DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

EFFETTO DI FORMULATI NATURALI E MICRORGANISMI BENEFICI SULLA PRODUZIONE DI PEPERONE IN COLTURA PROTETTA SU TERRENO INFESTATO DA *Meloidogyne incognita* E RELATIVO CONTENIMENTO DEL NEMATODE GALLIGENO

EFFECT OF NATURAL FORMULATIONS AND BENEFICIAL MICRORGANISMS ON PRODUCTION OF PEPPER GROWN IN THE GREENHOUSE IN SOIL INFESTED BY *Meloidogyne incognita* AND RELATIVE REDUCTION OF THE ROOT-KNOT NEMATODE

Laureando
Michael Di Nunzio

Relatore
Prof. Sergio Saia

Correlatore
Dott.ssa Giovanna Curto

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

Indice

RIASSUNTO 2
ABSTRACT 4
1. INTRODUZIONE 6
1.2 I nematodi del genere *Meloidogyne* 7
1.2 Parassitismo: ciclo biologico e sintomi 9
1.3 Ecologia 11
1.3.1 Distribuzione geografica e temporale 11
1.3.2 Specie ospiti e importanza di *Meloidogyne* spp. 12
1.4 Strategie di contenimento di *Meloidogyne* spp. 12
1.4.1 Mezzi chimici 13
1.4.2 Mezzi di lotta eco-compatibili 15
1.4.3 Antagonisti e competitori microbiologici 17
1.4.4 Sterilizzazione con vapore associato a sostanze a reazione esotermica e solarizzazione 18
1.4.5 Impiego di varietà e portinnesti resistenti 18
1.4.6 Avvicendamenti colturali 19
1.4.7 Colture intercalari, "cover crops", sovesci e sostanze di origine naturale 19
1.4.8 Piante biocide 24
1.4.9 Metodi di controllo biotecnologici 26
2. OBIETTIVI DELLA RICERCA 28
3. MATERIALI E METODI 29
3.1 Caratteristiche del sito di prova 29
3.2 Impostazione della sperimentazione 29
3.3 Rilievi in campo 31
3.4 Estrazione delle larve infestanti dal terreno campionato 34
3.5 Calcoli e analisi statistica 35
4. RISULTATI 36
4.1 Presenza di nematodi nel terreno e nella radice 36
4.2 Risultati relativi alla produzione aggregati tra le raccolte 39
4.3 Risultati relativi alla produzione aggregati per evento di raccolta 44
5. DISCUSSIONE 50
6. CONCLUSIONE 55
7. BIBLIOGRAFIA 57
RINGRAZIAMENTI 70

RIASSUNTO

L'orticoltura è un settore trainante l'economia di alcune province dell'Emilia Romagna, ed in particolare quelle che si affacciano sul mare, caratterizzate da terreni sabbiosi e minimi termici contenuti. Tuttavia, l'intensità dei sistemi orticoli specializzati e talvolta l'omosuccessione, anche in serra, ha comportato l'incremento della carica di patogeni e parassiti tra i quali gravi preoccupazioni sono poste dai nematodi galligeni.

Per molti anni la sola tecnica utilizzata nel contenimento dei nematodi galligeni è stata la fumigazione chimica con l'utilizzo del 1,3-dicloropropene (1,3-D). Tale pratica, pur caratterizzata da costi contenuti ed elevata efficacia, ha tuttavia comportato problemi alla fertilità biologica del terreno a causa del suo effetto fumigante e preoccupazioni per la salute, al punto che diverse agenzie preposte alla tutela ne hanno ritirato l'uso recentemente, a meno di determinate deroghe.

Per tali ragioni, si è vista sempre più la necessità e l'interesse di mettere a punto strategie di contenimento dei nematodi galligeni alternative al 1,3-D, ivi incluse quelle con utilizzo di sostanze di origine naturale, microbiologica e fitostimolante, utilizzabili anche in agricoltura biologica.

Tuttavia, le informazioni circa l'efficacia di molti prodotti nel contenimento dei nematodi e sulla resa delle orticole, in particolare del peperone, sono carenti in letteratura scientifica e nei report tecnici.

Pertanto, il seguente lavoro ha avuto la finalità di valutare l'efficacia di nuovi formulati a basso impatto ambientale sul contenimento dell'infestazione del nematode galligeno *Meloidogyne incognita* in peperone allevato in serra. La prova è stata svolta in tre cicli colturali primaverili-estivi (2017, 2018, 2019) presso un'azienda agricola di Bellaria-Igea Marina (RN).

I prodotti applicati, alcuni dei quali presenti in tutti i cicli e altri presenti in due soli cicli colturali, sono stati un prodotto di sintesi e prodotti a base di estratto d'aglio, di tannini o microrganismi promotori della crescita vegetale.

L'applicazione dei prodotti liquidi è stata effettuata tramite manichetta forata, i prodotti solidi sono stati applicati al trapianto in ciascuna buca. Per ogni annata sono stati effettuati tre rilievi riguardanti l'indice galligeno *in situ* e la presenza di larve di

M. incognita nel terreno mediante estrazione e analisi morfologica allo stereomicroscopio in laboratorio. Il numero di rilievi sulla produzione è stato variabile in base all'annata in funzione dei flussi di produzione.

Nel 2017 alcune tra le strategie più efficaci nel proteggere la coltura e assicurare buone produzioni, che hanno fornito risultati simili a quelli del fumigante 1,3-D (testimone positivo) sono risultate: due trattamenti con il p.a. Fluopyram preceduto in pre-trapianto da un'applicazione al terreno di *Bacillus firmus* ceppo I-1582, lo sfarinato proteico di *Brassica carinata,* seguito da trattamenti con il medesimo prodotto in formulazione liquida, l'estratto di aglio granulare al trapianto, seguito da trattamenti con estratto d'aglio in formulazione liquida.

Nel 2018, tutti i prodotti utilizzati hanno efficacemente contenuto, l'attacco di *M. incognita* all'apparato radicale e con un'infestazione crescente. Particolare efficacia (indice galligeno < 1) è stata riscontrata nelle due tesi con un trattamento in pre-trapianto seguito da terpeni e in quella trattata con tannino C.

