

MAURIZIO VURRO\*, MASSIMO CRISTOFARO\*\*, FRANCESCA CASELLA\*,  
ANGELA BOARI\*, MARIA CHIARA ZONNO\*

## Lotta biologica alle piante infestanti

### INTRODUZIONE

Con il termine di *pianta infestante*, oppure *malerba* o, popolarmente, *erbaccia*, si intende generalmente una pianta che, non rivestendo alcuna funzione utile per l'uomo, ne va a danneggiare le produzioni agricole entrando in competizione o parassitizzando queste ultime. Tuttavia, in senso più ampio e completo, il concetto può essere esteso, oltre che alle piante infestanti i campi coltivati, anche a quelle che crescendo in ambienti sia antropizzati che naturali, interferiscono con le attività dell'uomo o modificano gli ecosistemi. Rientrano in questo concetto ampliato, ad esempio quelle che crescono in città e hanno effetti allergenici, o quelle che danneggiano il patrimonio archeologico, le specie acquatiche che ostacolano la viabilità dei corsi d'acqua, o quelle che crescono negli ambienti naturali e riducono la biodiversità.

### LA LOTTA BIOLOGICA

La lotta biologica alle specie infestanti è una applicazione “non convenzionale” della patologia vegetale e della entomologia con la quale un organismo dannoso è utilizzato per mitigare l'effetto dannoso di specie bersaglio senza danneggiare le specie vegetali non-bersaglio, come quelle coltivate o indigene. L'idea di impiegare organismi viventi per controllare le piante infestanti risale a oltre un secolo fa, e risultati molto incoraggianti sono stati ottenuti negli

\* Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Bari

\*\* ENEA C. R. Casaccia, BAS BIOTEC-SIC, S. Maria di Galeria (Rm)

anni 60-70. Ma è a partire dagli anni '80 che vi è stato un rinnovato interesse per queste ricerche che ha portato a numerosi promettenti sviluppi, e nel prossimo futuro ci saranno probabilmente ulteriori motivi di interesse. Fra questi, l'aumentata richiesta per la riduzione dell'impiego dei prodotti chimici nelle produzioni alimentari da parte dell'opinione pubblica; l'incremento dei consumi di prodotti agricoli e agro-industriali biologici; la messa al bando di diserbanti ritenuti pericolosi; i costi sempre più elevati per lo sviluppo e la registrazione di nuove sostanze attive; la mancanza di erbicidi registrati per le colture minori; l'insorgenza di fenomeni di resistenza agli erbicidi di sintesi nelle specie infestanti; l'impossibilità di utilizzare prodotti chimici in taluni ambienti naturali o antropizzati; l'aumentata consapevolezza della necessità di protezione dell'ambiente; gli effetti negativi di altre esistenti pratiche di gestione delle infestanti; la necessità di controllare infestanti non-agrarie e invasive; gli elevati costi dei metodi di gestione delle infestanti negli ambienti naturali e nelle colture estensive.

Il controllo biologico si basa sullo sfruttamento di determinate caratteristiche di un organismo *agente* nei confronti di un altro organismo *bersaglio*. L'obiettivo dovrebbe essere quello di ridurre la presenza della malerba a un livello, o al di sotto di un livello, economicamente significativo (Huffaker, 1958).

Se correttamente impiegata e stabilizzata la lotta biologica classica (vedi sezione successiva) si presenta come una tecnica di controllo delle malerbe poco dispendiosa, permanente, non pericolosa per l'ambiente e che non comporta trattamenti ripetuti o correttivi. L'utilizzo delle strategie del controllo biologico non implica l'eradicazione della pianta anzi, perché lo stesso consegua un successo continuativo, un piccolo numero di *bersagli* dovrebbe permanere per assicurare la sopravvivenza dell'agente. Questo, a sua volta, dovrebbe essere sempre efficace per contenere il numero di piante bersaglio.

Gli insetti sono stati finora i principali protagonisti della lotta biologica in quanto costituiscono il gruppo più numeroso di nemici delle piante. Le specie di insetti che hanno evidenziato capacità applicative nel controllo biologico delle malerbe appartengono agli ordini degli Emitteri, Omotteri, Tisanotteri, Coleotteri, Lepidotteri, Ditteri e Imenotteri. Altre specie animali sono state utilizzate, con risultati non sempre soddisfacenti; ad esempio un acaro è stato introdotto in Australia allo scopo di controllare una specie di cactus originaria di quelle zone (Mann, 1969); i pesci, le lumache e il lamantino sono stati utilizzati per il controllo di alcune piante acquatiche.

Altri organismi in grado di controllare adeguatamente le malerbe sono gli agenti patogeni (funghi, virus, batteri). In particolare, i funghi, come gli

insetti, risultano i più utilizzabili perché presentano: (1) un alto grado di specializzazione nei confronti dell'ospite, (2) alte capacità di adattamento sull'ospite e (3) un elevato numero di specie adattabili a diverse situazioni ecologiche (National Academy of Science, 1969).

Gli interventi di lotta biologica alle infestanti possono essere utilizzati in differenti condizioni e ambienti, alcuni dei quali particolarmente favorevoli a queste applicazioni, quali le coltivazioni biologiche e coltivazioni a gestione integrata, gli ambienti naturali, quelli forestali, gli ambienti acquatici (canali, corsi d'acqua, laghi) e quelli antropizzati (parchi urbani, zone archeologiche, margini stradali e ferroviari).

La lotta biologica contro le infestanti viene realizzata con due modalità fondamentali: il metodo classico e quello inondativo, che verranno di seguito illustrati.

Un ulteriore metodo, chiamato "conservativo" o "system management", un approccio di tipo ecologico, propone di proteggere e ampliare le popolazioni di agenti di biocontrollo naturalmente presenti, attraverso modifiche ambientali o adattamento di preesistenti pratiche agricole, in modo da far raggiungere a tali popolazioni una dimensione sufficiente a controllare la popolazione infestante bersaglio (Frantzen et al., 2001).

#### IL METODO CLASSICO

Definito anche "inoculativo" consiste nel rilascio di uno o più agenti, importati dalla stessa zona di origine della infestante, nell'ambiente in cui l'infestante si è diffusa e provoca danni a causa dell'assenza di nemici naturali. Questo metodo prevede l'immissione dell'agente di controllo con minime manipolazioni tecnologiche, su una superficie limitata rispetto a quella infestata in modo da ottenere una progressiva epidemia che consenta nel tempo il controllo dell'infestante nell'area considerata. Si tratta di una strategia dal basso costo, e risulta particolarmente adatta per la gestione di quelle popolazioni infestanti diffuse in aree vaste o a bassa redditività, quali pascoli, ambienti naturali, ambienti acquatici, zone boschive, che si riproducono soprattutto per via vegetativa e quindi geneticamente omogenee. In queste situazioni esse rappresentano ideali bersagli per il controllo con agenti che si sono coevoluti e che sono solo stati separati fisicamente per un periodo di tempo. Se le condizioni sono favorevoli, l'agente si moltiplica e si diffonde nella popolazione infestante limitandone la crescita e riducendone la diffusione. La popolazione inizia quindi lentamente a declinare. In

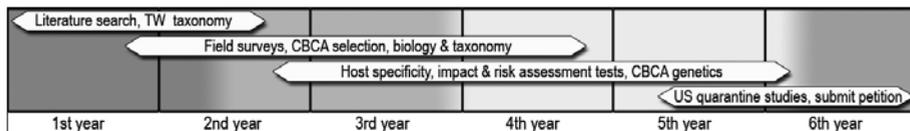


Fig. 1 *Diagramma schematico di un progetto di lotta biologica in funzione del tempo.*  
 Abbreviazioni: TW = pianta infestante bersaglio; CBCA = Agente Candidato di Controllo Biologico.

questo caso sono necessari parecchi mesi, o anni, prima che si raggiunga il desiderato livello di controllo.

Dal primo tentativo di lotta biologica *classica* (intorno al 1865), erano stati introdotti in varie zone del mondo, contro 100 specie di infestanti naturalizzate, circa 200 organismi (Julien, 1987). Gli esiti di tutte queste introduzioni di nemici naturali sono alquanto variabili, anche se in circa il 25-30% dei casi si può affermare con sicurezza di avere ottenuto dei risultati soddisfacenti, raggiungendo un controllo permanente delle infestanti bersaglio su ampie aree.

Il controllo biologico *classico* è applicabile soprattutto in aree relativamente stabili dal punto di vista geo-climatico, come i pascoli naturali o le foreste, oppure in tutte quelle zone in cui il ricorso a mezzi di controllo chimici o meccanici è economicamente sconveniente o proibito. La sua applicazione, anche se non del tutto impossibile, comunque risulta assai difficoltosa nelle zone caratterizzate da una agricoltura intensiva, in cui si hanno annuali variazioni nell'ordinamento colturale e vengono irrorate cospicue quantità di pesticidi.

Il grande vantaggio della strategia *introduttiva* o *classica*, è che il costo del controllo è indipendente dalla sua durata o dalla superficie dell'area infestata. Il controllo permanente di una malerba su aree estese migliaia di ettari non costa più di un intervento su superfici sensibilmente inferiori, per una durata di uno o più anni. Il costo per ettaro di tale strategia diminuisce in maniera proporzionale con l'aumentare della superficie considerata e con l'aumentare della durata del controllo stesso. I costi da affrontare in un progetto di biocontrollo di una malerba con la strategia *classica* riguardano (fig. 1) in particolare la ricerca nella zona di origine dell'infestante e i test e i rilasci iniziali degli agenti di controllo.

Una volta introdotti e stabilizzati questi si riproducono e si disperdono autonomamente sulle piante bersaglio. Anche se non richiede grossi investimenti di capitale, la strategia *classica*, presenta la necessità di dover attendere, prima che si intravedano i primi risultati, lunghi periodi di tempo (anche

10-15 anni); in funzione di ciò, il metodo è applicabile ad aree a basso valore economico, come ad esempio i pascoli naturali. Un altro svantaggio riguarda il fatto che gli insetti nella loro attiva ricerca della malerba ospite, o eventualmente i patogeni che si diffondono nell'ambiente, possono attaccarla e colpirla ovunque essa sia presente, anche in quelle zone ove venga considerata una pianta utile. Infatti una volta rilasciato e stabilizzato, un agente di controllo non può essere facilmente frenato. Deve quindi essere posta una attenta considerazione ai possibili conflitti di interesse che potrebbero sorgere tra gli aspetti utili e quelli dannosi della malerba, e ai possibili cambiamenti futuri in questi valori, prima che venga intrapresa una strategia di controllo biologico classico.

