

Il controllo dei nematodi nelle colture ortive: prove *in vitro* con i tannini di castagno

INTRODUZIONE

Sono state eseguite numerose ricerche su estratti vegetali e agro-industriali, come possibili sostituti di prodotti chimici convenzionali. La decomposizione di residui vegetali può produrre sostanze con proprietà nematocide, che possono essere utilizzate contro i nematodi fitoparassiti. I tannini, che si possono ritrovare in un'ampia varietà di piante e in quasi tutte le parti di esse, sono costituiti da diversi componenti tra i quali acqua, polifenoli solubili e loro derivati, che risultano tossici per funghi, batteri e lieviti (Scalbert, 1991). Prove sperimentali hanno evidenziato la capacità dei tannini di controllare l'infestazione dei galligeni (Mian e Kabana Rodríguez, 1982; Maistrello et al., 2010), come pure di agire sulla schiusura di larve di *Heterodera glycines* Ichinohe (Hewlett et al., 1997). Sono state condotte prove *in vitro* per capire il meccanismo di azione dei tannini estratti dalla corteccia di castagno su alcuni stadi biologici di *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood allevata in serra su pomodoro Marmande.

MATERIALI E METODI

Per le prove sono state utilizzate salierine in vetro, con copertura a tenuta e per i tannini è stato utilizzato il prodotto SAVIOTAN® (Nuova Rivart, Radicofani, SI). Il piano di lavoro era così strutturato: Tesi 1 - Soluzione di acqua (testimone); Tesi 2 - Soluzione sterile Saviotan, 2 g/l di tannino; Tesi 3 - Soluzione sterile

* Centro di Ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia, Firenze

** Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

Saviotan, 2 g/l di tannino + bisolfito; Tesi 4 - Soluzione sterile Saviotan, 5 g/l di tannino; Tesi 5 - Soluzione sterile Saviotan, 5 g/l di tannino + bisolfito. Per ciascuna delle 4 prove in oggetto le salierine impiegate sono state 20 (5 tesi x 4 repliche) e in ciascuna salierina sono stati introdotti 2 cc della soluzione con tannino da saggiare, o di acqua sterile. L'incubazione è avvenuta sempre in cella climatizzata, al buio, a una temperatura costante di 24°C.

Le *uova* sono state raccolte manualmente da ovisacchi isolati da radici di pomodoro infestate dal galligeno. Sono state poste in ciascuna salierina con 10 µl di acqua. L'osservazione e i conteggi delle larve schiuse dalle uova insegmentate o da quelle embrionate sono stati effettuati rispettivamente ogni 2 giorni per 22 giorni e quotidianamente per 11 giorni. Le *larve libere* sono state raccolte dagli ovisacchi e sono state poste nelle salierine con 10 µl di acqua. Le osservazioni in questo caso riguardavano la motilità delle larve infestanti immerse nelle varie soluzioni. I rilievi sono stati fatti quotidianamente per 11 giorni. A 5 e 7 giorni dall'inizio della prova un certo numero di larve immerse nelle soluzioni trattate che apparivano immobili sono state trasferite in acqua per capire se le diverse concentrazioni di tannino avessero avuto azione nematostatica e/o nematocida. Per quanto riguarda invece le *larve racchiuse negli ovisacchi*, sono state isolate dagli ovisacchi e poste in 10 µl di acqua sterile per salierina, per un totale di 100 ovisacchi (5 x 4 x 5). Osservazioni e conteggi sul numero di larve schiuse dai medesimi sono stati fatti ogni 2 giorni per 18 giorni. Al 18° giorno sono stati effettuati i conteggi, per ciascuna replica delle 5 tesi, relativi al numero di uova e larve rimaste ancora al loro interno.

I dati percentuali finali ottenuti da ciascuna prova sono stati trasformati in valori angolari e sono stati analizzati statisticamente (analisi della varianza e il test di Fisher).

RISULTATI

Per quanto riguarda le *uova insegmentate* (tab. 1), durante i primi 4 giorni di osservazione la percentuale di larve di II stadio schiuse è apparsa molto limitata, addirittura nulla nella tesi testimone. Poi si è notato un aumento graduale nella loro schiusura, sempre più accentuato nelle tesi 2 e 3 (minor concentrazione di tannini), rispetto alle tesi testimone e alle tesi 4 e 5. La presenza del bisolfito non ha inciso sul tasso di schiusura.

