

SUL POTENZIALE IMPIEGO DI METABOLITI MICROBICI NELLA LOTTA CONTRO LE INFESTANTI, ESEMPLIFICATO DALL'ACIDO β -NITROPROPIONICO, FITOTOSSINA DI SEPTORIA CIRSI.

Vurro M.[°], Zonno M.C.[°] e Bottalico A.^{*}

[°] Istituto Tossine e Micotossine da parassiti vegetali, C.N.R., Bari; ^{*} Istituto di Patologia vegetale, Università degli Studi, Sassari.

RIASSUNTO

Vengono esposte le più recenti conoscenze riguardanti l'impiego di metaboliti naturali, in particolare fitotossine prodotte da funghi fitopatogeni, per la lotta biologica contro le piante infestanti, e le relative prospettive di studio. Vengono inoltre riportate indicazioni sull'attività erbicida dell'acido β -nitropropionico, fitotossina prodotta da *Septoria cirsii*, fungo responsabile di una grave malattia su *Cirsium arvense*.

SUMMARY

Possible use of microbial metabolites in weed biocontrol, exemplified by β -nitropropionic acid, a phytotoxin of *Septoria cirsii*.

The more recent knowledges regarding the use of natural metabolites, mainly plant pathogen toxins, for weed biocontrol are exposed. Moreover, the herbicidal activity of β -nitropropionic acid, a toxin produced by *Septoria cirsii*, a fungal pathogen of *Cirsium arvense*, is reported.

INTRODUZIONE

La possibilità di disporre di nuovi erbicidi più selettivi ed efficaci, nonché meno costosi e meno dannosi per l'ambiente sta diventando una esigenza sempre più sentita sia dai produttori di tali sostanze, sia dai fruitori, e sia dall'opinione pubblica. Inoltre, è ormai accertato che l'impiego massiccio dei tradizionali erbicidi di sintesi può determinare l'insorgenza anche di altri problemi, quali la comparsa di piante infestanti più resistenti agli erbicidi di sintesi (ad es. le triazine), o la diffusione di specie infestanti filogeneticamente più vicine alle colture da proteggere, con conseguente maggiore difficoltà di lotta. Negli ultimi anni si sono moltiplicati gli studi tesi alla utilizzazione di metodi biologici di lotta alle piante infestanti. Particolare attenzione è stata rivolta all'impiego di microrganismi fitopatogeni, essenzialmente funghi (TeBeest et al., 1992; Van Dyke, 1993), o di organismi predatori, prevalentemente insetti.

Un'altra strategia promettente è rappresentata dall'impiego di erbicidi di origine naturale, cioè di metaboliti prodotti da piante, funghi, batteri o animali (Duke, 1986; Strobel et al., 1991).

In questa nota vengono esposte alcune delle più recenti conoscenze riguardanti l'impiego di metaboliti naturali nella lotta biologica contro le piante infestanti, e in particolare di fitotossine prodotte da funghi fitopatogeni. A quest'ultimo riguardo, viene inoltre riportata come esempio l'attività

biologica dell'acido β -nitropropionico, una fitotossina prodotta da *Septoria cirsii*, un fungo responsabile di una grave malattia su *Cirsium arvense* (Vurro et al., 1993).

Caratteristiche

Alcune delle caratteristiche chimiche e biologiche degli erbicidi di origine naturale possono risultare sia vantaggiose che svantaggiose se confrontate ai tradizionali erbicidi. Ad esempio, una delle prerogative più interessanti è quella di avere molto spesso una struttura chimica estremamente originale, difficilmente sintetizzabile. Questo, se da un lato consente di disporre di classi di composti completamente nuove, dall'altro, essendo tali composti ottenibili solo per via fermentativa, riduce le attenzioni dei produttori, a causa dell'aumento dei costi e delle difficoltà di produzione.

Altro aspetto interessante è l'effetto che tali prodotti possono avere sull'ambiente. La persistenza dei prodotti naturali è relativamente breve, in quanto possono essere più facilmente detossificati o metabolizzati dai microrganismi o dalle piante. Anche tale aspetto può rappresentare una caratteristica negativa, in quanto il metabolita potrebbe risultare troppo poco persistente, rendendo necessari numerosi trattamenti.

