

ANNALI
DI
MICROBIOLOGIA
ED ENZIMOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE, AGRARIA, ALIMENTARE,
ECOLOGICA, INDUSTRIALE; DI ENZIMOLOGIA
E DI CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI

VOL. XXXVIII - 1988 - Parte I

Direzione e Amministrazione
VIA CELORIA, 2 - 20133 MILANO

EDITI CON IL CONTRIBUTO DEL CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

I limitatori microbici di *Zyginidia pullula* Boh., fitomizo del mais *

O.I. OZINO, G. ZEPPA

Istituto di Microbiologia e Industrie agrarie dell'Università di Torino, Torino, Italia.

Indagini epidemiologiche condotte nei riguardi di *Zyginidia pullula* Boh. (Homoptera Auchenorrhyncha Typhlocybinæ) in diverse zone maidicole piemontesi hanno rivelato che questo insetto può essere limitato da microrganismi entomoparassiti (1). In particolare è nei mesi di settembre e di ottobre che *Z. pullula* appare bloccata sulle foglie di mais e attaccata da funghi.

In precedenti ricerche (2, 3) differenti specie fungine, tra le quali *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, *Penicillium oxalicum* Currie et Thom, *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder et Hansen, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas, *V. fusisporum* Gams, *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi, *Mucor hiemalis* Wehmer, sono state isolate dal cicadellide.

Esemplari dell'insetto saggiati in prove d'infezione in laboratorio (3) si sono mostrati sensibili all'effetto di questi funghi; soprattutto è apparsa rilevante la virulenza di *V. lecanii* e di *V. fusisporum*, i quali hanno determinato rispettivamente la mortalità dell'80% e del 60% degli individui trattati. Questi deuteromiceti, che sono notoriamente entomopatogeni (4-7), hanno rappresentato però soltanto il 6,0% e l'1,0% degli isolamenti ottenuti.

Tale risultato ha suggerito la necessità di proseguire le ricerche allo scopo di approfondire ulteriormente le conoscenze sui microrganismi parassiti di *Z. pullula*.

METODI

Sono stati considerati 464 esemplari di *Z. pullula*, raccolti morti nelle seguenti zone maidicole del Piemonte: Carignano, La Loggia e Stupinigi in pro-

* Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R. nell'ambito del P.F. I.P.R.A.; sottoprogetto 1. Pubblicazione n. 1678.

vincia di Torino, Castellazzo Bormida, Predosa e Quattordio in provincia di Alessandria. I prelievi del materiale sono stati eseguiti nei mesi di settembre e di ottobre di 3 annate successive, 1984, 1985, 1986, in collaborazione con l'Istituto di Entomologia agraria e Apicoltura dell'Università di Torino.

Tutti gli insetti sono stati osservati al microscopio stereoscopico per l'esame delle caratteristiche più evidenti del fungo o dei funghi che li avvolgevano. Successivamente, prelevando piccole porzioni di micelio, preparati sono stati allestiti per lo studio al microscopio a contrasto di fase. Mediante questo metodo è stato possibile separare gli esemplari di *Z. pullula* su cui comparivano soltanto saprofiti, più volte osservati durante le precedenti ricerche, da quelli su cui erano presenti ifomiceti del genere *Verticillium* o altri miceti mai prima riscontrati.

Quando sugli esemplari compariva micelio attribuibile a *Verticillium* si è proceduto alla determinazione specifica per confronto con preparati da colture in purezza, considerando in particolare aspetto e dimensioni dei verticilli e dei conidi. Da ognuno di questi insetti è stato tentato l'isolamento del fungo con la metodologia già descritta in un precedente lavoro (2).

Nel 1986, a seguito del rinvenimento su 8 esemplari di *Z. pullula*, 4 provenienti da La Loggia e 4 da Predosa, di una formazione miceliare gelatinosa, che faceva sospettare la presenza di una Entomofioracea è stato fatto l'isolamento impiegando un mezzo al tuorlo d'uovo coagulato (8). Ogni insetto è stato posto in camera umida sterile su un vetrino portaoggetti, per raccogliere i conidi proiettati dal fungo. I conidi medesimi sono poi stati asetticamente prelevati dal vetrino con piccole quantità di substrato al tuorlo d'uovo, trasferiti sul mezzo di coltura e incubati a 23°C.

