



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dip. AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Dip TERRITORIO E SISTEMI AGRO-FORESTALI

Corso di laurea in SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

Il metabolismo della durrina in *Sorghum bicolor* ed il suo ruolo nella biofumigazione dei terreni agrari.

RELATORE:

Dott. Renella Giancarlo.

LAUREANDO:

Scardoni Matteo.

Matricola n. 2007829

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RIASSUNTO

La durrina è un glicoside cianogenico prodotto nella via biosintetica dall'aminoacido aromatico L-tirosina, nella quale si produce HCN, una sostanza tossica perché interferente il metabolismo respiratorio. La durrina è prodotta dal metabolismo secondario di diverse famiglie di piante, con la funzione di protezione dagli stress biotici e abiotici. La biomolecola è composta da uno zucchero, un gruppo fenolo e dal gruppo cianidrico, legati ad un carbonio chirale mediante legami covalenti. Recentemente, è stato dimostrato che questo metabolita può essere usato in agricoltura per risanare i suoli agricoli mediante interventi di biofumigazione. Tali interventi si realizzano trinciando e interrando i residui vegetali che, una volta nel suolo, libereranno la molecola che esplicherà la sua funzione biocida. La durrina è in grado di controllare le popolazioni di organismi patogeni presenti nel suolo ed aumentare le rese in sostituzione di prodotti di sintesi utilizzati per la stessa pratica. Il *Sorghum bicolor* è un cereale macrotermo, nelle fasi precoci del suo sviluppo è in grado di accumulare alti livelli di questo glucoside nei tessuti vegetali, anche in funzione dei fattori ambientali, climatici e varietali. L'uso di quest'essenza per risanare i suoli agricoli può essere una valida alternativa ai prodotti di sintesi in un contesto di contrazione e limitazione d'uso dei prodotti fitosanitari.

ABSTRACT

Durrin is a cyanogenic glycoside produced in the biosynthetic pathway from the aromatic amino acid L-tyrosine, in which hydrocyanic acid (HCN), a toxic substance that interferes with respiratory metabolism, is generated. Durrin is produced through the secondary metabolism of various plant families, having a function of protection against biotic and abiotic stresses. This biomolecule consists of a sugar, a phenolic group, and a cyanide group bound to a chiral carbon through covalent bonds. Recently, it has been demonstrated that this metabolite can be used in agriculture to remediate agricultural soils through biofumigation interventions. These interventions involve chopping and burying of plant residues, which once into soil, release the biocidal HCN. High concentrations of Durrin in plants of green manuring can effectively control populations of soilborne pathogens such as nematodes and increase yields, replacing synthetic products commonly used for the same purpose. *Sorghum bicolor* is a cereal, capable of accumulating high levels of this Durrin in its tissues during its early growth stages, depending on the environmental conditions, especially climate, and on the variety. The use of this sorghum as green manure for biological control in agriculture can be a viable and sustainable alternative to synthetic products in a context of reduced and restricted use of phytosanitary products.

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	2
INDICE.....	3
Capitolo 1	4
INTRODUZIONE	4
1.1 Introduzione.....	4
1.2 Scopo della tesi.....	6
CAPITOLO 2: La durrina.....	8
2.1 Il ruolo dei glucosidi cianogenici.	8
2.2 Dal metabolismo primario alla biosintesi della durrina.	9
2.2.1 Schema delle vie metaboliche coinvolte nella biosintesi della durrina	10
2.3 Biosintesi della durrina, particolari ed enzimi coinvolti.	14
2.3.1 Caratterizzazione del complesso enzimatico della via biosintetica della durrina.	17
Capitolo 3: La biofumigazione.....	19
3.1 Generalità e caratteristiche botaniche di <i>Sorghum bicolor</i>	19
3.2 Le cover crop e la biofumigazione.....	20
3.3 L'attività dell'HCN nel suolo	21
3.4 Generalità dei nematodi fitoparassiti	22
3.4.1 Morfologia dei nematodi.	23
3.5 Valutazione dell'effetto biofumigante, del sorgo (tratto da Djian-Caporalino et al. 2019.).....	24
3.6 Conclusioni	26
Ringraziamenti	28
BIBLIOGRAFIA.....	29

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Introduzione

L'utilizzo di sostanze chimiche di sintesi in agricoltura ha rivestito e riveste tutt'oggi un ruolo centrale per aumentare le rese, difendere e migliorare la qualità delle produzioni vegetali. Dalla scoperta dei primi principi attivi per la protezione contro i diversi fattori biotici alla creazione dei fertilizzanti di sintesi, molte sono le molecole prodotte ed utilizzate dalla metà del XIX secolo. Esse, insieme al miglioramento genetico e alla meccanizzazione, hanno contribuito all'aumento della produzione media per ettaro, con la possibilità di eliminare velocemente molte problematiche, che limitavano gli obiettivi di produzione aziendale. L'aumento della produttività e quindi l'intensificazione dell'attività agricola, tuttavia, non è priva di effetti collaterali. I concimi minerali, ad esempio, permettono da un lato, di andare incontro a tutti i fabbisogni nutritivi delle colture aumentando la resa ma dall'altro, anni di agricoltura intensiva, unita alle profonde lavorazioni meccaniche del terreno, hanno contribuito fortemente alla riduzione della fertilità fisica, chimica e biologica dei suoli. La degradazione dei suoli agricoli è dovuta alla riduzione dei nutrienti disponibili, perché asportati in misura maggiore di quanto reintegrati e alla lisciviazione delle quote non assorbite dalle colture con conseguente inquinamento delle falde idriche, all'eccessiva mineralizzazione della sostanza organica dovuta al rivoltamento di strati profondi del suolo con la conseguente disintegrazione degli aggregati del terreno che aumenta il potere ossidativo dei microrganismi tellurici. Anche l'uso massivo di fitofarmaci, presenta effetti negativi: l'insorgenza di fenomeni di resistenza, la comparsa di fitofagi indotti, gli effetti aspecifici dei principi attivi con squilibrio biologico dell'agroecosistema, il bioaccumulo e la loro tossicità acuta e cronica hanno determinato nel tempo, un graduale interesse verso altre metodologie di lotta che si discostano sempre più dalla tradizionale lotta chimica. Molti sono i principi attivi revocati ogni anno quindi non più a disposizione delle aziende, creando non poche problematiche nella gestione sia delle erbe infestanti e degli organismi nocivi. Alla luce della nuova Politica Agricola Comunitaria (PAC 2023-2027) è ormai chiara la necessità di ridurre l'impatto ambientale dell'agricoltura (www.reterurale.it). Per il conseguimento degli ambiziosi obiettivi di sostenibilità ambientale c'è un forte sostegno all'agricoltura biologica, con sostegni alle aziende che limitano l'uso di agrofarmaci, antibiotici e concimi minerali, dimostrandosi più virtuose nelle pratiche agricole, seguendo i maggiori vincoli legati a questa certificazione. Uno di questi obiettivi, fissato con la strategia "farm to fork" è aumentare la

superficie agricola condotta in regime biologico, arrivando ad un 25% della superficie agricola totale entro il 2027. Tra le pratiche più utilizzate in tale regime, troviamo la tecnica del sovescio. La gestione del terreno agrario con questa pratica permette di godere di alcuni vantaggi che, possono portare al beneficio di più esternalità positive. Tra di esse si annoverano: il mantenimento della fertilità del suolo col reintegro della sostanza organica, una miglior struttura del suolo e la riduzione di fenomeni di erosione. Se opportunamente trinciate ed interrate, alcune piante possono anche avere una significativa azione biofumigante, offrendo una valida alternativa ai nematocidi di sintesi. Questa pratica permetterebbe alle aziende biologiche di proteggere le loro colture rimanendo all'interno degli stringenti vincoli normativi sull'utilizzo di prodotti di sintesi.

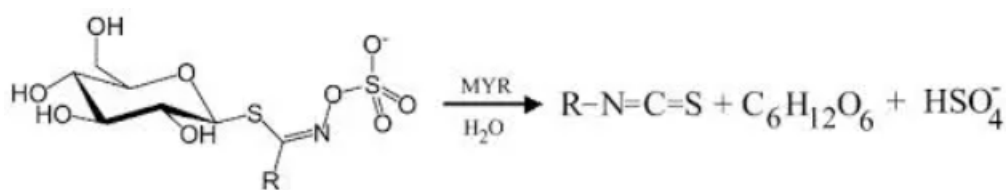
Alcune famiglie botaniche possono essere efficacemente utilizzate per il controllo sugli organismi fitopatogeni del suolo. Tra i generi e le specie utilizzabili a tale scopo ritroviamo il rafano, la senape, la rucola e il sorgo. Queste piante, in monocoltura o associazione possono essere utilizzate come biofumiganti naturali in pieno campo e in ambiente protetto. La biofumigazione prevede l'incorporazione di materiale vegetale trinciato nel suolo o nel substrato di coltivazione, nel quale sono rilasciati i metaboliti che hanno un effetto tossico sui nematodi fitoparassitari e altri fitopatogeni del suolo. Nell'attività agricola si hanno spesso problemi con infestazioni di nematodi che portano alla formazione di galle e "tuberi" radicali che non consentono alla radice di svolgere la normale funzione di assorbimento dei nutrienti, e le espongono all'attacco di patogeni secondari. Ne conseguono cali di resa, graduale deperimento che può portare alla morte della pianta. Tra le colture più colpite ci sono molte cucurbitacee quali melone, zucchino, anguria, pomodoro, carota, bietola e patata.

I nematodi fitoparassiti rappresentano una minaccia significativa per la sicurezza alimentare globale, i danni direttamente imputabili a questi organismi sono difficilmente quantificabili ma molto consistenti, uno studio economico ha stimato, considerando ventuno differenti colture, che le perdite globalmente sono nell'ordine di 77 miliardi di dollari (Barker, Kenneth R. 1998). I sintomi spesso sono difficili da individuare poiché non sono specifici. Come detto in precedenza, la ridotta disponibilità di agrofarmaci ammessi insieme alla necessità di ridurre gli input chimici in agricoltura limitano le opzioni a disposizione delle aziende agricole per la disinfezione del terreno prima della messa a dimora della coltura. Per le aziende che operano in regime di agricoltura convenzionale i principi attivi disponibili sono il Dazomet ed il Metam, entrambi contenuti in diversi prodotti commerciali, ma destinati ad uscire di produzione in tempi brevi. Ad esempio, l'autorizzazione all'impiego dell'azadiractina scade il 31/8/2024 ([Banca dati Prodotti Fitosanitari \(sian.it\)](http://Banca dati Prodotti Fitosanitari (sian.it))).

In regime di agricoltura biologica non vi sono prodotti chimici di sintesi utilizzabili e si opera generalmente con trattamenti fisici, quali la solarizzazione e il sovescio che, tuttavia, non preservano le colture da problemi riconducibili ad attacchi da nematodi. Alcuni prodotti a base d'estratto d'aglio

hanno mostrato una minima efficacia contro i nematodi fitopatogeni. Nella biofumigazione con Brassicaceae l'effetto biocida è dovuto al rilascio nel suolo di isotiocianati, nitrili, tiocianati ed eptenonitrili, prodotti conseguente all'idrolisi dei glucosinolati. La reazione di idrolisi è catalizzata dall'enzima mirosinasi, una solfatasi che scinde legami tiolici complessi presenti nei glucosidi cianogenici (Figura 1). Questi metaboliti secondari, normalmente si trovano nei vacuoli, ciò per evitare, all'interno della cellula stessa il contatto mirosinasi-glucosinolati che porterebbe a fenomeni di autotossicità. Alla rottura delle cellule vegetali però, viene meno questa compartimentalizzazione, si formano così i diversi composti biofumiganti. Passando invece alla famiglia delle Poaceae, nello specifico nel genere *Sorghum*, troviamo un'altra classe di biomolecole, i glucosidi cianogenici; anch'essi sono frutto del metabolismo secondario, la molecola più studiata e consistente nei tessuti di queste piante è rappresentata dalla durrina che in *Sorghum bicolor* può rappresentare fino al 30% del peso secco degli apici in accrescimento (Dutta et al. 2019).