Dalla tabella 1 è evidente che nelle tesi 1, 2 e 3 la schiusura si è bloccata a 16 e 18 giorni; nelle tesi 4 e 5, la schiusura delle larve, che nei primi 10 giorni

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE										
		2 gg	4 gg	6 gg	8 gg	10 gg	12 gg	14 gg	16 gg	18 gg	20 gg	22 gg
1	0,0 g/l	0,00	0,00	4,29	8,86	17,29	43,03	70,23	70,65	70,65	70,65	70,65 AB
2	2 g/l	0,00	0,39	7,96	16,58	31,57	62,21	84,98	95,55	95,55	95,55	95,55 B
3	2 g/l + bisolf.	0,00	2,23	6,80	13,06	20,03	44,84	79,42	88,73	92,50	92,50	92,50 B
4	5 g/l	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,18	20,35	23,51	23,51	25,59	26,36 A
5	5 g/l + bisolf.	0,00	0,23	0,23	0,72	1,65	6,91	19,74	26,32	26,55	26,72	29,03 A

I dati sono medie di 4 repliche.
Nella colonna le medie seguite da lettere maiuscole diverse risultano significativamente differenti per P = 0,01 (Anova e test di Fisher).

Tab. 1 *Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla schiusura di uova insegmentate di M. incognita: % di larve schiuse*

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE										
		1 gg	2 gg	3 gg	4 gg	5 gg	6 gg	7 gg	8 gg	9 gg	10 gg	11 gg
1	0,0 g/l	35,09	44,98	51,65	60,20	67,39	77,35	79,35	81,98	83,26	85,91	86,79
2	2 g/l	19,78	35,08	37,22	40,19	45,15	48,89	59,71	68,21	80,50	82,63	83,04
3	2 g/l + bisolf.	23,68	38,27	50,41	55,85	59,46	61,58	65,65	68,43	70,13	73,29	74,13
4	5 g/l	16,40	38,13	49,20	52,13	54,57	55,51	57,28	58,22	58,22	60,09	60,09
5	5 g/l + bisolf.	28,30	31,52	36,26	41,10	48,61	50,20	53,25	54,79	59,45	72,21	72,21

Vedi nota tabella 1.

Tab. 2 *Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla schiusura di uova embrionate di M. incognita: % di larve schiuse*

è apparsa inconsistente, dal 12° giorno in poi è aumentata gradualmente, se pur con valori più contenuti. Le uova non schiuse delle tesi 4 e 5, al 22° giorno, avevano assunto una colorazione marrone scuro. Dall'analisi statistica effettuata sui dati finali è evidente che non esiste una differenza significativa tra i valori medi percentuali di larve schiuse da uova insegmentate delle tesi 1, 2 e 3. È apparsa però altamente significativa la differenza tra il valore percentuale medio raggiunto dalle uova immerse nelle soluzioni a concentrazione più elevata rispetto a quelle a minor concentrazione.

Per quanto riguarda le *uova embrionate* (tab. 2) dal primo giorno di osservazione si è notato una pronta emergenza di larve da tutte e 5 le tesi, che è aumentata in maniera graduale protrandosi quasi fino all'ultimo giorno. Le differenze rilevate tra i valori medi del tasso di schiusura al termine della prova non sono risultate statisticamente significative tra loro.

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE										
		1 gg	2 gg	3 gg	4 gg	5 gg	6 gg	7 gg	8 gg	9 gg	10 gg	11 gg
1	0,0 g/l	95,13	92,64	92,64	91,55	90,64	89,13	88,52	88,52	86,31	83,49	82,27 D
2	2 g/l	90,01	88,46	88,46	87,98	87,71	85,36	79,46	68,52	66,46	62,53	62,53 C
3	2 g/l + bisolf.	88,60	86,66	84,99	80,55	78,94	72,12	67,19	66,18	60,92	54,10	52,49 BC
4	5 g/l	84,39	87,11	79,12	68,61	61,38	43,38	34,23	34,47	31,45	31,45	31,45 A
5	5 g/l + bisolf.	83,02	81,97	76,18	71,45	68,51	65,94	59,54	56,75	51,54	48,09	47,06 B
Vedi nota tabella 1.												

