



Uso di artropodi fitofagi nel controllo delle erbe infestanti

Il problema delle malerbe è di crescente interesse, anche a causa del rapido aumento di trasporti ed attività commerciali internazionali che favoriscono lo spostamento degli organismi attraverso diverse aree geografiche. Il controllo biologico delle infestanti sembra offrire una soluzione sicura, economica e sostenibile per l'ambiente

DOI 10.12910/EAI2016-043

di **Massimo Cristofaro**, ENEA e **Francesca Marini**, BBKA onlus

Quando si parla di controllo biologico di tipo classico ci si riferisce, in senso generale, all'utilizzo di organismi viventi "utili" (agenti di controllo biologico) che compiono il proprio ciclo vitale (o parte di esso) a discapito della specie *pest*, determinandone la riduzione della popolazione ad una densità tale da non costituire più un problema economico. Nella definizione di controllo biologico in senso stretto, sono esclusi quei metodi che impiegano sostanze naturali quali, ad esempio, feromoni, metaboliti secondari, tossine fungine e batteriche (a meno che non vengano usati insieme agli organismi che li producono), mentre vi rientrano sia il controllo biologico delle piante infestanti che quello microbiologico. Le piante infestanti possono essere definite come quelle piante "nate nel posto sbagliato"; tale affermazione può essere interpretata in chiave agronomica o naturalistica. Nel primo caso, per "infestante" s'intende una specie vegetale autoctona o alloctona, che con la sua presenza crea un danno economico alle colture abbassandone la resa economica, e che dunque è necessario eradicare o perlomeno contenere. Dal punto di vista naturalistico, invece, una pianta infestante è generalmente una specie alloctona che, infedata nel nuovo habitat, crea una condizione di squilibrio entrando in competizione con la flora nativa. Nella sua area d'origine la pianta è controllata dai propri nemici naturali ed è inserita in un equilibrio costituito da numerosi altri fattori che ne limitano l'espansione; introdotta in un nuovo areale, in presenza di relazioni ecologiche e climatiche favorevoli e in assenza dei suoi nemici naturali, si possono creare i

presupposti perché la pianta possa assumere le caratteristiche demografiche ed ecologiche di una specie infestante aliena invasiva ed interferire con il naturale ecosistema. Il problema delle malerbe è di crescente interesse in tutto il mondo, anche a causa del rapido aumento di trasporti ed attività commerciali internazionali che favoriscono lo spostamento degli organismi attraverso diverse aree geografiche. A tale proposito, il controllo biologico alle infestanti sembra offrire la soluzione più sicura, economica e sostenibile per l'ambiente, con una buona percentuale di successo [1]. Sono passati più di 200 anni da quando il primo insetto è stato introdotto volontariamente in India contro alcune Cactaceae e da allora sono stati realizzati molti altri progetti, soprattutto negli ultimi decenni [1]. Tra gli esempi possiamo citare il controllo di Cactaceae del genere *Opuntia* che, importate in Australia nel 1900, invasero in maniera devastante i pascoli locali. Nel 1926 fu introdotto il Piralide *Cactoblastis cactorum* Berg. (un

lepidottero d'origine argentina), che si dimostrò, e continua a dimostrarsi, molto efficace nel controllare la pianta bersaglio. Le pratiche di controllo biologico delle piante infestanti hanno seguito uno sviluppo diverso da quello del controllo degli artropodi dannosi e la principale differenza riguarda il maggiore rilievo dato alla valutazione dei rischi. Al fine di evitare l'introduzione di organismi che potrebbero attaccare non solo la pianta bersaglio, bensì anche altre specie di interesse economico, si devono infatti prendere particolari precauzioni ed è ugualmente importante salvaguardare elementi indigeni che potrebbero essere minacciati dagli stessi organismi rilasciati. [1 e 2]. È chiaro, quindi, che per evitare danni maggiori di quelli causati dall'organismo che s'intende controllare, una volta selezionato il potenziale agente di controllo, la sua specificità verso la pianta bersaglio debba essere adeguatamente valutata. Esistono quattro componenti chiave per la riuscita dei test di spe-