Per lungo tempo i progetti inerenti i programmi di controllo biologico sono stati intrapresi in maniera alquanto superficiale non dando alcuna considerazione all'aspetto scientifico del problema (Harris, 1977). Negli ultimi decenni il metodo si è evoluto considerevolmente grazie allo sviluppo di protocolli sperimentali impostato su basi scientifiche (Harris, 1971; Wapshere, 1974a/b; Wapshere, 1975; DeLoach, 1978).

Attualmente l'efficacia dell'organismo viene valutata sulla base di due metodiche: il *metodo Harris* e il *metodo Wapshere*. Il primo propone di selezionare gli organismi "agenti" secondo la loro specificità, il tipo di danno indotto, il periodo di attacco, il fattore di mortalità; il secondo dà rilevanza soprattutto alle osservazioni fatte in pieno campo (diffusione aggressività, virulenza, ecc.) (Harris, 1973; Wapshere, 1975).

L'organismo "agente", oltre a essere efficace, deve risultare altamente specifico nei confronti della pianta "bersaglio" e, conseguentemente, innocuo per le altre piante. A tal fine Wapshere ha proposto un metodo di selezione per la determinazione della gamma d'ospite detto della "spirale filogenetica" che tiene conto, cioè, delle piante correlate tassonomicamente alla famiglia dell'infestante. Non va trascurata la valutazione della specificità anche nei confronti delle cosiddette "piante a rischio", per esempio quelle attaccate da organismi tassonomicamente vicini all'organismo agente (Schroeder, 1983).

Programmi di lotta biologica classica con artropodi sono stati condotti in particolare negli Stati Uniti, in Canada, Australia, Paesi nei quali le piante infestanti (allototone) sono un serio problema in aree non coltivate dove entrano in competizione con la flora nativa. Il tipo di habitat, naturale e a basso valore economico, ha reso non solo possibile ma altamente raccomandabile l'applicazione di programmi di lotta biologica.

Esempi di successo nella lotta biologica alle infestanti sono stati ottenuti inizialmente con *Lantana camara* nelle Hawaii (all'inizio del '900), per

poi proseguire con il fico d'India (*Opuntia* spp.), *Senecio jacobea*, *Chondrilla juncea*, *Euphorbia esula*, *Onopordum acanthium*, *Centaurea solstitialis*, *Tamarix* spp.

Nel caso della carduina annuale *Centaurea solstitialis* (Asteraceae), responsabile di una delle più dannose infestazioni negli Stati Uniti, per parecchi anni gli studi sono stati focalizzati su organismi che colpivano i boccioli fiorali e che avevano un diretto impatto sulla produzione dei semi, tra cui i ditteri tefritidi *Urophora sirunaseva* e *Chaetorellia australis* e i coleotteri curculionidi *Bangasternus orientalis*, *Eustenopus villosus* e *Larinus curtus* (Campobasso et al., 1998; Clement et al., 1988; Sobhian, 1993; Sobhian e Fornasari, 1994). Nonostante il rilascio di questi 5 agenti, l'impatto sulle popolazioni di *C. solstitialis* nell'ovest degli USA è stato per molti anni piuttosto scarso (Pitcairn et al., 2006 a/b). Per questo motivo, negli ultimi anni sono stati presi in considerazione altri agenti di controllo, che colpiscono la pianta infestante nei primi stadi fenologici (rosetta o all'inizio della levata): è il caso del coleottero curculionide *Ceratopion basicorne*, la cui larva si sviluppa a spese del colletto della radice, o del coleottero alticino *Psylliodes chalconera*, che colpisce il meristema apicale e lo stelo all'inizio della levata (Cristofaro et al., 2004; Smith et al., 2006). In particolare per questi due agenti la ricerca non si è limitata alla valutazione della specificità alimentare, ma ha preso anche in considerazione parametri innovativi quali il comportamento di aggregazione e la valutazione dell'impatto sulla pianta infestante. Inoltre, per entrambe le specie considerate, è stato necessario mettere a punto programmi di analisi biomolecolare in grado di distinguere i 2 agenti da specie e/o sottospecie morfologicamente vicine (Antonini et al., 2005). Il progetto sul controllo biologico di questa pianta infestante si sta concludendo con il rilascio in California anche della ruggine *Puccinia centaureae* e con le ultime prove di campo con l'eriofide *Aceria solstitialis* (Fisher et al., 2007; Monfreda et al., 2005; 2007).

Analogamente, il programma sulla lotta biologica a un'infestante perenne con moltiplicazione agamica per rizomi, l'euforbiacea *Euphorbia esula*, ha richiesto l'intervento polivalente di diverse associazioni entomologiche: il lepidottero sfingide *Hyles euphorbiae*, il coleottero cerambicide *Oberea erythrocephala*, e 2 ditteri galligeni (*Dasineura capsulae* e *Spurgia capitigena*); tuttavia i risultati più interessanti sono stati ottenuti impiegando un genere di piccoli crisomelidi alticini (*Aphthona* spp.), che pur danneggiando in modo molto limitato la pianta allo stadio larvale (questi insetti provocano piccole lesioni superficiali ai peli radicali), inducevano dei devastanti danni secondari alla popolazione dell'infestante. Studi sull'associazione fungo-insetto, hanno messo chiaramente in luce la sinergia esistente tra il danno larvale di varie specie di

alticini del genere *Aphthona* e quello provocato da funghi generici del genere *Rizoctonia* (Caesar et al., 1993; 1998, Kremer et al., 2004).

Per decenni, gli artropodi sono stati preferiti come agenti di lotta biologica classica (Julien e Griffiths, 1998), in parte perché il potenziale ruolo dei patogeni era stato sottovalutato. Negli ultimi 35-40 anni si è assistito a un aumento dell'uso dei patogeni, sia riguardo l'approccio classico che il metodo inondativo. Fra i patogeni, quelli fungini sono stati solitamente preferiti rispetto ad agenti batterici o virali nei programmi di lotta classica (Charudattan, 2001), soprattutto perché in genere non richiedono un vettore per la disseminazione, e anche perché spesso hanno un livello di specificità superiore. Benché patogeni radicali siano conosciuti agenti di devastanti malattie delle piante, sono quelli fogliari preferenzialmente selezionati come agenti di biocontrollo in quanto in genere sono più specifici e più facilmente dispersi dal vento o dalle piogge (Watson, 1991). Funghi biotrofici (obbligati) sono patogeni chiave per la lotta classica in quanto sono altamente ospite-specifici e parassitizzano e danneggiano severamente piante vigorose (Watson, 1991), ottenendo nutrienti direttamente dai tessuti viventi. Fra tali organismi sono compresi quelli agenti di sintomi quali ruggini, carboni e muffe. Essi raramente uccidono le piante direttamente, ma hanno degli effetti negativi, determinando un dispendio di energie, con effetti comparabili a quelli degli insetti erbivori (Charudattan, 2005).

Poiché fondamentalmente l'uomo non ha ulteriori possibilità di gestione del microrganismo una volta rilasciato nell'ambiente, per poter avere successo e nel contempo non causare danni, i requisiti fondamentali che un fungo patogeno utilizzabile con il metodo classico deve soddisfare sono in particolare: specificità verso la specie bersaglio, elevata virulenza, mobilità nell'ambiente, elevata capacità riproduttiva e adattabilità all'ambiente.

Anche per il controllo biologico utilizzando i patogeni fungini, i migliori risultati sono stati ottenuti in questo campo in particolare in Australia e nel continente americano proprio perché numerose specie vegetali sono state introdotte, quasi sempre dall'Europa e spesso al semplice scopo ornamentale, e sono divenute infestanti proprio perché non avevano nessun nemico naturale.

I primi tentativi formali di lotta classica con i patogeni iniziarono verso la fine degli anni '60 con un progetto per trovare e utilizzare un patogeno per specie di *Rumex* infestanti negli Stati Uniti (Inman, 1971) e rovo (*Rubus* spp.) in Cile (Oehrens, 1977). Dagli anni 70 in poi ci sono stati numerosi tentativi di successo nei programmi di biocontrollo (Charudattan, 2005; Watson, 1991).

Fra gli interventi meglio riusciti c'è il controllo di *Acacia saligna* (fam. Fabaceae) con l'impiego della ruggine *Uromycladium tepperianum* introdotta in Sud Africa dall'Australia, zona di origine della specie infestante (Morris, 1999). *A. saligna* è considerata la specie invasiva più pericolosa per la regione floristica di Capo Fynbos, un ecosistema unico del Sud Africa. Il fungo introdotto causa lo sviluppo di galle sulle branche e sui rami determinandone la rottura e la caduta, e infine anche la morte della pianta. Il fungo fu introdotto negli anni 1987-1989. Negli otto anni successivi alla sua introduzione il fungo si diffuse in tutta la zona di infestazione, determinando una riduzione della densità della specie stimata fra il 90 e 95%. Anche il numero di semi nel seed bank si è ridotto considerevolmente e il declino della specie è tuttora in corso (Morris, 1997).

Un altro "famoso" esempio di successo è l'uso di *Puccinia chondrillina* per controllare l'infestante *Chondrilla juncea* (fam. Asteraceae) in Australia. Questa infestante, chiamata "lattugaccio comune" è originaria del bacino del Mediterraneo. Ed è proprio dal Mediterraneo (in particolare alcuni isolati sono stati ritrovati dalla zona del Gargano, in Puglia) che alcuni isolati sono stati ottenuti e rilasciati in Australia, consentendo un efficace controllo della infestante. Si calcola che i benefici ottenuti grazie al rilascio di questo agente siano almeno 100 volte superiori ai costi sostenuti per gli studi compiuti e per il rilascio stesso (Cullen, 1985).

Un altro programma di successo ha visto l'impiego di un carbone, *Entylo-ma ageratinae*, dalla Giamaica per il controllo di *Ageratina riparia* (fam. Asteraceae), una infestante introdotta dal Messico nelle foreste e nei pascoli delle Hawaii nel 1974. Due o tre mesi dopo il rilascio nell'ambiente, devastanti epidemie furono osservate nelle popolazioni più dense della infestante. La popolazione di *A. riparia* fu ridotta a meno del 5 % in circa 9 mesi. La stessa situazione si ebbe nei 3-4 anni successivi, quando il fungo venne rilasciato a più riprese in altre zone. Si calcola che con questi interventi circa 50.000 ettari siano stati riabilitati a pascolo grazie all'impiego di questo patogeno, e non è stata mai segnalata alcuna evidenza di fenomeni di resistenza della infestante e tanto meno di presenza di forme mutate del patogeno (Trujillo et al., 1988; Trujillo, 2005). Il fungo è stato anche introdotto in Nuova Zelanda fra il 1998 e il 2001, insieme a *Procecidochares alani* consentendo un controllo pressoché definitivo della infestante (Barton et al., 2007).