Altra caratteristica talvolta posseduta dagli erbicidi biologici è la selettività o specificità che può esprimersi fino a livello varietale. Infatti alcune fitotossine prodotte da microrganismi fitopatogeni possono presentare una specificità di azione nei confronti dell'ospite. La specificità può rappresentare un fattore positivo, se si considerano le specie infestanti tassonomicamente molto vicine alle specie coltivate (es. infestazioni di *Avena fatua* in campi di *Avena*), ma più frequentemente l'estrema selettività rappresenta un fattore limitante per l'impiego di tali metaboliti, considerando che quasi sempre il mercato richiede un prodotto con un ampio spettro di azione, per il contenimento di infestazioni complesse.

Potenziali bioerbicidi di origine microbica

I composti di origine microbica possono essere prodotti sia da microrganismi non fitopatogeni (saprofiti, microrganismi del suolo), sia da microrganismi fitopatogeni.

Metaboliti fitotossici di microrganismi non fitopatogeni

Al momento l'unico metabolita microbico che ha ottenuto un notevole successo commerciale è il bialaphos. Si tratta di un tripeptide, isolato inizialmente da colture di *Streptomyces viridochromogenes*, e in seguito anche di *S. hygroscopicus*, composto da un analogo dell'acido glutammico, denominato fosfinotricina, e due residui di alanina (Mase, 1984). Il bialaphos, in combinazione con la fosfinotricina ottenuta sinteticamente, sono i principi attivi contenuti in numerosi erbicidi commerciali non selettivi (ad es. glufosinate ammonio, nome commerciale: BASTA).

Da specie di *Streptomyces* sono stati ottenuti diversi altri composti, quali oxetina (Omura et al., 1984), vulgamycin (Babczinski et al., 1991), omoalanosina (Fushimi et al., 1989), che vengono attualmente considerati per la loro

attività erbicida.

Un altro interessante esempio di metabolita tossico prodotto da un microrganismo non fitopatogeno è la cornexistin, di *Paecilomyces variotii*. Questo metabolita è risultato attivo su numerose piante infestanti, fra cui *Digitaria* spp. e *Solanum nigrum* L., mentre il Mais è risultato altamente resistente (Nakajima et al., 1991).

Tra gli altri metaboliti di un certo interesse vi sono: anisomicina e toyocamycin, prodotte da *Streptomyces* sp. (Yamada et al., 1972) attiva verso *Echinocloa crus-galli* (L.) Beauv. e *Digitaria* sp., ed inattiva verso Pomodoro e Rapa; erbimicina A e B, prodotti da *Streptomyces* sp., potenti erbicidi verso numerose monocotiledoni e dicotiledoni, in particolare verso *Cyperus microiria* (Omura et al., 1976); e la rizobitossina, prodotta da alcuni isolati di *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan, in grado di causare clorosi su numerose specie di piante ma non su Soia, ospite del batterio produttore.

Metaboliti fitotossici di microrganismi fitopatogeni

Tra i metaboliti fitotossici prodotti da microrganismi fitopatogeni, comunemente noti come fitotossine, giova distinguere le fitotossine ospite-specifiche, da quelle non ospite-specifiche.

Tossine ospite-specifiche

Quasi tutte le tossine ospite-specifiche studiate e caratterizzate sono prodotte da funghi patogeni di piante coltivate. Tuttavia, se analoga attenzione venisse rivolta ai funghi patogeni di piante infestanti, certamente potrebbero essere caratterizzate fitotossine ospite-specifiche potenzialmente utili come bioerbicidi. In questo ultimo caso, a causa della specificità di tali composti le attenzioni dovrebbero essere rivolte verso quei patogeni di piante infestanti di grande diffusione ed importanza economica. Inoltre la modificazione chimica di queste fitotossine potrebbe consentire di ampliare o di modificare lo spettro di azione.