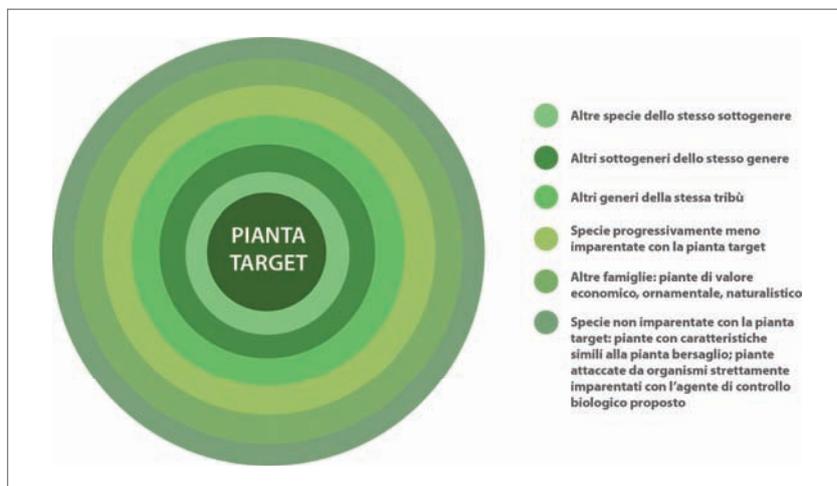
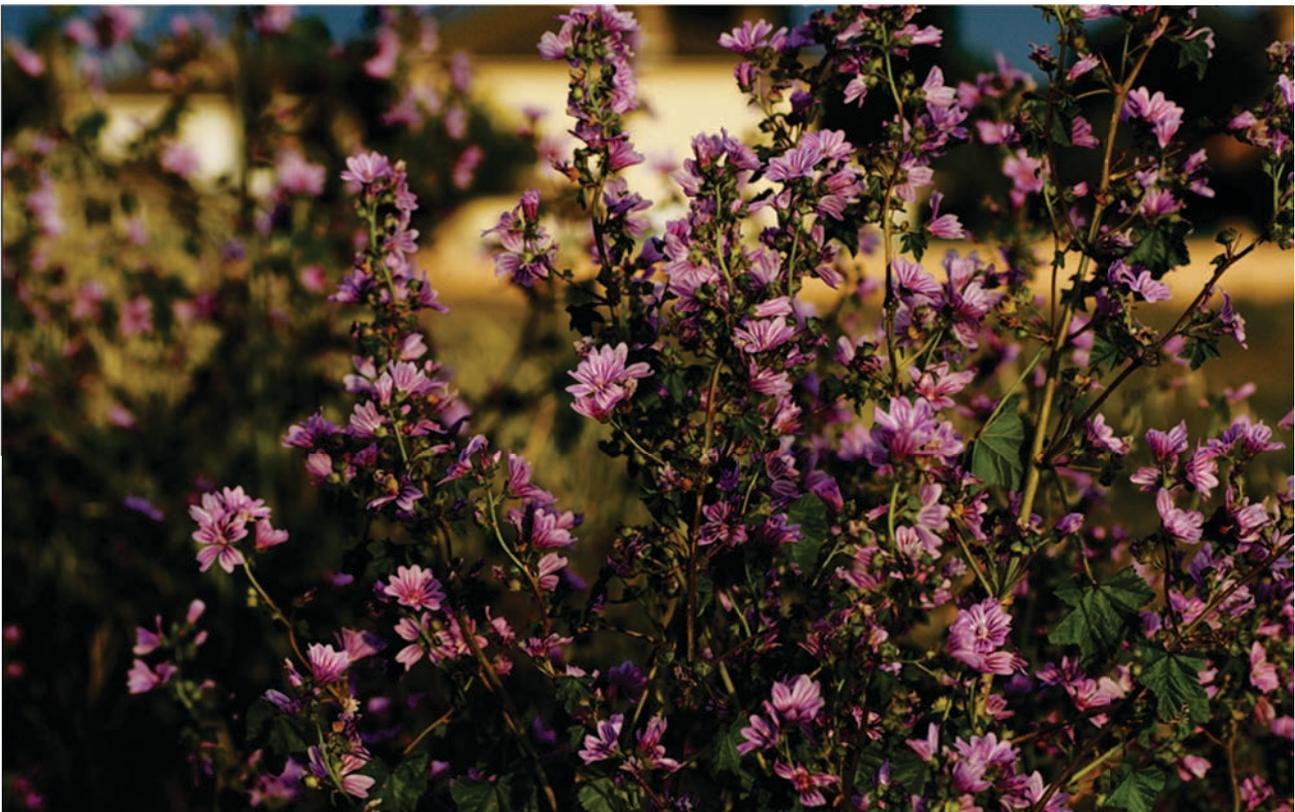


