

INSETTI EUDAFICI E FUNGHI DEL TERRENO PATOGENI DEI CEREALI: STUDIO IN LABORATORIO

GLORIA INNOCENTI (*), MARIA AGNESE SABATINI (**)

(*) Dipartimento di Protezione Valorizzazione Agroalimentare, Università degli Studi,
Bologna

(**) Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi, Modena

RIASSUNTO

E' stato condotto uno studio sulle interazioni fra *Onychiurus pseudogranulosus* (Insecta, Collembola) e i più diffusi agenti del mal del piede dei cereali. Esempari di *O. pseudogranulosus* allevati in laboratorio, introdotti in scatole Petri contenenti substrato agarizzato inoculato con *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium culmorum* e *Rhizoctonia* sp., hanno attivamente ricercato e mangiato le ife dei tre funghi. Ciò porta ad ipotizzare un ruolo di *O. pseudogranulosus* nel contenimento dei patogeni considerati.

Prove condotte utilizzando *Bipolaris sorokiniana* hanno, invece, evidenziato che questo fungo esercita un effetto repellente e letale nei confronti di *O. pseudogranulosus*. Ulteriori indagini hanno confermato che il fungo produce uno o più metaboliti non volatili con effetto letale sui collemboli. Prove di laboratorio hanno evidenziato che tale/i sostanze inibiscono totalmente, almeno *in vitro*, lo sviluppo miceliare di *G.graminis* var. *tritici* e di *Rhizoctonia* sp. e riducono significativamente anche lo sviluppo di *F. culmorum*.

SUMMARY

LABORATORY STUDY ON EUEDEPHIC INSECTS AND SOIL-BORNE CEREAL PATHOGEN FUNGI

We studied the interactions between *Onychiurus pseudogranulosus* (Insecta Collembola) and the most important pathogen fungi of the foot and root of cereals. Laboratory reared specimens of *O. pseudogranulosus*, introduced into Petri dishes containing agar medium inoculated with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium culmorum* and *Rhizoctonia* sp., actively grazed on the hyphae of the three fungi. This suggests a potential role of *O. pseudogranulosus* as a biological control agent of the tested fungi.

On the contrary, another pathogen fungus, *Bipolaris sorokiniana*, had a repellent and lethal effect against *O. pseudogranulosus*. Additional studies revealed that *B. sorokiniana* produced one or more non-volatile metabolites lethal for *O. pseudogranulosus*. *In vitro*, these substances completely inhibited *G. graminis* var. *tritici* and *Rhizoctonia* sp. growth and strongly reduced the mycelial growth of *F. culmorum*.

INTRODUZIONE

L'attuazione di una agricoltura a basso rischio ambientale richiede una più ampia conoscenza della biologia del suolo agrario, quindi non solo delle piante coltivate e dei loro agenti patogeni, ma anche degli altri organismi che con questi interagiscono, fra i quali certamente importanti sono i componenti della pedofauna. Un ruolo nella regolazione dei processi di decomposizione e mineralizzazione della sostanza organica è da tempo attribuito agli animali del suolo come diretto o indiretto risultato delle loro attività alimentari (Seastedt, 1984). L'importanza della fauna del suolo negli agroecosistemi è dovuta soprattutto ai suoi effetti sulla microflora (Crossley *et al.*, 1989).

Mentre molto numerosi sono gli studi riguardanti il contenimento di funghi patogeni da parte di altri funghi scarse sono le conoscenze sulle interazioni fra le crittogame patogene e gli animali del suolo, fra i quali un importante gruppo è rappresentato dai microartropodi. Fra questi ultimi molto rappresentati sono gli insetti collemboli, prevalentemente micofagi e detritivori (Wallwork, 1976) che vivono nei primi centimetri del suolo dove si trovano anche i propaguli di molte crittogame fitopatogene.

Wiggins e Curl (1979), Curl *et al.* (1988), Nakamura *et al.* (1992) hanno evidenziato con prove svolte *in vitro* che alcune specie di collemboli si cibavano delle ife di *Rhizoctonia solani* e di *Fusarium oxysporum* e che la presenza di questi insetti nel terreno determinava una sostanziale riduzione della moria dei semenzali di cotone e di cocomero. El Titi e Ulber (1991) hanno ottenuto risultati simili nei confronti delle piantine di bietola attaccate da *Pythium ultimum*, *Phoma betae*, *Fusarium oxysporum* e *Aphanomyces cochlioides*.

Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare l'interazione *in vitro* fra collemboli appartenenti alla specie *Onychiurus pseudogranulosus* Gisin e i principali agenti del mal del piede dei cereali: *Gaeumannomyces graminis* Von Arx var. *tritici* Walker, *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, *Rhizoctonia* sp.. Particolare riguardo è stato dedicato alle preferenze alimentari tenendo conto che nei terreni agrari le 4 specie di patogeni coesistono anche se in rapporti e percentuali diverse.

MATERIALI E METODI

Collemboli onichiuridi appartenenti alla specie *O. pseudogranulosus* sono stati allevati in laboratorio per più generazioni. Gli esemplari alimentati con lievito di birra, sono stati mantenuti in termostato a 20 °C, al buio in vasetti di vetro contenenti un substrato di argilla saturata con acqua.

Individui tenuti a digiuno per 48 ore sono stati introdotti in piastre Petri di 9 cm di diametro, contenenti 15 ml di Agar Patata Destrosio Difco (Harasymek e Sinha, 1974), inoculate 24 ore prima (Curl, 1979) con dischetti di 2 mm di diametro provenienti da colture in attiva crescita di isolati di *G. graminis* var. *tritici*, *F. culmorum*, *B. sorokiniana*, *Rhizoctonia* sp. che in prove precedenti erano risultati altamente patogeni per il frumento.

Una prima serie di prove è stata effettuata introducendo 50 collemboli in capsule Petri contenenti una sola colonia fungina. Piastre testimoni sono state allestite con i soli funghi o i soli collemboli. Le prove sono state ripetute 3 volte.

Per saggiare le preferenze alimentari i collemboli sono stati introdotti in piastre Petri inoculate da 24 ore contemporaneamente con 2, 3, 4 funghi, secondo tutte le possibili combinazioni. In ogni piastra sono stati introdotti 60 animali. Le preferenze sono state valutate in base alla posizione degli animali osservata allo stereomicroscopio a intervalli di tempo diversi entro 48 ore dall'inizio dell'esperimento. Il termine di 48 ore è stato fissato perchè dopo tale momento le piastre cominciano a riempirsi di colonie batteriche che in qualche modo potrebbero falsare i risultati. Ciascuna prova è stata ripetuta 2 volte.

Per valutare l'eventuale effetto di metaboliti non volatili prodotti da *B. sorokiniana* colonie di quest'ultimo sono state fatte crescere su PDA ricoperto da un foglio di cellophane, prodotto dalla Ditta Safta (PC), che permette il passaggio dei metaboliti, ma non delle ife (Dennis e Webster, 1971). Dopo 72 ore dall'inoculazione di *B. sorokiniana*, il cellophane è stato tolto e in ciascuna piastra sono stati introdotti 30 collemboli. Lo stesso numero di collemboli è stato introdotto in piastre testimoni nelle quali era stato aggiunto il solo cellophane. Il conteggio degli animali vivi e l'eliminazione dei morti sono stati effettuati ogni 12 ore. La prova è stata ripetuta 3 volte. Piastre ottenute con la stessa metodica sono state inoculate separatamente con *G. graminis* var. *tritici*, *F. culmorum* e *Rhizoctonia* sp.. I diametri delle colonie sono stati misurati a intervalli di tempo regolari. I valori dei diametri delle colonie sviluppatesi in presenza dei metaboliti di *B. sorokiniana* sono stati confrontati con quelli delle colonie testimoni mediante il *t* di Student.

RISULTATI

I Collemboli appartenenti alla specie *O. pseudogranulosus* introdotti nelle piastre Petri in cui erano stati inoculati separatamente *G. graminis* var. *tritici*, *F. culmorum* e *Rhizoctonia* sp. hanno attivamente ricercato e si sono cibati delle ife fungine di tutte e tre le specie. I collemboli hanno notevolmente ridotto l'accrescimento miceliare di *Rhizoctonia* sp. e di *G. graminis* var. *tritici*, in quest'ultimo caso hanno scavato l'agar per nutrirsi delle ife del fungo sviluppatesi all'interno del substrato. Gli animali introdotti in piastre in cui era stato posto un dischetto di agar privo di micelio non hanno dimostrato alcun interesse alimentare per il substrato. Il contenimento della colonia di *F. culmorum* è stato minore rispetto a quello delle crittogame precedenti per la notevole velocità di accrescimento del fungo. I collemboli introdotti in piastre Petri in cui era presente *B. sorokiniana* hanno, invece, dimostrato una certa repulsione per il fungo, evitando di avvicinarsi all'inoculo fungino e rimanendo ai bordi della piastra. Le osservazioni effettuate hanno permesso di accertare che dopo 12 ore era morto il 10% degli esemplari, dopo 24 ore il 50% e dopo 48 ore il 95%. La mortalità di *O. pseudogranulosus* nelle piastre testimoni non ha mai superato l'1%.