Al momento, l'unica tossina specifica nota prodotta da un patogeno di una pianta infestante è la maculosina (Stierle et al., 1988). Questa tossina, isolata dai filtrati culturali di *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, agente di una maculatura fogliare di *Centaurea maculosa* Lam., è risultata essere una dichetopiperazina. Applicata su foglie dell'ospite a concentrazioni di 10^{-5} M mediante un saggio di puntura fogliare, la tossina ha causato la comparsa di necrosi simili a quelle provocate dal patogeno, mentre a concentrazioni 100 volte superiori, saggiata su un campione di 19 differenti specie vegetali, fra cui Pomodoro, Girasole ed alcune infestanti, non ha causato alcun effetto. Altre sei maculosine, purificate dai filtrati culturali dello stesso fungo, hanno mostrato, rispetto alla maculosina, effetto minore o nullo. Questo indica che lievi modificazioni della struttura possono influenzare considerevolmente l'attività tossica. Altro aspetto interessante della maculosina è che è stata ottenuta anche per via sintetica.

Tabella 1. Effetto dell'acido β -nitropropionico su alcune specie vegetali coltivate e spontanee

		5 μ g	2,5 μ g	1 μ g
<i>Beta vulgaris</i>	Barbabietola	+++*	-	-
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo verde	++++	+++	++
<i>Capsicum annuum</i>	Pepe rosso	+	ns	ns
<i>Cicer arietinum</i>	Cece	+	ns	ns
<i>Cichorium intybus</i>	Cicoria	+++	-	-
<i>Cirsium arvense</i>	Stoppione	++++	++	+
<i>Citrus lemon</i>	Limone	-	-	-
<i>Citrus nobilis</i>	Mandarino	-	-	-
<i>Citrus reticulata</i>	Mandarino	++	+	+
<i>Cynara scolymus</i>	Carciofo	++	-	-
<i>Euphorbia</i> sp.	Euforbia	+	ns	ns
<i>Fragaria vesca</i>	Fragola	-	-	-
<i>Helianthus annuus</i>	Girasole	+++	+	-
<i>Hibiscus subduriffa</i>	Ibisco	+++	++	+
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Pomodoro	+++	-	-
<i>Malus sylvestris</i>	Melo	+	-	-
<i>Malva</i> sp.	Malva	-	-	-
<i>Mercurialis annua</i>	Mercurella	+++	ns	ns
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabacco	++	+	-
<i>Petroselinum crispum</i>	Prezzemolo	+	ns	ns
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fagiolo	++	ns	ns
<i>Pisum sativum</i>	Pisello	+	ns	ns
<i>Solanum tuberosum</i>	Patata	+	-	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	Crespino com.	-	-	-
<i>Triticum aestivum</i>	Frumento	-	-	-

ns = non saggiato

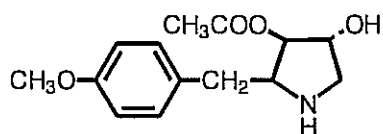
= - nessun sintomo; + necrosi 0-1 mm; ++ necrosi 1-2 mm;

+++ necrosi 3-4 mm; ++++ necrosi 5-7 mm

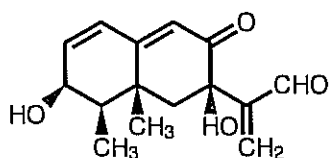
Tossine non ospite-specifiche

Le fitotossine non ospite-specifiche sono quelle più studiate per la potenzialità erbicida. Benché comunemente si definiscano fitotossine aspecifiche quelle in grado di produrre effetti tossici su diverse piante anche non ospiti del patogeno tossigeno, alcune di esse possiedono un certo grado di selettività. Ad esempio lo zinnio, applicato a foglie di Girasole alla concentrazione di 5 mM, provoca la comparsa di macchie necrotiche, mentre su foglie di Orzo determina un effetto di ritenzione della clorofilla (Robeson e Strobel, 1984).

