da tè, contenente larve di Galleria mellonella, utilizzato per la raccolta di EPN dal terreno.

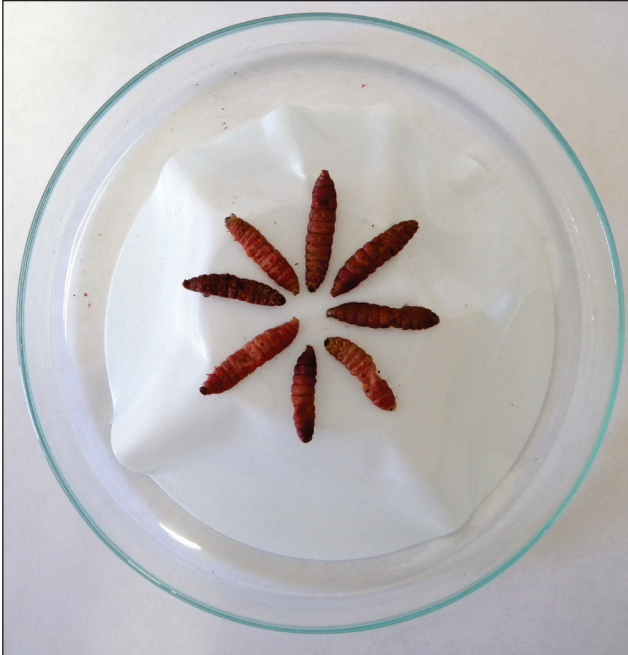


Figura 5.6 – “White trap” per il recupero dei DJ da larve di Galleria mellonella infestate da EPN.

plastica ben chiusa per evitarne la disidratazione. A 5-10 °C la durata della vita degli stadi infettivi è da 1-3 mesi ad alcuni anni, a seconda della specie. Per questo tipo di conservazione serve poca tecnologia, poca energia e i nematodi sono di buona qualità. Gli svantaggi sono costituiti dagli alti costi (circa 1 €/milione di nematodi) e non è possibile fare economia di scala. Oltre che in frigorifero i nematodi entomopatogeni possono essere conservati indefinitamente in azoto liquido. In Italia sono stati svolti, e sono in corso, sperimentazioni di crioconservazione con risultati molto interessanti. Per la produzione industriale vengono impiegati bioreattori, ma attualmente non in Italia; nel Nostro Paese che pure ha grandemente contribuito nei decenni passati alla messa a punto di tecnologie per la produzione massale di EPN (si pensi solo alla biofabbrica della Ecogen Europe attiva a Pantalla di Todi negli anni Ottanta), attualmente non vi sono centri di produzione (Tarasco *et al.*, 2015).

5.3 Sistematica dei nematodi entomopatogeni

Negli EPN, così come in tutti gli altri nematodi, i caratteri morfologici e morfometrici sono molto importanti per la determinazione di una specie. Tuttavia, la grande uniformità del piano strutturale degli EPN e nel contempo la elevata variabilità intraspecifica, rendono molto difficile il lavoro di identificazione su base esclusivamente morfologica. L'approccio molecolare, con il sequenziamento di specifici loci, recentemente sempre più utilizzato nella determinazione degli organismi animali e vegetali in abbinamento allo studio morfologico, ha reso oggi più facile e certa l'identificazione delle specie degli EPN. Il locus ipervariabile ITS1, o la regione più conservata del dominio D2D3 (LSU), per il DNA ribosomiale e il locus della Citocromo Ossidasi I (COI) o del gene ribosomiale 12S, per il DNA mitocondriale vengono amplificati utilizzando dei primer specifici di PCR (*Polymerase Chain Reaction*: reazione a catena della polimerasi); il prodotto dell'amplificazione viene sequenziato e le sequenze ottenute vengono infine confrontate con quelle omologhe depositate nei database pubblici. Per lo studio morfologico, in entrambe le famiglie Steinernematidae e Heterorhabditidae, la forma primariamente presa in considerazione per l'identificazione della specie è il terzo stadio giovanile infettivo o IJ.