Maggiori produzioni si sono evidenziate sulle tesi dove è stata riscontrata una maggiore efficacia nematocida e quindi nella riduzione dell'indice galligeno, con relativo incremento della rigenerazione di nuove radici sane.

Infine nel 2019 anno conclusivo della prova, è stato inserito nelle strategie il microrganismo fungino *Paecilomyces lilacinus* ceppo 251. Il microrganismo in sinergia con il p.a. Fluopyram ha evidenziato una buona attività nel contenimento dell'indice galligeno, attestando quindi anche una buona produzione media.

Tali strategie alternative riguardanti l'applicazione di formulati nematocidi, nematostatici o fitostimolanti, hanno complessivamente assicurato nelle varie annate produzioni soddisfacenti, grazie al ripetersi delle applicazioni ogni 15 giorni, che hanno contenuto l'infestazione e portato alla generazione di nuove radici attive, mentre prodotti chimici maggiormente abbattenti e persistenti hanno limitato i danni alla produzione anche con un numero inferiore di interventi.

ABSTRACT

Horticulture is an important sector in the economy of some of the most prominent district of Emilia Romagna, especially those that are faces the sea, characterized by sunny soil and minimal thermic content. However, the intensity of specialized horticultural system and sometimes monoculture, even in the greenhouse has led to an increase in the pathogen load, of which serious concerns are posed by root-knot nematodes.

For many years, the only technique used in the containment for root-knot nematodes was chemical fumigation with the use of 1,3-dichloropropene (1,3-D).

This practice, although characterized by low cost and high efficacy has however had problems with the biological fertility of the soil because of its fumigant effect and health concerns, to the point that several protection agencies have recently withdrawn its use, unless some exceptions.

For these reasons, the requirement and the interest to develop strategies for containment of root-knot nematodes alternative to 1,3-D, with the use of natural substances, microbiological and phytostimulant origin that can also be used in organic agriculture.

However information about the efficacy of many products in the containment of nematodes and on the yield of horticultural products, in particular the bell pepper, is lacking in scientific literature and technical reports.

Therefore, the following trial was carried out to assess the effectiveness of new formulations with low environmental impact on the containment of the infestation of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on bell pepper grown in greenhouse. The test was carried out in three spring-summer crop cycles (2017, 2018, 2019) at a farm in Bellaria Igea-Marina (RN).

The implemented products, some of which were present in all cycles and others in only two cultivation cycles, were represented by a synthetic product and another one based on garlic extract, tannins and microorganisms that promote plant growth.

The application of liquid products was carried out by drilled hose, solid product have been applied to transplant in the pit. For each year, three assessments were made concerning the gall index *in situ* and the presence of *M. incognita* larvae in soil samples

analized by stereomicroscope in laboratory. The number of assessments on bell pepper production was variable, based on the year, according to the production flows.

In 2017, some of the most efficacy strategies to protect the crop and ensure good production, supplying similar results to those of fumigant 1,3-D (positive control) were recorded: two treatments with the active substance Fluopyram preceded in pre-transplant by an application to the soil of *Bacillus firmus* strain I-1582, proteic powder of *Brassica carinata*, followed by treatments with the same products in liquid formulations, the granular garlic extract at the transplant, followed by treatments with garlic extract in liquid formulation.

In 2018, all the used products effectively contained the infestation of *M. incognita* at the root system and with a growing infestation. Especially effectiveness (gall index < 1) was observed in both thesis with pre-transplant treatment followed by terpenes and in the other one treated with tannin C.

Increasing bell pepper productions were highlighted in the thesis where higher nematicide efficacy, was shown, corresponding to a decrease in gall index and a relative increase of the regeneration in new healty roots.

Finally, in 2019 the last year of the trial, the fungal microorganisms *Paecilomyces lilacinus* 251 was included in the strategies. This microorganism, in sinergy with the active substance Fluopyram, has shown good activity in containment of gall index, thus also attesting to a good average bell pepper production.

Those alternative strategies concerning the application of nematistatic or phytostimulant formulation, have achieved satisfactory bell pepper production in the various vintages, thanks to the repetition of the applications every 15 days, containing the infestation and leading to the growth of new active roots, while chemical products, with a more knock down activity and persistence, have limited the damage to bell pepper production even with fewer treatments.

1. INTRODUZIONE

Il suolo è caratterizzato da un complesso sistema di processi fisici, chimici e biologici che interagiscono tra loro mantenendo un equilibrio dinamico. La componente edafica è costituita da una moltitudine di organismi, che svolgono importanti processi di degradazione e decomposizione di residui utili alla formazione della sostanza organica. Tra questi sono presenti anche organismi biologici nocivi per le piante, che si nutrono delle porzioni ipogee arrecando danni alla salute delle colture e alla produzione.

Tra questi vengono annoverati i nematodi fitoparassiti, il cui contenimento nei sistemi agrari è spesso difficoltoso (Perry and Moens, 2011). È stato stimato, in particolare, che i nematodi galligeni del genere *Meloidogyne* rappresentano un serio problema nei terreni sabbiosi per molte colture orticole, causando globalmente perdite di produzione per un ammontare di circa 100 miliardi di dollari all'anno, nonostante tutti i metodi attualmente utilizzati (Abad *et al*., 2008; Wesemael *et al*., 2011, Coyne *et al*., 2018). Tali nematodi, soprattutto la specie *M. incognita*, presentano una vasta gamma di piante ospiti sia spontanee che coltivate, fra cui *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabacee*, *Apiaceae*, *Compositeae* (Abad e Williamson, 2010; Dutta *et al*., 2015; Jones *et al*., 2011).

Tale parassitismo nella specie in esame è molto studiato, soprattutto a livello genico, prendendo come riferimento la carteculina Mi-CRT (Jaouannet *et al*., 2013) e gli enzimi che modificano la parete cellulare *msp-18* e *msp-20* (Shivakumara *et al*., 2017). I geni correlati invece allo sviluppo di *M. incognita* sono Mi-*Rpn*7, che riducendo l'espressione hanno portato a interferire nella locomozione nelle larve L2 (Niu *et al*., 2012), agendo sui geni della L-lattato deidrogenasi, precursore proteico mitocondriale stress-70, precursore proteico della catena β dell'ATP sintasi e tirosina fosfatasi (Ibrahim *et al* 2011a), cosi come la proteina shock termico 90 (*hsp90)* e isocitrato liasi (*icl*) (Lourenço-Tessutti *et al*., 2015).