Dalle prove di preferenza alimentare effettuate con più funghi presenti contemporaneamente è emerso che, fatta eccezione per *B. sorokiniana* i cui propaguli sono costantemente evitati, i collemboli si suddividono tra le varie colonie passando inoltre dall'una all'altra. L'analisi delle preferenze alimentari di *O. pseudogranulosus* in presenza di tutti e quattro i funghi studiati (Fig.1) ha messo in evidenza che nelle prime ore dell'esperimento i collemboli, evitate le ife di *B. sorokiniana*, erano suddivisi fra le colonie degli altri tre funghi con un maggior numero di esemplari sulla colonia di *G. graminis* var. *tritici* (Figg. 1-2a). In seguito un

numero sempre maggiore di esemplari ha raggiunto e si è stabilizzato sul micelio di *F. culmorum*, abbandonando prima *Rhizoctonia* sp. e quindi *G. graminis* var. *tritici* (Fig. 2b). Alla fine dell'esperimento (48 ore dall'inizio) (Fig.1) quasi tutti i collemboli si trovavano su *F. culmorum*, ma pochi individui continuavano a nutrirsi degli altri 2 funghi, e nel caso di *G. graminis* var. *tritici* a scavare l'agar per raggiungere le ife cresciute all'interno del substrato. I pochi esemplari di *O. pseudogranulosus* conteggiati alla fine dell'esperimento sulla colonia di *B. sorokiniana* erano morti.

Gli esperimenti effettuati introducendo collemboli nelle piastre nelle quali erano cresciuti sopra un cellophane le ife di *B. sorokiniana* hanno avuto come risultato la morte di tutti i collemboli entro le 72 ore dall'inizio dell' esperimento.

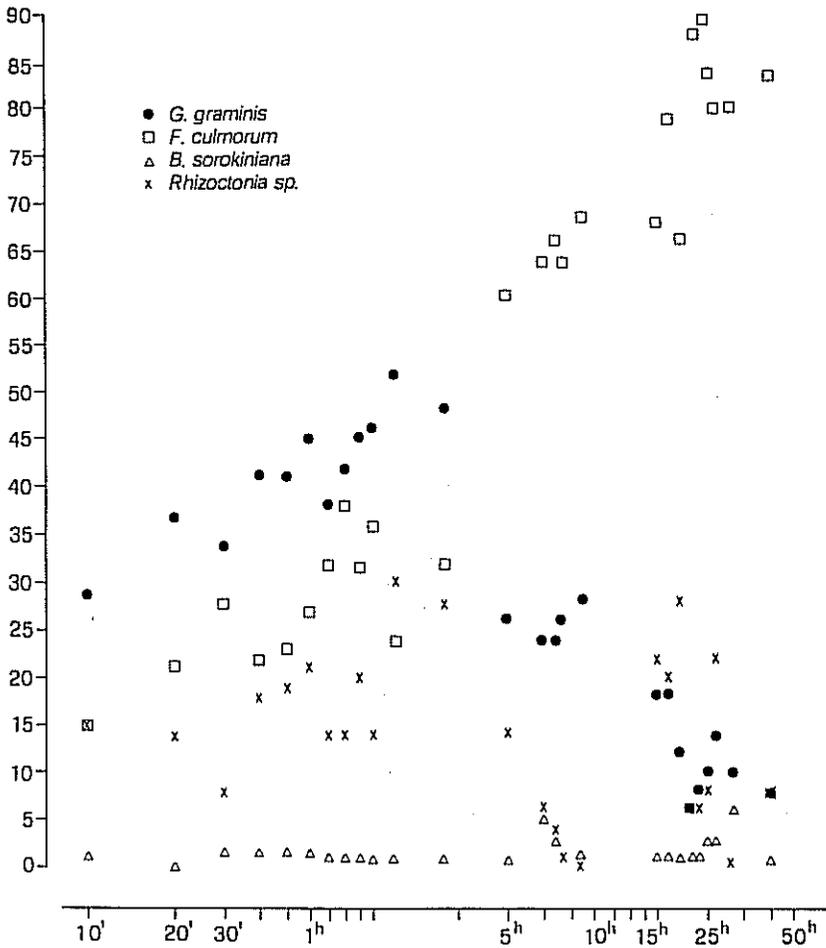


Fig. 1 - Numero di Collemboli (su un totale di 120 esemplari) osservati in tempi diversi nell'area di sviluppo delle colonie dei 4 funghi saggiati.