Figura 1. Esempio di reazione catalizzata dalla mirosinasi.



1.2 Scopo della tesi

L'intento del mio lavoro di tesi di laurea è di fare il punto sulle conoscenze delle reazioni biochimiche che portano alla formazione e all'accumulo nei tessuti vegetali di molecole che possono anche avere un'azione biofumigante del suolo, in particolare sul metabolismo secondario in *Sorghum bicolor*. Il principale composto nel caso della coltura considerata è la durrina, un glucoside cianogenico presente soprattutto nelle fasi di attivo accrescimento della pianta. Si accumula nelle foglie, negli apici in accrescimento con funzione principalmente di difesa dagli erbivori ed insetti fitofagi. Al completamento della maturazione si ha diminuzione della concentrazione della molecola fino a livelli non rilevabili alla fine del ciclo biologico della pianta. La granella matura ne è priva e la restante biomassa prodotta può essere insilata a silosorgo, usato come foraggio per la zootecnia. Ho inoltre approfondito i molteplici effetti, anche negativi, che la presenza di tale molecola potrebbe avere nel suolo. In particolare, ho valutato come gli effetti ambientali possano alterare l'accumulo della molecola, sul meccanismo della sua tossicità, sulla sua persistenza, sul possibile effetto di fitotossicità del glucoside sulla coltura trapiantata in seguito e quindi sui tempi di sicurezza da rispettare. Il riscaldamento globale dato dal cambiamento climatico, agevola la coltivazione del sorgo anche in

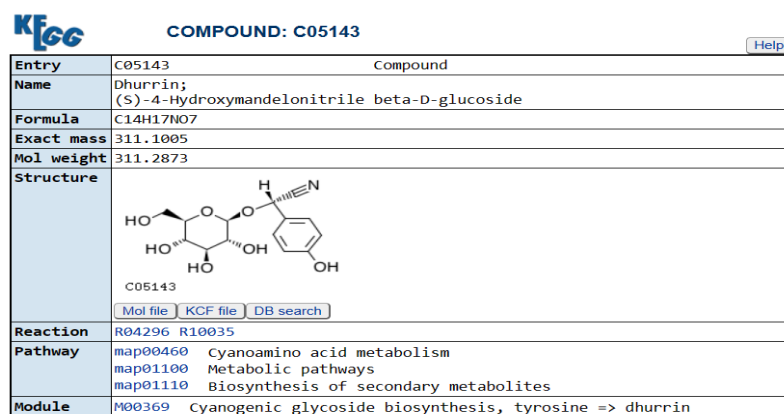
Pianura Padana, periodi di forte siccità e di carenza idrica in futuro saranno fenomeni estremi sempre più frequenti, il sorgo essendo una coltura molto adattata a queste nuove condizioni, suscita un crescente interesse. Temperature medie più alte potrebbero velocizzarne il ciclo di sviluppo, che se paragonato ad altri cereali, nella fase iniziale è più lento; arrivando quindi più rapidamente alla fenofase più idonea alla trinciatura, che rimane comunque precoce, fase dove, in relazione alla varietà e ambiente il glucoside è ben concentrato. Nella mia tesi, mi concentro sul *Sorghum bicolor* come coltura intercalare da sovescio, in serra o in pieno campo, da trinciatura in fase precoce.

CAPITOLO 2: La durrina

2.1 Il ruolo dei glucosidi cianogenici.

Essendo organismi sessili, le piante hanno evoluto vie metaboliche che producono un gran numero di metaboliti che costituiscono veri e propri arsenali chimici difensivi (Gatehouse et al. 2002) per contrastare gli stress biotici ed abiotici. Le sostanze bio-attive in questione sono molteplici e possono essere distinte in fitoanticipine e fitoalessine (Mithöfer et al.2012). La differenza tra i due gruppi è che nel primo caso, queste sono sintetizzate in maniera costitutiva, quindi, presenti sempre nei tessuti della pianta, mentre la sintesi delle seconde è indotta da un “attacco” esterno. Tra queste sostanze, che rivestono un ruolo chiave nell’interazione piante-insetti (Dar et al. 2023), troviamo i glucosidi cianogenici che svolgono un ruolo di deterrenza verso erbivori, insetti fitofagi e nematodi. Essi fanno parte del gruppo delle fitoanticipine, ed esplicano la loro azione tossica solo in seguito ad ingestione di tessuti della pianta, in seguito alla digestione delle cellule con la rottura dei compartimenti sub-cellulari. Questa famiglia di molecole è prodotta costitutivamente da più di 3000 specie di piante. Chimicamente sono composti che derivano dal metabolismo degli amminoacidi aromatici e presentano il gruppo nitrile. Si trovano nel tessuto vegetale nella loro forma glucosilata, in quanto è una forma che permette alla molecola di non essere tossica e troppo reattiva, in modo da evitare fenomeni di auto tossicità. Partecipano inoltre nel processo di germinazione, nella regolazione dello stress ossidativo e anche nel trasporto all’interno del vegetale di carbonio e azoto. La Durrina (Figura 2), nome lupac, [(S)-4-idrossimandelonitrile-β-D-glucopiranosio], è una delle principali molecole appartenenti a questa categoria, identificata per la prima volta in *Sorghum bicolor* e da qui ampiamente studiata (Ballhorn et al., 2009), essendo anche un composto azotato immagazzina quindi azoto e funge da osmoregolatore, aiutando la pianta a tollerare meglio anche gli stress abiotici (come lo stress idrico e le basse temperature). (Cowan et al. 2022).

Figura 2. Formula di struttura della durrina e suo inquadramento metabolico dato dal software metabolomico Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).



Osservando la struttura molecolare del glucoside cianogenico è possibile distinguere una porzione costituita da β D-glucosio in forma ciclica emiacetalica, tale struttura glucidica è unita al resto della molecola per mezzo di un atomo di ossigeno che fa da ponte tra il C anomero dello zucchero ed un altro atomo di C chirale, legato con legami covalenti a quattro sostituenti che sono: un gruppo fenolo, un gruppo nitrile ($-C\equiv N$) ed un atomo di idrogeno, che fa da quarto e ultimo possibile sostituito. Negli organismi vegetali la porzione glicosidica della molecola deriva dal metabolismo primario, in particolare dalla fotosintesi clorofilliana, mentre la restante porzione deriva da successive modifiche attuate sull'amminoacido aromatico L-tirosina.

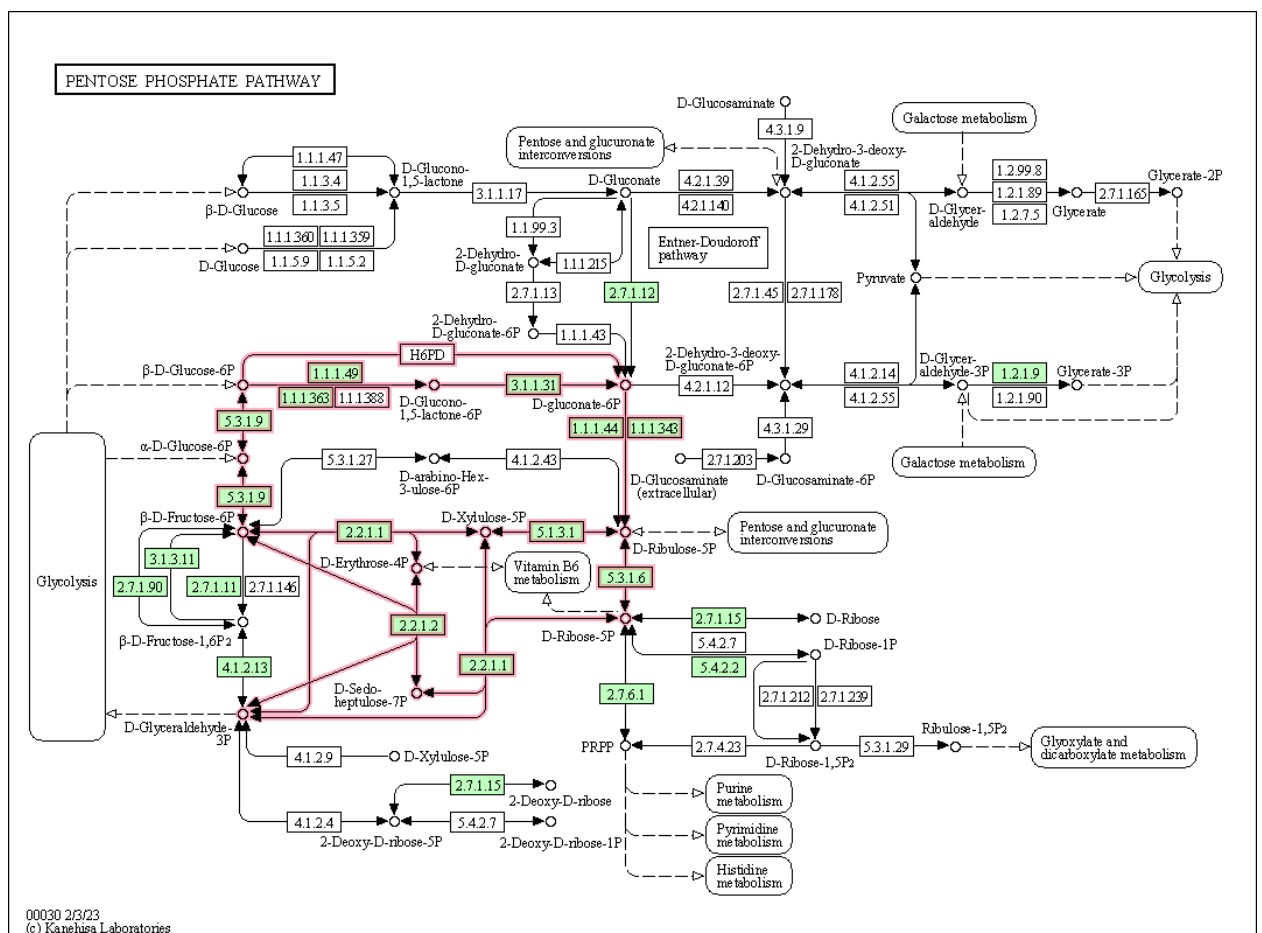
2.2 Dal metabolismo primario alla biosintesi della durrina.

La durrina come molti altri metaboliti secondari è il prodotto di una serie di reazioni biochimiche, tali vie metaboliche sono definite secondarie in quanto partono dalle molecole sintetizzate del metabolismo primario. Le molecole di partenza, quindi, sono le stesse che si ritrovano nelle vie metaboliche di base, ed esse sono molteplici, tra cui ricordo la fotosintesi, la glicolisi, il ciclo di Krebs, la gluconeogenesi e la via dei pentosi fosfato. Le diverse vie metaboliche sono tra loro interconnesse e spesso i prodotti o gli intermedi di una via partecipano a reazioni presenti negli altri processi, regolandosi vicendevolmente. Facendo sempre riferimento al glucoside quindi, l'aldo-esoso presente nella molecola, proviene principalmente dal processo di fotosintesi e gluconeogenesi. Mentre L-tirosina da qui origina la restante porzione deriva dal metabolismo degli amminoacidi aromatici, che partendo dalla molecola di eritrosio-4 fosfato, zucchero a quattro atomi di carbonio, intermedio sia dalla via dei pentosi fosfato che del ciclo di Calvin-Benson. In quest'ultima, permette la rigenerazione del 1,5 ribulosio bisfosfato che permetterà in seguito all'enzima RUBISCO di organizzare su quest'ultimo zucchero fosforilato un'altra molecola di anidride carbonica. L'eritrosio-4 fosfato passa quindi da una serie di reazioni che prende il nome di via dell'acido shichimico dal quale viene bio-sintetizzato l'acido corismico, capostipite di diversi amminoacidi aromatici come la fenilalanina, il triptofano e anche la tirosina.