I protocolli generali nei programmi di lotta classica differiscono poco a prescindere se il potenziale agente sono patogeni o artropodi.

Una volta individuata la specie infestante target, il punto di partenza è la ricerca dei potenziali agenti di lotta e dalla loro identificazione. Questo

avviene innanzitutto con una approfondita ricerca bibliografica per individuare la zona di origine della infestante e quella di eventuali potenziali agenti conosciuti. La conoscenza del centro evolutivo di origine della infestante è fondamentale e consente di pianificare la ricerca in campo in tali zone, dove i nemici naturali si sono coevoluti con la specie infestante, e quindi è più probabile che siano più specifici e anche relativamente più abbondanti (Evans et al., 2001). Una volta che gli organismi di potenziale interesse sono stati identificati, diverse popolazioni/isolati vengono collezionate e successivamente saggiate. Iniziali test di specificità vengono condotti in modo da scartare potenziali candidati non specifici. Una attenta valutazione della efficacia, e ancor prima, della specificità, deve precedere la eventuale introduzione dell'organismo nell'ambiente. Ad esempio, gli studi condotti su una specie di *Uromyces* per il controllo del *Cytisus scoparium* vennero abbandonati in quanto tale specie era in grado di infettare anche una specie spontanea (*Chamaecytisus palmensis*) botanicamente vicina alla pianta bersaglio nelle prime fasi di screening (Morin et al., 2000). La introduzione dei patogeni finora si è dimostrata impeccabile da un punto di vista della sicurezza, con la mancanza assoluta di segnalazione di agenti rilasciati che hanno provocato effetti inattesi e indesiderati (Barton, 2004).

Superate le prove di specificità, test di patogenicità e virulenza vengono poi condotti, in modo da assicurarsi che gli isolati candidati siano in grado di infettare le popolazioni della infestante bersaglio presente nell'ambiente in cui è stata introdotta. Le condizioni richieste per lo sviluppo e la diffusione dell'agente vengono quindi opportunamente individuate (Berner e Bruckart, 2005). Una accurata valutazione della virulenza diventa poi fondamentale per dimostrare la necessità e la potenziale efficacia ottenibile dalla introduzione dell'agente di biocontrollo.

#### RILASCIO E INSEDIAMENTO NEL NUOVO HABITAT

Nel campo della lotta biologica di tipo classico, si debbono prevedere studi preliminari sulla biologia e l'ecologia della specie vegetale da controllare, sulla biocenosi (animale e vegetale) a essa associata sia nella zona di origine che in quelle d'introduzione, sulle condizioni abiotiche presenti, quali la natura del suolo, il clima e i dati pluviometrici.

A questi background seguiranno una serie di rilevazioni di campo in aree controllate e non, che consentiranno di valutare la stabilizzazione dell'organismo di controllo introdotto e la sua fitness nel nuovo ambiente. Ci sono diversi esempi

che dimostrano che l'introduzione di una specie relativamente poco frequente nella zona di origine, ha mostrato invece un'esplosione demografica nell'area di introduzione. Tra queste, si possono citare a titolo indicativo 3 esempi: il dittero tefritide *Chaorellia australis*, introdotto accidentalmente in California per il controllo di *Centaurea solstitialis*, i coleotteri crisomelidi *Aphthona* spp. e *Diorhabda* spp., rispettivamente per il controllo di *Euphorbia esula* e *Tamarix* spp. (Cline et al., 2008; Lym e Nelson, 2000; De Loach et al., 2000; 2003). Tale comportamento va attribuito non solo alla grandissima quantità di fonte alimentare presente nel nuovo habitat, ma anche alla (selettiva) mancanza di organismi di controllo specifici per l'agente introdotto (ovvero i parassitoidi e i predatori che contengono la specie fitofaga nelle zone di origine (Sheppard et al., 2006).

Va tuttavia messo in luce che alcuni autori hanno riscontrato qualvolta degli effetti negativi indiretti causati da alcuni organismi di controllo biologico, a discapito di specie animali e/o vegetali che sono lontane troficamente dall'associazione presa in considerazione (Carvalho et al., 2008; Louda et al., 2005). Un esempio può essere le specie di uccelli che nidificano su piante (considerate infestanti) del genere *Tamarix*, o il decremento della produzione di miele in California quando viene controllato il cardo *Centaurea solstitialis*.

#### IL METODO INONDATIVO

Consiste nell'applicazione dell'agente fitopatogeno in grandi dosi al fine di ottenere una rapida epidemia, con applicazioni analoghe a quelle impiegate per gli erbicidi chimici. Esso si basa quindi sulla gestione delle specie indesiderate utilizzando i nemici naturalmente presenti nell'ambiente di diffusione della infestante e potenzialmente in grado di causare un elevato grado di malattia. In natura questa potenzialità non si esplica a causa, per esempio, di un basso livello di diffusione del patogeno nell'ambiente o a una ridotta disponibilità d'inoculo nel momento in cui sarebbe necessario intervenire. Il metodo inondativo si propone, quindi, di aumentare la disponibilità di inoculo, accrescendolo in idonee condizioni di laboratorio o industriali e, successivamente, di applicarlo in dosi elevate sulla intera popolazione infestante, come un erbicida tradizionale. Il metodo inondativo è più adatto negli agrosistemi intensivi sia per le modalità di azione e di somministrazione, e sia per l'efficacia dei trattamenti. A causa delle analogie con gli erbicidi chimici, e poiché inizialmente furono utilizzati solo microrganismi fungini, venne coniato il termine di micoerbicidi. Poiché attualmente si utilizzano anche altri microrganismi fitopatogeni o i loro prodotti, si utilizza più ampiamente il termine "bioerbicidi". La maggior parte dei funghi fitopatogeni impiegati sono

patogeni indigeni, benché molti studi abbiano riguardato la possibile introduzione in quantità massicce di patogeni esotici. Questi sono spesso applicati come bioerbicidi di post-emergenza delle infestanti, e possono essere applicati anche più di una volta durante la stagione, comunque prima che la infestante bersaglio abbia raggiunto un livello indesiderato di dannosità. Sono in genere necessarie applicazioni annuali poiché di solito la sopravvivenza del patogeno è limitata nel tempo (non sopravvive fra le stagioni) e quindi non è in grado di produrre l'elevato livello di infezione necessario per causare l'epidemia (Charudattan, 1988; TeBeest et al., 1992). Al contrario dei patogeni obbligati, i funghi patogeni facoltativi, comprendendo emibiotrofi e necrotrofi, possono essere facilmente accresciuti su substrati artificiali, e quindi si prestano a essere prodotti in grandi quantità e a essere utilizzati in dosi massicce. I patogeni necrotrofi, che infettano le piante prima uccidendo le cellule e poi colonizzando i tessuti morti sono stati preferiti nei programmi di lotta inondativa, ma raramente utilizzati in quelli di lotta classica. (Morris et al., 1999; Gourlay et al., 2000). Si stima che oltre 200 patogeni vegetali siano stati valutati per il loro potenziale come bioerbicidi, includendo funghi e batteri responsabili di malattie fogliari, soil-borne funghi e batteri fitopatogeni, e rizobatteri deleteri (Roskopf et al., 1999; Charudattan, 2001; Boyetchko et al., 2002).

Le principali caratteristiche che vengono solitamente considerate, e da cui può dipendere il successo di un potenziale bioerbicida sono: efficacia (virulenza verso la specie bersaglio), potenziale per la commercializzazione (efficacia in condizioni di campo), specificità e spettro d'ospite, velocità di azione, facilità di accrescimento *in vitro*, compatibilità con altri pesticidi, applicabilità con i comuni sistemi per la somministrazione dei fitofarmaci.

L'abilità di un patogeno a causare danno verso la infestante bersaglio è influenzata da numerosi fattori, fra cui la concentrazione dell'inoculo, la dose di applicazione, le condizioni ambientali (temperatura e umidità relativa in particolare), le modalità di formulazione, i parametri di distribuzione (ad es., nel caso di applicazione aerea: dimensione delle gocce, deposizione e distribuzione), età o stadio di sviluppo della pianta bersaglio, presenza di specie non target (ostacolo), micro e macro organismi presenti nella fillosfera o rizosfera, eventuale presenza di pesticidi applicati alle colture.

#### OSTACOLI E MIGLIORAMENTO

Nonostante gli studi realizzati, il numero di bioerbicidi che hanno raggiunto il mercato risulta ancora piuttosto basso (tab. 1), e questo è dovuto a una serie

PRODOTTO	ANNO	Patogeno	INFESTANTI BERSAGLIO	COLTURA/AMBIENTE	NAZIONE	STATUS
Biochon	1997	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Infestanti arboree, ad es. <i>Prunus serotina</i>	Foreste	Olanda	Disponibile fino al 2000
BioMal	1992	<i>Colletotrichum gloeosporioides f. sp. malvae</i>	<i>Malva pusilla</i>	Frumento, lenticchia, lino	Canada	Non disponibile commercialmente. In fase di rivalutazione per il mercato.
Camperico	1997	<i>Xanthomonas campestris pv. poae</i>	<i>Poa annua</i>	Campi da golf	Giappone	Commercialmente disponibile
CASST	1983	<i>Alternaria cassiae</i>	<i>Cassia</i> spp.	Soia, arachidi	USA	Non più disponibile per mancanza di interesse commerciale
Chontrol = Ecoclear	2004	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Latifoglie	Foreste	Canada	Commercialmente disponibile
Collego	1982	<i>Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeshynomene</i>	<i>Aeshynomene virginica</i>	Riso, soia	USA	Non più prodotto dal 2003, ora in fase di ri-registrazione con il nome di Lock Down
DeVine	1981	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morrenia odorata</i>	Agrumeti	USA	Commercialmente disponibile
Dr BioSedge	1987	<i>Puccinia canaliculata</i>	<i>Cyperus esulentus</i>	Soia, canna da zucchero, mais, patata, cotone	USA	Registrato, ma il prodotto aveva un sistema di produzione non economicamente conveniente
Hakatak	1999	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Hakea gummosis, H. sericea</i>	Ambienti naturali	Sud Africa	Mai registrato, ma può essere prodotto su richiesta
Lubao	1963	<i>Colletotrichum gloeosporioides f. sp. cuscatae</i>	<i>Cuscata</i> spp.	Soia	Cina	Probabilmente ancora disponibile
Mycro-Tech	2004	<i>Chondrostereum purpureum</i>	Latifoglie	Foreste	Canada	Commercialmente disponibile
SARRITOR	2008	<i>Sclerotinia minor</i>	<i>Taraxacum officinale</i> e altre dicotiledoni	Prati, pascoli	Canada	In fase di valutazione commerciale
Smolder	2005	<i>Alternaria destruens</i>	<i>Cuscuta</i> spp.	Vivai, piante ornamentali	USA	Registrato. Quasi sul mercato
SolviNix	2008	Tobacco mild green mosaic virus - TMGMV	<i>Solanum viarum</i>	Pascoli	USA	In fase di valutazione commerciale
Stumpout	1997	<i>Cylindrobasidium leave</i>	<i>Acacia</i> spp.	Ambienti naturali	Sud Africa	Disponibile
Woad Warrior	2002	<i>Puccinia thlaspeos</i>	<i>Isatis tinctoria</i>	Fattorie, pascoli, aree abbandonate, margini stradali	USA	Registrato