Fig. 1 Schema del centrifugal-phylogenetic method
Fonte: [3]

cificità e della valutazione del rischio per gli altri organismi: la scelta delle piante da testare; l'utilizzo della tecnica migliore per eseguire i test; l'interpretazione dei dati sulle basi delle conoscenze dell'ecologia e della biologia degli organismi coinvolti; la comunicazione dei risultati alle autorità competenti, al fine di

affidamento sulle osservazioni riguardanti l'utilizzo dell'ospite da parte dell'insetto nella zona d'origine. In seguito fu compreso che questo sistema non poteva essere sufficiente né adeguato e, negli anni 20, iniziò a svilupparsi l'idea di testare le piante economicamente importanti. Gradualmente

method (Figura 1) per la scelta delle piante da testare. Si tratta di un sistema di selezione che prende in considerazione dapprima i taxa più strettamente correlati alla pianta infestante da controllare, per poi arrivare a racchiudere altre specie rappresentative appartenenti a taxa diversi.



mantenere sempre viva l'attenzione sul progetto in atto e coinvolgere l'opinione pubblica [2].

Selezione delle specie vegetali su cui fare i test di specificità

Nelle prime esperienze di lotta biologica alle piante infestanti, gli agenti introdotti non venivano formalmente testati e si faceva

i test inclusero sempre più specie correlate con la pianta *target* e gli sforzi si spostarono progressivamente sulla ricerca dell'*host range* dell'insetto, piuttosto che sulla valutazione di sicurezza o meno nei confronti di una determinata specie vegetale [3]. Dal 1974, gli operatori nel settore del controllo biologico hanno seguito il metodo chiamato *centrifugal-phylogenetic*

Questa procedura tuttavia ha i suoi limiti, in quanto non fa concretamente uso della filogenetica, ma si focalizza per lo più su conoscenze tassonomiche basate su similarità morfologiche.

Un nuovo metodo suggerito da Briese [2], propone di selezionare le piante test sulla base delle strette relazioni filogenetiche e biomolecolari, supportato dall'applicazione di

filtri ecologici e biogeografici, per essere sicuri che l'elenco includa quelle specie considerate a rischio. Possono quindi essere incluse anche: specie appartenenti a ordini diversi da quello della specie *target*, se si riscontrano con quest'ultima delle caratteristiche morfologiche e/o biochimiche simili; specie native economicamente e/o ecologicamente importanti che mostrino una sovrapposizione geografica o ecologica con la specie infestante; piante sulle quali si nutrono e si riproducono specie congeneriche dell'agente di controllo.

Nell'ultimo decennio è stato revisionato e analizzato il ruolo dei test di *host range* per gli artropodi fitofagi nella valutazione del rischio di impatto su specie vegetali non bersaglio, mettendo in luce tre punti fondamentali: a) identificazione degli stadi fisiologici dell'agente di controllo da utilizzare per lo studio del suo *host range*; b) studio del suo "fundamental host range"; c) selezione delle specie vegetali a rischio di *host-shifting* da utilizzare nei test di scelta in laboratorio e pieno campo. Pertanto questo tipo di approccio prevede di subordinare i test di *host range* a un precedente studio della biologia dell'artropode da utilizzare, in modo da essere a conoscenza dei meccanismi fisiologici e comportamentali che permettono al fitofago di riconoscere e colonizzare la pianta bersaglio [4]. Tuttavia va evidenziato che tutto il processo non è esente da rischi, vista la possibilità che eventi e fattori esterni, quali ad esempio i cambiamenti climatici, possano avere un ruolo chiave nell'insorgenza di forme di rapida evoluzione, che possono determinare una diversa percezione della pianta ospite da parte del fitofago [5].