Di seguito presento schematicamente le vie metaboliche di base per poi descrivere nel dettaglio le reazioni della fase finale di biosintesi del glucoside, in quanto la complessità, l'intrecciarsi ed i molti dettagli presenti nelle diverse reazioni che costituiscono il metabolismo primario, toglierebbe troppo spazio all'argomento principale della presente tesi. L'intento del prossimo paragrafo è quello di far emergere integralmente il percorso biosintetico del glucoside a partire dai metaboliti primari.

bisogno di ATP per procedere, dopo di che, alla formazione dei triosi fosfato (gliceraldeide 3P e diidrossiacetone-3P) si ha l'ossidazione dei successivi composti, fino alla formazione del piruvato, intermedio a 3 atomi di carbonio che all'interno dei mitocondri verrà ulteriormente ossidato tramite il processo di respirazione cellulare, con produzione di anidride carbonica e acqua nel ciclo dell'acido citrico. La gluconeogenesi (figura 2.2) è una via anabolica che permette di produrre glucosio utilizzando ATP e NADPH₂. Indipendentemente dalla fotosintesi, la via è attiva nel citoplasma di tutte le cellule vegetali, comprese quelle non fotosintetizzanti, sostiene la vita delle cellule nei periodi di ridotta fotosintesi, come il periodo invernale. Nel processo, a livello dell'acido 2-fosfoglicerico le reazioni a valle e gli enzimi coinvolti sono i medesimi della glicolisi, le due vie quindi, si autoregolano vicendevolmente ed il procedere dell'una o dell'altra dipende dalla quantità di glucosio disponibile nelle cellule e dalla concentrazione molare di ATP e AMP presenti nel citoplasma cellulare. In particolare la fosfofruttochinasi cambia la sua affinità verso i substrati al variare della concentrazione dei due cofattori.

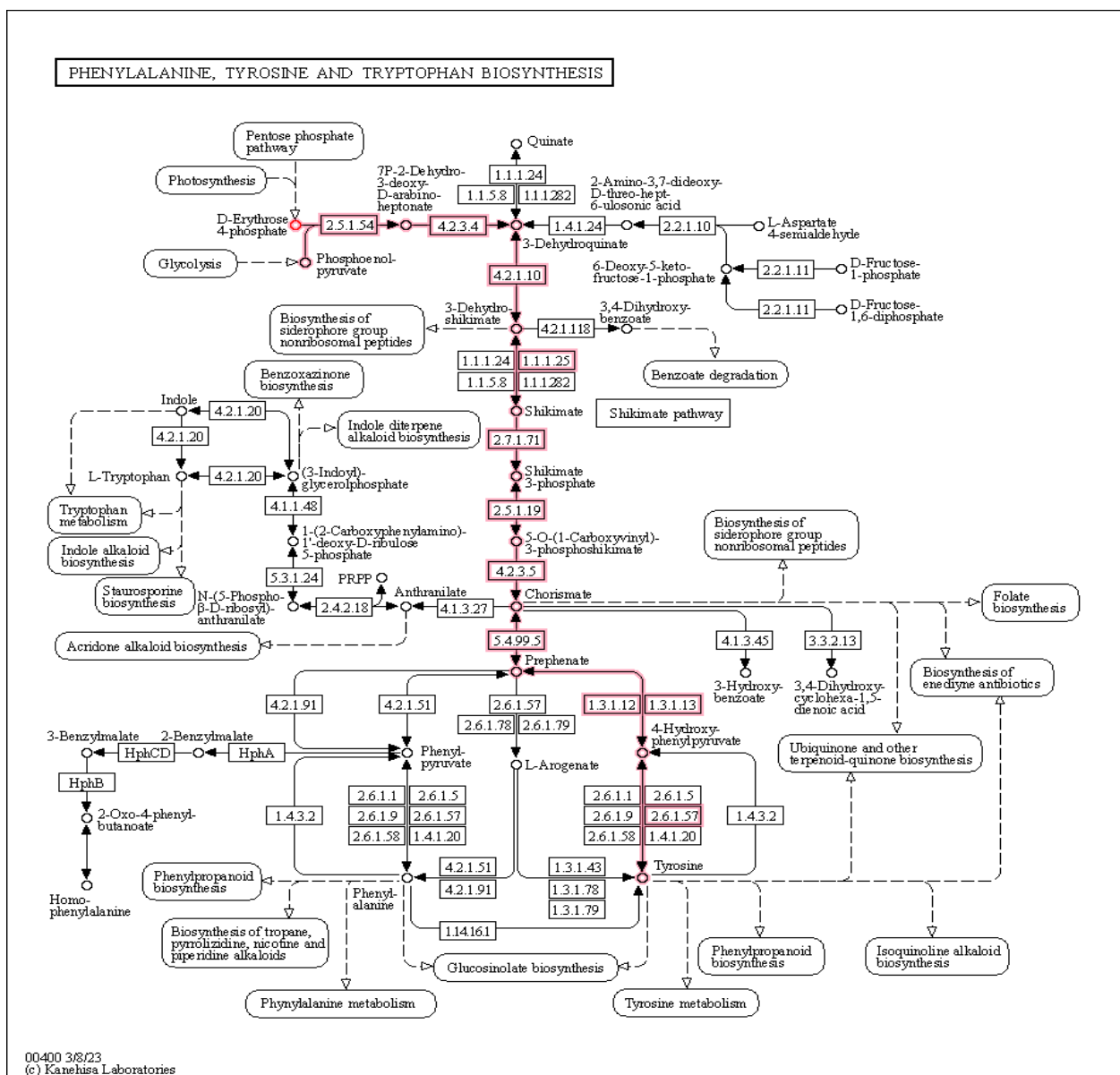
Figura 2.3: evidenziata in rosso la via dei pentosi fosfato ed alcuni enzimi coinvolti. Fonte KEGG.



Legenda figura 2.3: 1.1.1.363 / 1.1.1.49 → Glucosio-6P-deidrogenasi; 3.1.1.31 → 6-fosfogluconolattionasi; 1.1.1.44/1.1.1.343 → 6-fosfoglucono deidrogenasi; 5.3.1.6 → ribosio 5P isomerasi; 5.1.3.1 → ribuliosio 5P epimerasi; 2.2.1.1 → transchetolasi; 2.2.1.2 → transaldolasi.

Con la via dei pentosi fosfato (figura 2.3), si ha la formazione di diversi zuccheri importanti in molte altre vie biosintetiche, le prime reazioni consistono nell'ossidazione del glucosio con formazione di potere riducente stoccato nella molecola di nicotinammide-adenin-dinucleotide fosfato (NADPH₂), la seconda parte del processo consiste in una fase non ossidativa dove gli enzimi transchetolasi e tranaldolasi interconvertono tra loro diversi zuccheri, producendo tra questi anche l'eritrosio-4P. Questo processo evolutivamente parlando è molto antico e avviene indipendentemente nei cloroplasti, mitocondri e nel citoplasma cellulare.

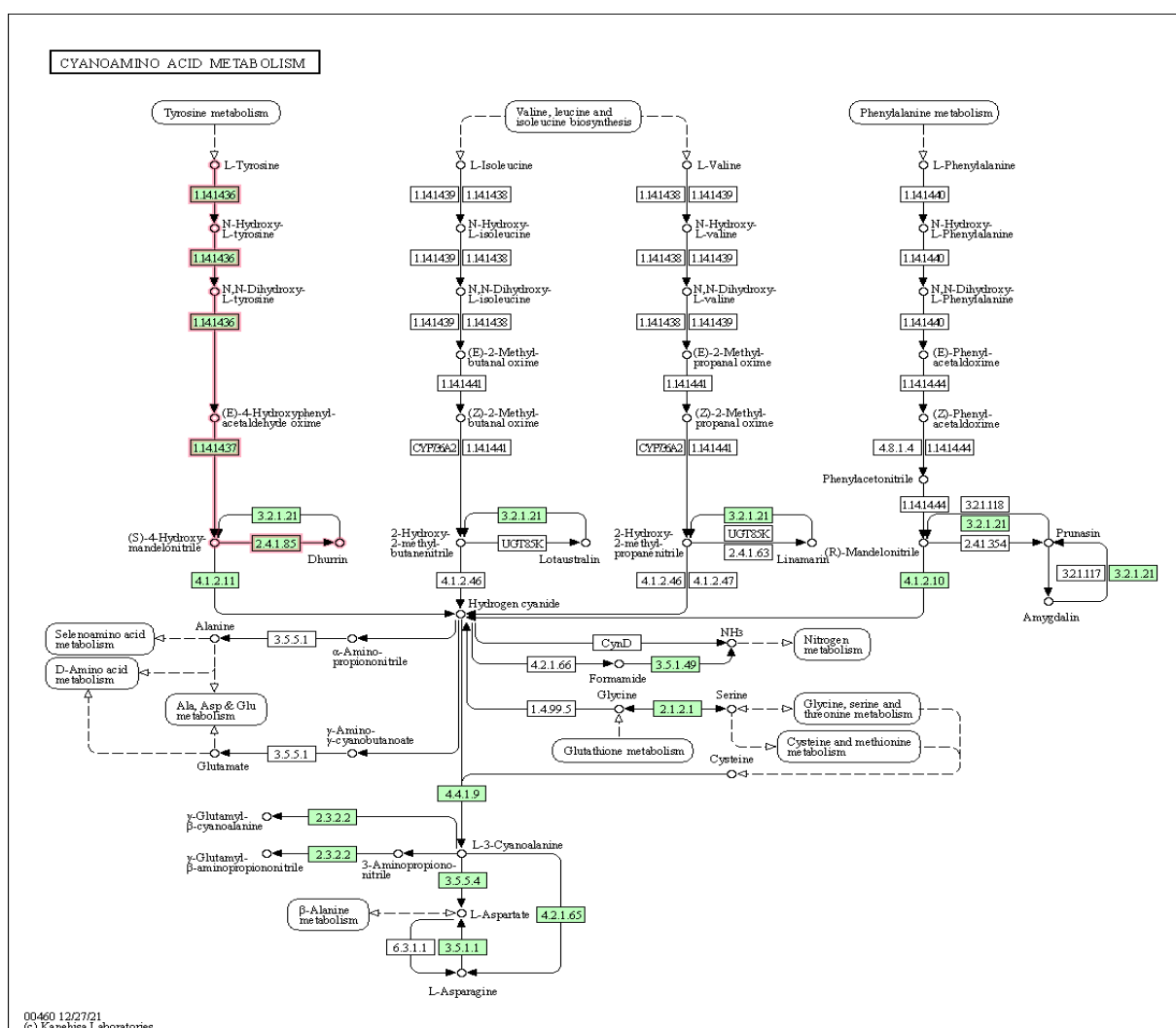
Figura 2.4: via dell'acido shichimico e biosintesi della tirosina a partire dall'acido corismico con i principali enzimi coinvolti. Fonte KEGG.