Tab. 1 Elenco degli erbicidi microbici sviluppati e "status" commerciale

di ostacoli che ne limitano lo sviluppo e la commercializzazione. Tali ostacoli includono problemi di tipo tecnologico (quali le difficoltà di produrre grandi quantità di inoculo attraverso i processi fermentativi, o le formulazioni che assicurino una elevata stabilità e una prolungata “vita di scaffale”); limitazioni commerciali, quali la dimensione solitamente ridotta del mercato, gli alti costi di produzione e di registrazione, o norme restrittive che limitano l’impiego di organismi viventi; limitazione biologiche, come le difficoltà dovute alla gestione di organismi viventi, che possono perdere la virulenza o interagire con altri organismi quando applicati; fattori ambientali, come gli effetti negativi dovuti alle sfavorevoli condizioni climatiche, fenomeni di dilavamento, o la inattivazione dell’inoculo a causa delle radiazioni luminose o per le temperature troppo elevate.

Per questi motivi, molti studi hanno riguardato la possibilità di migliorare l’efficacia dei microrganismi, considerando, ad esempio, la possibilità di individuare nuovi microrganismi o bersagli più adatti; il miglioramento delle modalità di produzione, formulazione e distribuzione degli agenti di biocontrollo; l’aumento della efficacia mediante selezione di migliori caratteristiche o strategie genetiche; l’applicazione combinata di organismi con altri microrganismi, metaboliti, batteri, insetti, erbicidi. Alcuni di questi approcci verranno descritti in seguito. Alcuni prodotti sono stati immessi sul mercato più o meno recentemente, e con alterne fortune. Fra questi, si ricorda:

*Collego*. Formulato commerciale a base di *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschyromene* usato negli Stati Uniti nel 1982 per la lotta alla leguminosa infestante *Aeschynomene virginica*, nelle colture di riso e soia. È un formulato a base di conidi disidratati applicate in una sospensione liquida, in grado di infettare foglie, piccioli e fusti, oltre che semi e plantule. Dopo l’applicazione, le lesioni sono visibili dopo 7-10 giorni dopo l’applicazione, e la malattia consente un controllo del 90-100%. Il prodotto è stato immesso e ritirato dal commercio più volte. Recentemente è stata avviata una procedura per una nuova registrazione con il nome di LockDown che dovrebbe concludersi quest’anno.

*De Vine*. A base di *Phytophthora palmivora*, un fungo patogeno di *Morrenia odorata*, una infestante degli agrumeti. È venduto come sospensione liquida contenente circa  $6 \times 10^5$  clamidospore/ml, da applicare sulla superficie del terreno. Provoca la necrosi dei fusti e la morte delle piante in 1-6 settimane, a seconda della età delle stesse.

*Mycotech*. Il prodotto è stato messo a punto per proteggere le foreste di conifere in Canada, in particolare di pino strobo, dalla competizione con le latifoglie infestanti arboree. Nelle foreste sottoposte a tagli programmati, i

pini vengono seminati per favorire la naturale rigenerazione, ma subiscono la competizione di altre specie ad accrescimento più rapido. Questo prodotto, registrato nel 2002, è a base di *Chondrostereum purpureum*, un microrganismo fungino largamente presente nelle foreste di latifoglie delle zone temperate. Il micelio fungino di isolati non modificati viene incorporato in un gel biodegradabile che protegge e nutre il fungo. Viene applicato sulle superfici di taglio delle infestanti appena eseguito, in modo da innescare il processo naturale di marciume del legno, che impedisce la ricrescita della pianta infestante o la formazione di polloni radicali o succhioni. In questo modo viene favorita la crescita dei giovani pini, che non sono colpiti da questo patogeno. La efficacia di controllo di infestanti arboree e arbustive decidue è fra il 70 e il 100%, a seconda della specie trattata. Estese sperimentazioni condotte in oltre dieci anni hanno dimostrato non solo l'efficacia del prodotto, ma anche la totale assenza di rischi per l'Uomo e per l'ambiente, quando usato secondo le indicazioni di etichetta.

*Stump Out*. Sviluppato in Sud Africa, è un preparato a base del fungo basidiomicete *Cylindrobasidium laeve* per la lotta contro alcune specie di *Acacia* introdotte dall'Australia. Le basidiospore del fungo, confezionate in sacchetti, prima dell'applicazione vengono diluite in olio di girasole e 1-2 ml della emulsione vengono applicati con un pennello sulla superficie di taglio fresca delle infestanti. Il fungo, entro 6-12 mesi dal trattamento, colonizza il ceppo e impedisce lo sviluppo di ricacci determinando quindi la morte della pianta, con una efficacia quasi totale.

#### NUOVI AGENTI

Molti degli studi sono stati concentrati sull'impiego di funghi. Tuttavia recentemente altri agenti molto promettenti e finora sottostimati sono stati considerati, come batteri e virus, o anche patogeni con un più ampio spettro d'ospite.

Fra questi il SolviNix, a base di Tobacco Mild Green Mosaic Virus (TMGMV) proposto per il controllo di *Solanum viarum*, una infestante molto nociva negli Stati Uniti Sud-Orientali, appare particolarmente promettente. Il virus ha un impatto drammatico, causando la rapida morte delle piante trattate, e ha un elevato livello di specificità che garantisce contro i rischi per le persone o gli animali. Viene prodotto inoculando piantagioni di tabacco, che funge da portatore sano, da cui vengono recuperati i succhi cellulari, contenenti le particelle virali, che poi possono

essere utilizzati per i trattamenti contro la infestante bersaglio (Charudattan e Hiebert, 2007).

Uno dei fattori che possono limitare l'impiego dei bioerbicidi è l'eccessiva specificità, che se da un lato può essere una garanzia nella sicurezza dell'impiego, dall'altro ne riduce le possibilità applicative solo alla situazione, peraltro infrequente, di una infestazione ridotta a una singola specie bersaglio. A questo riguardo un interessante agente oggetto di studio è *Sclerotinia minor*, il principio attivo del SARRITOR, un bioerbicida in corso di registrazione in Canada per il controllo di *Taraxacum officinale* e di altre dicotiledoni infestanti in prati e pascoli. Il prodotto viene applicato sul terreno sotto forma di granuli, e la malattia si sviluppa rapidamente portando a morte le piante colpite nel giro di soli 7 giorni, due volte più velocemente rispetto agli erbicidi chimici commerciali. Il prodotto è anche compatibile con le normali operazioni di mantenimento del prato, come fertilizzazione, irrigazione e sfalcio (Watson, 2007).

CAMPERICO è invece il primo bioerbicida batterico in commercio. È a base di *Xanthomonas campestris* pv. *poae* ed è commercializzato in Giappone per il controllo di *Poa annua*, infestante dei campi da golf. La caratteristica principale di questo prodotto è che la estrema specificità, quasi sempre fattore limitante per i bioerbicidi, in questo caso viene sfruttata utilmente. Il batterio infatti è in grado di colpire la infestante bersaglio, una graminacea annuale, mentre non è patogeno per *P. pratensis* e *Lolium perenne*, altre graminacee usualmente impiegate per la realizzazione dei manti erbosi dei campi da golf (Imaizumi et al., 1999).

#### MIGLIORAMENTO DEI PROCESSI PRODUTTIVI

La produzione di inoculo microbico con metodi economici gioca un ruolo fondamentale nel determinare il costo finale di un prodotto sul mercato, e ne quindi influenza il successo commerciale. Substrati colturali per la produzione di propaguli fungini dovrebbero essere selezionati usando appropriate tecnologie di fermentazione, seguiti dalla valutazione delle migliori condizioni per la crescita, selezione delle migliori tecnologie per separare i propaguli dal prodotto di fermentazione, e valutazione della "vita di scaffale" del prodotto formulato. L'uso di biomasse ottenute da residui di processi agroindustriali o da pratiche agricole potrebbero ridurre i costi di produzione. Molasse, pani esausti della lavorazione delle olive, residue dalle birrerie, o scarti delle lavorazioni industriali di frutta e verdura sono solo alcuni esempi di prodotti che ancora contengono nutrienti

che potrebbero essere usati favorevolmente per accrescere microbi. Spesso lo smaltimento di tali scarti presenta problemi economici e ambientali, e quindi essi rappresenterebbero substrati ideali e a basso costo per la produzione di molti agenti microbici di lotta biologica (Vurro e Casella, 2008).

#### APPLICAZIONE E RILASCIO

Uno dei principali problemi nell'impiego di agenti microbici è quello di trovare metodi di applicazione adatti, che consentano una distribuzione uniforme dell'agente al sito desiderato, evitando sprechi o consumi eccessivi che aumenterebbero i costi di trattamento e i rischi di effetti indesiderati.

L'applicazione di elevati volumi di bioerbicidi è di solito proposta per assicurare la completa copertura delle aree infettabili (bersagli) e per fornire una umidità sufficiente per consentire la germinazione dei conidi (Klein, 1992). Tuttavia l'impiego di elevati volumi può deprimere l'uso dei bioerbicidi, perché influisce negativamente sui costi, sulle modalità e sui tempi di trasporto e applicazione dei prodotti. È stato osservato che il numero di lesioni prodotte o la densità di infezione non è influenzata dal solo volume di applicazione, ma piuttosto dalla dimensione delle gocce della sospensione applicata, nonché dalla persistenza delle gocce, dalla loro uniformità di distribuzione e dalla concentrazione dell'inoculo per ciascuna goccia. (Lawrie et al., 1997). E quindi l'efficacia del prodotto può essere fortemente influenzata dal dispositivo di distribuzione.