5.3.1 Genere *Steinernema*

Genere *Steinernema* Travassos, 1927 Steinernematidae: Panagrolaimomorpha: Strongyloidoidea (Fig. 5.7). Prima e seconda generazione di adulti anfimittica. Ovipari o ovovivipari. Alla stessa famiglia appartiene anche il genere *Neosteinerema* Nguyen *et* Smart, 1994 (trovato solo in America). Al genere *Steinernema* appartengono attualmente 108 specie. Queste sono state raggruppate, senza intenti di classificazione filogenetica, in cinque gruppi; quattro di essi, *glaseri*, *feltiae*, *intermedium* e *carpocapsae*, sono stati individuati principalmente in base alla lunghezza del corpo dell'IJ; il quinto, denominato *bicornutum*, è caratteriz-

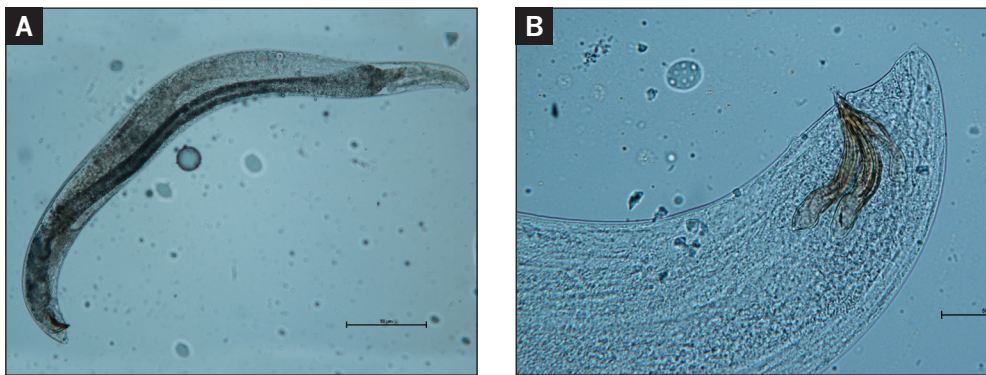


Figura 5.7 – *Steinernema feltiae*: A) maschio, particolare della spicola; B) accoppiamento.

5. Utilizzo dei nematodi entomopatogeni in agricoltura

zato dalla presenza, nei giovani di queste specie, di strutture simili a corna nella regione cefalica. Delle specie di *Steinernema* descritte, 15 sono state trovate o segnalate in Europa e/o nelle aree mediterranee extraeuropee.

5.3.2 Genere *Heterorhabditis*

Genere *Heterorhabditis* Poinar, 1976 Heterorhabditidae, Rhabditomorpha: Strongyloidea (Fig. 5.8). Prima generazione di adulti ermafrodita, seconda generazione di adulti anfimittica. Ovipari o ovovivipari. Al genere *Heterorhabditis* attualmente vengono attribuite 14 specie, di cui 4 sono state trovate o segnalate in Europa (per approfondimenti sulla sistematica degli EPN si consiglia di consultare Nguyen e Hunt, 2007).

5.3.3 Presenza e distribuzione degli EPN in Italia

I primi dati relativi all'isolamento di un ceppo di EPN in Italia risalgono al primo dopoguerra e riguardano il rinvenimento di alcuni esemplari del cleono della barbabietola, *Temnorhinus mendicus* (Coleoptera, Curculionidae), infestati da nematodi, che furono descritti come *Neoaplectana menozii* Travassos, attualmente specie *inquirenda*. Sono invece del 1983 i primi campionamenti, effettuati in Emilia-Romagna, allo scopo di accertare la diffusione dei nematodi entomopatogeni nel suolo. Ricerche successive, che hanno interessato e interessano pressoché tutte le regioni italiane, hanno fornito e stanno fornendo dati molto interessanti con il rinvenimento di nuove specie. Fino ad oggi più di 7.000 campioni di terreno sono stati raccolti da differenti località e biotopi; tra gli ambienti campionati il 50% sono habitat agrari (oliveti, vigneti, frutteti di vario tipo, campi di orticole e cereali), il 35% è costituito da ambienti boschivi (pinete, quercete, castagneti), il 10% sono zone costiere e il restante 5% pascoli, incolti, bordi di saline e di laghi. Sinora in Italia sono stati isolati complessivamente più di 150 ceppi di EPN: 48 isolati di *Heterorhabditis bacteriophora*, 1 di *H. downesi*, 58 di *Steinernema feltiae*, 11 di



Figura 5.8 – *Heterorhabditis bacteriophora*. Femmina (foto F. Porcelli).

