

## Natura antibiotica della resistenza al Punteruolo rosso in *Washingtonia filifera* e possibilità di diagnosi precoce in *Phoenix canariensis*

B. Cangelosi<sup>1</sup>, F. Clematis<sup>1</sup>, F. Monroy<sup>1</sup>, V. Lanzotti<sup>2</sup>, P. Curir<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali), Corso degli Inglesi 508, 18038 Sanremo (IM)

<sup>2</sup>Università degli Studi Federico II, Dipartimento di Agraria, Via Università 100, 80055 Portici (NA)



Il grado di suscettibilità di ciascuna delle specie riportate come ospiti del Punteruolo rosso delle palme non è del tutto chiaro e, a seconda dei casi, può essere determinato da un particolare meccanismo di resistenza della pianta. Painter (1958) ha definito tre meccanismi di resistenza delle piante agli insetti: "non preferenza", antibiosi e tolleranza. La "non-preferenza" si verifica quando la pianta non risulta attraente per l'insetto. Kogan e Ortman (1978) hanno sostituito il termine "non-preferenza" con quello di "antixenosi", intendendo quel tipo di resistenza della pianta alla

colonizzazione dell'insetto dovuta a barriere meccaniche o a sostanze repellenti. Questo tipo di difesa può interferire con varie fasi del comportamento degli insetti, come l'orientamento, la colonizzazione, l'alimentazione e la deposizione delle uova.

Per "antibiosi", invece, è da intendersi un disturbo al normale sviluppo dell'insetto, soprattutto in fase giovanile, seguito da ridotta capacità riproduttiva e morte prematura. Infine, si parla di "tolleranza" quando la pianta tollera certi livelli di densità di infestazione, senza essere danneggiata eccessivamente.

Nell'area del Mediterraneo, *P. dactylifera*, *C. humilis* e *W. filifera* risultano più resistenti al fitofago rispetto a *Phoenix canariensis*, ospite preferenziale del fitofago.

A partire da Luglio 2012 fino ad oggi, presso l'Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali di Sanremo, si sta portando avanti una sperimentazione volta ad indagare sui possibili meccanismi di resistenza implicati nella minore suscettibilità delle 3 specie ospiti sopracitate.

Tale studio ha previsto, inizialmente, prove di infestazione "forzata" (inserendo artificialmente le larve negli stipiti delle piante) ed infestazione "naturale" (attraverso il lancio di femmine adulte accoppiate in gabbie contenenti le singole piante) delle specie vegetali oggetto di studio.

Gli esperimenti, svolti in una serra, internamente rivestita da una struttura a rete metallica, in condizioni di luce e di temperatura naturali, sono stati eseguiti su palme in vaso di *P. dactylifera*, *W. filifera*, *C. humilis* di circa 10 anni di età. Piante di *P. canariensis* della stessa età sono state incluse come controllo.

Nel caso dell'infestazione "forzata su tutte le specie testate è stato riscontrato il 100% di infestazione. Infatti, in tutte le relative osservazioni, l'attività edafica operata dalle larve è risultata ben evidente, con la presenza di profonde gallerie di alimentazione nei tessuti vegetali.

In *W. filifera* e in *C. humilis*, in corrispondenza delle gallerie scavate dalle larve, è stata, inoltre, osservata la produzione di secrezioni gommose. In particolare in *W. filifera* tale produzione, più intensa che in *C. humilis*, ha portato all'escrezione dai fori praticati sugli stipiti



per inserire le larve, di formazioni tubolari lunghe diversi centimetri, costituite dalla rosura prodotta dalle larve impastata con le sostanze gommose prodotte dalle piante. Il tasso di mortalità si è rivelato relativamente basso in tutte le tesi, senza alcuna differenza statistica.

Nel caso dell'infestazione naturale, quando le palme sono state esposte direttamente a femmine accoppiate, solo in *P. canariensis*, usata come controllo, si è verificato il 100% di infestazione, in tutti gli altri casi questa percentuale è stata pari a zero.

Nessuna delle tre specie testate (*W. filifera*, *C. humilis*, *P. dactylifera*), dunque, ha mostrato completa resistenza a *Rhynchophorus ferrugineus*. Infatti, in tutti e tre i casi, quando le larve sono state inserite direttamente nello stipite delle piante, l'infestazione si è verificata, a differenza di quanto osservato cercando di creare una situazione di infestazione naturale. Questo può significare che le specie che in natura risultano meno attaccate dal fitofago possono diventarne ospiti se sono già indebolite da altre cause (es. attacchi di agenti patogeni). In *P. dactylifera*, la minore suscettibilità a *R. ferrugineus*, potrebbe essere dovuta soprattutto a meccanismi antixenotici. Le piante, infatti, quando le larve sono introdotte direttamente nel loro stipite, non mostrano alcuna reazione e l'insetto compie il suo ciclo più o meno regolarmente.