La determinazione del fungo è stata eseguita tenendo soprattutto conto della forma e delle dimensioni dei conidi primari, dei capilloconidi e delle zigospore, osservati in parte direttamente sull'insetto, in parte sulle colture pure ottenute (9).

La patogenicità del fungo isolato nei riguardi di *Z. pullula* è stata valutata con una prima prova d'infezione. Insetti sani, in totale 5, allevati in laboratorio, sono stati introdotti in capsula Petri, nella quale su carta bibula inumidita è stata posta una porzione di foglia di mais con un esemplare morto e avvolto dal micelio del microrganismo in studio. La permanenza degli insetti nella capsula è stata di 24 ore, per permettere che i conidi proiettati a distanza li raggiungessero, infettandoli. A parte è stata predisposta una capsula con foglia per i 5 testimoni, i quali hanno subito lo stesso trattamento, eccettuato il contatto con la cicalina infetta. Gli insetti sottoposti ad infezione, trasferiti in altre provette su foglie fresche di mais, sono stati controllati giornalmente fino alla morte. I morti sono stati trasportati su portaoggetti in camera umida sterile a 23°C per favorire lo sviluppo miceliare del patogeno e per reisolarlo. Dopo l'isolamento dell'Entomofiora, gli insetti sono stati mantenuti per ulteriori 10 giorni in camera umida allo scopo di verificare l'evoluzione del fungo.

Infine, per chiarire l'effettiva incidenza del *Verticillium* e dell'Entomofioracea sulle popolazioni di *Z. pullula*, sono state avviate prove di laboratorio, utilizzando 30 esemplari del fitofago, rinvenuti ancora vivi nel mese di ottobre in maideti di Pessione, in provincia di Torino, caratterizzati da estese morie del cicadellide. Gli insetti sono stati inseriti in numero variabile da 1 a 3 in provette contenenti una porzione di foglia fresca di mais, tappate con cotone e mantenute a temperatura ambiente. Ciascun esemplare è stato controllato almeno due

volte al giorno. I morti sono stati immediatamente prelevati e posti in camera umida. Il micelio è stato osservato al microscopio stereoscopico e al microscopio a contrasto di fase, prendendo in considerazione anche l'aspetto delle ife che coinvolgevano i tessuti dell'insetto. Da ogni individuo sono stati effettuati gli isolamenti dei patogeni.

RISULTATI

Su esemplari di *Z. pullula* raccolti morti in campo sono stati riscontrati in purezza *V. lecanii* o lo zigomicete *Zoophthora radicans* (Bref.) Batko. *V. lecanii* è stato osservato frequentemente anche in associazione a funghi saprofiti, già rinvenuti sul fitofago in precedenti ricerche. Questi stessi saprofiti sono stati notati soli o in varie combinazioni su un elevato numero di individui. Nella Tabella 1 sono riportate le percentuali delle frequenze che i vari miceti hanno raggiunto nelle 3 annate prese in considerazione.

TABELLA 1 — Frequenza dei diversi miceti rinvenuti su esemplari di *Zyginidia pullula* raccolti morti in differenti zone maidicole del Piemonte negli anni 1984, 1985 e 1986.

Specie fungine	Insetti %		
	1984	1985	1986
<i>Verticillium lecanii</i>	15,17	10,00	15,46
<i>V. lecanii</i> e funghi saprof.	14,48	12,50	51,79
<i>Zoophthora radicans</i>	—	—	2,87
Funghi saprofiti	70,35	77,50	29,88

La maggior parte degli esemplari è apparsa infungata da saprofiti o da saprofiti assieme a *V. lecanii*. Quest'ultimo micete è stato osservato in purezza in percentuali relativamente costanti nelle 3 annate e variabili dal 10,00 al 15,46%. *Z. radicans* è stata rinvenuta, come già indicato, soltanto su 8 individui. Il suo micelio era neoformato con conidiofori ancora privi di conidi o con conidi in via di sviluppo.