Legenda figura 2.4: 2.5.1.54 → D-eritrosio-4 fosfato liasi; 4.2.3.4 → deidrochinato sintetasi; 4.2.1.10 → deidrochinasi; 1.1.1.25 → shichimato deidrogenasi; 2.7.1.71 → shichimato-chinasi; 2.5.1.19 → enol-piruvil-shichimato-fosfato-sintetasi; 4.2.3.5 → corismato-sintetasi; 5.4.99.5 → corismato-mutasi; 1.3.1.12 → prefenato deidrogenasi; 2.6.1.57 → aminoacido aromatico transferasi.

La via dell'acido shichimico (figura 2.4) consiste in una serie di complesse reazioni che avvengono nei cloroplasti e nel citoplasma cellulare, si parte dall'eritrosio 4P e dal fosfoenol-piruvato, per arrivare, grazie al consumo di ATP e NADPH₂ all'acido corismico, importante molecola da qui dipartono differenti vie metaboliche che porteranno alla biosintesi dei diversi aminoacidi aromatici. Da questi verranno prodotti molti metaboliti secondari come: l'acido indolacetico con funzione ormonale, a partire dal triptofano, la lignina, i flavonoidi, pigmenti e anche i glucosidi cianogeni come la durrina.

Figura 2.5: Biosintesi della durrina. Da notare come altri aminoacidi sia aromatici che non, attraverso altre vie producano altre tipologie di glucosidi cianogenici, come l'amigdalina, la prunasina e linamarina. Fonte KEGG.



Legenda figura 2.5: 1.14.14.36 → L-tirosina N-monossigenasi (CYP79A1); 1.14.14.37 → citocromo P450 NADPH-reduttasi (CYP71E1); 2.4.1.85 → β-cianidrina glucosil-transferasi (UGT85B1); 3.2.1.21 → β-glucosidasi; 4.1.2.11 → α-idrossi-nitril-liasi. La durrina quindi, è sintetizzata da una serie di reazioni a partire dall'amminoacido L – Tirosina;

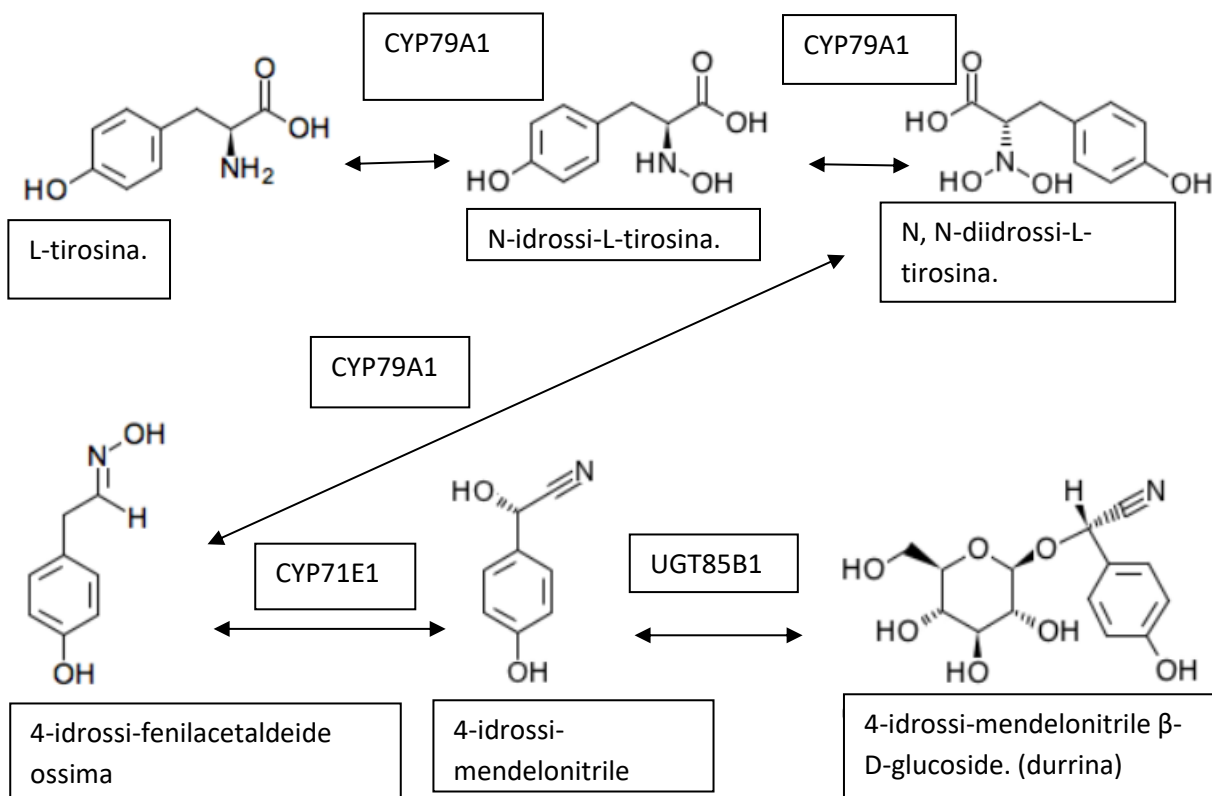
Le reazioni sono catalizzate da enzimi ancorati alla membrana del reticolo endoplasmatico. Sull'organello sono tre le proteine di membrana coinvolte: il citocromo P450 ossidoreduttasi NADPH dipendente (POR), due enzimi di membrana sempre appartenenti alla famiglia delle P450 (CYP79A1 e CYP71E1) ed infine un enzima libero nel citoplasma, l'UGT85B1 (uridina difosfato glicosil transferasi) che catalizza la reazione di glucosilazione (Thayer et al.1981). Quest' ultima reazione rende più stabile e meno reattivo il composto nella cellula.

Nel sorgo, avvenuta la reazione di condensazione, la molecola è trasferita all'interno del vacuolo grazie alla presenza di specifiche proteine di trasporto presenti sulla superficie esterna dell'organello, dove è tenuto separato dai due enzimi β -glucosidasi e α -idrossinitril-liasi. Infatti, nelle foglie del sorgo in fase giovanile le cellule dell'epidermide accumulano la durrina in alta concentrazione nei vacuoli, mentre nelle cellule del mesofilo fogliare la troviamo rispettivamente nel citosol e nei cloroplasti nei quali gli enzimi α -idrossinitril-liasi e β -glucosidasi liberano l'HCN (Thayer et al.1981).

La conoscenza dell'istochimica fogliare del sorgo consente di comprendere come per avere l'effetto biofumigante dalla liberazione dell'HCN sia, importante utilizzare tessuti di piante giovani e disgregare completamente i tessuti vegetali per distruggere la compartimentalizzazione cellulare.

2.3 Biosintesi della durrina, particolari ed enzimi coinvolti.

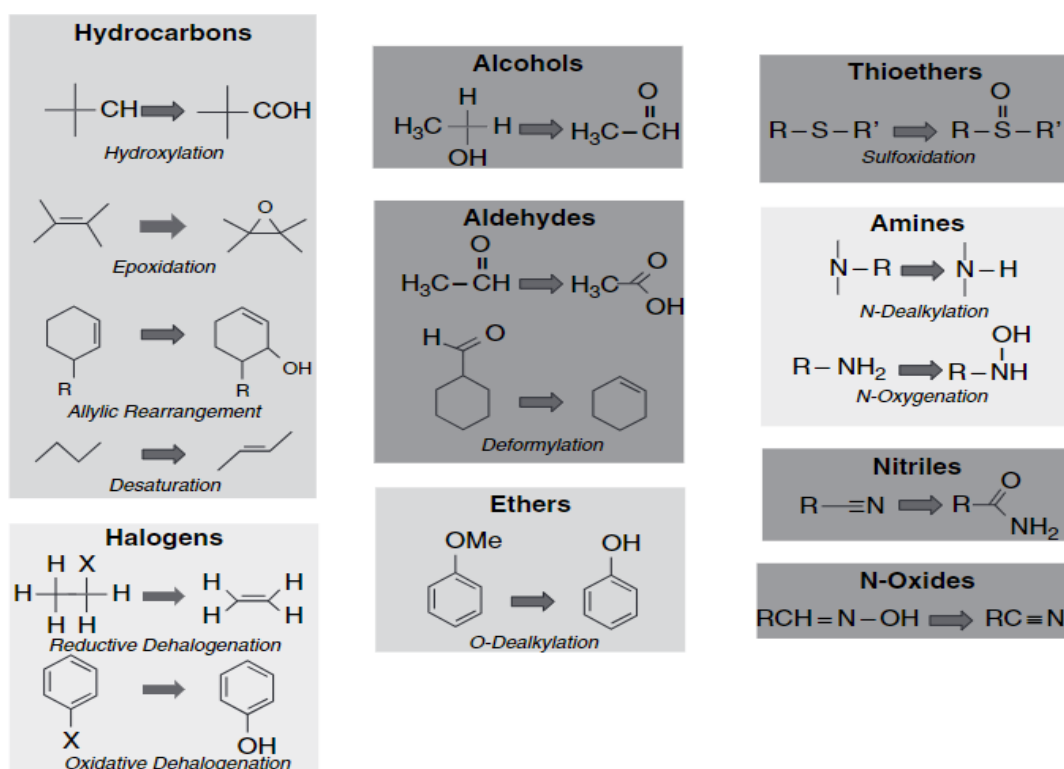
Figura 2.5: enzimi coinvolti e molecole prodotte durante la biosintesi della durrina. Strutture molecolari tratte da KEEG.



Gli enzimi CYP79A1 (tirosina monossigenasi) e CYP71E1 (4-idrossifenilacetaldeide ossime monoossigenasi) sono due proteine di membrana del reticolo endoplasmatico delle cellule vegetali che appartengono ad un'ampio gruppo di proteine, chiamato delle citocromo P450 mono/di-ossigenasi che catalizzano i primi step chiave della via biosintetica. Sono diverse proteine codificate da altrettanti geni, tanto da richiedere per la loro classificazione una propria nomenclatura suddivisa in famiglie e sottofamiglie. Nel caso dei due enzimi sopra citati la radice del codice di annotazione 'CYP' indica che la proteina in questione fa parte del gruppo dei citocromi P450, mentre il numero indica la famiglia di appartenenza identificando il gene che codifica la catena polipeptidica, la lettera che segue definisce la sottofamiglia, mentre l'ultimo numero indica il gene della sottofamiglia che codifica la struttura primaria della catena polipeptidica. Le famiglie di proteine P450 presenti nelle piante ad oggi conosciute stanno nell'intervallo dalle CYP71 alle CYP99. In generale le "CYP proteins" sono presenti in tutti gli organismi viventi ed intervengono nella produzione di molti intermedi in molte vie biosintetiche essendo in grado sia di ossidare che di ossigenare (aggiungendo uno o due atomi di ossigeno al substrato), è da questa loro capacità di ossigenare e quindi di trasferire elettroni dal substrato di partenza che a queste proteine viene data la denominazione generica di "citocromi". (Poulos et al.2007)