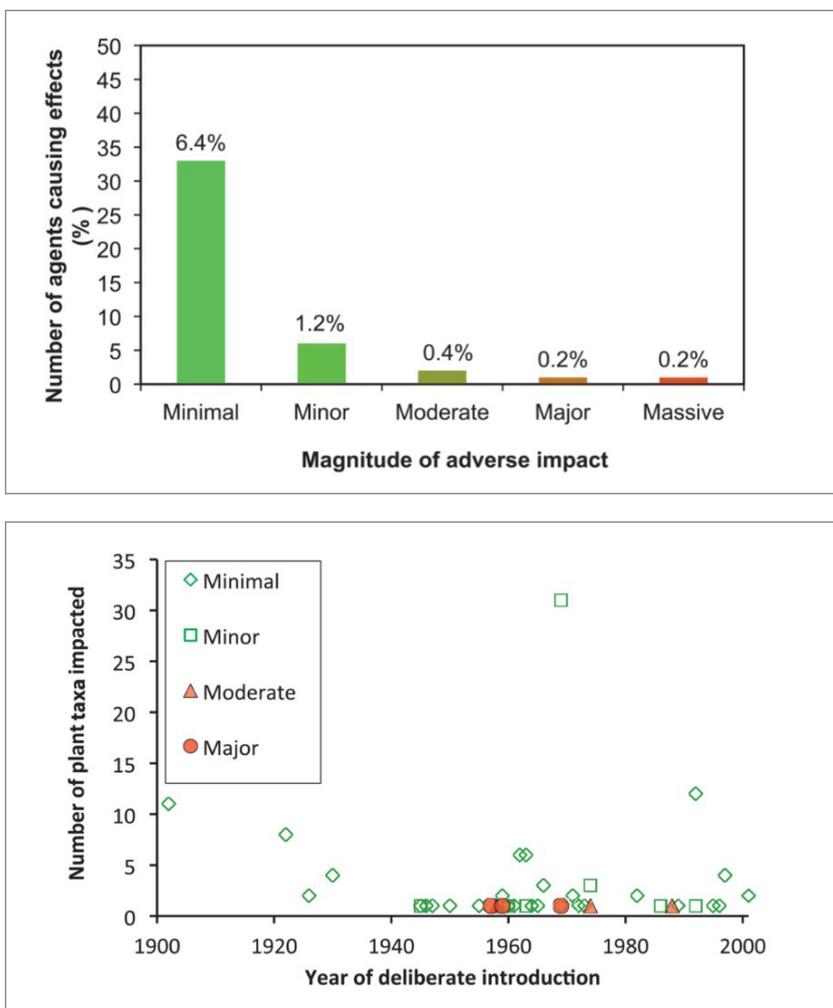


Fig. 2 a/b Analisi dell'impatto di agenti di controllo biologico su specie non-target
Fonte: [1]

Tipi di test

I test di specificità sono un valido strumento per la stima della probabilità e dell'entità dei rischi che potrebbero correre le specie non-*target* in seguito all'immissione dell'agente di controllo biologico selezionato. I criteri più usati per valutare l'organismo selezionato per il controllo biologico sono la sua percezione della pianta e la capacità di nutrirsi e svilupparsi su di essa. Generalmente i tipi di test proposti sono tre:

- *test di non-scelta*: in questo caso viene valutato il comportamento dell'insetto in presenza di una sola specie vegetale. L'agente di controllo può essere lasciato sulla pianta fino alla sua morte o per un tempo sufficiente a fargli raggiungere uno stato di alto stress da privazione ("Fundamental host range"). Oltre alla determinazione del *Fundamental host range* dell'organismo, i test di non-scelta possono essere impiegati per trarre informazioni sullo sfrutta-

A comparison of genetic techniques useful for biological control of weeds programs^a.