Tab. 3 Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla motilità di larve di II stadio di *M. incognita*: % di larve mobili

Per quanto riguarda le *larve di II stadio libere* (tab. 3) è emersa una graduale perdita di motilità, particolarmente accentuata nelle larve immerse nelle soluzioni con la maggiore concentrazione di tannini (tesi 4 e 5), come evidenziato anche al termine delle prove dalle differenze altamente significative tra il testimone e tutte le altre tesi, in particolare tra la tesi 4 e le altre tesi.

La prova condotta trasferendo in acqua sterile un certo numero di larve di II stadio, all'apparenza immobili, immerse nelle diverse concentrazioni di tannino, ha dato come risultato che solo quelle delle tesi 4 e 5 (5 g/l di tannino con e senza bisolfito), in ragione di 1/3 e di 1/5 rispettivamente, avevano ripreso la loro motilità; nelle tesi 2 e 3 tutte le larve si erano riativate.

Per quanto riguarda le *larve di II stadio incluse negli ovisacchi* (tab. 4) le larve sono schiuse in maniera graduale, per tutta la durata della prova, dagli ovisacchi della tesi 1 e in linea generale anche dalle tesi 2 e 3. Dagli ovisacchi immersi nella soluzione a più alta concentrazione di tannino, la schiusura invece si è bloccata tra l'14° e il 16° giorno. La massima percentuale di schiusura è stata rilevata nella tesi testimone. Al termine della prova il tasso di schiusura in tutte le tesi con tannini era significativamente inferiore rispetto al controllo, ma non statisticamente diversi tra loro.

A fine prova è stato anche conteggiato il numero di uova e larve rimaste ancora all'interno degli ovisacchi immersi nelle varie soluzioni. L'aspetto delle uova e delle larve rimaste negli ovisacchi immersi nella soluzione di tannino della tesi 2 era normale, quelle immerse in soluzione di tannino a 2 g/l più bisolfito apparivano vacuolizzate; quelle della tesi 4 distorte e vacuolizzate ma ancora vive; deformate, vacuolizzate e tutte morte quelle della tesi 5. In quest'ultima tesi anche le uova erano oltremodo vacuolizzate.

TESI	DOSI	TEMPO DI IMMERSIONE								
		2 gg	4 gg	6 gg	8 gg	10 gg	12 gg	14 gg	16 gg	18 gg
1	0,0 g/l	4,18	10,65	11,27	13,30	21,68	26,62	30,38	32,03	33,06 A
2	2 g/l	1,57	3,09	4,75	6,66	7,37	7,91	8,74	9,44	10,01 B
3	2 g/l + bisolf.	1,42	2,09	2,20	2,48	2,59	2,73	2,73	3,74	3,90 B
4	5 g/l	2,94	4,19	4,30	4,62	4,79	4,92	5,12	5,22	5,22 B
5	5 g/l + bisolf.	1,45	2,66	2,96	3,05	3,05	3,14	3,16	3,16	3,16 B
Vedi nota tabella 1.										

Tab. 4 Azione di 2 concentrazioni di tannino con e senza bisolfito sulla schiusura di larve di II stadio da ovisacchi di *M. incognita*: % di larve schiuse

Gli ovisacchi trattati con il tannino, hanno assunto velocemente un colore bruno rossiccio.