L'impiego di sistemi o tecnologie usualmente disponibili in agricoltura potrebbero influenzare l'accettabilità degli agenti da parte degli agricoltori, e allargarne il mercato. Per esempio, la "microbigation" cioè l'uso dei sistemi di irrigazione di precisione per l'applicazione di sospensioni conidiche al terreno è stato recentemente proposto (Boari et al., 2007). Tali sistemi sono già ampiamente utilizzati per la somministrazione di sostanze nutritive e curative oltre che acqua, direttamente in prossimità dell'apparato radicale delle colture. Un vantaggio dell'impiego dei sistemi di microirrigazione per distribuire bioerbicidi al terreno è la possibilità di proteggerli da fattori ambientali avversi, quali radiazioni UV o vento, oltre che dalle elevate temperature. Un ulteriore vantaggio è la distribuzione precisa in prossimità dell'apparato radicale e non nell'intero campo, determinando quindi una riduzione dei volumi dei trattamenti.

Altri sistemi disponibili per l'agricoltura di precisione, come ad esempio dispositivi che riescono a riconoscere la presenza della infestante sul suolo

nudo possono essere impiegati molto vantaggiosamente, trattando solo le piante bersaglio, e di conseguenza minimizzando i consumi e quindi i costi del trattamento.

L'applicazione di agenti microbici come "agenti concianti" dei semi o al momento del trapianto potrebbe certamente ridurre i costi di applicazione e distribuzione. In questo caso però gli agenti dovrebbero essere "rhizosphere competent", cioè essere in grado di crescere lungo le radici della coltura e rimanere vitale durante tutte le fasi di vita della pianta coltivata. Benché questa proprietà sia limitata solo a un numero limitato di patogeni, questa applicazione potrebbe essere molto utile nel caso di quelle specie, come le piante parassite (ad esempio specie di *Orobanche*), che dipendono completamente dalla pianta per l'intero ciclo vitale, vivendo costantemente a contatto dell'apparato radicale dell'ospite.

Un'altra interessante modalità applicativa è rappresentata dall'uso del TMGMV per il controllo di *S. viarum* (Charudattan et al., 2004). Poiché il virus viene distribuito su ampie superfici adibite a pascolo, è stato messo a punto un sistema di distribuzione a bassa pressione combinato con la abrasione delle piante, ottenuto con una specie di "maglia metallica" trainata dal mezzo semovente che esegue l'applicazione del virus immediatamente dopo, o in alternativa con un sistema ad alta pressione, che in pratica ha l'effetto di "iniettare" il virus nei tessuti vegetali.

Altri mezzi di distribuzione dei bioerbicidi sono le formulazioni solide, utilizzate nei trattamenti pre-emergenza, cioè per quei prodotti che colpiscono le infestanti al livello o al di sotto della superficie del terreno (Boyette et al., 1996). Fra i vari substrati impiegati per queste formulazioni si ricorda il "Pesta", a base di farina di frumento, studiato per esempio per l'applicazione di *Colletotrichum truncatum*, *Alternaria crassa* e *Fusarium lateritium* (Connick et al., 1991) o farina di mais mista a sabbia per *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, un bioerbicida proposto per il controllo di *Cucurbita texana* (Boyette et al., 1984). Le formulazioni solide permettono di prolungare la shelf-life e agiscono come "tampone" proteggendo il microrganismo quando in campo si verificano condizioni climatiche avverse (Boyetchko, 1999).

#### INTEGRAZIONE DEGLI AGENTI DI BIOCONTROLLO CON ALTRI AGENTI, ERBICIDI O ALTRI COMPOSTI CHIMICI

Un importante fattore che può ridurre l'efficacia di un potenziale bioerbicida è l'abilità della infestante di resistere alla invasione e colonizzazione dell'agente di

biocontrollo. Numerosi tentativi sono stati fatti per combinare i bioerbicidi con composti chimici, come fungicidi ed erbicidi, o con sostanze naturali, come tossine ed enzimi, nel tentativo di aumentarne l'efficacia. Queste combinazioni possono ad esempio sopprimere o indebolire i meccanismi di difesa delle piante bersaglio, ad esempio bloccando la produzione di metaboliti secondari di difesa della pianta, o abbattendo le barriere fisiche all'attacco del patogeno, con il risultato di aumentare l'efficacia del biocontrollo (Duke et al., 2007, e riferimenti ivi contenuti).

Ad esempio, la strategia di impiegare dosi subletali di erbicida è stata utilizzata per aumentare l'efficacia di alcuni agenti patogeni, come nel caso del trattamento con glifosate a basse dosi che determina la inibizione della produzione di fitoalessine, rendendo la leguminosa infestante *Senna obtusifolia* più suscettibile alla infezione causata da *Alternaria cassiae* (Sharon et al., 1992). Altri studi riportano una migliore efficacia di *Pyricularia setariae* nel controllare il falso panico (*Setaria viridis*) una graminacea infestante, se applicato con dosi ridotte del graminicida setoxydim (Peng e Byer, 2005), o di *Ascochyta caulina* nel controllare *Chenopodium album* se i conidi del fungo vengono applicati insieme a dosi ridotte dell'erbicida metribuzin (Vurro et al., 2001).

Anche per i programmi di lotta biologica utilizzando insetti fitofagi, in particolare quando la pianta infestante presenta una distribuzione che richiede strategie integrate di gestione, lo *screening* dell'insetto agente di controllo prevede anche studi sugli effetti di erbicidi (a basso dosaggio) sul suo ciclo vitale e sul suo potenziale di distribuzione. Non mancano casi in cui tali studi mostrano addirittura un incremento della *fitness* dell'insetto quando si alimenta su pianta trattate a basse dosi di erbicida (Collier et al., 2007; Nelson e Lym, 2003).

Interessanti risultati sono stati anche ottenuti applicando gli agenti di biocontrollo insieme a composti in grado di ridurre le difese delle piante, come ad esempio chelatori del calcio, che riducono la formazione di callosio (Gressel et al., 2002) o con l'acido  $\delta$ -aminolevulinico, un precursore dei tetrapirroli, composti coinvolti nei processi di decolorazione e morte dei tessuti vegetali (Hirase et al., 2006).

Per aumentare ulteriormente l'efficacia erbicida degli agenti, è stata anche proposta una applicazione "multipla", consistente nella applicazione inondativa di più patogeni, per il controllo contemporaneo di alcune infestanti. Questo tipo di intervento può permettere sia di ampliare lo spettro d'ospite della miscela bioerbicida, ma anche la preparazione di una miscela "ad hoc" preparata in base alle infestanti da controllare. Ad esempio Chandramohan et al. (2003) hanno miscelato tre patogeni specifici: *Alternaria cassiae* (specifico per *Cassia obtusifolia*), *Phomopsis amaranthicola* (specifico per *Amaranthus*

spp.), e *Colletotrichum dematium* f. sp. *crotalariae* (specifico per *Crotalaria spectabilis*) riuscendo a controllare contemporaneamente le tre infestanti. L'eccellente controllo di sette graminacee infestanti è stato anche raggiunto con l'impiego contemporaneo di tre diversi patogeni specifici (*Drechslera gigantea*, *Exserohilum rostratum* e *E. longirostratus*) (Chandramohan et al., 2002).

#### MIGLIORAMENTO GENETICO

Numerose tecniche consentono di ottenere modifiche genetiche in funghi fitopatogeni. Tali strategie, per quanto non immediatamente perseguibili per fini pratici, consentono di acquisire importanti informazioni sulle interazioni pianta-patogeno, sulla comprensione dei meccanismi di virulenza e di difesa, e permettono di ipotizzare nuove strategie per aumentare l'efficacia degli agenti di biocontrollo. Ad esempio, alcuni geni cosiddetti "soft", come quelli codificanti carboidrati, auxine, pectinasi, espansine, cellulasi o ossalati, o geni "hard" cioè codificanti tossine come NEP1 e cerato-platanina sono stati recentemente inseriti nel genoma di alcuni potenziali micobicidi, quali *Fusarium* spp. e *Colletotrichum coccodes*, con interessanti risultati in termini di aumento di efficacia e anche ampliamento dello spettro d'ospite (Gressel et al., 2007). Mutazioni genetiche o la selezione di mutanti naturali consentirebbero anche di ottenere bioerbicidi con altre caratteristiche migliorate, come ad esempio la resistenza a pesticidi chimici, alla disidratazione, alle temperature estreme, o anche maggiori produttori di sostanze naturali.

#### RILASCIO CONGIUNTO DI FUNGHI E INSETTI

In alcuni casi il danno provocato dai singoli agenti di biocontrollo può non essere tale da garantire un sufficiente livello di riduzione della popolazione infestante. Già nel passato, l'associazione artropode-patogeno ha dimostrato di avere spesso delle valenze di sinergia e, in alcuni casi di simbiosi. A questo proposito si può citare l'associazione tra un coleottero curculionide e la ruggine *Puccinia punctiformis* su *Cirsium arvense* (Kluth et al., 2001): in questo caso, sembra che ci sia una preferenza della femmina del curculionide per piante infette, mentre la ruggine si può avvalere del coleottero come "vettore" per propagare l'infezione su altre piante.

Inoltre, larve di *Phytomyza orobanchia*, un dittero agromizide, sono state impiegate per rilasci inondativi (da 500 a 1000 per ettaro). Questi insetti, pur essendo in grado di nutrirsi intensamente di fusti e semi di Orobanche, e

pur determinando una riduzione della produzione di semi fino al 96 %, non sono sufficienti per un efficace controllo di *Orobanchae*, a causa dell'enorme numero di semi altamente longevi che tale specie produce (Klein e Kroschel, 2002). Tuttavia, il rilascio di insetti potrebbe essere molto più efficace se fossero impiegati non solo come agenti di biocontrollo, ma anche come mezzi di distribuzione di altri agenti di biocontrollo come i funghi fitopatogeni. Essi potrebbero trasportare conidi, spore o cellule di patogeni specifici, e questa capacità acquisterebbe maggiore importanza, piuttosto che la loro efficacia come agenti di controllo. Da questo punto di vista molti insetti, in passato scartati dai programmi perché non buoni “mangiatori” di infestanti, potrebbero essere reconsiderati come buoni “trasportatori” di agenti di controllo. Tale impiego è stato scarsamente considerato. Ad esempio, alcuni tentativi sono stati compiuti per utilizzare *Phytomyza vitalbae* per trasportare il fungo patogeno *Phoma clematidina* per il controllo di *Clematis vitalba* in Nuova Zelanda (Hill et al., 2003).