Molecular technique	Common applications	Variability	Dominance ^b	Cost
<i>No prior knowledge of genome required</i>				
Karyotype/cytogenetics	Ploidy level/matching chromosomes	Low ^c	Not applicable	\$-\$
Allozymes/proteins	Population genetics	Low ^c	Co-dominant	\$
RFLPs	Population genetics	Low-moderate ^d	Co-dominant	\$
RAPDs/ISSRs/UP-PCR/DAF	Population genetics	Moderate-high ^d	Dominant	\$
AFLPs	Population genetics	High ^d	Dominant	\$-\$
<i>Prior knowledge of genome required</i>				
SSRs	Population genetics	Moderate-high ^d	Co-dominant	\$\$-\$\$\$
DNA sequencing				
Chloroplast		Low-moderate ^e	Uniparental	\$\$
Mitochondrial	Insect/fungal population genetics, phylogenetics	Low-high ^e	Uniparental	\$\$
Nuclear	Population genetics, phylogenetics	Low-moderate ^e	Co-dominant	\$\$
SNPs	Population genetics/genotyping	High ^d	Co-dominant	\$\$\$
SSCP/DSCP/DGGE	Determine existence of differing alleles	Not applicable ^d	Co-dominant	\$-\$
RT-qPCR	Detection and quantification specific of DNA	High ^d	Co-dominant	\$\$-\$\$\$
ESTs/Microarrays	Find/quantify expressed genes	High ^d	Dominant and co-dominant	\$\$-\$\$\$

\$ = relatively inexpensive; \$\$ = moderately expensive; \$\$\$ = relatively expensive.
^a Includes information adapted from Le Roux and Wicczorek (2009), Sunnucks (2000).
^b Co-dominant means both alleles of a diploid individual can be distinguished, dominant means it is not possible to distinguish between the two alleles present in a diploid individual, and uniparental means that there is only one allele, because only one copy of the genome is present in an individual.
^c Marker typically used for interspecific studies.
^d Marker typically used for intraspecific studies.
^e Marker used for both inter- and intraspecific studies.

Tab. 1 Diverse tecniche biomolecolari usate nel controllo biologico alle infestanti
 Fonte: [6]

mento della pianta: percentuale di sopravvivenza; velocità di sviluppo; dimensioni del corpo nei vari stadi; fecondità e longevità degli adulti; numero e frequenza di uova deposte; frequenza e durata dell'alimentazione. I test di ovideposizione e di oogenesi effettuati in condizione di non-scelta offrono la stima migliore della minaccia di colonizzazione di specie non-*target* da parte dell'agente di controllo [5]. I test di non-scelta sono lo strumento migliore per indagini preliminari, ma debbono essere supportati anche da test di scelta e test in campo aperto, soprattutto nel caso in cui i primi risultati dei test di non-scelta siano ambigui [2]. Di contro, quando si verifica la situazione in cui l'insetto rifiuta completamente la pianta in condizioni di non-scelta, si può essere quasi certi che in campo accada lo stesso;

- *test di scelta*: si tratta dello strumento più valido per valutare il

comportamento alimentare e di ovideposizione di specie dotate di stadi di sviluppo (generalmente l'adulto) provvisti di una mobilità discriminativa [4]. In questo caso vengono esaminati gli stessi parametri dei test di non-scelta, ma la condizione è differente. Si tratta infatti di una procedura nella quale viene stimata la preferenza dell'insetto tra più specie di piante, allo stesso tempo e allo stesso stadio fenologico. Le prove di scelta possono essere effettuate secondo due modalità: il più tradizionale prevede la scelta in presenza della pianta *target*, il secondo la scelta tra diverse piante non-*target* in assenza della pianta bersaglio;

- *test in campo*: questo tipo di test, eseguito nella zona di origine della pianta *target*, è quasi sempre un test di scelta effettuato in condizioni tali da rendere massima l'opportunità, per la popolazione dell'agente selezionato, di com-

portarsi nel modo più naturale possibile. Viene utilizzato soprattutto per testare contemporaneamente diversi agenti o per chiarire ed integrare i risultati provenienti dai precedenti test [2]. Sono particolarmente utili per quegli insetti che sono difficili da allevare, per quelli molto mobili o per quelli che sono sensibili all'ambiente artificiale del laboratorio. Briese [2] ha proposto di eseguire il test in due fasi: all'inizio, con la presenza sia delle specie da testare che della pianta *target*; in un secondo momento, la pianta *target* viene fisicamente rimossa per forzare l'agente di controllo ad utilizzare le specie test o ad emigrare fuori dall'area sperimentale.