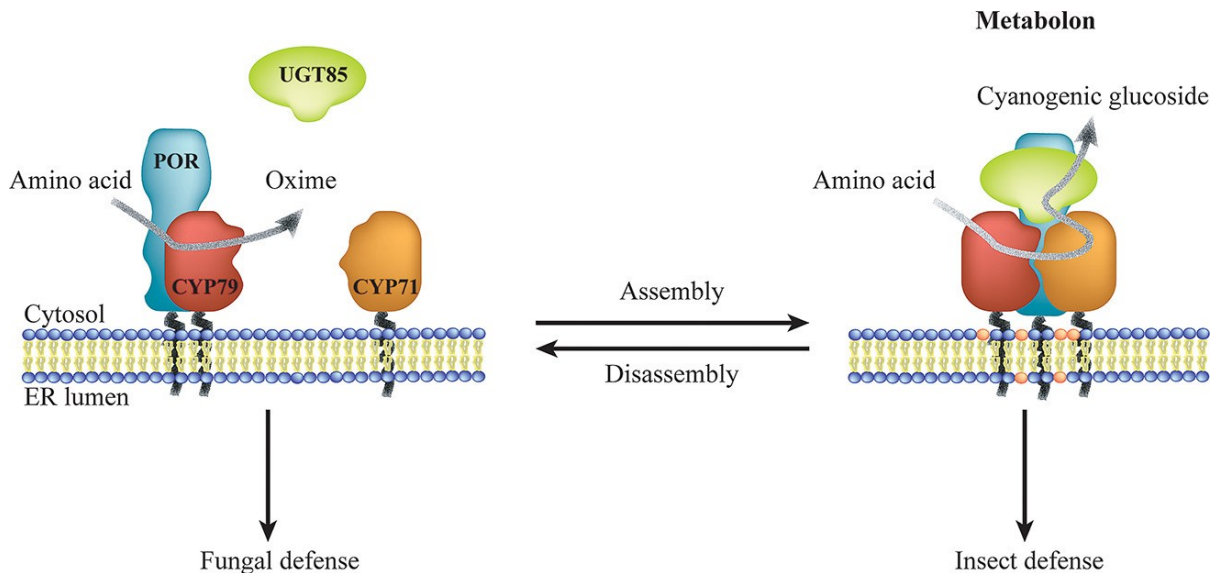
Figura 2.6: Alcune vie metaboliche in qui sono coinvolte le P450. Immagine tratta da: Poulos e Maharena, 2007.

DIVERSITIES AND SIMILARITIES IN P450 SYSTEMS



Questi enzimi di membrana nella sintesi del glucoside si organizzano in quelli che vengono chiamati “metaboloni”, cioè clusters di più proteine enzimatiche che hanno capacità di associarsi. Gli enzimi coinvolti interagendo tra loro, riescono a “canalizzare” i diversi step di reazione impedendo la perdita di metaboliti intermedi tossici o poco stabili, liberando solamente il prodotto finale della via metabolica, aumentando l’efficienza della via biosintetica. Per un efficiente canalizzazione delle varie reazioni, tra un enzima e il successivo, la distanza tra gli enzimi coinvolti deve essere dell’ordine dei 0.1-1 nm. Ciò si realizza attraverso l’interazione reciproca tra le diverse proteine del metabolone. L’interazione consiste nella formazione di legami deboli di natura elettrostatica, dove un ruolo importante è giocato dalla conformazione spaziale delle proteine e dalle cariche portate dalle teste polari dei lipidi prossimali al metabolone, che formano il doppio strato lipidico del reticolo endoplasmatico. Queste forze deboli consentono all’ ‘aggregato enzimatico’ di essere dinamico (figura 2.7), in grado quindi di assemblarsi e disassemblarsi in risposta agli stimoli ambientali. (Knudsen, C. *et al.* 2018).

Figura 2.7: esempio di metabolismo dinamico, in risposta a stimoli ambientali, all’occorrenza il metabolone può disassemblarsi producendo nel caso della via metabolica della durrina il 4-idrossi-acetaldeide-ossima, intermedio con proprietà antifungine. Fonte: Knudsen et al. 2018.



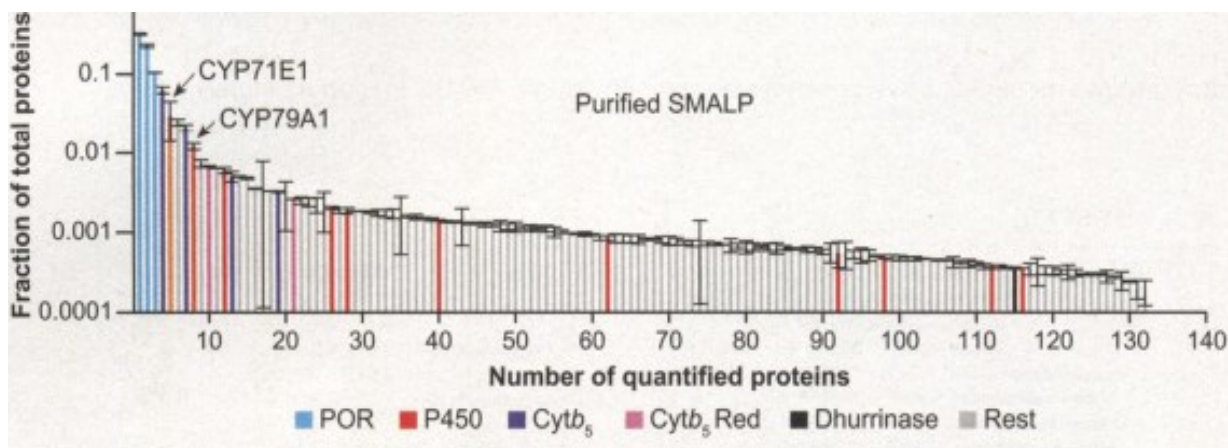
Nello specifico, la sintesi della durrina richiede che i due enzimi P450 si associno al citocromo P450 ossidoreduttasi NADPH dipendente (POR), che trasferirà gli elettroni provenienti dal NADPH₂ presenti nel citosol cellulare alle due proteine CYP. Il CYP79A1 catalizza le prime reazioni di ossigenazione della L-tirosina fino alla formazione del 4-idrossi-fenilacetaldeide. La prossimalità del successivo enzima CYP71E1, come già accennato in precedenza permette di convertire velocemente l’intermedio in 4-

idrossi-mendelonitrile, una cianidrina, che essendo potenzialmente tossico per la stessa pianta viene immediatamente convertito dal enzima cianidrina β -glucosiltransferasi (UGT85B1) che catalizza il trasferimento di una molecola di glucosio presente sulla molecola di uridinadifosfogluco (UDP-glucose) alla cianidrina (Laursen et al. 2015). Questa reazione permette alla molecola di essere più stabile e non citotossica alle cellule dei tessuti del sorgo.

2.3.1 Caratterizzazione del complesso enzimatico della via biosintetica della durrina.

Di tutte le proteine di membrana caratterizzate si stima che l'1% di esse sono coinvolte nella sintesi del glucoside cianogenico, ma in piantine giovani di sorgo sono stati rilevati valori sul peso secco di durrina che possono arrivare fino al 30%. La spiegazione di tale efficienza deriva proprio dalla formazione di questo complesso enzimatico che "canalizza" in modo efficiente L-tirosina in durrina. Queste informazioni sono state ottenute da ricerche (Laursen et al. 2016) che hanno migliorato la caratterizzazione del metabolone, del reticolo endoplasmatico delle cellule epidermiche del sorgo, che se solubilizzato in tensioattivi si dissociano. Utilizzando un polimero di acido stiren-maleico che si riesce a integrare alla doppia membrana fosfolipidica mantenendo inalterati i complessi delle proteine di membrana pre-esistenti, formando SMALPS (Small Nanodiscs by Alternating Polymer Systems) nanostrutture a forma di disco costituite dai lipidi di membrana con le loro proteine e dall'acido stiren-maleico che, purificate possono essere identificate mediante spettroscopia di massa. Con questo metodo sono state quantificate 132 proteine di membrana tra cui le due P450 che intervengono nella sintesi del glucoside.

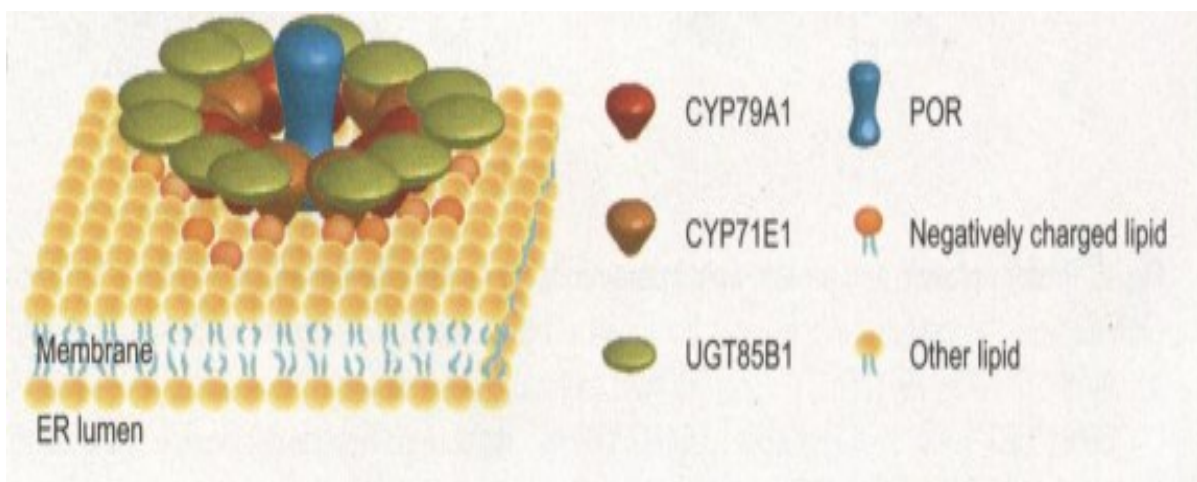
Figura 2.8: Distribuzione delle proteine del reticolo endoplasmatico ottenuta mediante spettroscopia di massa. Fonte Laursen et al. 2016.



Lo studio (Blomstedt et al. 2016) ha inoltre mostrato che in piante di sorgo dove il gene che codifica per la glucosil-transferasi è stato silenziato, si è notata una crescita stentata in suoli con ridotta fertilità, dovuto all'accumulo degli intermedi tossici, che il mutante per sopravvivere deve poi detossificare. Ruolo importante nella stabilità e formazione del metabolone lo hanno anche i fosfolipidi di membrana spazialmente limitrofi al complesso, in particolare l'enzima CYP71E1 sembra lavorare meglio quando le cariche negative portate dalle teste polari dei fosfolipidi sono tra il 20-30% del totale.

Figura 2.9: struttura e organizzazione del complesso enzimatico presente anche in *Sorghum bicolor*.

Fonte: Laursen et al. 2016.



Capitolo 3: La biofumigazione.

3.1 Generalità e caratteristiche botaniche di *Sorghum bicolor*.

Sorghum bicolor, come tutti i cereali fa parte della famiglia botanica delle *Poaceae* come riso, mais, frumento, orzo, segale ed avena. Nello specifico fa parte dei cereali macrotermi, quindi si accresce nel periodo primaverile-estivo, dove le temperature e le condizioni climatiche alle nostre latitudini gli sono più favorevoli. La specie *bicolor* si presenta sul mercato con diverse sottospecie e varietà adatte a diversi utilizzi, per i sorghi da granella nel bacino del mediterraneo, ad esempio, è adatta a tale scopo, la varietà Durra, ma vi sono molte altre sottospecie adatte a climi ancor più caldi o siccitosi, molto usate nel continente africano e molto importanti per i paesi in via di sviluppo. Vi sono poi, sottospecie adatte per la costituzione di foraggio, spesso chiamato “sudangress” dalle quali si ottiene con la falciatura un alimento zootecnico molto grossolano, affienabile solo in piena estate, quando le temperature sono elevate. Una volta tagliato è in grado, anche in Pianura Padana, di ricacciare fino a tre volte in un anno. Per questi usi si impiega la sottospecie sudanese oppure vengono impiegati “ibridi”, termine improprio in quanto sono incroci costituiti tra sottospecie all’interno della stessa specie *bicolor*. A seguire poi, la varietà *saccharatum* adatta per la produzione di biogas e di silosorgo, grazie al suo alto quantitativo di zuccheri facilmente fermentescibili stoccati nella granella e nel fusto. Infine, la varietà *technicum*, un tempo molto utilizzata per la produzione di utensili come le scope, in quanto l’impalcatura dell’infiorescenza una volta essiccata si prestava molto a questa funzione, ormai in disuso dopo l’avvento di materiali plastici.