CONCLUSIONI

Considerando le *uova insegmentate*, alle concentrazioni più elevate si è osservato un iniziale rallentamento dell'embriogenesi cui è seguita la schiusa delle larve a una percentuale assai ridotta, mentre l'analisi delle uova non schiuse ha indicato che i tannini hanno agito bloccando l'embriogenesi stessa. Al contrario, alle concentrazioni più basse di tannini si è osservata un'accelerazione dell'embriogenesi rispetto al testimone e la schiusura quasi totale delle larve dalle uova. L'aggiunta di bisolfito non ha interferito sul tasso di schiusura. A fine prova le uova delle tesi 4-5 sono apparse imbrunite e alcune ancora insegmentate. Il prodotto non ha agito nei confronti delle *uova embrionate*. Infatti le percentuali medie di schiusura delle tesi trattate non si sono statisticamente differenziate da quelle del testimone. Il tannino invece, oltre a bloccare in parte l'embriogenesi alla concentrazione più elevata, ha agito, essenzialmente nei confronti delle *larve libere di II stadio*, da nematostatico alla dose più bassa (le larve immobili trasferite in acqua riprendevano la loro attività), da nematostatico ed essenzialmente da nematocida alla dose più elevata. Comunque, dalle larve immerse nelle diverse soluzioni di tannino solo percentuali statisticamente inferiori a quella del testimone erano in grado di rimanere attive. Le due concentrazioni con o senza bisolfito hanno evidenziato una notevole azione nei confronti degli *ovisacchi*, contenendo notevolmente la schiusura delle larve da questi. Alla concentrazione più alta le larve apparivano anche deformate e vacuolizzate.

I migliori risultati si sono ottenuti con soluzioni di tannino di 5 g/l con o senza l'aggiunta di bisolfito. A tale concentrazione il tannino, oltre a bloccare

e/o a rallentare l'embriogenesi, ha agito come nematostatico ed essenzialmente come nematocida nei confronti delle larve libere infestanti e hanno determinato il blocco dell'embriogenesi e la schiusura delle larve all'interno degli ovisacchi.

RIASSUNTO

Si è testato l'effetto di prodotti a base di tannino di castagno su alcuni stadi biologici del nematode galligeno *Meloidogyne incognita*. L'attività nematocida è stata testata con due concentrazioni (2-5 g/l) con e senza bisolfito, per periodi variabili tra 11 e 22 giorni. La concentrazione con 2 g/l di tannino ha stimolato in modo significativo l'embriogenesi e la schiusa delle larve da uova insegmentate, mentre il trattamento alla dose più alta ha inibito e ritardato l'embriogenesi riducendo il tasso di schiusura delle uova. Questo prodotto vegetale ha rivelato un'azione significativa sulla motilità delle larve di II stadio mostrando proprietà nematostatica e soprattutto nematocida alla dose più alta. Infine ha mostrato un significativo effetto inibitorio sull'emergenza delle larve dagli ovisacchi. Tutte queste proprietà rendono il prodotto un mezzo interessante per una nuova strategia di controllo nella gestione nematodi parassiti.

ABSTRACT

The effect of chestnut tannins was evaluated against some biological stages of *Meloidogyne incognita*. The nematicidal activity was tested at two concentrations (2-5 g/l) with and without bisulphite, for periods varying between 11 and 22 days. Treatment of 2 g/l of tannin stimulated significantly the embryogenesis and the juvenile hatching from unsegmented eggs, whereas treatment at higher dose inhibited and delayed the embryogenesis reducing the hatching rate from eggs. This vegetable product revealed a very significant action on free juveniles motility showing nematostatic and mainly nematicidal properties at higher concentration. Finally tannin exhibited a significant inhibitory effect in hatching of juveniles included in egg masses. All these properties make of this by-product an interesting means for a new control strategy in nematode pest management.

RINGRAZIAMENTI

La presente ricerca è stata promossa e sostenuta finanziariamente dalla Società Agrostar S.r.l. (Cavriago, Reggio Emilia).

BIBLIOGRAFIA

HEWLETT T.E., HEWLETT E.M., DICKSON D.W. (1997): *Response of Meloidogyne spp., Heterodera glycine and Radopholus similis to tannic acid*, «Supplement to the Journal of Nematology», 29, 4S, pp. 737-741.

- MAISTRELLO L., VACCARI G., SASANELLI N. (2010): *Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode Meloidogyne javanica*, «Helminthologia», 47, pp. 48-57.
- MIAN I.H., RODRIGUEZ-KABANA R. (1982): *Organic amendments with high tannin and phenolic contents for control of Meloidogyne arenaria in infested soil*, «Nematropica», 12, pp. 221-234.
- SCALBERT A. (1991): *Antimicrobial properties of tannins*, «Phytochemistry», 30, pp. 3875-3883.