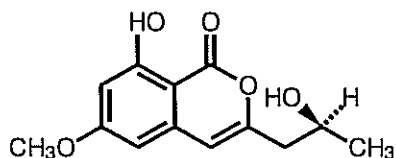
Gli eremofilani sono un vasto gruppo di metaboliti prodotti da diversi funghi, aventi la struttura di sesquiterpeni biciclici, dotati di differente attività biologica. Fra questi, di particolare interesse per l'attività fitotossica risultano: bipolaroxin, prodotta da *Bipolaris cynodontis*, un fungo patogeno di *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Sugawara et al., 1985); gigantone (Kenfield et al., 1989) e petasol (Bunkers e Strobel, 1991), prodotti da *Drechslera gigantea*



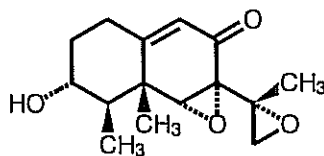
Anisomycin



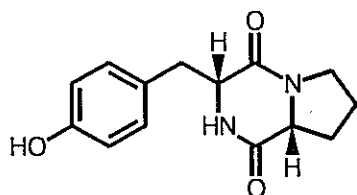
Bipolaroxin



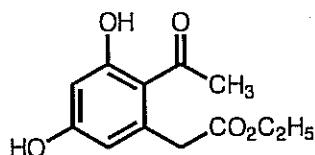
De-O-metildiaportina



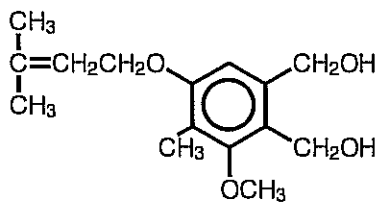
Gigantenone



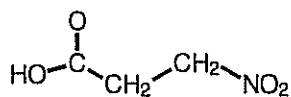
Maculosina



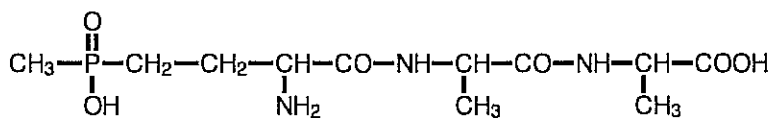
Curvulina



Zinniolo



Acido β-Nitropropionico



Bialaphos

Esempi di fitotossine prodotte da funghi fitopatogeni e non

(Heald & Wolf) Ito, patogeno di numerose specie pratensi coltivate ed infestanti. La caratteristica fondamentale di questi metaboliti è il diverso effetto che provocano su mono- e dicotiledoni. Infatti, sulla maggior parte delle dicotiledoni, la somministrazione fogliare degli eremofilani provoca la comparsa di maculature necrotiche; mentre sulle monocotiledoni, in particolare gigantenone e petasol, provocano la comparsa di aree localizzate di ritenzione della clorofilla, cioè un'attività citochinino-simile, pur non essendo strutturalmente correlati a questi ultimi composti (Bunkers e Strobel, 1991).

La *curvulina*, prodotta da *Drechslera indica* (Kenfield et al., 1989), a basse dosi causa effetti tossici su *Portulaca oleracea* L. e *Amaranthus spinosus* L., due specie ospiti del fungo; mentre a dosi più elevate è attiva anche su altre specie vegetali. Questo più ampio spettro di azione può essere, da un punto di vista applicativo, più favorevole rispetto ad una eccessiva selettività. Inoltre, anche in questo caso le modificazioni chimiche di questo composto può contribuire a orientare favorevolmente la selettività.

I triticoni (triticone A e B) sono dei metaboliti tossici aventi una inusuale struttura di γ -lattami spirociclici, purificati dai filtrati colturali di *Drechslera tritici-repentis* (Diedieke) Shoemaker, responsabile di macchie fogliari su *Agropyron cristatum* (L.) P.B. e *A. repens* (L.) P.B., nonché su Segale e su Frumento. Queste tossine, applicate congiuntamente sulle foglie delle piante ospiti a concentrazione 10^{-5} M provocano degli effetti tossici simili a quelli osservabili nel caso della infezione naturale del patogeno (Sugawara et al., 1988).