La pianta è quasi totalmente autogama con bassa percentuale di allogamia, a differenza del mais accetisce già allo stadio di 4-5 foglie, pianta annuale, terofita scaposa. A maturità presenta un’infiorescenza apicale molto ramificata, che prende il nome di “panicolo” (pannocchia molto sviluppata), dove si trovano spighe uniflore fertili portanti un fiore ermafrodita, queste possono presentarsi glabre o irsute. Le spighe in dipendenza della sottospecie possono essere tutte fertili, oppure le stesse possono essere portate a gruppi di 2-3, nel cui gruppo, si può distinguere una spigetta centrale subsessile, che porta il fiore ermafrodita, mentre le restanti si presentano peduncolate e portano un fiore maschile. In seguito all’impollinazione della spigetta fertile si sviluppano le cariossidi. Pianta che svolge la fotosintesi C4 e per questo molto adatta ai climi caldi e siccitosi, in grado quindi di utilizzare in modo molto efficiente la poca acqua presente nel suolo, presenta infatti un coefficiente idrico di 250 mm d’acqua su Kg di sostanza secca prodotta che è circa, il 50% di quello del mais. Presenta radici fascicolate molto assorbenti, che si approfondiscono molto nel terreno ed un palco radicale in più rispetto al mais. Come tutte le *Poaceae* presenta foglie parallelinervie, composte da guaina e lamina fogliare, quest’ultima è lanceolata, larga dai 2 ai 7 cm,

mentre la guaina avvolge il culmo composto da nodi ed internodi, a maturità è pieno e molto robusto, in dipendenza della sottospecie di *Sorghum bicolor* esso può raggiungere mediamente un'altezza che va dal metro fino ai tre (www.agraria.org). Le foglie sono ricoperte di cera e gli stomi infossati consentono a questa tipologia di pianta di perdere meno acqua nell'ambiente circostante. La tecnica di coltivazione e quindi la densità di semina, la concimazione variano molto in relazione alla destinazione d'uso del sorgo che coltiviamo, ambiente di coltivazione, terreno arido o irriguo, precocità dell'ibrido e altre caratteristiche varietali. Questi elementi vanno considerati preventivamente, prima della messa a dimora delle cariossidi. Considerata una pianta da rinnovo, in pianura Padana l'epoca di semina è generalmente tardiva (inizio-metà maggio), questo per le sue elevate esigenze termiche, infatti la cariosside, nel terreno per germinare ha bisogno di raggiungere una temperatura di 15-16° C. La messa a dimora della cariosside può essere di precisione a 3 cm di profondità, con l'interfila che può variare dai 25-30 cm, oppure di 45 cm. Nel controllo delle infestanti è preferibile attuare un diserbo di pre-emergenza, questo per il difficile controllo della "sorghetta" (*Sorghum helepense*) che può causare gravi problemi, nel caso di una sua forte presenza, in quanto con coltura in campo non vi sono erbicidi che riescono a colpire in modo selettivo solo quest'ultimo, evitare quindi di coltivare sorgo, nel caso di forti infestazioni. Caratteristica interessante per gli scopi della mia tesi, di questo cereale è che, dipendentemente dal genotipo e dall'ambiente, è in grado di accumulare nei tessuti in attivo accrescimento elevate concentrazioni di durrina quale fitoanticipina difensiva contro l'erbivoria. Questa peculiarità rende il sorgo (varietà sudanense oppure ibridi) una coltura utilizzabile nella gestione dei fitopatogeni del suolo, soprattutto contro i nematodi mediante biofumigazione.

3.2 Le cover crop e la biofumigazione.

Con il termine "cover crops" ci si riferisce alla coltivazione di diverse tipologie di piante che letteralmente hanno lo scopo di coprire il suolo durante i periodi in cui la coltura da reddito non è presente in campo. Questa pratica, se implementata nella gestione dei terreni agricoli, permette di ottenere diverse tipologie di benefici, prima fra tutte, è sicuramente la capacità delle stesse di proteggere i suoli dall'erosione e dalla lisciviazione dei nutrienti. Le cover crop possono essere distinte in tre gruppi principali:

- green manures (sovesci), solitamente leguminose, queste ad esempio, sono in grado di fissare N nel suolo e quindi renderlo disponibile, in seguito a trinciatura, alla coltura da reddito che successivamente, se ne avvantaggerà, ma possiamo trovare anche altre famiglie botaniche come, ad esempio, il *Sorghum bicolor*, che trinciato ed interrato libererà nel terreno la durrina, con effetto biofumigante.

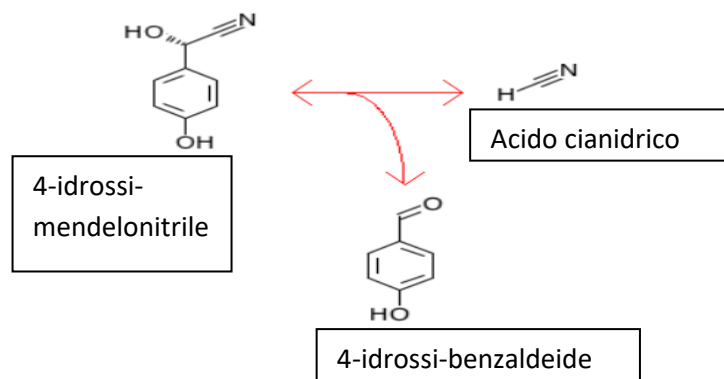
- catch crops, essenze che permettono di trattenere i nutrienti in un periodo in cui la coltura da reddito non è presente e quindi andrebbero persi, limitando l'inquinamento delle falde e l'impovertimento del suolo.
- living mulch, essenze che crescono in contemporanea e continuano a farlo soprattutto dopo la raccolta della coltura da reddito, queste vengono scelte e gestite, in modo che, quando la coltura principale è in crescita, non vi sia competizione con quest'ultima, ma in seguito viene lasciata libera di svilupparsi senza alcun vincolo.

In generale, l'utilizzo delle cover crop riduce l'erosione dei suoli, il run off superficiale, le perdite di nutrienti dal terreno, incrementa la sostanza organica del suolo con effetti positivi sulla fertilità e con effetti di soppressione dei fitopatogeni tellurici. Potenzialmente, le cover crop possono sul lungo periodo, mantenere la produttività dei terreni coltivati e, quindi le rese, riducendo l'inquinamento ambientale. Infine, attuando i giusti sovesci possiamo avere una 'biofumigazione' con riduzioni significative delle fitopatologie con conseguente minor utilizzo di prodotti di sintesi. (Kaspar et al. 2011.)

3.3 L'attività dell'HCN nel suolo

Dopo la trinciatura dei tessuti del sorgo, la durrina inizialmente stoccata nei vacuoli delle cellule epidermiche entra in contatto con la β -glucosidasi citoplasmatica che catalizza l'idrolisi della molecola liberando così l'aglicone 4-idrossi-mendelonitrile, una cianidrina reattiva, che a contatto con l'enzima α -idrossi-nitrillasi del citosol delle cellule del mesofillo fogliare libera nel suolo 4-idrossi-benzaldeide ed HCN. Quest'ultimo composto chimico esplicherà la funzione biofumigante.

Figura 3.1: Reazione catalizzata dall' α -idrossi-nitrillasi. Formule molecolari tratte da KEGG.



L'HCN è un acido volatile che nella soluzione del suolo si dissocia liberando l'anione cianuro. La sua tossicità è attribuita soprattutto all'inibizione dell'enzima citocromo ossidasi presente nella catena di

trasporto degli elettroni nel mitocondrio, inibendo quest'enzima si blocca il processo di respirazione cellulare con conseguente inibizione della produzione di ATP, l'ossigeno infatti anche se presente nella cellula non si riduce più, il flusso di elettroni lungo la catena di trasporto si blocca e così anche le pompe protoniche che sfruttano il gradiente protonico tra la matrice e lo spazio compreso tra le due membrane del mitocondrio. Senza questo gradiente l'ATP-sintasi smette di funzionare portando la cellula alla morte. Inoltre, inibendo la respirazione cellulare è in grado di alterare, il normale funzionamento della glicolisi, della via dei pentosi fosfato, inibendo quindi anche il ciclo di Krebs con conseguente mancata formazione di intermedi essenziali al metabolismo primario. (Way et al. 2007) La biofumigazione si basa sul naturale rilascio dell'HCN nel suolo da parte dei residui trinciati ed interrati del sorgo. Questa pratica è utilizzata nel controllo nei nematodi fitoparassiti, soprattutto se abbinata con la solarizzazione che amplifica l'effetto nematocida.

3.4 Generalità dei nematodi fitoparassiti

I nematodi rappresentano un Phylum del regno degli animali molto ampio che include specie in grado di colonizzare ogni habitat ed ecosistema della biosfera. Sono invertebrati microscopici, non segmentati privi di appendici, ma provvisti di una simmetria bilaterale. Possiedono un sistema nervoso, un sistema di secrezione, di escrezione, un apparato riproduttivo, un apparato digerente composto da una bocca e un canale alimentare che termina con l'ano; non hanno un sistema respiratorio e circolatorio specializzato. Il corpo dei nematodi è generalmente ricoperto da una cuticola esterna con funzione protettiva trasparente. Sono tra gli organismi pluricellulari più abbondanti sulla terra, proliferano nella materia organica in decomposizione come la lettiera delle foreste e del suolo, all'interno di piante e animali, sui fondali marini. Degradano la sostanza organica, oppure sono predatori o parassiti, anche delle piante coltivate.

Uno dei gruppi di nematodi più studiati è quello dei nematodi fitoparassiti, in grado in caso di forte infestazione di ridurre le rese agricole. È stato stimato che infestazioni severe di nematodi del genere *Meloidogyne* su soia possono provocare perdite annuali che oscillano tra il 10 ed il 50%. Le perdite economiche sono correlate al grado di infestazione ma anche dal profilo delle diverse specie presenti, ma le stime sono difficili e poco precise. Infatti, una radice parassitizzata da questi organismi, modifica la sua morfologia e fisiologia e, non raramente, ciò porta ad una predisposizione dell'ospite ad infezioni secondarie batteriche, fungine e a virus. A complicare ulteriormente il quadro, non sempre le piante colpite presentano sintomi ben visibili. Tradizionalmente, la gestione dei nematodi fitoparassiti si basa sull'impedire o ridurre l'inoculo iniziale e sul contenere la popolazione dannosa, quest'ultimo obiettivo è attuabile con le rotazioni colturali che consentono di cambiare la tipologia d'ospite e

quindi, di riflesso di non far proliferare i generi patogeni alla cultivar, l'uso di varietà resistenti ed infine l'impiego di nematocidi di sintesi. Come ho introdotto sopra, il ritiro dal commercio dei principi attivi più efficaci crea il bisogno di proteggere le colture con metodi alternativi, come lo sviluppo di cultivar resistenti e l'impiego di pratiche biologiche come la biofumigazione. (Barker, Kenneth R. 1998.)