In *M. incognita* l'espressione di diversi geni è stata regolata durante l'infezione e a sua volta ha influenzato l'espressione dei loro geni bersaglio in cotone (Pan *et al*., 2019) e pomodoro (Kaur *et al*., 2017). Inoltre, la riduzione dell'espressione dei geni *drh-3* e *mut-2* ha disturbato lo sviluppo dei nematodi (Iqbal *et al*., 2016).

Tali studi sono stati messi in luce per comprendere meglio come agire per far fronte agli alti costi, inoltre i risultati talvolta insoddisfacenti e le restrizioni nell'uso dei prodotti nematocidi di sintesi hanno portato a un maggior interesse nei confronti di metodi alternativi per il contenimento di questi organismi.

1.2 I nematodi del genere *Meloidogyne*

Il genere *Meloidogyne* (Famiglia *Meloidogyninae*) comprende circa 100 specie di nematodi fitoparassiti galligeni tra i quali quelli di maggior interesse per diffusione e importanza economica sono: *Meloidogyne incognita*, *M. hapla*, *M. arenaria*, *M. javanica, M. graminicola*, *M. chitwoodi* e *M. fallax*.

Fig. 1 - Femmina di *M. incognita* (da inea.it).

Gli adulti di *Meloidogyne spp.* sono tipicamente di colore bianco perlaceo e caratterizzati da un dimorfismo sessuale marcato.

Le femmine (Fig. 1) hanno lunghezza variabile tra 0,6 e 0,8 mm e sono a forma di fiasco con collo allungato. L'apertura orale è costituita da 6 labbra; le aperture degli anfidi sono a fessura. La cuticola è percorsa da sottili striature trasversali e, nella parte terminale del corpo, 6 ghiandole rettali unicellulari secernono la matrice gelatinosa che formerà l'ovisacco, in cui sono deposte numerose uova. Lo stiletto misura da 9 a 18 μm ed ha 3 piccoli bottoni basali ("knobs") prominenti e incurvati dorsalmente. Il bulbo mediano è largo e conduce ad un breve istmo; vicino ad esso si trovano le ghiandole esofagee, che coprono la parte anteriore dell'intestino e contengono 3 nuclei. La ghiandola dorsale del bulbo basale si espande in un'ampolla dietro la sua congiunzione con il lume dell'esofago. Il canale escretore si apre all'esterno in un poro

posto in posizione anteriore, subcefalica. L'intestino ha perso la sua forma e non è collegato al retto. Le femmine possiedono 2 grandi ovari e una spermateca a forma di tasca. La vulva e l'ano si trovano nella parte terminale del corpo, circondati da pieghe cuticolari chiamate "perineal patterns" (Fig. 2), utilizzate anche per l'identificazione morfologica delle diverse specie (Shurtleff e Averre, 2000).

Fig. 2 - In dettaglio "perineal patterns" di *M. incognita* (da Virginia Polytechnic Institute e State University).

I maschi (Fig. 3) sono vermiformi, di lunghezza compresa tra 1,1 e 1,9 mm, con il dorso che si assottiglia in una regione cefalica molto sclerotizzata. Le labbra laterali e mediane sono prominenti e gli anfidi sono contenuti in un cappuccio. I campi laterali sono segnati da 4 linee che si estendono dal centro del dorso fino all'estremità posteriore. Lo stiletto misura da 10 a 25 μm ed ha bottoni basali arrotondati. Il bulbo mediano è ridotto e ad esso segue un sottile istmo; l'esofago, anteriormente, ricopre in parte l'intestino, così come nelle larve di seconda età (L2). Il poro escretore è vicino all'anello nervoso, davanti al bulbo mediano. I maschi possiedono uno o due testicoli ed hanno spicule e *gubernaculum* vicino alla coda, che è molto breve ed incurvata (Shurtleff e Averre, 2000).

Fig. 3 - Maschio di *M. incognita* (da aspnet.org).

Le L2 (Fig. 4) sono corte (0,3-0,5 mm), hanno uno stiletto debole, lungo 10-15 μm e con bottoni basali indistinti. La coda è conoide (Shurtleff e Averre, 2000).

Le uova (Fig. 4) sono ellittiche e vengono deposte in ovisacchi gelatinosi bianco perlacei, che invecchiando assumono una colorazione più scura (Shurtleff e Averre, 2000).

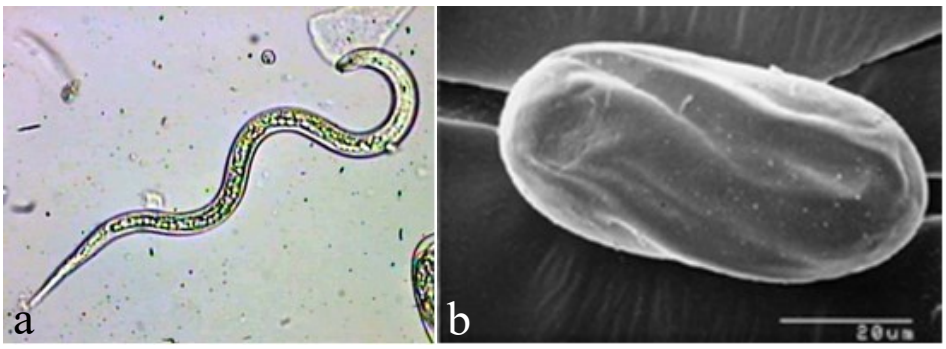


Fig. 4 - Particolare di larva di seconda età (a) e uovo (b) di *M. incognita* (da aspnet.org, plpnemweb.edu).

1.2 Parassitismo: ciclo biologico e sintomi

Le specie di *Meloidogyne* spp. svernano nel terreno come uova, che possono rimanere quiescenti fino a 3 anni, o come larve; il fattore di schiusa delle uova è dato da condizioni ambientali adatte (temperature comprese tra 15 e 25°C, elevata umidità del terreno, presenza di ospiti suscettibili). I nematodi del genere *Meloidogyne* spp. sono endoparassiti sedentari: tutto il ciclo di sviluppo è svolto nelle radici di molte specie vegetali.