Nelle prove d'infezione in laboratorio *Z. radicans* ha determinato in 4 giorni la morte degli insetti saggiati; mentre i testimoni erano tutti vivi. Dai morti è stato ottenuto l'isolamento in purezza dell'agente dell'infezione. A distanza di una decina di giorni, questi insetti, mantenuti in camera umida sterile, si sono ricoperti del micelio e degli organi di moltiplicazione tipici di *V. lecanii*. L'esame microscopico ha inoltre rivelato la completa lisi di tutte le strutture miceliari di *Z. radicans*.

Gli esemplari di *Z. pullula*, raccolti vivi in campo e posti in allevamento in provette, hanno dato i seguenti risultati: su 30 individui 11 (36,67%) sono morti dopo 4-5 giorni colpiti da *Z. radicans* (Fig. 1), 4 (13,33%) dopo 4-15 giorni ad opera di *V. lecanii* (Fig. 2), 1 (3,33%) dopo 5 giorni con sviluppo di *V. lecanii*

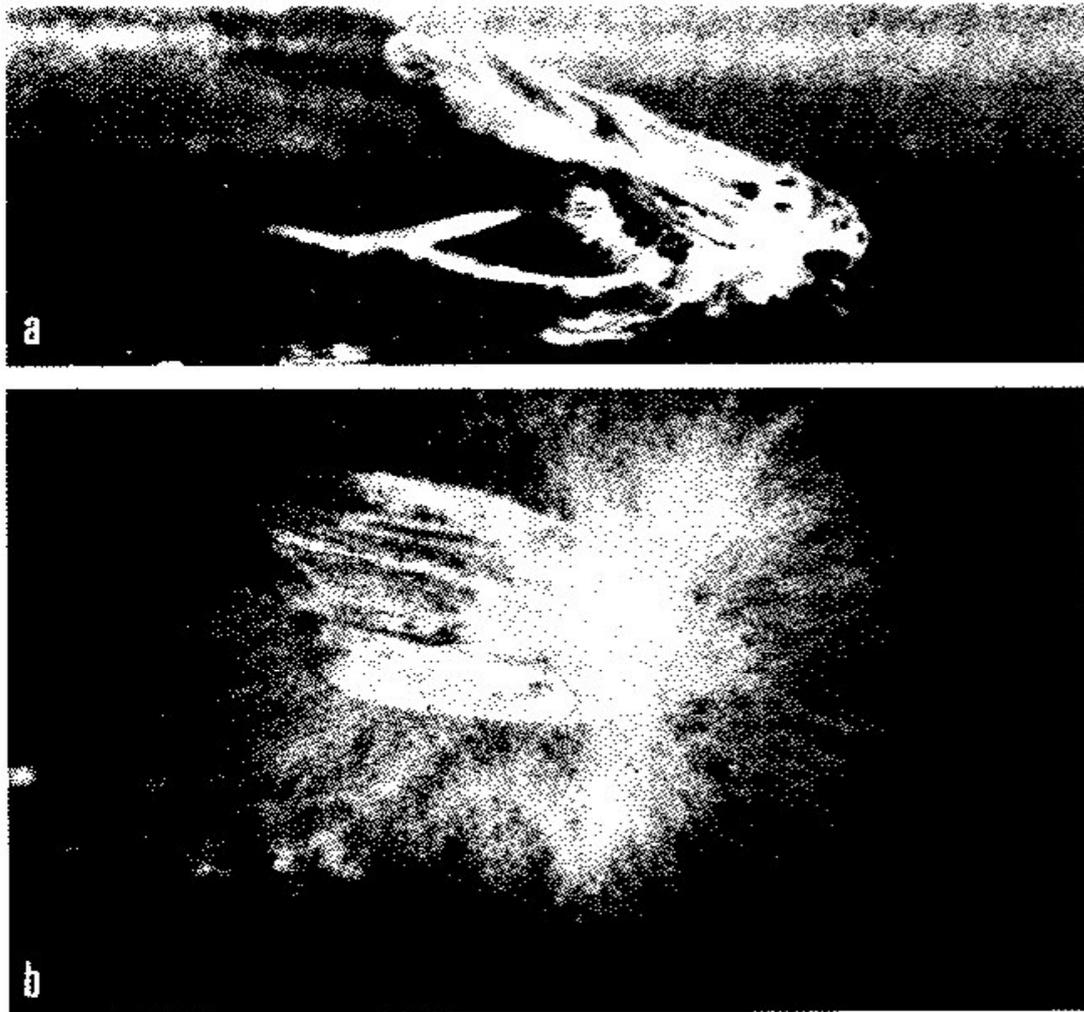


FIG. 2 — *Verticillium lecanii* su esemplari di *Zyginidia pullula*: sviluppo del micelio (a) dopo 14 ore dalla morte (ingrandimento 20x); (b) dopo 48 ore (ingrandimento 12x).