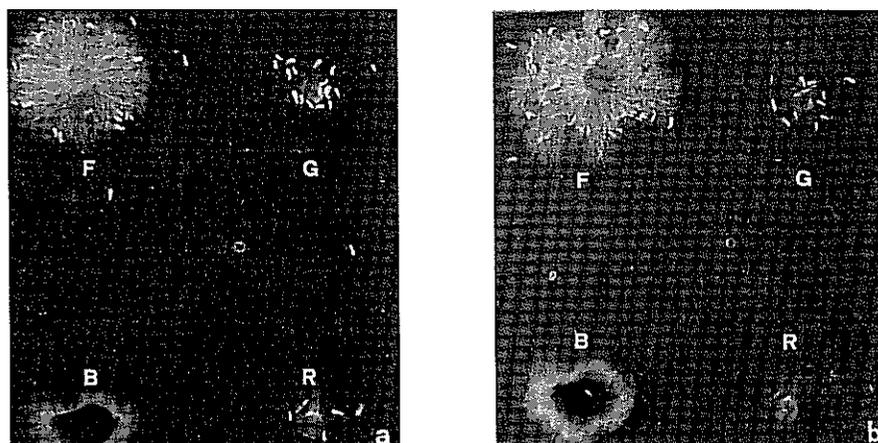


Fig. 2 - Colonie di *F. culmorum* (F), *G. graminis* var. *tritici* (G.), *Rhizoctonia* sp. (R) e *B. sorokiniana* (B) due ore (a) e 9 ore (b) dopo l'aggiunta degli esemplari di *O. pseudogranulosus*.

L'effetto della/e sostanze non volatili prodotte dal fungo sull'accrescimento diametrico delle altre crittogame è riportato in Fig. 3. Tale effetto è espresso come inibizione percentuale rispetto allo sviluppo della colonia testimone posto uguale a 100. Dall'esame del grafico si evidenzia che l'inibizione dello sviluppo di *G. graminis* var. *tritici* e di *Rhizoctonia* sp. è risultata totale e che la riduzione dell'accrescimento di *F. culmorum* è stata significativa. Il confronto mediante il *t* di Student dei valori del diametro delle colonie testimoni con quello delle colonie sviluppatesi sul substrato

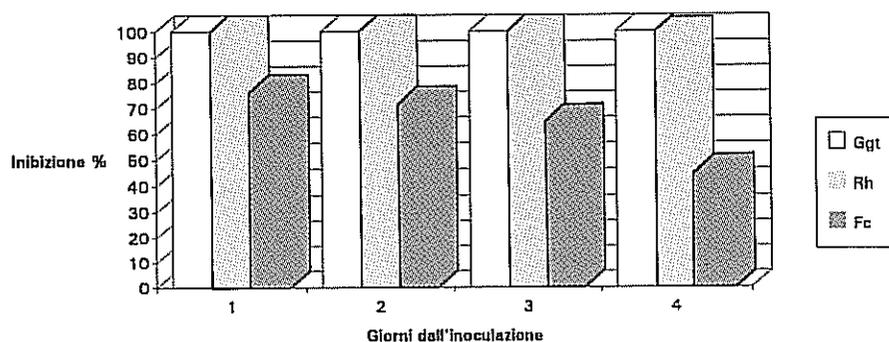


Fig. 3 - Effetto della/e sostanze non volatili prodotte da *B. sorokiniana* sullo sviluppo diametrico delle colonie di *G. graminis* var. *tritici* (Ggt), *Rhizoctonia* sp. (Rh), *F. culmorum* (Fc), espresso come inibizione percentuale rispetto al testimone posto uguale a 100.

contenente i metaboliti, ha permesso di accertare differenze altamente significative ($P < 0,01$) per tutti i funghi dopo 24, 48, 72, 96 ore dall'inoculazione. Gli inoculi di *G. graminis* var. *tritici* e di *Rhizoctonia* sp. prelevati dal substrato agarizzato contenente i metaboliti e posti su PDA privo di tali sostanze si sono sviluppati seppure più lentamente rispetto alle colonie testimoni.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti, in accordo con le osservazioni di Wiggins e Curl (1979), Curl *et al.* (1988), Nakamura *et al.* (1992), fanno ipotizzare che i collemboli, cibandosi del micelio di crittogame patogene, possano svolgere un ruolo importante come potenziali agenti di lotta biologica alterando la densità di inoculo dei miceti. In particolare si è osservato per la prima volta che questi insetti possono essere attivi anche nei riguardi di alcune importanti crittogame agenti del mal del piede dei cereali nei cui confronti non sempre sono disponibili efficaci metodi di lotta chimica.