Esempi sinergici sono stati dimostrati per l'associazione *Aphthona-Rhizoctonia* su *Euphorbia esula* (Caesar et al., 1993); Kremer e Spencer (1989 a/b) hanno evidenziato come l'emittero *Niesthrea louisianica* potesse permettere una maggiore insorgenza di infezione di *Fusarium* spp. su *Abutilon theophrasti*.

In altri casi gli insetti possono, causando ferite o danni sulle piante, favorire la penetrazione dei patogeni e quindi aumentare la severità della malattia. Per esempio il curculionide *Ceutorhynchius troglodytes* crea lesioni che consentono al fungo patogeno *Phomopsis subordinaria* di penetrare nei tessuti di *Plantago lanceolata* (De Nooij, 1988).

Altri tentativi hanno considerato la possibilità di diffondere specie di *Fusarium* tramite il rilascio di insetti. Ad esempio, insetti che si cibano dei coni e dei semi di pini sono stati considerati come possibili agenti di diffusione del devastante cancro del pino causato da *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*, per la lotta biologica nei paesi dell'emisfero meridionale, dove le conifere infestanti sono fra i principali problemi ambientali ed ecologici (Hoover et al., 1996).

Infine, va evidenziato che il binomio insetto-fungo potrebbe esprimere la sua potenzialità se integrato in un processo semi-industriale: ovvero, se sia il fungo che l'insetto fossero moltiplicati in modo massale in specifiche strutture (biofabbriche) o/e che fossero messe a punto trappole “catch-and-release”, utilizzando feromoni sessuali e/o di aggregazione e camere di contaminazione in cui l'insetto viene catturato e successivamente “sporcato” dalle spore del fungo prima di essere liberato di nuovo nell'ambiente (Cosse et al., 2006; Vega et al., 2008).

## RISCHI

Benché in genere ben disposta verso le pratiche di agricoltura biologica e richieda metodi sicuri e sani per la produzione di alimenti, l'opinione pubblica appare invece preoccupata dei rischi e delle conseguenze del rilascio nell'ambiente di organismi, sia per l'ambiente in generale, e sia per gli organismi non-bersaglio, l'Uomo in primo luogo.

Per l'analisi e la valutazione di tali rischi potrebbe rivelarsi utile l'impiego di strumenti genetici, come ad esempio marcatori genetici specifici che consentirebbero di riconoscere e di "tracciare" gli isolati microbici dopo il loro rilascio, e quindi permettere senza dubbi di determinare il loro "destino" nell'ambiente, la stabilità, la persistenza, o i rischi di dispersione.

La competizione per lo spazio e i nutrienti è una strategia molto comune nei microrganismi per avvantaggiarsi rispetto ad altri organismi. Il rischio di una "sostituzione competitiva" nel caso di agenti per la lotta biologica alle infestanti potrebbe essere considerata come la possibilità che un agente introdotto potrebbe escludere un organismo nativo dal suo ambiente, quindi modificando negativamente l'ecosistema. Per esempio, nella lotta alle infestanti, nel caso di applicazione al suolo potrebbe esserci il rischio, anche se molto basso, di un effetto negativo sulla composizione microbica della rizosfera della coltura.

Alcune spore o conidi fungini possono causare allergie in soggetti sensibili, come anche reazioni in animali domestici o selvatici. Potenzialmente, un agente di lotta alle infestanti potrebbe possedere questa peculiarità, che deve essere opportunamente valutata.

Spesso gli organismi fitopatogeni producono metaboliti bioattivi, tossine, antibiotici, e questi composti potrebbero essere prodotti e dispersi da agenti di biocontrollo quando applicati e rilasciati nell'ambiente. In questo caso sarebbe importante valutare il rischio reale di produzione di tali metaboliti, ad esempio valutando la esatta produzione di tossine quando i funghi sono formulati, o quando sono applicati e crescono sulle piante bersaglio. Questo perché molti microrganismi producono elevate quantità di metaboliti secondari solo quando accresciuti per alcune settimane su idonei substrati di crescita, dove hanno a disposizione elevate quantità di sostanze nutritive e possono produrre cospicue quantità di biomassa, come avviene ad esempio per le micotossine prodotte durante la conservazione di cereali, o nel caso di contaminazione di alimenti. Ma l'accumulo di metaboliti può essere sensibilmente diverso nel caso di un fungo formulato come conidi disidratati, o clamidospore, come sono di solito i micoerbicidi. In condizione di campo le

sostanze nutritive non sono così abbondanti, e di solito il micoerbicida causa un elevato grado di malattia entro pochi giorni, e quindi scompare insieme alla pianta bersaglio. Così, la potenzialità di produrre elevate quantità di tossine sembra essere piuttosto limitato. Ad esempio *Myrothecium verrucaria*, un fungo patogeno proposto come agente per il biocontrollo di *Pueraria montana* var. *lobata*, quando accresciuto sia su substrati liquidi che solidi produce un gran numero di tricoteceni macrociclici, delle pericolose micotossine come epiroridin E, verrucarina A e J, a concentrazioni nell'ordine di milligrammi per grammo di coltura. Tuttavia nessuno di questi metaboliti è stato individuato per analisi HPLC nei tessuti della pianta ospite infettati artificialmente con i conidi di questo fungo (Abbas et al., 2001).

Un altro rischio non insignificante e percepito dalla opinione pubblica è la possibilità che gli agenti di biocontrollo possano colpire piante coltivate o native. Questo problema è uno delle questioni più importanti e controverse del rilascio di agenti di controllo. Comunque, molti patogeni impiegati come bioerbicidi sono specifici o hanno un numero molto limitato di ospiti, mentre la questione per il metodo classico non si pone, perché vengono rilasciati solo organismi altamente specializzati. Per i patogeni meno specifici il problema può essere risolto utilizzando opportune procedure di applicazione, o mediante il rilascio in ambienti privi di rischio, come indicato nel già citato esempio del Sarritor.

Un altro aspetto che necessita di essere valutato è il rischio genetico, inteso come la possibilità di mutazioni genetiche che potrebbero avere effetti sullo spettro d'ospite, o di ricombinazioni sessuali o asessuali con altre specie o con specie patogene correlate.

Comunque, le tecnologie e gli strumenti scientifici oggi a disposizione sono così accurati e precisi che permettono di dare una esatta valutazione di questi rischi. Questo può avere delle conseguenze positive sull'accettazione degli organismi per la lotta biologica alle infestanti, sia a livello di opinione pubblica e sia di legislazione.

#### RIASSUNTO

La lotta biologica alle specie vegetali infestanti è una applicazione "non convenzionale" in particolare della patologia vegetale e della entomologia, grazie alla quale un organismo dannoso è utilizzato per mitigare l'effetto negativo di specie vegetali bersaglio senza danneggiare le specie vegetali non-bersaglio, come quelle coltivate o indigene. La lotta biologica contro le infestanti viene realizzata con due modalità fondamentali: il metodo "classico" e quello "inondativo". I principali agenti di biocontrollo, le modalità per l'applicazione

cazione e il rilascio, nonché i vantaggi e gli svantaggi rispetto alle strategie convenzionali di gestione vengono descritti in questo articolo. Vengono anche illustrati alcuni dei più importanti successi ottenuti nel campo della lotta biologica, i principali requisiti necessari per rendere un potenziale agente adatto all'impiego, i maggiori fattori che limitano l'utilizzo di agenti di biocontrollo, alcune strategie possibili per migliorarne l'efficacia, e i potenziali rischi derivanti dal loro rilascio nell'ambiente.

ABSTRACT

Biological control of weeds is a “non-conventional” application mainly of plant pathology and entomology, thanks to which a damaging organism is applied to reduce the negative effects of the target plants, avoiding any damage to the non-target plants, such as crop or endemic species. Weed biological control is realized with two main strategies: the “classic” and the “inundative” method. The main biocontrol agents, the strategies of release and application, as well as the advantages and disadvantages of these strategies in comparison with other conventional control methods are described in the article. Some of the main successes in the field of weed biocontrol are also described, together with the main characteristics that make a potential agent suitable for the release, the limiting factors for their application, some strategies to enhance their efficacy, and the possible risks resulting from their release into the environment.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ABBAS H.K, TAK H., BOYETTE C.D., SHIER W.T., JARVIS B.B. (2001): *Macrocytic trichothecenes are undetectable in kudzu (Pueraria montana) plants treated with a high-producing isolate of Myrothecium verrucaria*, «Phytochemistry», 58, pp. 269-276.
- ANTONINI G., AUDISIO P., CRISTOFARO M., COLETTI G., DE BIASE A., DOLGOVSKAYA R., KOROTYAEV B., REZNIK S., RECTOR B., TRONCI C, VOLKOVITSH M. (2005): *Psylliodes sp. nr. chalcomerus and Ceratopion basicorne: synergism of morphological observations, life history, host range and genetic analyses for the selection as candidates for the biological control of Centaurea solstitialis L.*, Proceedings 8th International Conference on Ecology and Management of Alien Plant Invasions, Katowice, Poland, p. 44.
- BARTON J. (2004): *How good are we at predicting the field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds?*, «Biological Control», 31, pp. 99-122.
- BARTON J., FOWLER S.V., GIANOTTI A. F., WINKS C.J., DE BEURS M., ARNOLD G.C., FORRESTER G. (2007): *Successful biological control of mist flower (Ageratina riparia) in New Zealand: Agent establishment, impact and benefits to the native flora*, «Biological Control», 40, pp. 370-385.
- BERNER D.K., BRUCKART W.L. (2005): *A decision tree for evaluation of exotic plant pathogens for classical biological control of introduced invasive weeds*, «Biological Control», 34, pp. 222-232.
- BOARI A., ZUCCARI D., VURRO M. (2008): *“Microbigation.”: delivery of biological control agents through drip irrigation systems*, «Irrigation Science», 26, pp 101-107.
- BOYETCHKO S. M. (1999): *Innovative applications of microbial agents for biological weed*