Controversie scientifiche: *host-shifting* e etiche evolucionistiche

Nonostante gli indiscussi vantaggi economici ed ecologici associati ai programmi di lotta biologica alle

piante infestanti [1], c'è un'importante controversia scientifica sulla presenza di casi di indesiderato *host-shifting*, oppure sulla valutazione "etica" dell'intervento di lotta biologica. Il primo caso, riscontrato su 43 fitofagi dei 512 introdotti volontariamente in programmi di controllo biologico alle infestanti a livello mondiale, se considerato in termini di "impatto reale" va considerato un falso problema. Infatti il 99% dell'*host shifting* di questi 43 fitofagi viene definito come un danno con un impatto molto basso (o addirittura pressoché nullo); nel rimanente 1% dei casi (che grosso modo va individuato in 2 casi di *host-shifting*, rispettivamente *Cactoblastis cactorum* su altre specie di *Opuntia* native e *Rhinocyllus conicus* su cardi native) si trattava di specie considerate - e valutate - con una oligofagia conclamata rispettivamente all'interno del genere *Opuntia* spp. e della sottofamiglia *Carduinae*) [1] (vedi Figura 2a/b). Le cose si complicano invece nel caso di una valutazione su "scala evolutivistica", aumentando necessariamente la magnitudo per cercare di prendere in considerazione tutte le variabili ambientali presenti nel sistema. Questo tipo di analisi spazia dai processi di microevoluzione e adattamento dovuti ai cambiamenti climatici agli effetti non-target sull'habitat: per esempio gli effetti indesiderati del controllo biologico delle tamerici sulla nidificazione della fauna aviaria dei fiumi del Nord-America, oppure i possibili effetti sulla demografia degli insettivori causata dalla presenza di nuove specie di artropodi in un nuovo habitat. Pur dando valore all'importanza di questi studi, va considerata l'effettiva difficoltà di prevedere a priori tutti i possibili effetti sul nuovo ecosistema. Inoltre, non va sotto-

valutato che gli interventi chimici - quando sostenibili economicamente - avrebbero degli effetti secondari negativi sull'ecosistema con una valenza maggiore rispetto a quella relativa alla lotta biologica. Infine, una risposta eccessivamente prudente come il "non-intervento", a nostro avviso non può essere considerata sostenibile, perché la condizione di "non-equilibrio" presente nell'areale di infestazione della specie alloctona invasiva comporterebbe un impatto sulle specie native a rischio assolutamente devastante.

[1]. La maggior parte degli insuccessi è da imputare a errori d'identificazione delle specie, a una sottostima della variabilità intraspecifica o a lacune nelle conoscenze filogeografiche dei taxa in studio. Negli ultimi anni è nata quindi l'esigenza di affiancare ai metodi classici di controllo biologico i dati relativi a marcatori genetici; è cresciuto, di conseguenza, l'interesse scientifico nell'integrare aspetti ecologici ed evolutivistici nel controllo degli organismi dannosi [6]. A partire dall'ultima decade del

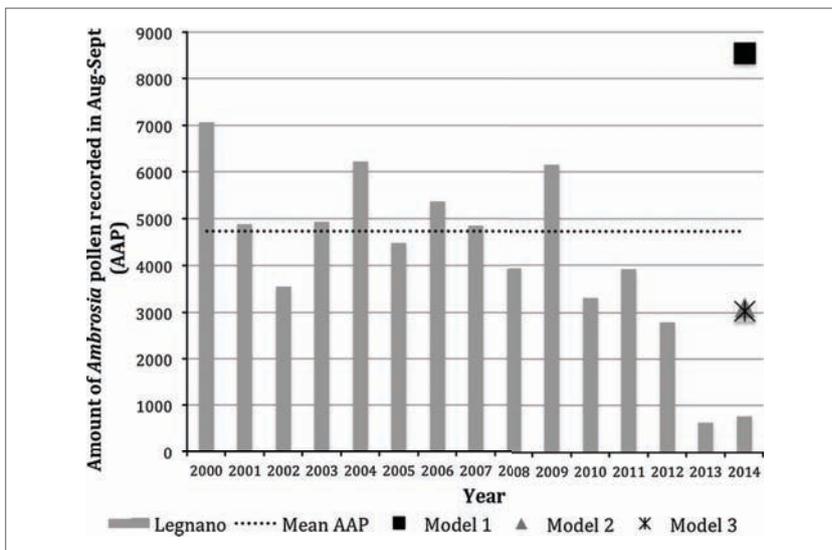


Fig. 3 Dati annuali del monitoraggio di polline di Ambrosia (stazione di Legnano, Mi); da notare il calo del polline nel 2013 e 2014 in associazione alla presenza di *Ophraella communa* Fonte [7]