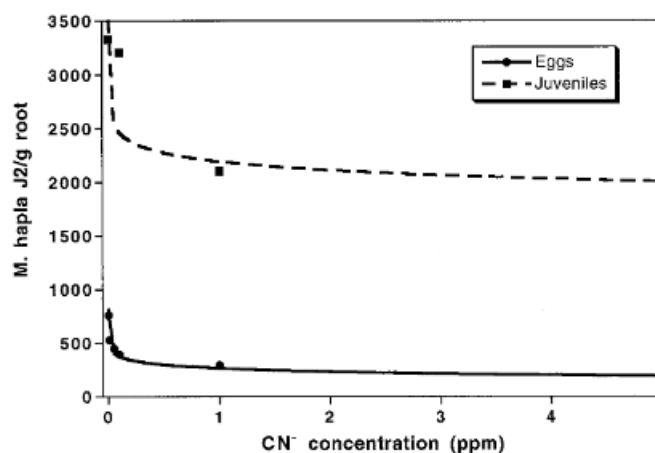
3.4.1 Morfologia dei nematodi.

La dimensione dei nematodi generalmente è molto varia, ma considerando solo i nematodi fitopatogeni, normalmente, questa oscilla tra l'uno e i due millimetri, potendo avere però forme molto diversificate (vermiformi, a forma di limone ecc.). I generi dannosi all'agricoltura possono essere raggruppati in due ordini morfologicamente differenti: i Dorilamida ed i Tylenchida. Il primo presenta maschi con due testicoli, un sistema escretore unicellulare, assenza sulla cuticola dei fasmidi (organi sensoriali posti posteriormente), setole sulle labbra, femmine che producono un numero limitato di uova, la presenza delle ghiandole ipodermali, mentre al contrario, nell'ordine dei Tylenchida abbiamo un sistema escretore composto da più cellule, l'assenza delle ghiandole ipodermiche, maschi che solitamente presentano un solo testicolo, femmine che producono molte uova, labbra con papille e fasmidi lungo la cuticola esterna. Quindi l'apertura boccale, considerando entrambi gli ordini, normalmente è circondata da 3 o 6 labbra fornite di papille o di setole sensitive; questa contiene uno stiletto in grado di estroflettersi e di penetrare nei tessuti radicali aspirando per depressione il contenuto cellulare. La classificazione dei nematodi è molto complessa, si basa principalmente sulla morfologia ma anche sulla loro differente attività trofica (fungivori, parassiti delle piante, predatori, onnivori e microbiovori). Vi sono poi nematodi endoparassiti che entrano all'interno dei tessuti parassitizzandoli, ma anche nematodi ectoparassiti (che vi rimangono all'esterno). Il loro ciclo vitale può essere suddiviso in sei stadi di sviluppo (uovo, quattro forme giovanili ed infine lo stadio di adulto). In base al genere vi possono essere nematodi in grado o meno, di formare cisti radicali, come il genere *Heterodera* e *Globodera*, capaci inoltre di andare in diapausa nel periodo avverso, sempre dipendentemente dal genere, essi possono riprodursi per anfigonia o partenogeneticamente come il genere *Meloidoyne* molto polifago. In relazione alla specie le femmine possono compiere da un singolo ciclo annuo a molti, deponendo da 30 a 3000 uova. L'estrema biodiversità di questa classe di esseri viventi è stata ed è tuttora una sfida aperta per chi si occupa di sistematica, in quanto con i nuovi metodi di analisi molecolare, negli ultimi anni sono state scoperte molte nuove specie e sottospecie.

3.5 Valutazione dell'effetto biofumigante, del sorgo (tratto da Djian-Caporalino et al. 2019.)

Attraverso prove sperimentali sia in campo che in ambiente protetto descritte nell'articolo (Djian-Caporalino et al.2019), sono state confrontate le capacità nematocide di due varietà differenti di sorgo, una ad alto e l'altra a basso contenuto di durrina. In seguito, sono stati analizzati attraverso esperimenti in serra, i fattori che possono influenzare l'azione abbattente per entrambe le varietà, ed infine, è stato attuato uno screening di altri genotipi di sorgo, per valutare la loro differente suscettibilità nei confronti di *Meloidogyne incognita*. In questo studio, è stato osservato che le proprietà nematocide del sorgo, contrariamente a quello che ci si poteva aspettare, non sono influenzate dalla quantità di durrina presente nei tessuti delle due cultivar in esame. Dai dati non è stato possibile osservare una differenza che fosse statisticamente significativa ma entrambe erano state in grado di ridurre la densità dei nematodi dannosi presenti nel suolo. Come conseguenza, della trinciatura di entrambe, si è potuto notare una riduzione dei danni alle colture da reddito successive, sia invernali che primaverili-estive. La spiegazione di questa non differenza tra le due varietà di sorgo a differente contenuto di durrina potrebbe arrivare da quest'altro articolo (T. L. Widmer and G. S. Abawi.2000), in particolare nella figura 3.2 tratta dall'ultima pubblicazione citata, si mette in luce come il secondo stadio giovanile (J2) di *Meloidogyne hapla* vari all'aumentare della concentrazione dell'anione.

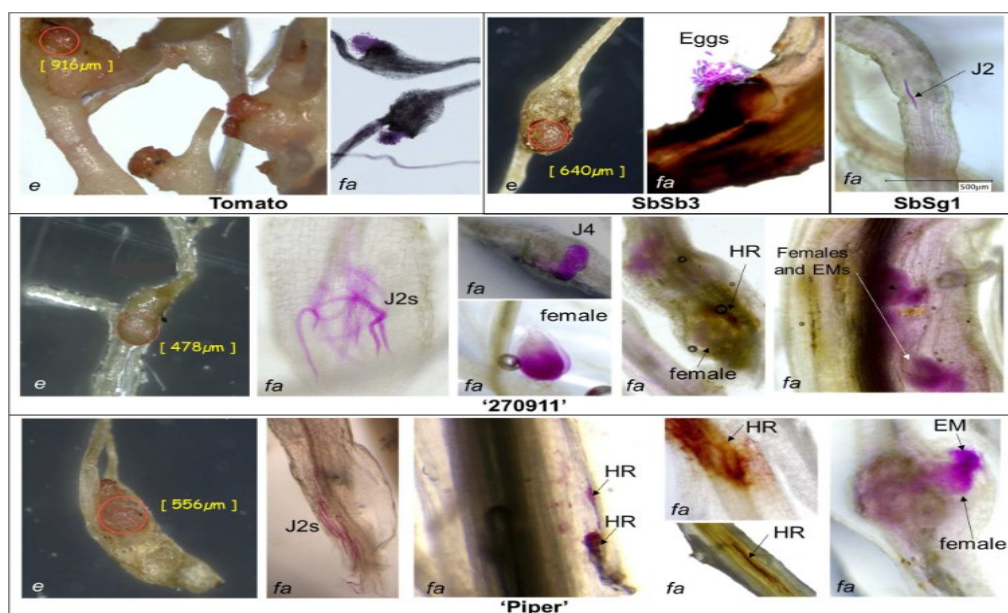
Figura 3.2: Variazione della densità di popolazione del secondo stadio giovanile dei nematodi, in funzione dell'esposizione all'anione cianuro, liberato dalla degradazione della durrina. La dose letale mediana calcolata è dell'ordine di 0.1 mg/kg di ione cianuro. Fonte: Widmer et al., 2000.



Tra i fattori che riducono od amplificano l'efficacia della biofumigazione abbiamo sicuramente il tipo di suolo. Infatti, si è riscontrato che in suoli limosi o sabbiosi dopo la biofumigazione la densità della popolazione di nematodi fitopatogeni si riduce notevolmente rispetto ai suoli argillosi. Dal confronto

di diverse varietà di sorgo e si è potuto constatare che esse non rappresentano ospiti preferiti per i nematodi del genere *Meloidogyne*; questo è un aspetto importante, che contribuisce al controllo di questi fitopatogeni in quanto la presenza di questo cereale ne riduce la capacità di riprodursi nei mesi più caldi dell'anno, proprio quando aumenterebbe notevolmente la loro densità di popolazione con conseguente aumento dell'incidenza delle patologie. Lo screening ha consentito di valutare come diversi genotipi di sorgo reagivano alla presenza del parassita in termini di risposta ipersensibile, ridotto numero di uova ed altri fattori. Tra le varietà analizzate la "SbSg1" risulta essere non ospite, poiché sperimentalmente nelle sue radici sono stati trovati pochi nematodi al secondo stadio giovanile, ma nessuno di questi è arrivato poi al terzo stadio, ciò non sembra dipendere dalla quantità di durrina presente, in quanto, varietà più ricche in questo glucoside presentano, anche se in minor misura rispetto al controllo (pomodoro), tutti gli stadi comprese le masse delle uova deposte dagli adulti.

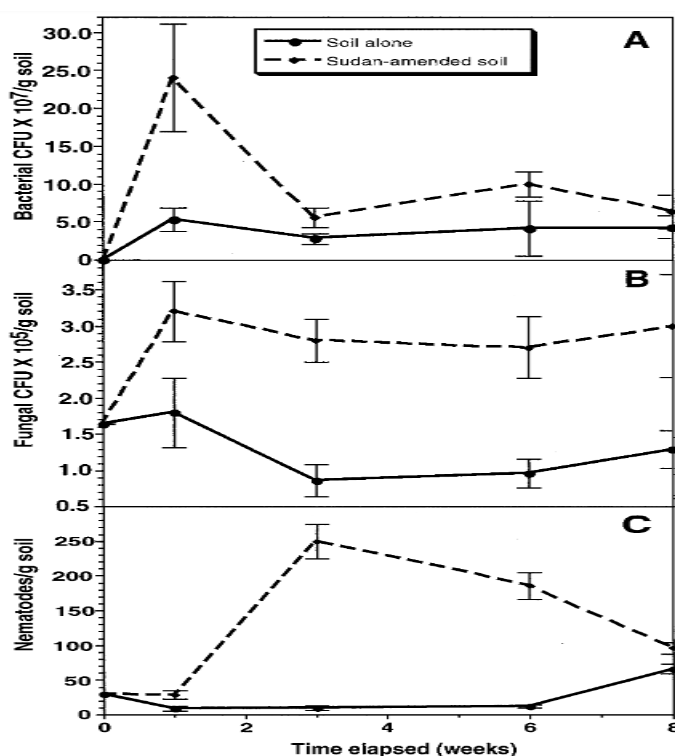
Figura 3.3: alcune immagini che mettono a confronto una cultivar di pomodoro suscettibile con diversi genotipi di sorgo. "Piper": varietà a basso contenuto di durrina. "270911": genotipo ad alto contenuto di durrina. "SbSb3" e "SbSg1" altri genotipi di sorgo, l'ultimo dei quali si è dimostrato non ospite con contenuto intermedio del glucoside. Fonte Djian-Caporalino et al. 2019.



