

RELAZIONE SULLE ATTIVITÀ SVOLTE DURANTE LA STM 2016

Titolo: COMPATIBILITÀ TRA ESTRATTI VEGETALI E MICRORGANISMI ANTAGONISTI DI FITONEMATODI

Fruitore: Laura Cristina Rosso

Le attività sperimentali, di studio e confronto scientifico sono state svolte presso il laboratorio di Ecologia Microbica, Dipartimento di Microbiologia e Immunologia della Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales dell' Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, sotto il tutoraggio della Dott.ssa Maria Alejandra Passone dal 19 Aprile al 6 Maggio 2016.

RISULTATI

Sono stati raggiunti i seguenti obiettivi:

1. Sono stati prodotti oli essenziali (OE) ed estratti vegetali (EV) da piante aromatiche.

Oli essenziali sono stati ottenuti mediante la tecnica di idrodistillazione (Passone et al. 2012, *Int. J. Food Microbiol.* 159, 198-206) dalle seguenti piante:

- 1- *Thymus vulgaris* (OE1)
- 2- *Origanum spp.* (OE2)
- 3- *Coriandrum sativum* (OE3)
- 4- *Pimpinella anisum* (OE4)
- 5- *Rosmarinus officinalis* (OE5)

Estratti vegetali (EV) sono stati ottenuti mediante macerazione in 10 ml di acqua di 30 g di foglie di:

- 6- *Lippia integrifolia* (EV1)
- 7- *Lippia turbinata* (EV2)

2. È stata analizzata la compatibilità tra OE o EV con attività biocida e agenti di controllo biologico (ACB) di nematodi fitoparassiti.

Sono stati testati cinque funghi ACB: *Purpureocillium lilacinum* (SR, SR7), *Metarhizium spp.* (SRR51), aislado no identificado (SRR54), e *Pochonia clamydospora*. Ad eccezione di questo ultimo, tutti i funghi sono stati isolati dalla rizosfera di piante orticole infestate da *Nacobus aberrans*. Dati preliminari ottenuti da saggi *in vitro* hanno dimostrato la capacità di questi isolati nel parassitare l'uovo di *N. aberrans*.

Il saggio è stato condotto su substrato PDA (potato dextrosa agar) + OE o EV ad una concentrazione di 200ppm. L'inoculo fungino è stato eseguito mediante puntura centrale di una sospensione di conidi in soft agar (agar acqua 0.2%). Le piastre sono state incubate a 30°C e il diametro della colonia misurato giornalmente (cm). I risultati di maggiore interesse sono riportati a continuazione:

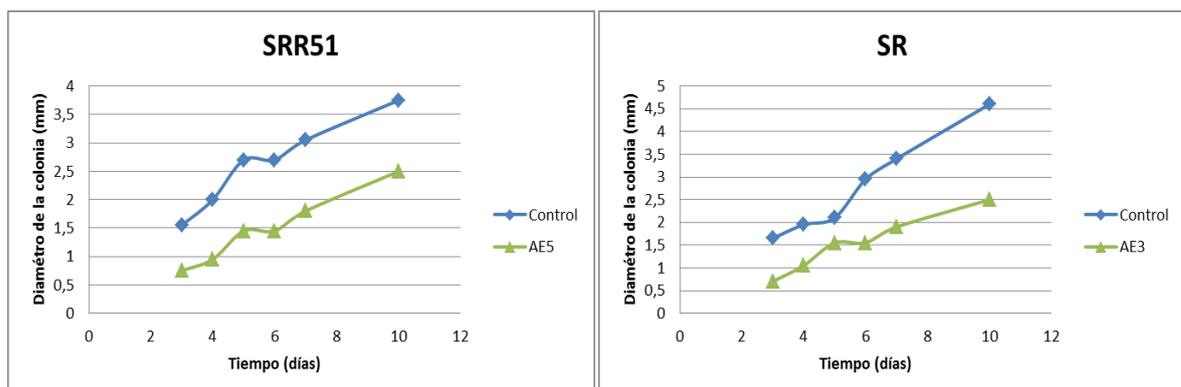


Figura 1. Effetto degli oli essenziali (AE3= *Coriandrum*; AE5= *Rosmarinus*) sulla crescita di *Metarhizium spp.* (SRR51) e *P. lilacinum* (SR).

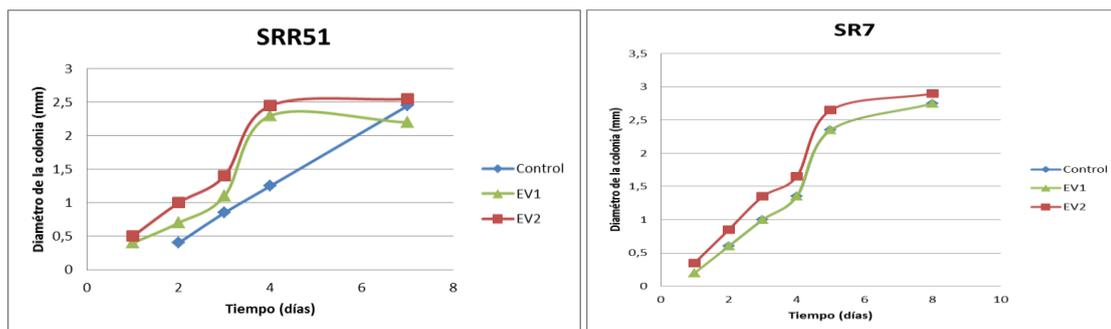


Figura 2. Effetto degli estratti vegetali (EV1= *L. integrifolia*; EV2= *L. turbinata*) sulla crescita di *Metarhizium* spp. (SRR51) e *P. lilacinum* (SR7).