- control, in *Biotechnological Approaches in Biocontrol of Plant Pathogens*, a cura di K.G. Mukerji, Plenum Publishers, New York, pp. 73-97.
- BOYETCHKO S.M., ROSSKOPF E.N., CAESAR A.J., CHARUDATTAN R. (2002): *Biological weed control with pathogens: Search for candidates to applications*, in *Applied Mycology and Biotechnology*, a cura di G.G. Khachatourians e D.K. Arora, Elsevier Science, The Netherlands, II, pp. 239-274.
- BOYETTE C.D., QUIMBY P.C. JR., CAESAR A.J., BIRDSALL J.L., CONNICK W.J. JR., DAIGLE D.J., JACKSON M.A., EGGLEY G.H., ABBAS H.K. (1996): *Adjuvants, formulations, and spraying systems for improvement of mycoherbicides*, «Weed Technology», 10, pp. 637-644.
- BOYETTE C.D., TEMPLETON G.E., OLIVER L.R. (1984): *Texas gourd (Cucurbita texana) control with Fusarium lateritium f. sp. cucurbitae*, «Weed Science», 32, pp. 649-655.
- CAESAR A.J., CAMPOBASSO G., TERRAGITTI G. (1998): *Identification, pathogenicity and comparative virulence of Fusarium spp. associated with diseased Euphorbia spp. in Europe*, «Biocontrol Science and Technology», 8, pp. 313-319.
- CAESAR A.J., REES N.E., SPENCER N.R., QUIMBY P.C. JR. (1993): *Characterization of Rhizoctonia spp. causing disease of leafy spurge in the northern plains*, «Plant Disease», 77, pp. 681-684.
- CAMPOBASSO G., SOBHIAN R., KNUTSON L., TERRAGITTI G. (1998): *Host specificity of Bangasternus orientalis Capiomont (Coleoptera: Curculionidae) introduced into the United States for biological control of yellow starthistle (Centaurea solstitialis L., Asteraceae, Carduaceae)*, «Environmental Entomology», 27, pp. 1525-1530.
- CARVALHEIRO L.G., BUCKLEY Y.M., VENTIM R., MEMMOTT, J. (2008): *Assessing indirect impacts of biocontrol agents on native biodiversity: a community level approach*, Proceedings XII ISBCW, a cura di M.H. Julien, R. Sforza, M.C. Bon, H.C. Evans, P.E. Hatcher, H.L. Hinz, B.G. Rector, CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 91-94.
- CHANDRAMOHAN S., CHARUDATTAN R. (2003): *A multiple-pathogen system for bioherbicide control of several weeds*, «Biocontrol Science and Technology», 13, pp. 199-205.
- CHANDRAMOHAN S., CHARUDATTAN R., SONODA R.M., SINGH M. (2002): *Field evaluation of a fungal mixture for the control of seven weedy grasses*, «Weed Science», 50, pp. 204-213.
- CHARUDATTAN R. (1988): *Inundative control of weeds with indigenous fungal plant pathogens*, in *Fungi in Biological Control Systems*, a cura di M.N. Burge, Manchester University Press, Manchester, U.K., pp. 86-110.
- CHARUDATTAN R. (2001): *Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology*, «Biocontrol», 46, pp. 229-260.
- CHARUDATTAN R. (2005): *Ecological, practical, and political inputs into selection of weed targets: what makes a good biological control target?*, «Biological Control», 35, pp. 183-196.
- CHARUDATTAN R., HIEBERT E. (2007): *A plant virus as a bioherbicide for Tropical Soda Apple, Solanum viarum*, «Outlooks on Pest Management», 18, pp. 167-171.
- CHARUDATTAN R., PETERSEN M.S., HIEBERT E. (2004): *Use of Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)-mediated lethal hypersensitive response (HR) as a novel method of weed control*, U.S. Patent No. 6,689,718 B2, February 10, 2004.
- CLEMENT S.L., MIMMOCCHI T., SOBHIAN R., DUNN P.H. (1988): *Host specificity of adult Eustenopus hirtus (Waltl) (Coleoptera: Curculionidae), a potential biological control agent of yellow starthistle, Centaurea solstitialis L. (Asteraceae, Carduaceae)*, «Proceedings of the Entomological Society of Washington», 90, pp. 501-507.

- CLINE D., JURICEK C., LYM R.G., KIRBY D.R. (2008): *Leafy spurge* (*Euphorbia esula*) control with *Aphthona* spp. affects seedbank composition and native grass reestablishment, «Invasive Plant Science and Management», 1, pp. 120-132.
- COLLIER T.R., ENLOE S.F., SCIEGIENKA J.K., MENALLED F.D. (2007): *Combined impacts of Ceutorhynchus litura and herbicide treatments for Canada thistle suppression*, «Biological Control», 43, pp. 231-236.
- CONNICK W.J. JR., BOYETTE C.D., MCALPINE J.R. (1991): *Formulation of mycoherbicides using pasta-like process*, «Biological Control», 1, pp. 281-287.
- COSSE A.A., BARTELT R.J., ZILKOWSKI B.W., BEAN D.W., ANDRESS E.R. (2006): *Behaviourally active green leaf volatiles for monitoring the leaf beetle Diorhabda elongata, a biocontrol agent of saltcedar, Tamarix spp.*, «Journal of Chemical Ecology», 32, pp. 2695-2708.
- CRISTOFARO M., DOLGOVSKAYA M.Y., KONSTANTINOV A., LECCE F., REZNIK S., SMITH L., TRONCI C., VOLKOVITSH M.G. (2004): *Psylliodes chalcomera (Illiger) (Coleoptera: Chrysomelidae: alticinae), a flea beetle candidate for biological control of yellow starthistle Centaurea solstitialis*, in *Proceedings of the XI Symposium on Biological Control of Weeds*, Canberra, Australia, April 27-May 2 2003, a cura di J.M. Cullen, D.T. Briese, D.J. Kriticos, W.M. Lonsdale, L. Morin, J.K. Scott, pp. 75-80.
- CULLEN J.M. (1985): *Bringing the cost benefit analysis of biological control of Chondrilla juncea up to date*, in *Proceedings of the VI ISBCW*, August 19-25, 1984, Vancouver, Canada, a cura di E.S. Delfosse, Agriculture Canada, Ottawa, pp. 145-152.
- DELOACH C.J. (1978): *Considerations in introducing foreign biotic agents to control native weeds of rangelands*, in *Proceedings of the IV International Symposium on the Biological Control of Weeds*, Gainesville, Florida, 30 August–2 September 1976, University of Florida, Gainesville, pp. 39-50.
- DELOACH C.J., CARRUTHERS R.I., LOVICH J.E., DUDLEY T.L., SMITH S.D. (2000): *Ecological interactions in the biological control of saltcedar (Tamarix spp.) in the United States: toward a new understanding*, in *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4–14 July 1999, a cura di N.R. Spencer, Montana State University, Bozeman, pp. 819-873.
- DELOACH C.J., LEWIS P.A., HERR J.C., CARRUTHERS R.I., TRACY J.L., JOHNSON J. (2003): *Host specificity of the leaf beetle, Diorhabda elongata deserticola (Coleoptera: Chrysomelidae) from Asia, a biological control agent for saltcedars (Tamarix: Tamaricaceae) in the western United States*, «Biological Control», 27, pp. 117-147.
- DE NOOIJ M. (1988): *The role of weevils in the infection process of the fungus Phomopsis subordinaria in Plantago lanceolata*, «Oikos», 52, pp. 51-58.
- DUKE S.O., WEDGE D.E., CERDEIRA A.L., MATALLO M.B. (2007): *Interactions of synthetic herbicides with plant disease and microbial herbicides*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 277-296.
- EVANS H.C., FRÖHLICH J., SHAMOUN S.F. (2001): *Biological control of weeds. Fungal biocontrol agents of weeds*, in *Bio-exploitation of Filamentous Fungi* a cura di S.B. Pointing e K.D. Hyde, Fungal Diversity Press, Hong Kong, China, pp. 349-401.
- FISHER A.J., WOODS DM, SMITH L., BRUCKART W. (2007): *Developing an optimal release strategy for the rust fungus Puccinia jaceae var. solstitialis for biological control of Centaurea solstitialis (yellow starthistle)*, «Biological Control», 42, pp. 161-171.
- FRANTZEN J., PAUL N.D., MÜLLER-SHÄRER H. (2001): *The system management approach of biological weed control: some theoretical considerations and aspects of application*, «Bio-Control», 46, pp. 139-55.

- GOURLAY A.H., WITTENBERG R., HILL R.L., SPIERS A.G., FOWLER S.V. (2000): *The biological control program against Clematis vitalba in New Zealand*, in *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4–10 July 1999, a cura di N.R. Spencer, Montana State University, Bozeman, pp. 799-806.
- GRESSEL J., MEIR S., HERSCHKOVITZ Y., AL-AHMAD H., GREENSPOON I., BABALOLA O., AMSELLEM Z. (2007): *Approaches to and successes in developing transgenically enhanced mycoherbicides*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management* a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 297-305.
- GRESSEL J., MICHAELI D., KAMPPEL V., AMSELLEM Z., WARSHAWSKY A. (2002): *Ultralow calcium requirements of fungi facilitate use of calcium regulating agents to suppress host calcium-dependent defenses, synergizing infection by a mycoherbicide*, «Journal of Agriculture and Food Chemistry», 50, pp. 6353-6360.
- HATCHER P.E., PAUL N.D. (2001): *Plant pathogen–herbivore interactions and their effects on weeds*, in *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations*, a cura di M.J. Jeger e N.J. Spence, CABI International, UK, pp. 193-225.
- HARRIS P. (1971): *Current approaches to biological control of weeds*, in *Technical communication*, Commonwealth Institute of Biological Control, 4, pp. 67-76.
- HARRIS P. (1973): *Insects in the population dynamics of plants*, in *Insect/Plant relationships*, a cura di M. Van Emden, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 201-209.
- HARRIS P. (1977): *Biological control of weeds: from art to science*, in *Proceedings of the 15th International Congress of Entomology*, Washington, D.C. 1976, pp. 478-483.
- HILL R.L., FOWLER S.V., WITTENBERG R., BARTON J., CASONATO S., GOURLAY A.H., WINKS C. (2003): *Phytophthora vitalbae, Phoma clematidina, and insect–plant pathogen interactions in the biological control of weeds*, in *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*, Canberra, Australia, 27 April-2 May 2003, a cura di J.M. Cullen, D.T. Briese, D.J. Kriticos, W.M. Lonsdale, L. Morin, J.K. Scott, pp. 48-56.
- HIRASE K., NISHIDA M., SHINMI T. (2006): *Effect of  $\delta$ -aminolevulinic acid on the herbicidal efficacy of foliar-applied MTB-951, a mycoherbicide to control Echinochloa crus-galli L.*, «Weed Biology Management», 6, pp. 44-49.
- HOOVER K., WOOD D.L., STORER A.J., FOX J.W., BROS W.E. (1996): *Transmission of the pine pitch canker fungus Fusarium subglutinans f. sp. pini, to Monterey pine, Pinus radiata, by cone- and twig-infesting beetles*, «The Canadian Entomologist», 128, pp. 981-994.
- HUFFAKER C.B. (1958): *Principles of biological control of weeds*, in *Proceeding of the X International Congress of Entomology*, Montreal, 1956, pp. 533-542.
- IMAIZUMI S., HONDA M., MORITA K., TATENO A., FUJIMORI T. (1999): *Study of the biological control of annual bluegrass using a plant-pathogenic bacterium*, «Journal of Weed Science and Technology», 44, pp. 361-369.
- INMAN R.E. (1971): *A preliminary evaluation of Rumex rust as a biological control agent for curly dock*, «Phytopathology», 61, pp. 102-107.
- JULIEN M.H., GRIFFITHS M.W. (1988): *Biological Control of Weeds. A world catalogue of agents and their target weeds*, CAB International, Wallingford, UK, II, 146 pp.
- KLEIN O., KROSCHER J. (2002): *Biological control of Orobanche spp. with Phytophthora orobanchia, a review*, «BioControl», 47, pp. 245-277.
- KLEIN T. (1992): *The application of mycoherbicides*, «Plant Protection Q.», 7, pp. 161-162.