e di *V. fusisporum*; i rimanenti 14 (46,67%) sono morti in tempi più lunghi senza manifestare accrescimento fungino. Da tutti questi insetti sono stati isolati in purezza i relativi agenti d'infezione ad eccezione di *V. fusisporum*.

Nei preparati microscopici allestiti a partire dagli individui la cui morte è stata determinata da *Z. radicans* sono stati osservati i corpi ifali, le strutture miceliari, i conidi (Fig. 3a) e in 3 casi, anche le caratteristiche zigospore (Fig. 3b); in quelli approntati a partire dagli insetti colpiti da *Verticillium*, sono state notate la proliferazione miceliare e conidica nella parte più superficiale e la presenza di ife nei tessuti.

Negli 11 insetti attaccati da *Z. radicans* e conservati in camera umida i processi di lisi delle strutture del fungo sono stati osservati a distanza di 48 h; dopo 10 giorni, 2 individui sono apparsi ricoperti esclusivamente dal micelio di *V. lecanii*, 9 da vari saprofiti.

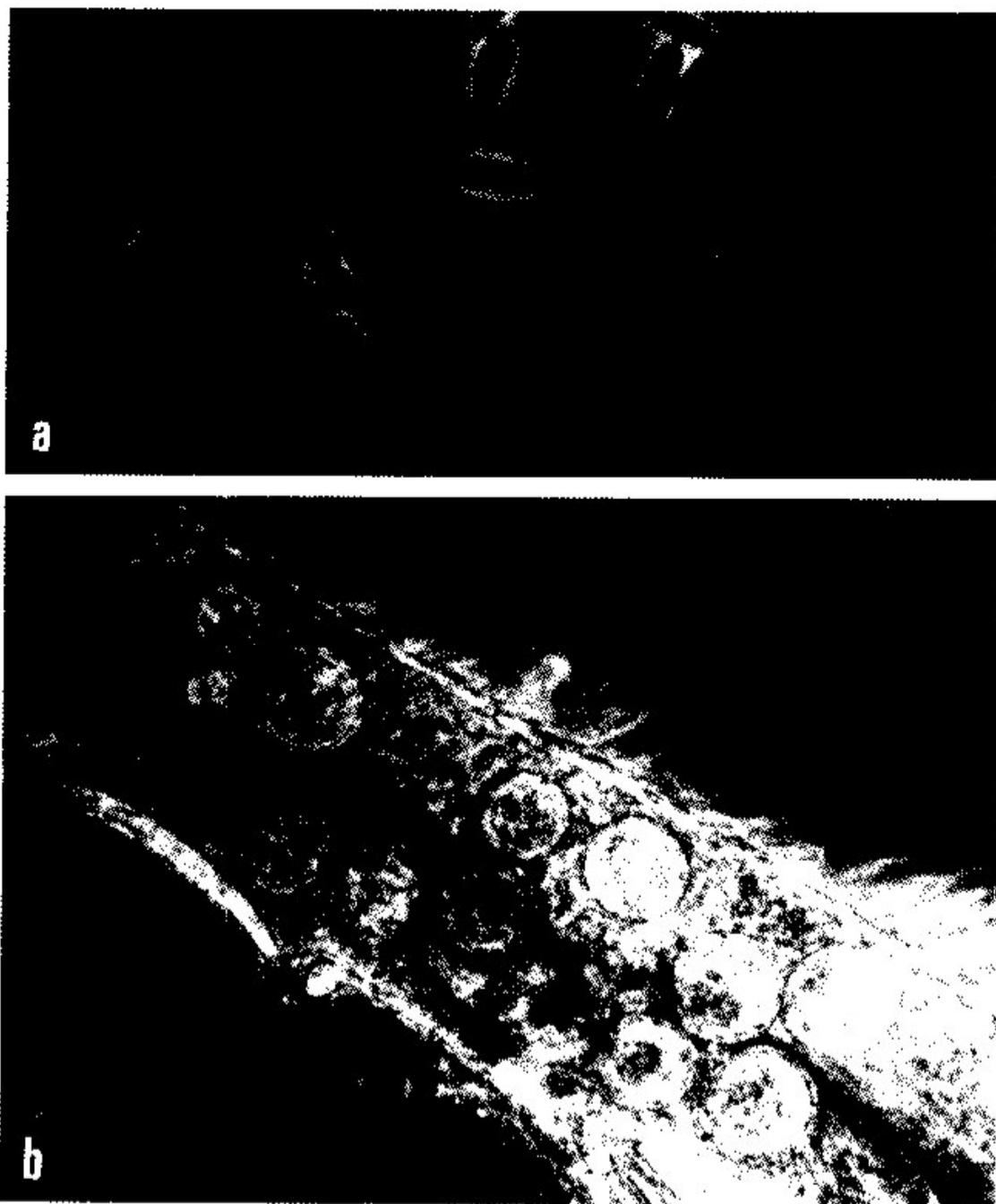


FIG. 3 — *Zoophthora radicans*: (a) conidi primari e capilloconidio; (b) zigospore su zam-
pa di *Zyginidia pullula* (ingrandimento 520×).

CONCLUSIONI

Precedenti ricerche condotte su esemplari di *Z. pullula* prelevati morti in moideti piemontesi hanno dimostrato la patogenicità di *V. lecanii* nei confronti del fitofago (2, 3). All'elevata virulenza di questo fungo, che in prove di laboratorio si era esplicito determinando una mortalità dell'80%, aveva fatto riscontro un limitato numero di isolamenti che non consentiva di spiegare compiutamente il vistoso fenomeno epidemiologico rilevato in campo (1).