La durata del ciclo biologico (Fig. 5) del nematode varia a seconda della specie, ma può essere anche di due sole settimane; in genere, comunque, si compie in 20-60 giorni. Tipicamente i nematodi di regioni più fredde hanno cicli più lunghi (Tacconi, 1980; Curto, 2008).

La prima muta avviene all'interno dell'uovo, pertanto alla sua schiusa sgusciano soltanto L2, unico stadio in grado di dare avvio all'infestazione (larve infestanti), le quali migrano nel terreno, penetrando nell'apice di radici in allungamento e nei punti di emergenza di radici laterali, attratte da CO_2 e da altre molecole; la penetrazione è di origine meccanica (attraverso lo stiletto) e chimica (ad opera di cellulasi e pectinasi).

Le larve, poi, si muovono attraverso le cellule corticali verso l'apice radicale, arrivano alle cellule meristematiche e si muovono negli spazi intercellulari, raggiungendo il cilindro centrale. Qui le larve provocano un'alterazione delle cellule, con il riassorbimento delle pareti e la formazione di sincizi multinucleati detti cellule giganti, specializzate nella funzione di provvedere al nutrimento della larva durante il suo sviluppo. Contemporaneamente le cellule corticali e del periciclo, in prossimità del punto di attacco, si ingrossano e si dividono formando così delle iperplasie dette galle, il cui accrescimento è stimolato da ogni larva; in caso di attacchi massicci esse possono fondersi a formare dei cordoni. Dopo altre 3 mute, il nematode raggiunge lo stadio adulto, differenziando quindi i sessi.

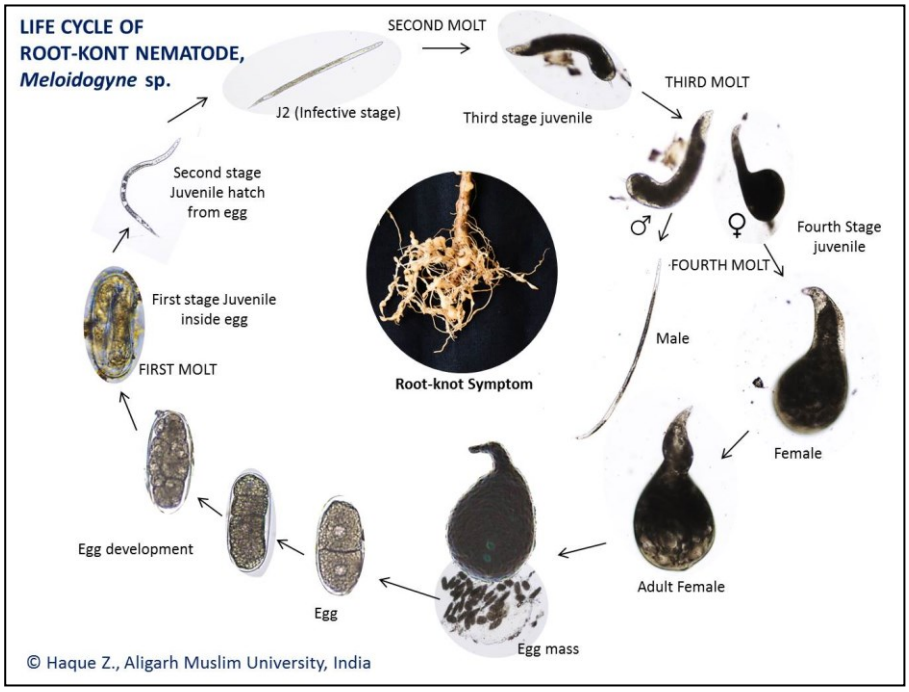


Fig. 5 - Ciclo biologico di *Meloidogyne* spp. (Haque, 2017)

Nella fase adulta le femmine restano all'interno della radice sporgendo all'esterno soltanto con la parte posteriore del corpo (Fig. 6) e si accoppiano con il maschio, che al contrario, da adulto, vive nel terreno.

I maschi sono migratori e poco frequenti, perché per lo più la riproduzione avviene per partenogenesi, che porta a nascita di sole femmine.

Le galle possono avere dimensioni e forma variabile (irregolare, a fuso, sferica) in funzione della specie di *Meloidogyne*, del numero degli individui presenti nel tessuto colpito, della specie ospite e dell'età della pianta (Shurtleff e Averre, 2000).

Le galle, ricoprendo l'apparato radicale (Fig. 7), diminuiscono la funzione di assorbimento; la normale differenziazione dello xilema e del floema nelle radici attaccate, è disturbata; il trasporto di acqua e nutrienti verso la parte aerea diminuisce e di conseguenza la crescita e la produzione si riducono; spesso il tessuto corticale

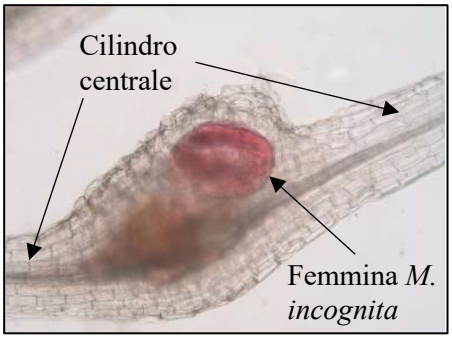


Fig. 6 - Particolare di femmina di *M. incognita* colorata in rosa con fucsina all'interno di radice (Victoria *et al*., 2008).

delle radici è rotto e danneggiato dopo che sono stati espulsi gli ovisacchi (Shurtleff e Averre, 2000).

Le piante parassitizzate mostrano sintomi quali nanismo, clorosi, ritardo nello sviluppo vegetativo e appassimenti, fino a giungere alla morte in seguito a gravi attacchi. La distribuzione delle piante colpite si presenta a chiazze all'interno della coltura e spesso, anche in presenza di un'adeguata umidità e di una buona concimazione, le piante attaccate manifestano sintomi comparabili a quelli causati da carenze minerali o da danni da siccità. Tali piante risultano inoltre più suscettibili all'attacco di altri parassiti e patogeni e, a causa della ridotta funzionalità dell'apparato radicale (Fig. 7), hanno produzioni inferiori sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. Le varie specie ospiti possono manifestare sintomi diversi.