5.3 Sistematica dei nematodi entomopatogeni

S. affine, 4 di *S. kraussei*, 8 di *S. apuliae*, 4 di *S. ichnusae*, 12 di *S. carpocapsae*, 1 di *S. vulcanicum*, 4 di *S. arenarium*, 1 di *Oscheius onirici* (il genere *Oscheius* annovera diverse specie di nematodi delle quali solo alcune accomunate agli EPN per similitudini nell'azione parassitaria verso gli insetti) e alcuni ceppi di recente isolamento in Lombardia sono in fase di identificazione. *Steinernema kraussei* è stato isolato solo nei suoli dei castagneti dell'Etna, in Sicilia; *S. apuliae*, *S. ichnusae*, *S. vulcanicum* e *O. onirici* sono 4 specie nuove ad oggi rinvenute solo in Italia, la prima è stata isolata sulle coste pugliesi, la seconda in Sardegna e Campania, la terza sulle pendici dell'Etna in Sicilia e la quarta in Toscana. L'indagine sulla presenza e la caratterizzazione dei nematodi entomopatogeni in Italia evidenzia che gli EPN sono stati trovati in tutti gli habitat campionati, mostrando così un'ampia distribuzione di specie in diversi ecosistemi. Sono state trovate più specie di Steinernematidi rispetto agli Eterorabditidi, e *S. feltiae* e *H. bacteriophora* risultano le specie più comuni. *Steinernema feltiae* è stato isolato nella maggior parte degli habitat, con una preferenza per i terreni sabbiosi. Anche l'*Heterorhabditis bacteriophora* è specie abbastanza diffusa, rinvenuta anche nei suoli vulcanici (sull'isola vulcanica di Pantelleria), ma mai nei boschi di latifoglie, mostrando una preferenza per i suoli di sabbiosi (58% dei ceppi). Fatta eccezione per le due specie dominanti *S. feltiae* e *H. bacteriophora*, gli EPN tendono ad essere correlati con uno specifico habitat: per esempio, *S. kraussei* e *S. affine* sono stati trovati in foreste ad altitudini piuttosto elevate; *S. affine*, in particolare, è stato isolato da diversi tipi di suolo, ma quasi esclusivamente in boschi di latifoglie, e *S. kraussei* è stato isolato in castagneti con suolo sabbioso sull'Etna in Sicilia. Per quanto riguarda le preferenze di altre specie, *S. apuliae* è stato isolato da diversi habitat, ma sempre vicino alle zone costiere, mostrando una chiara preferenza per i suoli sabbiosi, mentre *S. carpocapsae* è stato isolato nella parte settentrionale della Puglia e anche in Toscana, Emilia-Romagna, Lombardia e Veneto per lo più in terreni incolti e tappeti erbosi. I campionamenti effettuati in Sicilia hanno rivelato i primi ceppi italiani di *H. megidis* e *H. downesi* e ciò significa che tutte le specie di Eterorabditidi segnalate per l'Europa sono presenti in Sicilia. Le caratteristiche del suolo sono un fattore aggiuntivo che influenza la presenza di EPN e la nostra indagine ha mostrato una chiara correlazione tra la presenza EPN e la consistenza del suolo, con una preferenza per i suoli sabbiosi e di medio impasto. Nessuno ceppo è stato isolato da terreni argillosi. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che i terreni sabbiosi e di medio impasto favoriscono la mobilità e la sopravvivenza dell'EPN, mentre i suoli con un alto contenuto di argilla limitano i movimenti dei nematodi. Questo studio sulla distribuzione dell'EPN tra gli habitat suggerisce l'importanza di due habitat naturali: pinete e querceti. Questi due ambienti forestali presentano i valori più elevati di ceppi di EPN isolati, con solo 3 delle 7 specie presenti nei boschi rinvenute anche in altri habitat. I dati sulla biodiversità degli EPN raccolti finora non coprono in modo esaustivo tutte le aree geografiche e gli habitat in Italia, ma apportano comunque un contributo significativo alla conoscenza della presenza e distribuzione geografica degli EPN in relazione alla grande varietà di habitat presenti in Italia (Tarasco *et al.*, 2015; Tarasco, 2020).