O. pseudogranulosus non ha mostrato un' elevata specificità alimentare, infatti si è cibato del micelio di *F. culmorum*, *G. graminis* var. *tritici* e *Rhizoctonia* sp. anche quando erano presenti contemporaneamente. Ciò fa supporre che questa specie di collembolo possa svolgere un ruolo di contenimento dei patogeni anche quando più specie di questi sono presenti insieme, come avviene normalmente nel suolo agrario.

E' stato messo in evidenza un effetto repellente e letale di *B. sorokiniana* nei confronti di *O. pseudogranulosus*. L'aver rilevato che l'effetto letale è dovuto a metaboliti non volatili potrebbe fare ipotizzare che il fungo produca anche sostanze volatili con effetto repellente. Ciò potrebbe concordare con quanto affermato da D'Ambrosio *et al.* (1992) per *Fusarium sporotrichioides*. Tali Autori hanno infatti osservato che l'attività "repulsiva" del fungo nei confronti del coleottero *Oryzaephilus surinamensis* non era determinata dalle micotossine da loro isolate ed hanno pertanto ipotizzato la produzione di composti volatili dall'odore repulsivo.

L'individuazione di metaboliti letali per *O. pseudogranulosus* suggerisce di verificare l'efficacia di tali sostanze anche nei confronti di insetti dannosi per le piante per una eventuale loro valutazione come bioinsetticidi.

I metaboliti non volatili di *B. sorokiniana* oltre che letali per i collemboli, sono risultati fungistatici per *G. graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia* sp. e *F. culmorum*. Tale effetto, se valido anche nel terreno, potrebbe avvantaggiare *B. sorokiniana* quando presente insieme alle altre crittogame.

Il presente contributo alla conoscenza delle complesse interazioni fra gli organismi del suolo agrario evidenzia che gli Artropodi ed in particolare i collemboli, possono influenzare la composizione qualitativa e quantitativa della micoflora della rizosfera e del rizopiano. Le interazioni sono rese ulteriormente complesse dal fatto che funghi del terreno producano metaboliti letali per i collemboli e fungistatici per altri miceti. Ciò sottolinea l'importanza degli organismi associati nella genesi ed evoluzione delle malattie delle piante.

LAVORI CITATI

- CROSSLEY D. A. jr, COLEMAN D. C., HENDRIX P. F. (1989). The importance of the fauna in agricultural soils: research approaches and perspectives. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 27, 47-55.
- CURL E.A., LARTEY R., PETERSON C.M. (1988). Interactions between root pathogens and soil microarthropods. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 24, 249-261.
- CURL E.A. (1979). Effects of mycophagous collembola on *Rhizoctonia solani* and cotton seedling disease. In: Soil-borne plant pathogens, coord. B. Schippers e W. Gams, Accademic Press, London, 253-269.
- D'AMBROSIO A., MULE' G., LOGRIECO A., BOTTALICO A. (1992). Comportamento di *Oryzaephilus surinamensis* in presenza di colture di *Fusarium sporotrichioides* contenenti tricoteceni. *Atti Gior. Fitopat.*, 2, 311-320.
- DENNIS C., WEBSTER J. (1971). Antagonistic properties of *Trichoderma*. I. Production of non volatile antibiotics. *Trans Br. Mycol. Soc.*, 57, 1, 25-39.
- EL TITI A., ULBER B. (1991). Significance of biotic interactions between soil fauna and microflora in integrated arable farming. In: Biotic interactions and soil-borne diseases, coord. A. B. R. Beemster, G. J. Bollen, M. Gerlach, M. A. Ruissen, B. Schippers, A. Tempel, Elsevier, Amsterdam, 1-19.
- HARASYMEK L., SINHA R.N. (1974). Survival of springtails *Hypogastrum tulbergii* e *Proistoma minuta* on fungal and bacterial diets. *Environ. Entomol.*, 3, 965-968.
- NAKAMURA Y., MATSUZAKI I., ITAKURA J. (1992). Effect of grazing by *Sinella curviseta* on *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum* causing cucumber disease. *Pedobiologia*, 36, 168-171.
- SEASTEDT T. R. (1984). The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annu. Rev. Entomol.*, 29, 25-46.
- WALLWORK J. A. (1976). The distribution and diversity of soil fauna. Academic Press, London.
- WIGGINS E., CURL E.A. (1979). Interactions of Collembola and microflora of cotton rhizosphere. *Phytopathology*, 69, 3, 244-24