- KLUTH C., KREUSS A., TSCHARNTKE T. (2001): *Interactions between the rust fungus Puccinia punctiformis and ectophagous and endophagous insects on creeping thistle*, «Journal of Applied Ecology», 38, pp. 548-556.
- KREMER R.J., CAESAR A.J., SOUISSI T. (2004): *Soilborne microorganisms of Euphorbia are potential biological control agents of the invasive weed leafy spurge*, «Applied Soil Ecology», 32, pp. 27-37.
- KREMER R.J., SPENCER N.R. (1989a): *Impact of a seed-feeding insect and microorganisms on velvetleaf (Abutilon theophrasti) seed viability*, «Weed Science», 37, pp. 211-216.
- KREMER R.J., SPENCER N.R. (1989b): *Interaction of insects, fungi, and burial on velvetleaf (Abutilon theophrasti) seed viability*, «Weed Technology», 3, pp. 322-328.
- LAWRIE J., GREAVES M.P., DOWN V.M., CHASSOT A. (1997): *Some effects of spray droplet size on distribution, germination of and infection by mycoherbicide spores*, «Aspects of Applied Biology», 48, pp. 175-182.
- LOUDA S.M., RAND T.A., RUSSELL F.L., ARNETT A.E. (2005): *Assessment of ecological risks in weed biocontrol: input from retrospective ecological analyses*, «Biological Control», 35, pp. 253-264.
- LYM R.G., NELSON J.A. (2000): *Biological control of leafy spurge (Euphorbia esula) with Aphanthomyces along railroad right-of-ways*, «Weed Technology», 14, pp. 642-646.
- MANN J. (1969): *Cactus-feeding insects and mites*, «U.S. National Museum Bulletin», 256, p. 158.
- MONFREDA R., DE LILLO E., CRISTOFARO M. (2005): *Studio preliminare degli Eriophyoidea infedati su Centaurea solstitialis L. nel bacino del Mediterraneo*, in *Proceedings XX Congresso Nazionale di Entomologia*, Assisi, 13-18 Giugno 2005, p. 396.
- MONFREDA R., DE LILLO E., CRISTOFARO M. (2007): *Eriophyoid mites on Centaurea solstitialis L. in the Mediterranean area*, in *Proceedings XII International Symposium on Biological Control of Weeds*, 22-27 April, 2007, La Grande Motte, France, p. 112.
- MORIN L., JOURDAN M., PAYNTER Q. (2000): *The gloomy future of the broom rust as a biocontrol agent*, in *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4-10 July 1999, a cura di N.R. Spencer, Montana State University, Bozeman, USA, pp. 633-638.
- MORRIS M.J., WOOD A.R., DEN BREEËN A. (1999): *Plant pathogens and biological control of weeds in South Africa: a review of projects and progress during the last decade*, «African Entomology Memoir», 1, pp. 129-137.
- MORRIS M.J. (1997): *Impact of the gall-forming rust fungus Uromycladium tepperianum on the invasive tree Acacia saligna in South Africa*, «Biological Control», 10, pp. 75-82.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE - NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1969): *Principles of Plant and Animal Pest Control. Vol. 2, Weed Control*, Natl Acad. Sci. Publ., 471pp.
- NELSON J.A., LYM R.G. (2003): *Interactive effects of Aphanthomyces nigriscutis and picloram plus 2,4-D in leafy spurge (Euphorbia esula)*, «Weed Science», 51, pp. 118-124.
- OEHRENS E. (1977): *Biological control of blackberry through the introduction of the rust, Phragmidium violaceum, in Chile*, «FAO Plant Protection Bulletin», 25, pp. 26-28.
- PENG G., BYER K.N. (2005): *Interactions of Pyricularia setariae with herbicides for control of green foxtail (Setaria viridis)*, «Weed Technology», 19, pp. 589-598.
- PITCAIRN M.J., SCHOENIG S., YACOB R., GENDRON J. (2006): *Yellow starthistle continues its spread in California*, «California Agriculture», 60, pp. 83-90.
- PITCAIRN M.J., WOODS D.M., POPESCU V. (2006): *Changes in densities of biological control agents and yellow starthistle at long-term study sites in California*, «Proceedings Western Society of Weed Science», 59, pp. 58.

- ROSSKOPF E.N., CHARUDATTAN R., KADIR J.B. (1999): *Use of plant pathogens in weed control*, in *Handbook of Biological Control*, a cura di T.S. Bellows e T.W. Fisher, Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 891-918.
- SCHROEDER D. (1983): *Biological control of weeds*, in *Recent advances in weed control*, a cura di W.W. Fletcher, CAB, Slough, UK, pp. 41-77.
- SHARON A., AMSELLEM Z., GRESSEL J. (1992): *Glyphosate suppression of an elicited defense response: Increased susceptibility of Cassia obtusifolia to a mycoherbicide*, «Plant Physiology», 98, pp. 654-659.
- SHEPPARD A.W., SHAW R.H., SFORZA R. (2006): *Top 20 environmental weeds for classical biological control in Europe: a review of opportunities, regulations and other barriers to adoption*, «Weed Research», 46, pp. 93-177.
- SMITH L., HAYAT R., CRISTOFARO M., TRONCI C., TOZLU G., LECCE F. (2006): *Assessment of risk of attack to safflower by Ceratopion basicorne (Coleoptera: Apionidae), a prospective biological control agent of Centaurea solstitialis (Asteraceae)*, «Biological Control», 36, pp. 337-344.
- SOBHIAN R. (1993): *Life history and host specificity of Urophora sirunaseva (Hering) (Dipt., Tephritidae), a candidate for biological control of yellow starthistle, with remarks on the host plant*, «Zeitschrift für Angewandte Entomologie», 116, pp. 381-390.
- SOBHIAN R., FORNASARI L. (1994): *Biology of Larinus curtus Hochhut (Coleoptera: Curculionidae), a European weevil for biological control of yellow starthistle, Centaurea solstitialis L. (Asteraceae), in the United States*, «Biological control: theory and applications in pest-management», 4 (4), pp. 328-335.
- TEBEEST D.O., YANG X., CISAR C.R. (1992): *The status of biological control of weeds with fungal pathogens*, «Annual Review of Phytopathology», 30, pp. 637-657.
- THOMPSON B.M., KIRKPATRICK M.M., SANDS D.C., PILGERAM A.L. (2007): *Genetically enhancing the efficacy of plant pathogens for control of weeds*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 267-275.
- TRUJILLO E.E. (1985): *Biological control of Hamakua pa-makani with Cercospora sp. in Hawaii*, in *Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds*, August 19-25, 1984, Vancouver, Canada, a cura di E.S. Delfosse, Agriculture Canada, Ottawa, pp. 66-671.
- TRUJILLO E.E. (2005): *History and success of plant pathogens for biological control of introduced weeds in Hawaii*, «Biological Control», 33, pp. 113-122.
- TRUJILLO E.E., ARAGAKI M., SHOEMAKER R.A. (1988): *Infection, disease development, and axenic culture of Entyloma compositarum, the cause of Hamakua pamakani blight in Hawaii*, «Plant Disease», 72, pp. 355-357.
- VEGA F., DOWD P.F., LACEY L.A., PELL J.K., JACKSON D.M., KLEIN M.G. (2008): *Dissemination of beneficial microbial agents by insects*, in *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Springer, The Netherlands, Chapter 3, pp. 127-146.
- VURRO M. (2007): *Benefits and risks of using fungal toxins in biological control strategies*, in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 53-74.
- VURRO M., CASELLA F. (2008): *Weed microbial biocontrol agents: benefits and limitations*, «Outlooks on Pest Management», 19, pp. 67-72.
- VURRO M., ZONNO M.C., EVIDENTE A., ANDOLFI A., MONTEMURRO P. (2001): *Enhancement of efficacy of Ascochyta caulina to control Chenopodium album by use of phytotoxins and reduced rates of herbicides*, «Biological Control», 21, pp. 182-190.

- WAPSHERE A.J. (1974a): *A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control*, «Annals of Applied Biology», 77, pp. 201-211.
- WAPSHERE A.J. (1974b): *Host specificity of phytophagous organisms and the evolutionary centres of plant genera or subgenera*, «Entomophaga», 19, pp. 301-309.
- WAPSHERE A.J. (1975): *A protocol for programmes for biological control of weeds*, «Pest Articles and News Summaries», 21, pp. 295-303.
- WATSON A.K. (1991): *The classical approach with plants pathogens*, in *Microbial Control of Weeds*, a cura di D.O. TeBeest, Chapman & Hall Inc., New York, USA, pp. 3-23.
- WATSON A.K. (2007): *Sclerotinia minor - Biocontrol Target or Agent?* in *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, a cura di M. Vurro e J. Gressel, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 205-211.