1.3 Ecologia

1.3.1 Distribuzione geografica e temporale

Il genere è diffuso nei terreni tendenzialmente sciolti di tutto il mondo. Nel Nord Italia la specie più diffusa, *M. incognita*, si ritrova soprattutto nelle regioni costiere, in terreni sabbiosi, dove provoca consistenti danni alle colture orticole e floricole sia in pieno campo sia in serra, alle colture da seme e alle piante da frutto nei vivai e nei nuovi impianti.

Nel Nord Italia compie da 5 a 7 generazioni all'anno; le infestazioni iniziano dal mese di aprile e i picchi di popolazione si registrano da maggio a settembre-ottobre, quando le condizioni ambientali (umidità relativa e temperature) sono più favorevoli al nematode, per poi declinare da novembre a dicembre. Nel periodo invernale i nematodi svernano come uova o come larve, che possono portarsi ad una profondità di 70-80 cm nel terreno (Curto, 2008).

1.3.2 Specie ospiti e importanza di *Meloidogyne* spp.

Le specie di *Meloidogyne* spp. si nutrono su più di 3000 specie di piante diffuse in tutto il mondo, tra cui specie orticole, cereali ed erbacee, legumi, arbusti e alberi da frutto. Poche specie sono ospite-specifiche e talvolta è possibile riscontrare più di una specie di *Meloidogyne* sullo stesso ospite (Shurtleff e Averre, 2000).

Meloidogyne ha tra i propri ospiti colture di notevole importanza, tra cui:

- piante orticole appartenenti alle famiglie delle *Solanaceae* (pomodoro, melanzana, patata, peperone), *Cucurbitaceae* (anguria, melone, cetriolo, zucca, zucchino), *Fabaceae* (erba medica, fagiolo, fagiolino, soia, pisello), *Apiaceae* (carota, finocchio, sedano, prezzemolo) *Lamiaceae* (basilico), *Compositeae* (lattuga, radicchio), *Liliaceae* (cipolla), *Chenopodiaceae* (spinacio);
- piante industriali: barbabietola e tabacco;
- piante da frutto, tra cui pesco, vite, fragola ed actinidia;
- piante floricole, quali rosa e garofano.

La soglia di danno è più bassa in colture maggiormente suscettibili al nematode galligeno, quali la carota, il vivaio di bietola da seme e tutte quelle nelle quali la produzione è rappresentata dalle radici, nonché le colture portaseme di specie vegetali ospiti.

1.4 Strategie di contenimento di *Meloidogyne* spp.

Le strategie razionali di contenimento dei nematodi fitoparassiti, come per le altre avversità, si dovrebbero fondare sull'integrazione dei metodi diretti e di tutti i metodi indiretti di contenimento. Tra i primi si annoverano l'applicazione al terreno o alla pianta di composti di origine sintetica o naturale, ivi inclusi composti di derivazione

vegetale. Tutte le variabili dell'agrotecnica rappresentano comunque metodi indiretti, tra cui la scelta del genotipo, dell'avvicendamento e della gestione del terreno e la coltivazione di particolari specie (soprattutto *Brassicaceae*) ad attività biocida dalle quali usualmente è possibile estrarre composti per il contenimento diretto.

1.4.1 Mezzi chimici

In accordo con il Protocollo di Montreal, l'impiego del bromuro di metile, fumigante dapprima ampiamente utilizzato per la sterilizzazione dei terreni per la sua attività biocida non solo nei confronti dei nematodi, ma anche di malerbe, funghi ed insetti terricoli, è stato vietato a partire dal 31/12/2004 (salvo deroghe concesse per "usi critici"), in quanto tale fumigante è ritenuto uno dei maggiori responsabili del buco nell'ozono.

Inoltre in seguito alla revisione europea delle sostanze attive, secondo la Direttiva 1107/2009/CE, attualmente soltanto il dazomet è stato inserito nella lista positiva dell'allegato A1, mentre l'1,3-D è stato revocato dal commercio, ma è possibile chiedere e ottenere la concessione per "usi d'emergenza", solo su terreni sabbiosi, su alcune colture e zone d'Italia.

In seguito a tali decisioni, numerose ricerche sono state condotte per individuare validi metodi alternativi per la difesa dai nematodi. Gli studi compiuti hanno condotto allo sviluppo di nuove molecole, alla messa a punto di formulazioni diverse di prodotti

Fig. 7 - Galle su radici di peperone a sinistra e carota a destra.

già in commercio, all'individuazione delle modalità di distribuzione dei formulati più efficaci.

Tra i nematocidi di sintesi si distinguono prodotti fumiganti e prodotti non volatili:

- **nematocidi fumiganti**, sono prodotti che permangono nel terreno allo stato gassoso; vengono distribuiti con macchine dotate di iniettori, nel caso di formulazioni liquide, o con macchine spandiconcime nel caso di formulazioni granulari, e in seguito interrati fino a 15-20 cm di profondità; successivamente possono essere richieste irrigazione e copertura con film plastici. Il trattamento viene effettuato in pieno campo o in serra in assenza della coltura, attendendo almeno 4-6 settimane tra il trattamento e la semina o il trapianto, poiché tali nematocidi sono altamente fitotossici; prima dell'impianto, poi, il terreno deve essere arieggiato con una lavorazione superficiale, per eliminare eventuali residui di prodotto nematocida. I fumiganti, inoltre, esercitano spesso anche un'azione fungicida, erbicida ed insetticida. In questa categoria sono annoverati l'1,3-D; i generatori di metilisotiocianato (MITC): metham sodio, metham potassio e dazomet; la cloropicrina, quest'ultima ad azione prevalentemente fungicida. Un recente prodotto fumigante, di prossima registrazione in Italia, che attualmente viene autorizzato in misura d'emergenza per 120 giorni, è il dimetildisolfuro (DMDS), che in sperimentazioni in pieno campo si è dimostrato efficace contro i nematodi galligeni e cisticoli, al pari dell'1,3-D (Curto *et al*., 2014).
- **nematocidi non volatili**, appartengono alle famiglie dei fosforganici e dei carbammati; sono disponibili in formulazioni granulari o liquide ed essendo poco fitotossici, vengono distribuiti al terreno in pre-trapianto i primi, in manichetta (*drip irrigation*), sia al trapianto sia durante la coltivazione, i secondi. La loro applicazione in pre-trapianto talvolta non riesce a proteggere una coltura a ciclo lungo (4-6 mesi), a raccolta tardo-estiva. In questa categoria sono compresi il fosthiazate, il fenamifos, l'oxamyl e l'ethoprofos quest'ultimo di recente revocato dal commercio in Europa (Noling, 2002; Matthiessen e Kirkegaard, 2006; Curto, 2004).