I dati delle successive ricerche, condotte negli anni 1984, 1985 e 1986, mediante osservazione diretta al microscopio delle strutture fungine e successivo isolamento dei probabili patogeni, hanno indicato la presenza di *V. lecanii* in purezza in non più del 10-15% degli insetti esaminati, confermando sostanzialmente le precedenti risultanze. In un elevato numero di casi, variabile a seconda dell'anno dal 12,50 al 51,79%, questo entomopatogeno è stato però rilevato in associazione con altri funghi notoriamente saprofiti. Inoltre, grazie all'abbondanza di individui raccolti in campo ed esaminati in laboratorio, la presenza di *Z. radicans* — specie dell'ordine delle *Entomophthorales* altamente virulenta per molti Omotteri, tra cui Afroforidi e Cicadellidi (10, 11) — è stata notata per la prima volta su 8 esemplari di *Z. pullula* nel settembre del 1986.

L'esito di prove orientative d'infezione condotte in laboratorio ha indicato che anche questa Entomofitoracea può avere un ruolo non indifferente nel contenimento del fitofago in studio. L'evoluzione della micosi sugli esemplari da cui era stata isolata *Z. radicans* ha dimostrato l'estrema labilità delle strutture di questo fungo ed ha rivelato che *V. lecanii* può agire anche come saprofita, analogamente ad altri efficaci funghi entomopatogeni (12).

Infine, i risultati delle prove condotte su insetti raccolti ancora vivi in campo hanno confermato che *V. lecanii* e *Z. radicans* sono effettivamente parassiti del cicadellide. Il limitato numero di esemplari su cui, a causa dell'avanzata stagione, è stato possibile operare non consente per ora di trarre conclusioni definitive dal punto di vista quantitativo. Ricerche più ampie su insetti ancora vivi appaiono necessarie per determinare l'entità dell'azione svolta in natura da *V. lecanii* e da *Z. radicans* nei confronti di *Z. pullula*.