Biologia molecolare

Come già accennato, il controllo biologico degli organismi dannosi è una metodologia utilizzata ormai da oltre un secolo. Tuttavia, in media, soltanto tra il 10 e il 35% delle specie selezionate si stabilisce con successo nell'ambiente in cui viene introdotto e solamente una frazione di questi conduce a risultati economici attesi

XX secolo si è avuta una seconda ondata di cambiamenti radicali nel campo della biologia molecolare, estendendo questa disciplina ad ulteriori ambiti, compreso quello del controllo biologico [6]. Le maggiori innovazioni responsabili di questo fenomeno riguardano soprattutto la manipolazione del materiale genetico: i nuovi sistemi di estrazione, amplificazione e sequenziamento

del DNA, che hanno reso queste complesse metodologie sempre più semplici, rapide ed accessibili, fino a renderle una routine di laboratorio (Tabella 1).

In conclusione, l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare a supporto di un programma di controllo biologico alle piante infestanti può essere sintetizzato nelle seguenti valenze [8]:

1. identificazione della specie/biotipo di pianta infestante;
2. conseguente individuazione dell'origine filogeografica dell'infestazione;
3. individuazione di ibridi nella specie infestante;
4. determinazione dei metodi di riproduzione nelle popolazioni della specie infestante;
5. organizzazione e messa a punto della lista delle specie vegetali da utilizzare per l'*host range*;
6. identificazione degli agenti (artropodi e/o funghi fitopatogeni);
7. identificazione degli stadi preimmaginali degli artropodi;
8. studio della variabilità genetica dei fitofagi nell'ambito di una popolazione;
9. individuazione della presenza di fenomeni di ibridazione nella popolazione dell'agente di controllo;
10. individuazione di endosimbionti e/o microorganismi associati con il fitofago;
11. individuazione di eventuali processi di speciazione/rapida evoluzione.

Caso studio in Europa: *Ambrosia artemisiifolia*

La maggior parte della ricerca e dell'implementazione associata ai

programmi di controllo biologico delle infestanti viene realizzata in ambienti naturali quali pascoli, parchi o aree protette, e riguarda Paesi quali il Canada, gli Stati Uniti d'America, l'Australia, la Nuova Zelanda e il Sud Africa. Quando una specie vegetale alloctona si insedia in questo tipo di habitat e assume le caratteristiche ecologiche di specie invasiva, le pratiche agronomiche e il diserbo chimico sono economicamente e ecologicamente non sostenibili, lasciando come unica alternativa – oltre al non intervento – un programma di controllo biologico mirato.

Il contesto ambientale cambia notevolmente quando ci si sposta in areali antropizzati e con estesi terreni agricoli, quali l'Europa e alcune nazioni popolate del continente asiatico (Cina, India, Giappone): per le infestanti in agricoltura, il controllo biologico "classico" presenta due grossi fattori limitanti, dati proprio dal ristretto *host range* e dal fattore temporale. Uno dei pochi esempi di successo di un programma di controllo biologico-integrato a livello europeo è dato dalla COST Action FA 1203 (SMARTER). Tale programma, iniziato nel giugno 2012 e che si concluderà nel mese di ottobre 2016, vede un coinvolgimento di ricercatori, amministrativi, medici e tecnici con l'obiettivo di organizzare e mettere a punto una strategia di gestione multidisciplinare di questa infestante di origine nord-americana. *Ambrosia artemisiifolia* non è solo un'asteracea infestante in molti Paesi europei, ma anche la causa del 20% delle allergie respiratorie nel nuovo areale. Per quanto riguarda il programma di controllo biologico di questa infestante, c'erano

già stati dei tentativi precedenti, particolarmente in Russia, con il crisomelide *Zygogramma suturalis* F. e il lepidottero *Tarachidia candefacta* Huebner: purtroppo, le popolazioni di queste due specie di fitofago non sono riuscite ad insediarsi negli areali di distribuzione in modo tale da poter registrare un effettivo controllo della specie infestante.