1.4.2 Mezzi di lotta eco-compatibili

Molti sono i fattori che determinano la tendenza in atto a ricercare metodi di difesa eco-compatibili, che integrino efficacemente diverse strategie di lotta ai nematodi, quali:

- la crescente richiesta di prodotti agricoli con ridotti residui e la maggiore attenzione alla riduzione dell'impatto ambientale dell'attività agricola;
- la revisione delle sostanze attive prevista dalla Direttiva 1107/2009/CE, ha lasciato in commercio pochi nematocidi, con un'efficacia e spettro d'azione limitato;
- la difficoltà di mettere a punto nuove molecole ad azione nematocida;
- l'elevata entità di costi e tempi per la ricerca e la registrazione degli agrofarmaci, che orientano le società produttrici a finanziare la ricerca di erbicidi e insetticidi, con maggiori prospettive di profitto.

Per tutti questi motivi la ricerca nell'ambito della lotta ai nematodi va nella direzione di prodotti e strategie alternativi ai prodotti di sintesi attuali; ad oggi l'integrazione dei vari mezzi di difesa appare la strada che deve essere seguita per garantire produzioni remunerative in orticoltura (Chitwood, 2002).

Oggi la ricerca di soluzioni alle infestazioni di nematodi, così come alle altre problematiche fitosanitarie, si fonda sul concetto della gestione integrata (IPM), il cui obiettivo è la massima riduzione nell'uso dei composti chimici ad ampio spettro, al fine di ridurre gli effetti indesiderati quali contaminazione dell'ambiente, eliminazione dei nemici naturali e sviluppo di resistenze (Matthiessen e Kirkegaard, 2006).

L'ordine *Capparales* (famiglie *Brassicaceae*, *Tovariaceae*, *Resedaceae*, *Capparaceae*, *Moringaceae*) comprende specie produttrici di metaboliti secondari chiamati glucosinolati (GLS), ampiamente studiati già a partire dagli anni '30 del secolo scorso per il loro potenziale abbattente, su una serie di organismi biologici del terreno, tra cui i nematodi. Anche alcune famiglie non appartenenti all'ordine *Capparales* producono glucosinolati: ad esempio *Caricaceae*, *Euphorbiaceae*, *Gyrotemonaceae*, *Limnathaceae*, *Salvadoraceae* e *Tropaeolaceae* (Fenwick *et al.*

1983). In particolare, tali composti sono molto diffusi nella famiglia delle *Brassicaceae*.

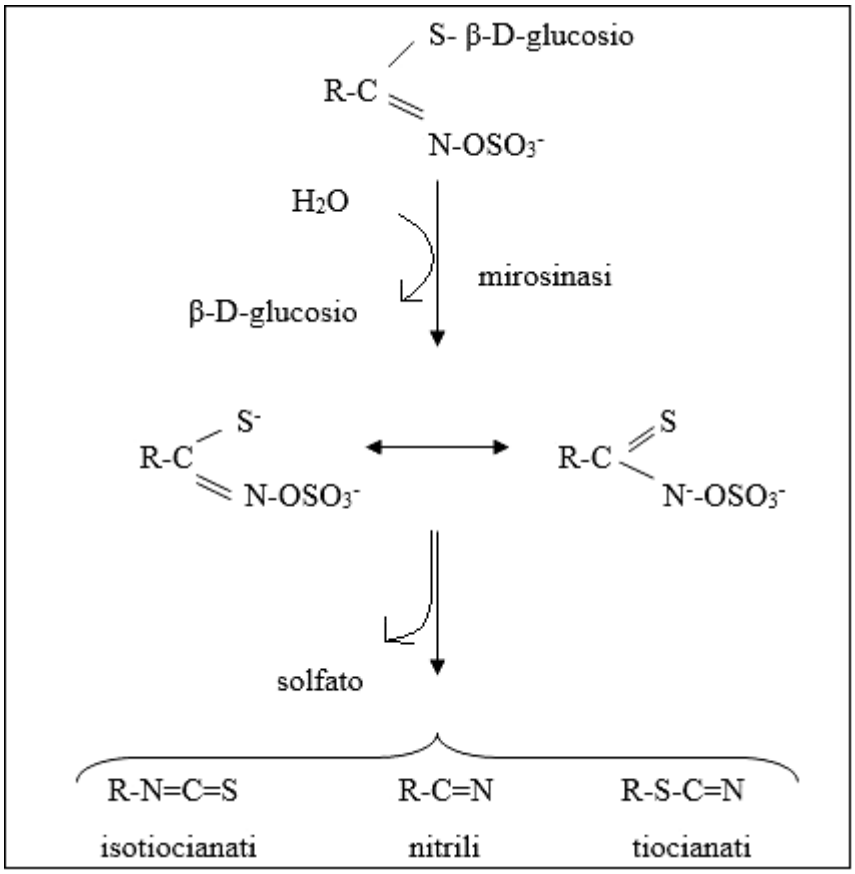


Fig. 8 - Idrolisi enzimatica dei glucosinolati via mirosinasi (Zasada e Ferris, 2003).

I glucosinolati da un punto di vista chimico sono costituiti da β-D-tioglucosio, una molecola formata da una parte glucidica, legata mediante un legame tiogucosidico a un'ossima sulfonata ed una catena laterale (R) variabile di natura aminoacidica (Tab. 1). La molecola presenta caratteristiche fortemente acide grazie al gruppo solfato, proprio per questo motivo i GLS sono controbilanciati da un catione come il potassio. Proprio per questo motivo nei vacuoli si trovano sotto forma di sali di potassio (Grob e Matile, 1979; Pocock *et al.*, 1987).

Tra i principali GLS troviamo la glucorafanina (GRA), glucoerucina (GER), glucobrassicina (GBS).