In *C. humilis* e *W. filifera*, invece, sebbene non si possano escludere meccanismi antixenotici, la produzione di secrezioni gommose indica che la minore suscettibilità di questa specie potrebbe anche essere attribuita a meccanismi antibiotici. Tali meccanismi sono risultati più evidenti nel caso di *W. filifera*, dove, oltre a una secrezione più abbondante, nessuno degli individui è stato in grado di completare il ciclo.

In una seconda fase dello studio, sono state eseguite delle prove in laboratorio, consistenti nella preparazione di estratti delle guaine fogliari (luogo preferenziale di ovideposizione dell'insetto) di *P. dactylifera*, *W. filifera*, *C. humilis* e nella somministrazione, attraverso dieta artificiale, a gruppi di larvette. In tutte le prove svolte le larve sottoposte agli estratti di *C. humilis* e *W. filifera* sono morte tutte entro il secondo giorno dall'inizio della prova, mentre sono risultate assai meno sensibili all'effetto biologico dell'estratto della *P. dactylifera*. I risultati ottenuti avvalorano le nostre ipotesi, formulate a seguito della conclusione della sperimentazione effettuata prima in semi-campo, dell'esistenza di una strategia difensiva di tipo antibiotico nel caso di *W. filifera* e di *C. humilis* non presente nel caso di *P. dactylifera*, dove sembra prevalere una risposta di tipo antixenotico.

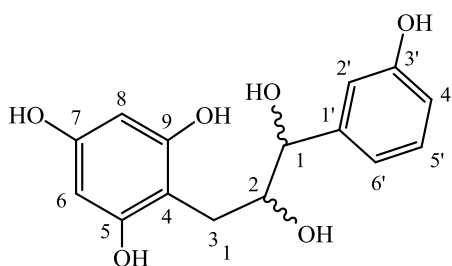
Esemplari di palma appartenenti alle specie *W. filifera*, *C. humilis* sono stati studiati dal punto di vista della composizione in metaboliti secondari a struttura fenolica, per valutare l'entità della produzione di questa tipologia di composti, notoriamente associati ad un'attività di resistenza nei confronti di patogeni fungini ed artropodi.

Si sono studiati in particolare i fenoli localizzati nelle porzioni rachidiali fogliari, considerando che le larve neonate si nutrono di tali tessuti. I risultati delle analisi svolte mediante HPLC presso l'Unità di Sanremo hanno evidenziato la presenza di numerosi componenti ed hanno consentito il riconoscimento di alcuni di essi.

A fianco alle componenti fenoliche identificate, nel corso delle analisi HPLC si sono evidenziati picchi sconosciuti, corrispondenti a molecole a struttura ignota ed in ogni caso non determinabile mediante semplice raffronto con markers. Si è, pertanto, ricorso alla cromatografia su colonna al fine di purificare alcune tra le diverse componenti e di ottenerne una quantità sufficiente a consentirne la caratterizzazione molecolare e l'effettuazione di saggi biologici dell'effetto su larve di Punteruolo.

A seguito del lavoro di separazione e purificazione cromatografica, si sono ottenute da estratti di *W. filifera* tre molecole che, inserite in un programma di saggi biologici su larve di Rincoforo di circa due settimane d'età, hanno evidenziato una elevata capacità abbattente, a seguito di ingestione, nei confronti delle larve stesse. E' pertanto verosimile che la maggiore resistenza della specie di palma sopra citata verso gli attacchi del Punteruolo rosso possa essere associata anche all'effetto antibiotico di tale molecole. Delle tre molecole isolate, una è un calconoide e le due altre sono costituite da zuccheri legati a catene alifatiche. Il primo composto, è stato sottoposto ad una serie di esperimenti spettroscopici di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) e di Spettrometria di Massa (MS) in bassa ed in alta risoluzione. Sono stati inoltre registrati spettri di 2D NMR COSY, HMQC ed HMBC che sono di enorme utilità nella determinazione della struttura chimica anche nel caso di molecole molto complesse. In aggiunta, sono state utilizzate metodiche classiche chimiche che hanno permesso la determinazione completa della stereostruttura della molecola in esame.

La struttura molecolare parziale del primo composto risulta essere la seguente:



Compound W2  
MW 292  
formula: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>

Nel caso degli altri due composti, la determinazione della struttura molecolare è ancora in corso.

Una comparazione degli spettri HPLC di estratti fogliari a base di metaboliti secondari di piante di *P. canariensis*, rispettivamente attaccate dal Rincoforo oppure sane, ha fornito elementi che conducono a ritenere sia possibile una diagnosi precoce dell'attacco del punteruolo a seguito di un semplice raffronto degli andamenti dei rispettivi grafici HPLC. Assenza e presenza di numerosi picchi cromatografici sembrano infatti correlati ai due stati fitosanitari di pianta attaccata e di pianta indenne. Una volta verificata la riproducibilità dei risultati, si ritiene che tale sistema diagnostico possa trovare impiego pratico ai fini di un rapido rilevamento del patogeno anche in fasi precoci del suo attacco.