Tuttavia, durante gli ultimi anni, si è potuto riscontare una esplosione demografica di un nuovo agente di controllo, il coleottero crisomelide *Ophraella communa* LeSage, accidentalmente introdotto nella Provincia di Milano e in seguito ampiamente diffuso in tutta la Pianura Padana. La fitness della specie ha evidenziato nel giro di poco tempo un incredibile impatto su *Ambrosia*, con conseguente drastica riduzione dei valori di polline recepito dalla rete di monitoraggio territoriale [7] (vedi Figura 3). Studi di *host range* sono in corso per valutare la biologia e la specificità del coleottero nel nuovo ambiente.

Infine, un altro artropode è stato recentemente studiato per il controllo biologico di *Ambrosia*: si tratta di *Aceria artemisiifoliae*, una nuova specie di acaro eriofide trovato in associazione con *Ambrosia* in Serbia [8]. Come già precedentemente riscontrato, nonostante le loro minuscole dimensioni, gli eriofidi sono tra gli artropodi considerati più interessanti nella lotta biologica alle infestanti, proprio per la loro specificità alimentare e per il loro impatto sulla riproduzione e sulla biomassa della specie infestante [9].

Per saperne di più:
massimo.cristofaro.cas@enea.it

BIBLIOGRAFIA

1. D.M. Suckling & R.F.H. Sforza (2014), "What Magnitude Are Observed Non-Target Impacts from Weed Biocontrol?" *PLoS ONE*, 9(1):e84847
2. D.T. Briese (2005), "Translating host-specificity test results into the real world: the need to harmonize the yin and yang of current testing procedures". *Biological Control*, 35:208-214
3. N.E. Rees, P.C. Quimby, G.L. Piper, E.M. Coombs, C.E. Turner, N.R. Spencer, L.V. Knutson (1995), "Biological control of weeds in the west". *West. Weed Sci. Soc. Am.*, Bozeman, MT
4. A.W. Sheppard, R.D. Van Klinken, T.A. Heard (2005), "Scientific advances in the analysis of direct risks of weed biological control agents to nontarget plants". *Biological Control* 35(3):215-226
5. P.B. McEvoy, K.M. Higgs, E.M. Coombs, E. Karaçetin, L.A. Starcevic (2012), "Evolving while invading: rapid adaptive evolution in juvenile development time for a biological control organism colonizing a high-elevation environment". *Evolutionary Applications*, 5(5):524-536
6. J.F. Gaskin, M.C. Bon, M.J.W. Cock, M. Cristofaro, A. De Biase, R. De Clerck-Floate, C.A. Ellison, H.L. Hinz, R.A. Hufbauer, M.H. Julien, R. Sforza (2011), "Applying molecular-based approaches to classical biological control of weeds (Review)". *Biological Control*, 58:1-21
7. M. Bonini, B. Sikoparija, M. Prentovic, G. Cislighi, P. Colombo, C. Testoni, L. Grewling, S.T.E. Lommen, H. Mueller-Scharer, M. Smith (2015), "A follow-up study airborne Ambrosia pollen in the Milan area in 2014 in relation to the accidental introduction of the ragweed leaf beetle *Ophraella communa*". *Aerobiologia*, 32, 2: 371-374 (DOI 10.1007/s10453-015-9406-2)
8. B. Vidovic, T. Cvrkovic, D. Rancic, S. Marinkovic, M. Cristofaro, U. Schaffner, R. Petanovic (2016), "*Aceria artemisiifoliae* sp. nov. Potential biological control agent of invasive common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia* L. in Serbia". *Syst. and Appl Acar*, 21 (7): 919-935
9. A. Skoracka, L. Smith, G. Oldfield, M. Cristofaro, J.W. Amrine (2010), "Host-plant specificity and specialization in eriophyoid mites and their importance for the use of eriophyoid mites as biocontrol agents of weeds". *Exp Appl Acarol* DOI 10.1007/s10493-009-9323-6