Altro fattore importante è la gestione della biofumigazione, risulta importante trinciare ed interrare immediatamente il sorgo; infatti, utilizzando piante cresciute sopra i 75 giorni di coltivazione la popolazione di nematodi non è significativamente abbattuta. Questo effetto è stato confermato da un altro studio (Paudel et al. 2021) in cui è stato riportato che l'effetto allelopatico di diverse varietà di sorgo calava utilizzando piante più mature, in quanto procedendo nello sviluppo il contenuto di durrina cala progressivamente per le motivazioni che ho esposto in precedenza, ed è quindi essenziale trinciare ed interrare i residui di piante giovani. La pratica della biofumigazione modifica i profili di popolazione

di gran parte degli organismi edafici. In particolare, l'aumento della sostanza organica ed il rilascio di essudati rilasciati dai residui della coltura, supportano funghi, batteri e popolazioni detritivore e onnivore di nematodi, in grado di svolgere un'azione di controllo nei riguardi dei nematodi fitoparassiti, appunto creando suoli più soppressivi verso gli organismi dannosi. Inoltre, il contenimento delle popolazioni dei nematodi fitoparassiti mediante biofumigazione consente di ridurre la diffusione dei geni di resistenza nelle popolazioni di nematodi del suolo che dipende dalla comparsa nella popolazione di mutazioni favorevoli.

Figura 3.4: cambiamento nel numero degli organismi tellurici in seguito alla biofumigazione. Fonte: Widmer et al., 2000.



3.6 Conclusioni

L'uso di residui di *Sorghum bicolor* come sovescio da trinciare ed interrare, sembra essere una valida tecnica naturale e sostenibile per il biocontrollo di nematodi fitopatogeni. Il ritiro dal mercato di molti principi attivi ad alto impatto ambientale e la necessità di ridurre l'uso di prodotti di sintesi in agricoltura porterà certamente ad un maggiore interesse verso questa pratica. La sua integrazione nella gestione dei terreni permette, oltre all'effetto allelopatico derivante dalla presenza del glucoside, l'aumento della sostanza organica con conseguente miglioramento della fisica, chimica e biologica del suolo. Sarà necessario effettuare ulteriori studi che permettano di capire meglio come attuare questa pratica in diversi sistemi agricoli, se esistono potenziali rischi per gli ecosistemi a causa della moltitudine di interazioni che avvengono nell'ambiente agrario, in modo da prevenire eventuali effetti

collaterali da questa pratica. Nella scelta del sorgo usato come “green manure” è importante la scelta della varietà, quelle che presentano la mutazione “brown mid rib” sono in grado di accumulare minor quantità di lignina nei loro tessuti, quindi, di essere degradate più rapidamente nel suolo con una conseguente più rapida liberazione di HCN. La quantità di durrina presente nei tessuti è importante, ma dalla ricerca bibliografica svolta deduco che non è necessario l’uso di varietà ad alto contenuto di glucoside, e che l’effetto biofumigante si ha anche con varietà a basso quantitativo di durrina. Certo, il metabolita secondario è importante nell’efficacia dell’azione biofumigante, ma complessivamente il biocontrollo deriva anche da altri fattori altrettanto importanti quali il tempo di copertura della cover crop, la fenofase in cui viene trinciato il sorgo, temperatura e umidità del suolo, la quantità di sostanza organica, il valore del pH, il rapporto C/N e la tessitura del suolo. L’uso di film plastici permette di trattenere per più tempo l’HCN aggiungendo anche l’effetto della solarizzazione che ne aumenta l’efficacia. Possibili effetti negativi sulle colture si possono avere se si semina o trapianta la coltura da reddito dopo poco tempo dall’interramento dei residui, con successivi fenomeni di fitotossicità, conseguenti cali di resa, ridotta crescita radicale e ridotti tassi di germinazione. In generale, il tempo di sicurezza da rispettare per evitare fitotossicità di norma dovrebbe essere di almeno 1 mese a partire dall’interramento dei residui, ma è soggetto alle variazioni dovute alla temperatura e proprietà fisiche, chimiche del terreno. Questo effetto comunque non è attribuibile unicamente alla durrina, il sorgo produce altri metaboliti secondari con effetto allelopatico, tra cui ad esempio il sorgol-eone, secreto come essudato dalle radici del sorgo e avente un effetto antagonista sulla crescita e sviluppo di altre essenze. La secrezione del sorgol-eone dai peli radicali desta interesse anche nel suo utilizzo per la produzione di estratti, a base di questa molecola da impiegare come erbicida biologico. Il Sorgol-eone è anche un inibitore naturale della nitrificazione che provoca un rallentamento dell’ossidazione dell’azoto ammoniacale nel suolo e un accumulo di ione NH_4^+ nel suolo che può andare incontro a fissazione nell’interstrato delle argille espandibili o a volatilizzazione come NH_3 .

Un aspetto importante da ricordare, in pianura Padana, la semina del sovescio a base di sorgo indicativamente sarebbe a inizio-metà maggio, considerando almeno un mese per lo sviluppo del cereale, il successivo mese per il processo di biofumigazione, la pratica tiene occupato il terreno agricolo nei mesi di maggio-giugno, mesi dove le temperature gradualmente aumentano, contribuendo rispetto ai mesi più freddi maggiormente allo sviluppo delle colture da reddito e quindi di conseguenza influisce sui ricavi dell’imprenditore agricolo. La scelta, quindi, comporta sia benefici, come il miglioramento della fertilità dei suoli, ma sicuramente sono da considerare dei potenziali mancati redditi dallo shift dal periodo culturale ottimale.

Nel bilancio complessivo di sostenibilità di questa pratica occorre valutare che la PAC 2023-2027 prevede sussidi basati sui mancati redditi derivanti dall’uso delle cover crop. (www.rica.crea.gov.it.)

Ringraziamenti

Ringrazio tutte le persone che mi hanno sostenuto in questo percorso. In particolar modo, la mia fidanzata Benedetta che, oltre a supportarmi mi ha sopportato. Maurizio e Marzia che mi hanno ospitato nella loro casa durante questo percorso e la mia famiglia che mi ha aiutato. Un ringraziamento per la disponibilità al Prof. Giancarlo Renella che mi ha assistito nella stesura di quest'elaborato finale.

BIBLIOGRAFIA

1. Ballhorn *et al.*, 2009 *Plant Signaling & Behavior* 4, fasc.8 (1/8/2009).
DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9088>
2. Barker, Kenneth R. «Introduction and Synopsis of Advancements in Nematology». In *Plant and Nematode Interactions*, 1–20. John Wiley & Sons, Ltd, 1998.
<https://doi.org/10.2134/agronmonogr36.c1>.
3. Blomstedt, C.K., O'Donnell, N.H., Bjarnholt, N., Neale, A.D., Hamill, J.D., Lindberg Møller, B., Gleadow, R.M. 2016. Metabolic consequences of knocking out UGT85B1, the gene encoding the glucosyltransferase required for synthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L. Moench)». *Plant and Cell Physiology* 57, 373–86.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcv153>.
4. Cowan, M., Lindberg Møller, B., Norton, S., Knudsen, C., Crocoll, C, Furtado, A., Henry, R., Blomstedt, C., Gleadow, R.M. 2022. Cyanogenesis in the Sorghum Genus: From Genotype to Phenotype. *Genes* 13, 140.
<https://doi.org/10.3390/genes13010140>.
5. Djian-Caporalino, C., Mateille, T., Bailly-Bechet, M., Marteu, N., Fazari, A., Bautheac, P., Raptopoulo, A., Van Duong, L., Tavoillot, J., Martiny, B., Goillon, C., Castagnone-Sereno, Ph., 2019. Evaluating sorghums as green manure against root-knot nematodes. *Crop Protection* 122, 142-150
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.002>
6. Dutta, Tushar K., Matiyar R. Khan, e Victor Phani. «Plant-Parasitic Nematode Management via Biofumigation Using Brassica and Non-Brassica Plants: Current Status and Future Prospects». *Current Plant Biology, Plant-Pathogen Interactions and their Control: Conventional vs. Modern Approach*, 17 (1 Gennaio 2019): 17–32.
<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.02.001>.

7. Gatehouse, John A. «Plant Resistance towards Insect Herbivores: A Dynamic Interaction». *New Phytologist* 156, fasc. 2 (2002): 145–69.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x>.
8. Kaspar, T.c., e J.w. Singer. «The Use of Cover Crops to Manage Soil». In *Soil Management: Building a Stable Base for Agriculture*, 321–37. John Wiley & Sons, Ltd, 2011. <https://doi.org/10.2136/2011.soilmanagement.c21>.
9. Knudsen, C. *et al.* (2018) 'Dynamic metabolic solutions to the sessile life style of plants', *Nat. Prod. Rep.*, 35(11), pp. 1140–1155. Available at:
<https://doi.org/10.1039/C8NP00037A>.
10. Laursen, T., Borch, J., Knudsen, C., Bavishi, K., Torta, F., Martens, H.J., Silvestro, D., et al. 2016. Characterization of a dynamic metabolon producing the defence compound dhurrin in sorghum. *Science* 354, 890–893. <https://doi.org/10.1126/science.aag2347>.
11. Laursen, T., Lindberg Møller, B., Bassard, J-E-. 2015. Plasticity of Specialized Metabolism as Mediated by Dynamic Metabolons. *Trends in Plant Science* 20, 20–32.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.002>.
12. T. L. Widmer and G. S. Abawi
Plant Disease 2000 84:5, 562-568 Mechanism of Suppression of Meloidogyne Hapla and Its Damage by a Green Manure of Sudan Grass. Consultato 8 agosto 2023.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.5.562>.
13. Mithöfer, Axel, e Wilhelm Boland. «Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects». *Annual Review of Plant Biology* 63, fasc. 1 (2012): 431–50.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>.
14. Paudel, Roshan, Philip Waisen, e Koon-Hui Wang. «Exploiting the Innate Potential of Sorghum/Sorghum–Sudangrass Cover Crops to Improve Soil Microbial Profile That

- Can Lead to Suppression of Plant-Parasitic Nematodes». *Microorganisms* 9, fasc. 9 (29 agosto 2021): 1831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091831>.
15. Poulos, Thomas L., e Yergalem T. Meharena. «Structures of P450 Proteins and Their Molecular Phylogeny». In *The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins*, 57–96. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470028155.ch3>.
16. Thayer, S. S., e E. E. Conn. «Subcellular Localization of Dhurrin Beta-Glucosidase and Hydroxynitrile Lyase in the Mesophyll Cells of Sorghum Leaf Blades». *Plant Physiology* 67, fasc. 4 (aprile 1981): 617–22. <https://doi.org/10.1104/pp.67.4.617>.
17. Way, James L., Peter Leung, Elizabeth Cannon, Ronald Morgan, Charmille Tamulinas, Jon Leong-Way, Lynn Baxter, Amina Nagi, e Carie Chui. «The Mechanism of Cyanide Intoxication and Its Antagonism». In *Ciba Foundation Symposium 140 - Cyanide Compounds in Biology*, 232–48. John Wiley & Sons, Ltd. Consultato 2 agosto 2023. <https://doi.org/10.1002/9780470513712.ch14>.

Sitografia

18. CREA - PSP EXPLORER. Consultato 9 agosto 2023. https://rica.crea.gov.it/APP/psp_explorer/.
19. Dar, 2023. Plant-insect interactions-cyanogenic glucosides - Google Scholar». Consultato 4 maggio 2023. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Plant-insect%20interactions-cyanogenic%20glucosides&publication_year=2016&author=S.A.%20Dar&author=A.B.%20Wani&author=M.Y.%20Wani&author=S.%20Hussain&author=M.S.%20Majid.
20. KEGG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. PATHWAY Database. <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

21. <<Banca dati Prodotti Fitosanitari (sian.it)>> .(fonte consultata il 29/04/2023.)

22. «Sorgo Sorghum vulgare Pers. - Cereali - Coltivazioni erbacee». Consultato 31 luglio 2023. <https://www.agraria.org/coltivazionierbacee/sorgo.htm>

23. Rete Rurale Nazionale. «PIANO STRATEGICO POLITICA AGRICOLA COMUNE 2023-2027». Consultato 28 aprile 2023.
<https://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/24037>.