Sono presenti in tutti i tessuti della pianta, ma principalmente nei semi e nei germogli e separati fisicamente dalle mirosinasi (Zasada e Ferris, 2003). Quando un

tessuto viene danneggiato (ad esempio per la penetrazione del nematode nella radice o la trinciatura della pianta nella tecnica del sovescio) entrano in contatto i GLS con l'enzima mirosinasi (Fig. 8). In seguito a questo fenomeno si verifica un'idrolisi del legame β-tioglucosidico, liberando un aglicone e il D-glucosio. L'aglicone instabile va incontro a un riarrangiamento spontaneo non enzimatico (riarrangiamento di Lossen), che genera un'ampia varietà di prodotti come; isotiocianati, tiocianati, nitrili, epitionitrili, a seconda del composto di partenza. Tali prodotti, ed in particolare gli isotiocianati, sono composti biocidi altamente tossici e bioattivi di varia volatilità, attivi nei confronti dei nematodi (Brown e Morra, 1997). L'elevata bioattività dipende dalla presenza del gruppo –N=C=S, dove l'atomo di carbonio centrale, fortemente elettrofilo è in grado di reagire con i gruppi nucleofili dei bersagli cellulari. Fattori che favoriscono il rilascio di isotiocianati sono pH neutro, alte temperature, presenza di ioni Fe^{2+}, ed elevata presenza di acqua.

È stato verificato come il sistema glucosinolati-mirosinasi sia coinvolto nella liberazione degli isotiocianati, osservando che estratti di semi o foglie di *B. napus* risultavano tossici nei confronti di *Caenorhabditis elegans*, *Xiphinema americanum*, *H. schachtii* e *Globodera* solo quando essi venivano idrolizzati enzimaticamente (Chitwood, 2002).

1.4.3 Antagonisti e competitori microbiologici

I microrganismi promotori della crescita vegetale possono avere sia un'azione di contenimento diretta dei nematodi, attraverso antagonismo o anche predazione, sia indiretti, attraverso uno stimolo della pianta (Siddiqui e Mahmood, 1999). Alcuni studi riportano come l'azione del batterio promotore della crescita *Bacillus subtilis* porti ad una maggiore produzione di acido indol-3-acetico (IAA), siderofori, ammoniaca e solubilizzazione di fosfati inorganici (Siddiqui 2006; Zaidi *et al*., 2006; Joseph *et al*., 2007). Il meccanismo coinvolto nel controllo della popolazione di nematodi galligeni da parte di questo batterio, risiede nella produzione di una serie di composti volatili nematocidi (fenilacetaldeide, 2-nonanone, decanale, 2-undecanone, dimetildisolfuro), lipo-polipeptidi antinematici e antibiotici (surfactina, fengicina e iturina), denotando un'attività contro *Meloidogyne* spp. (Huang *et al.,* 2010; Kavitha *et al.,* 2012).

L'efficacia dei microrganismi è tuttavia controversa e dipendente sia dalle specie microbiche, dei vegetali e del nematode. Tuttavia, sono disponibili formulati a base di microrganismi multipli (funghi e batteri), antagonisti o competitori di *Meloidogyne* spp., che vengono distribuiti al terreno prima dell'impianto della coltura oppure, in presenza della stessa, anche in manichetta. Tra di essi ricordiamo i prodotti contenenti i funghi *P. lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* (sin. *Verticillium chlamydosporium*), il cui micelio parassitizza principalmente le uova dei nematodi.

Tra i formulati a base di batteri, quelli contenenti *B. firmus* sono efficaci contro il nematode galligeno, di cui il batterio colonizza e distrugge le uova (Curto, 2006; Manzali e Curto, 2014).

1.4.4 Sterilizzazione con vapore associato a sostanze a reazione esotermica e solarizzazione

Il vapore associato a ossido di calcio (CaO) o idrossido di potassio (KOH) consente di raggiungere nel terreno elevate temperature (60-70°C nei primi 15-20 cm) prolungate nel tempo. Dopo la distribuzione, effettuata in assenza della coltura, il terreno viene ricoperto con film plastici (Curto *et al*., 2014).

La solarizzazione, ossia la copertura del terreno nudo con un telo plastico per alcuni mesi, sfrutta le elevate temperature raggiunte durante il giorno per contrastare lo sviluppo di nematodi, patogeni ed erbe infestanti ed è applicabile nell'Italia meridionale, ma con risultati non sempre ripetibili e soddisfacenti al Nord (Curto, 2004; Curto, 2006).

1.4.5 Impiego di varietà e portinnesti resistenti

Anche la scelta del genotipo è fondamentale per il contenimento dei nematodi. In particolare, sono disponibili varietà di pomodoro resistenti a specie e razze di *Meloidogyne* (Curto, 2004); per la barbabietola, l'impiego di varietà tolleranti a *H. schachtii* in terreni infestati consente, entro certi valori di densità di popolazione del nematode, di ottenere una buona resa e di permettere una minore moltiplicazione del nematode rispetto alle varietà tradizionali (Beltrami *et al*., 2006; Beltrami *et al.*, 2007; Curto, 2008); anche in colture arboree, quali il pesco, il miglioramento genetico ha

portato alla costituzione di varietà di pesco resistenti a *M. incognita* (Sansavini *et al*., 2008).

Su peperone è stato riscontrato come la resistenza di alcune varietà ai nematodi sia controllata dalla presenza di diversi geni dominanti indipendenti, definiti geni *Me*, in particolare (*Me4*, *Mech1* e *Mech2*) sono specifici per il genere *Meloidogyne* spp., invece i geni (*Me1*, *Me3* e *Me7*) sono specifici per *M. arenaria*, *M. javanica*, e *M. incognita* (Djian-Caporalino *et al*., 2007). Il problema relativo alla resistenza naturale del gene *Mi-1* è dato dalla sensibilità alle temperature, in quanto la resistenza viene meno a 28°C (Dropkin, 1969).

È possibile inoltre l'innesto di *Solanaceae* ospiti di *Meloidogyne* su piede resistente (*Solanum torvum*); attualmente questo risulta uno dei mezzi di difesa più efficaci (Curto, 2004).