La *de-O-metildiaportina*, appartenente al gruppo delle cumarine che annoverano anche alcune fitoalessine, è stata isolata dai filtrati colturali di *Drechslera siccans* (Drechsler) Shoemaker, un patogeno fogliare di *Avena sativa* L. e di *Lolium* spp. La caratteristica predominante di questo metabolita è che mostra una particolare semi-specificità. Infatti, applicato sulla superficie fogliare a concentrazione nanomolare, sembra essere attivo solo su piante non-ospiti. In particolare, *Avena* e *Lolium*, ospiti naturali del fungo, sono quasi insensibili alla tossina, mentre Mais, Soia, *Digitaria ischaemum* Schreb. ed *Echinocloa crus-galli* L. risultano molto sensibili (Hallock et al., 1988).

La *tentossina* è un tetrapeptide costituito da 4 aminoacidi riuniti in una struttura ciclica, prodotta da *Alternaria alternata* (= *A. tenuis*) (Meyer et al., 1971). Questa tossina provoca clorosi dei germinelli in varie specie mono- e dicotiledoni e presenta una elevata selettività (Durbin e Uchtil, 1977). Ed è proprio questa caratteristica che rende interessante tale tossina. Ad esempio, mentre *Sorghum halepense* (L.) Pers. è sensibile alla clorosi, il mais non risulta sensibile alla tossina. Inoltre alcune infestanti della soia (come *Ipomoea hederacea* (L.) Jacq. e *Cassia obtusifolia* L.) risultano particolarmente sensibili alla tentossina, a differenza della soia che invece è praticamente insensibile (Lax et al., 1988).

Acido β -nitropropionico, fitotossina di *Septoria cirsii*.

Dai tessuti fogliari infetti di *Cirsium arvense* L., una infestante largamente diffusa in Puglia e Basilicata, è stato isolato *Septoria cirsii* Niessl. Dai filtrati culturali del fungo è stato purificato e caratterizzato l'acido β -nitropropionico (Hershenhorn et al., 1993). Le prove biologiche condotte per valutare l'attività erbicida di questo metabolita, sono risultate molto interessanti.

La specificità di azione è stata valutata mediante l'impiego di un saggio di puntura fogliare eseguita su numerose specie vegetali, sia spontanee che coltivate (Sugawara et al., 1985). L'effetto della tossina è stato valutato dopo 24 h di incubazione a 25° C, con l'impiego di una scala empirica da 0 (nessun sintomo) a 4 (lesioni con diametro 5-7 mm). I risultati ottenuti sono esposti in tabella 1.

L'attività erbicida verso l'ospite è stato valutata impiegando un saggio su semi di *Cirsium arvense*. I semi, sterilizzati in ipoclorito di sodio, dopo la germinazione in piastre Petri su filtri imbibiti di acqua, sono stati trasferiti in piastra Petri in presenza di 2 ml di soluzione 10^{-3} , 10^{-4} , e 10^{-5} M di tossina. La lunghezza della radice principale è stata misurata dopo 5 gg e raffrontata a quella di un testimone accresciuto in acqua. La tossicità è stata espressa come percentuale di inibizione dell'accrescimento. E' stata rilevata una notevole tossicità alla concentrazione più elevata (62%).

I risultati ottenuti dimostrano un'attività dell'acido β -nitropropionico molto interessante e suggeriscono il possibile impiego di questa tossina come bioerbicida.

Ulteriori studi sono in corso per valutare in campo la possibile applicazione di questa tossina.

LAVORI CITATI

- BABCZINSKI P., DORGERLOH M., LÖBBERDING A., SANTEL H.J., SCHMIDT R.R., SCHMITT P., WÜNSCHE C. (1991). Pestic. Sci., 33, 439-446.
- BUNKERS G.J., KENFIELD D., STROBEL G.A. (1991). Production of petasol by *Drechslera gigantea* in liquid culture. Mycol. Res., 95(3), 347-351.
- BUNKERS G.J., STROBEL G.A. (1991). A proposed mode of action for green island induction by the eremophilane phytotoxins produced by *Dechslera gigantea*. Physiol. Mol. Plant Path., 38, 313-323.
- DUKE S.O. (1986). Naturally occurring chemical compounds as herbicides. Reviews of Weed Science, 2, 15-44.
- DURBIN R.D., UCHTIL T.F. (1977). A survey of plant insensitivity to tentoxin. Phytopathology, 67, 602-603.
- FUSHIMI S., NISHIKAWA S., MITO N., IKEMOTO M., SASAKI M., SETO H. (1989). J. Antibiot., 42, 1370-1378.
- HALLOCK Y.F., CLARDY J., KENFIELD D.S. and STROBEL G. (1988). De-o-methyldiaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans*. Phytochemistry, 27 (10), 3123-3125.
- HERSHENHORN J., VURRO M., ZONNO M.C. STIERLE A., STROBEL G. (1993). *Septoria cirsii*, a potential biocontrol agent of Canada thistle and its phytotoxin - β -nitropropionic acid. Plant Science (accettato per la pubblicazione).