RIASSUNTO

Su esemplari di *Zyginidia pullula* trovati morti in campo sono stati rinvenuti *Verticillium lecanii*, da solo o in associazione con altri funghi e, per la prima volta, *Zoophthora radicans*. Lo zigomicete, isolato da un limitato numero di individui, in prove d'infezione di laboratorio ha rivelato elevata virulenza nei confronti dell'insetto. Le strutture miceliari di questo fungo si sono mostrate estremamente labili rendendone particolarmente difficoltosa l'individuazione. Infatti, a seguito della lisi del parassita, l'insetto veniva rapidamente ricoperto da miceti vari, tra cui *V. lecanii*, che notoriamente può comportarsi anche come saprofita. I risultati delle prove condotte in laboratorio su insetti raccolti ancora vivi in campo hanno confermato che *V. lecanii* e *Z. radicans* sono efficaci limitatori di *Z. pullula*.

SUMMARY

On dead specimens of *Zyginidia pullula*, *Verticillium lecanii*, either pure or associated with other fungi, was found to be present, as well as, for the first time, *Zoophthora radicans*. This zygomycete was isolated from a limited number of the specimens examined, and in laboratory infection tests showed high virulence against the insect. The detection of the fungus resulted to be very difficult due to the extreme weakness of its mycelial structures. After the lysis of the parasite, the insect was rapidly covered by various moulds, including *V. lecanii*, which is known to behave as a saprophyte too. Results of laboratory tests on insects collected alive in the field confirmed the effectiveness of *V. lecanii* and *Z. radicans* in limiting *Z. pullula*.

Si ringrazia il Prof. Carlo Vidano, direttore dell'Istituto di Entomologia agraria e Apicoltura dell'Università di Torino per la preziosa collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Vidano C.: *Contributo alla conoscenza delle Zyginidia d'Italia* (Homoptera Auchenorrhyncha Typhlocybinæ). Mem. Soc. Ent. It., **60**, 128 (1982).
- 2) Ozino Marletto O.I.: *Indagine preliminare su ifomiceti isolati da Zyginidia pullula Boh.* Allionia, **25**, 101 (1982).
- 3) Ozino Marletto O.I., Maggiora S.: *Deuteromiceti entomoparassiti di Zyginidia pullula Boh.* Atti XIII Congr. Naz. It. Ent., Sestriere-Torino, 539 (1983).
- 4) Roberts D.W., Yendol W.G.: *Use of fungi for microbial control of insects*, in «Microbial Control of Insects and Mites» (H.D. Burges, N.W. Hussey eds.), Academic Press, London, New York (1971).
- 5) Sohm Ekbohm B., Ahman I.: *The fungus Verticillium fusicolorum as an insect pathogen.* J. Invert. Path., **36**, 136 (1980).
- 6) Hall R.A.: *The fungus Verticillium lecanii as a microbial insecticide against aphids and scales*, in «Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980». (ed. H.D. Burges), Academic Press, London, New York (1981).
- 7) Roberts D.W.: *Toxins of entomopathogenic fungi*, in «Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980». (H.D. Burges ed), Academic Press, London, New York (1981).
- 8) Remaudière G., Keller S., Papierok B., Latgé J.-P.: *Considerations systématiques et biologiques sur quelques espèces d'Entomophthora du groupe Sphaerosperma pathogènes d'insectes* (Phycomycètes: Entomophthoraceae). Entomophaga, **21** (2), 163 (1976).
- 9) Remaudière G., Hennebert G.L.: *Revision systématique de Entomophthora aphidis Hoffm.* in Fres. Description de deux nouveaux pathogènes d'aphides. Mycotaxon, **11** (1), 269 (1980).
- 10) Ben-Zé Ev I., Kenneth R.G.: *Zoophthora radicans and Zoophthora petchi sp. nov.* (Zigomycetes: Entomophthorales), *two species of the «Sphaerosperma Group» attacking leaf-hoppers and frog hoppers (Hom.)*. Entomophaga, **26** (2), 131 (1981).
- 11) Zimmermann G.: *Biological control of aphids by entomopathogenic fungi: Present state and prospects.* Proceedings EC Experts Meeting Portici, 33 (1982).
- 12) Madelin M.F.: *Fungal parasites of Invertebrates. I. Entomogenous Fungi*, in «The Fungi an Advanced Treatise» (G.C. Ainsworth, A.S. Sussman eds.), Academic Press, New York, London (1968).

(Pervenuto in Redazione il 16 dicembre 1987)