5. Utilizzo dei nematodi entomopatogeni in agricoltura

5.4 Strategie di lotta biologica con nematodi entomopatogeni

Prodotti commerciali contenenti *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis*, *Steinernema feltiae* e *Steinernema carpocapsae*, sono utilizzati con successo per il contenimento di parecchie specie di Eterotteri, Lepidotteri, Coleotteri, Ditteri e Imenotteri. In Italia, formulazioni di EPN sono state efficacemente sperimentate e applicate per il contenimento di: lo scolitide *Tomicus piniperda* ed il Lepidottero *Thaumetopoea pityocampa* su pino (Fig. 5.9); i Lepidotteri *Pamene fasciana*, *Cydia splendana* e *Cydia fagiglandana*, e i Coleotteri *Curculio elephas* e *C. glandium* su castagno; i rodilegno *Cossus cossus* e *Zeuzera pyrina* su fruttiferi; larve di Lepidotteri Nottuidi su carciofi; il Curculionide *Rhytidoderes plicatus* su radici di cavolo; il Lepidottero *Cydia pomonella* e l'Imenottero *Hoplocampa brevis* su pero; il Buprestide *Capnodis tenebrionis* su albicocco; il Cerambicide *Saperda carcharias* su pioppo; il Crisomelide *Xanthogaleruca luteola* su olmo (Fig. 5.10A); il Tingide *Corythucha ciliata* su platano (Fig. 5.10B); la Tentredine *Caliroa varipes* su quercia; il Lepidottero *Paysandisia archon* su palma; i Curculionidi *Otiorhynchus sulcatus* su piante ornamentali e su fragola e *Temnorhinus mendicus* su barbabietola da zucchero. Nell'area mediterranea, a seguito della diffusione di insetti esotici delle palme, esperienze promettenti di contenimento del curculionide *Rynchophorus ferrugineus* con nematodi entomopatogeni EPN, sono state svolte in diversi stati quali Egitto, Spagna e Italia (Fig. 5.11). Altre applicazioni di nematodi utili sono state efficacemente indirizzate al contenimento di Ditteri Sciaridi in vivai di piante ornamentali e in allevamenti di funghi, del Curculionide *Curculio nucum* su nocciolo, del Tripide *Frankliniella occidentalis* in coltura protetta, del Lepidottero *Tuta absoluta* su pomodoro, del Crisomelide *Diabrotica virgifera* su mais e di limacce e chioccioline in orticoltura, con l'utilizzo in quest'ultimo caso del nematode specifico *Phasmarhabditis hermaphrodita*. Più di recente questi agenti di controllo biologico hanno trovato ampio utilizzo nei programmi di controllo integrato dello Scarabeide *Popillia*

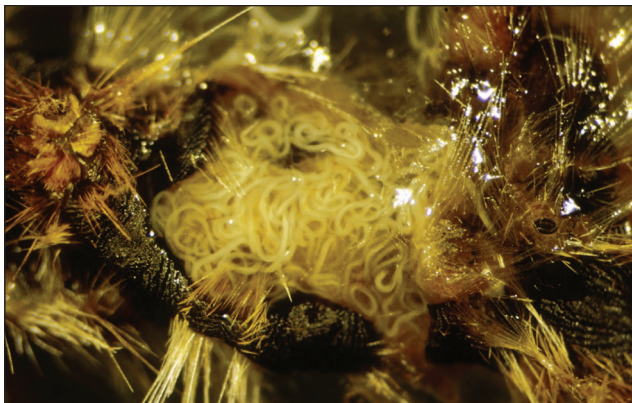


Figura 5.9 – Larva di *Thaumetopoea pityocampa* aperta ad arte: all'interno nematodi entomopatogeni.

I NEMATODI NEL SUOLO



**Clicca QUI per
ACQUISTARE il libro ONLINE**

**Clicca QUI per scoprire tutti i LIBRI
del catalogo EDAGRICOLE**

**Clicca QUI per avere maggiori
INFORMAZIONI**