- KENFIELD D., BUNKERS G., WU Y.-H., STROBEL G., SUGAWARA F., HALLOCK Y., CLARDY J. (1989). Gigantenone, a novel sesquiterpene phytohormone mimic. *Experientia*, 45, 900-902.
- KENFIELD D., HALLOCK Y., CLARDY J., STROBEL G. (1989). Curvulin and *O*-methylcurvulinic acid: phytotoxic metabolites of *Drechslera indica* which cause necroses on purslane and spiny amaranth. *Plant Science*, 60, 123-127.
- LAX A.L., SHEPHERD H.S., EDWARDS J.V. (1988). Tentoxin, a chlorosis-inducing toxin from *Alternaria* as a potential herbicide. *Weed technology*, 2, 540-544.
- MASE S. (1984). Meiji Herbiace (MW-801, SF-1293) (common name: bialaphos). A new herbicide. *Jpn. Pestic. Inf.* 45, 27-30.
- MEYER W.L., TEMPLETON G.E., GRABLE C.I. (1971). The structure of tentoxin. *Tetrahedron Lett.*, 25, 2357-2360.
- NAKAJIMA M., ITOI K., TAKAMATSU Y., SATO S., FURUKAWA Y., FURUYA K., HONMA T., KADOTANI J., KOZASA M., HANEISHI T. (1991). *J. Antibiot.*, 44, 1065-1072.
- OMURA S., NAKAGAWA A., SADAKANE N. (1976). *Tetrahedron Lett.*, 4323-4326.
- OMURA S., MURATA M., IMAMURA N., IWAI Y., TANAKA H., FURUSAKI A., MATSUMOTO T. (1984). Oxetin, a new antimetabolite from an actinomycete. Fermentation, isolation, structure and biological activity. *J. Antibiot.* 37, 939-940.
- ROBESON D.J., STROBEL G.A. (1984). Zinniol induces chlorophyll retention in barley leaves: The selective action of a non-host-specific phytotoxin. *Phytochemistry*, 23, 1597-1599.
- STIERLE A.C., CARDELLINA J.H., STROBEL G.A. (1989). Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 85, pp. 8008-8011.
- STROBEL G.A., KENFIELD D., BUNKERS G., SUGAWARA F., CLARDY J. (1991). Phytotoxins as potential herbicides. *Experientia*, 47, 819-826.
- SUGAWARA F., STROBEL G., FISHER L., VANDYNE G., CLARDY J. (1985). Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8291.
- SUGAWARA F., TAKAHASHI N., STROBEL G.A., STROBEL S.A., LU H., CLARDY J. (1988). Triticones A and B, novel phytotoxins from plant pathogenic fungus *Drechslera tritici-repentis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 4086-4087.
- TE BEEST D.O., YANG X.B., CISAR C.R. (1992). The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 30, 637-657.
- VAN DYKE C.G. (1992). Biological control of weeds with fungi. *Handbook of Applied Mycology*. Vol.1, D.Arora, B.Rai, K.Mukerji e G.R.Knudsen ed., Marcel Dekker, New York, 357-376.
- VURRO M., BOTTALICO A., ZONNO M.C. (1993). Potenziali micoerbicidi per la lotta biologica contro le piante infestanti. I. *Septoria cirsi* Niessl. su *Cirsium arvense* L. *Informatore fitopatologico*, 5, 53-55.
- YAMADA O., KAISE Y., FUTATSUYA F., ISHIDA S., ITO K., YAMAMOTO H., MUNAKATA K. (1972). Studies on plant growth-regulating activities of anisomycin and toyocamycin. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2013-2015.