Tra i cinque isolati testati, *Metarhizium* spp. (SRR51) e *P. lilacinum* (SR) sono stati in grado di crescere in presenza di 200 ppm di OE di Coriandro e Rosmarino, anche se con una crescita ridotta nel ordine del 46 y 34%. Molto più lentamente rispetto al controllo, anche l'isolato *P. lilacinum* (SR7) è stato in grado di crescere in presenza di questi OE. L'effetto inibitorio più marcato è stato osservato sull'isolato SRR54 e *Pochonia clamydospora*, per i quali non è stata osservata alcuna crescita di micelio. La presenza di olio essenziale di *T. vulgaris*, *Origanum* spp. e *P. anisum* ha totalmente inibito la crescita di tutti gli isolati testati.

Non sono stati osservati effetti inibitori sulla crescita dei cinque isolati studiati in presenza di estratti vegetali di *L. integrifolia* e *L. turbinata*, tutt'altro è stato possibile evidenziare un incremento della crescita, rispetto al controllo, di *Metarhizium* spp. (SRR51) e *P. lilacinum* (SR7).

3. E' stato analizzato l'impatto sui nematodi di vita dell'applicazione di OE o EV al suolo.

Il suolo in studio proveniva da un terreno agricolo adibito a cultura orticola a conduzione biologica. La prova è stata condotta in barattoli di vetro sterili contenenti 200 cc di suolo e 400 µL di OE o EV (2000 ppm), distribuiti sulla superficie a modo di gocce e omogeneizzato manualmente. I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente (25 ± 2°C) durante 96 ore. I nematodi di vita libera sono stati estratti dal terreno seguendo la metodologia dei setacci di Cobbs (1918). La mortalità è stata espressa come percentuale di esemplari morti sul totale. L'identificazione è stata eseguita mediante osservazione dei caratteri morfologici al microscopio ottico, usando chiave dicotomiche. I risultati sono riportati nella tabella a continuazione:

Tabella 2. Effetto degli oli essenziali sulla nematofauna di vita libera in 200 cc di terreno

	Nro. totale esemplare ¹	% mortalità ¹
Controllo senza OE	67,88 ± 17,05	1,5 ± 0,8
Rosmarinus officinalis	46,00 ± 7,81	74,57 ± 15,33
Coriandrum sativum	82,33 ± 39,88	100
Thymus vulgaris	73,33 ± 30,62	32,28 ± 15,72
Origanum spp.	66,33 ± 10,69	100
Pimpinella anisum	89,00 ± 10,15	100

¹ I dati riportati corrispondono al valore medio di tre repliche ± devio standard.

Il suolo analizzato ha presentato una abbondanza media di 354 esemplari . Kg⁻¹ con una mortalità naturale pari a 1,5%. In base alle caratteristiche morfologiche (presenza di stiletto, esofago, dimensione e forma del corpo) i nematodi presenti sono stati classificati come appartenenti ai gruppi Dorylaimida, Enoplia e Thylemchida.

Dopo 96 ore di incubazione con 2000ppm di OE è stato osservato che gli oli di *Rosmarinus officinalis* e *Thymus vulgaris* sono stati tra i meno tossici per la nematofauna di vita libera. Una completa mortalità è stata invece osservata nel terreno trattato con *Coriandrum sativum*, *Origanum* spp. e *Pimpinella anisum*.

Tabella 2. Effetto degli estratti vegetali sulla nematofauna di vita libera in 200 cc di terreno.

	Nro. totale esemplare	% mortalità
Controllo senza EV	597,25 ± 112,56	14,99 ± 3,32
Lippia turbinata	714,67 ± 156,43	21,01 ± 7,90
Lippia integrifolia	390,00 ± 25,98	24,99 ± 6,08

¹ I dati riportati corrispondono al valore medio di tre repliche ± devio standard.

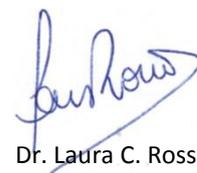
Il suolo analizzato ha presentato una abbondanza media di 2835 esemplari . Kg⁻¹ di suolo con una mortalità naturale pari a 15%. L'applicazione di estratti vegetali di *L. turbinata* e *L. integrifolia* non ha avuto un effetto significativo sulla mortalità della nematofauna presente.

CONCLUSIONE

I risultati ottenuti mostrano che (i) dei cinque OE saggiati, il *R. officinalis* non ha inibito la crescita dei potenziali ACB con una discreta tossicità verso i nematodi di vita libera, e (ii) entrambi gli estratti vegetali ottenuti da piante autoctone Argentine (*L. turbinata* e *L. integrifolia*) non hanno mostrato marcata tossicità sulla nematofauna di vita libera e stimolato la crescita dei BCA. Questi risultati promuovono il proseguimento di saggi di compatibilità e sinergia fra ACB e OE/EV di piante aromatiche per la formulazione di prodotti commerciali su base microbiologica e additivi di origine naturale con capacità inibitoria sul nematode *N. aberrans* a basso impatto ambientale.

Inoltre, lo scambio scientifico avvenuto durante la STM ha arricchito entrambi i gruppi di ricerca di nuove metodologie e ha consentito la impostazione di future collaborazioni nel ambito della microbiologia applicata.

Bari 08/06/2016



Dr. Laura C. Rosso