Da recenti studi di (Sànchez-Solana, *et al*., 2015) su nuove accessioni di portinnesti per peperone si è potuto appurare come la resistenza conferita dal gene *Me1* è stata più stabile rispetto a quella fornita dal gene *Me3*, portando all' identificazione di nuove varietà resistenti a *M. incognita.*

1.4.6 Avvicendamenti colturali

La rotazione con colture non ospiti è insufficiente a impedire che la popolazione di nematodi raggiunga la soglia economica di danno per specie polifaghe quali *Meloidogyne*; è invece un valido mezzo di difesa per specie con un limitato numero di ospiti, quali per esempio i nematodi cisticoli, ed è in grado di controllare anche patogeni e insetti dannosi alle colture (Curto e Di Silvestro, 2014).

1.4.7 Colture intercalari, "cover crops", sovesci e sostanze di origine naturale

Numerosi studi sono stati compiuti per verificare gli effetti di colture intercalari e del sovescio di alcune specie vegetali sulle popolazioni di nematodi.

Le colture intercalari e le "cover crops" contribuiscono a ridurre le popolazioni di nematodi in 4 modi:

- possono agire come colture non ospiti o come ospiti poco suscettibili, che inibiscono la riproduzione del nematode, ciò può avvenire per la morte precoce

del nematode all'interno della pianta, per la riduzione della produzione di uova e per l'inibizione dello sviluppo del nematode;

- possono produrre metaboliti secondari chiamati allelochimici, preesistenti nella pianta o indotti dall'attacco del nematode; tali sostanze possono essere repellenti o attrattive, indurre o inibire la schiusa delle uova dei nematodi, o essere tossiche verso questi organismi;
- possono creare una nicchia favorevole allo sviluppo della microflora e della microfauna antagoniste (parassiti, predatori e altri microrganismi con azione repellente, inibente o biocida nei confronti dei nematodi);
- possono agire come piante trappola, permettendo la penetrazione del nematode nelle radici, ma facendo in modo che esso non riesca a completare il proprio ciclo di sviluppo entro il periodo di coltivazione della pianta (Wang *et al.*, 2002).

Il sovescio, ossia la trinciatura seguita dall'interramento di una coltura, ha un forte impatto sulle caratteristiche biologiche e fisiche del terreno e può contrastare i nematodi in due modi:

- indirettamente, creando un ambiente favorevole ai microrganismi antagonisti e allo sviluppo della coltura ospite del nematode dovuto all'apporto di sostanza organica, che migliora la fertilità chimica e biologica del terreno;
- direttamente, a causa dei composti allelochimici prodotti (Chitwood, 2002; Lazzeri *et al.*, 2005; Curto *et al*., 2006).

È inoltre possibile produrre dei formulati a base di estratti vegetali ad effetto principalmente nematostatico, oltre che biostimolante nei confronti della pianta. Tali prodotti vengono distribuiti principalmente per "drip irrigation" ed esplicano il loro effetto a seguito del contatto prolungato con le radici.

Tra di esse ricordiamo gli estratti dell'albero del neem (*Azadirachta indica*, *Meliaceae*), contenenti azadiracthina un limonoide; gli estratti di *Quillaja saponaria* (*Rosaceae*), contenenti saponine triterpeniche, polifenoli e tannini (D'Addabbo *et al*., 2005; D'Addabbo *et al*., 2006) gli estratti di *Tagetes erecta* (*Compositeae*), contenenti α-tertienile (Chitwood, 2002; Curto *et al.*, 2007).

Altri formulati sono stati studiati per poter essere distribuiti nel sistema di irrigazione in manichetta, come l'estratto di aglio liquido, tannini estratti da diverse

essenze, terpeni e formulati costituiti da microrganismi come *P. lilacinus*, *B. firmus*, o *B. subtilis*.

Le sostanze a presunta attività biocida coinvolte nell'interazione pianta-nematode (allelopatia), una volta individuate, possono essere estratte al fine di evidenziarne l'efficacia nei confronti degli organismi bersaglio, in prove di campo o di laboratorio. In caso di comprovata attività biologica, tali sostanze possono essere destinate all'impiego come nematocidi o possono servire come modello per lo sviluppo di molecole di sintesi ad attività potenziata e rispettose dell'ambiente (Chitwood, 2002).

In Italia è attualmente in commercio un olio vegetale a base di *T. erecta* (80%), alghe (20%) e sostanza organica, ammesso anche in agricoltura biologica e privo di intervallo di sicurezza; i derivati tienilici contenuti nell'estratto di tale pianta distruggono la cuticola di *Meloidogyne* e il corion delle sue uova, oltre a esplicare attività battericida e fungicida (Curto, 2006).

Recentemente sono stati registrati formulati nematocidi a base di aglio o oli essenziali come timolo e geraniolo. I primi caratterizzati dalla presenza di polisulfidi molto reattivi per contatto o ingeriti dai nematodi, i secondi presentano un'attività lipofila, determinando la perdita di integrità delle membrane e successiva lisi. Inoltre entrambi caratterizzati da assenza di profilo residuale e modalità d'azione multisito.

I panelli proteici derivanti da semi disoleati di *B. carinata*, essiccati e pellettizzati, contengono elevate concentrazioni di sostanze biologicamente attive (glucosinolati). Il pellet distribuito al terreno, in presenza di acqua, manifesta attività antifungina, nematocida e di contenimento delle erbe infestanti, e apporta sostanza organica, azoto e fosforo (Chitwood, 2002; Lazzeri *et al*., 2009; Curto *et al*., 2016).

Anche alcuni prodotti di sintesi, come il metham sodio, fondano la propria attività biocida sulla liberazione di isotiocianati, in particolare il metil isotiocianato.

È possibile selezionare *Brassicaceae* che contengano concentrazioni di glucosinolati sufficientemente elevate da produrre, potenzialmente, livelli di isotiocianati uguali o superiori a quelli liberati dalle dosi comunemente applicate di composti di sintesi generatori di metil isotiocianato. Bisogna però tenere conto dell'efficienza di conversione dei glucosinolati in isotiocianati e del loro destino nel terreno (in generale, pare che terreni sabbiosi con bassi contenuti di sostanza organica

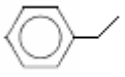
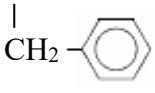
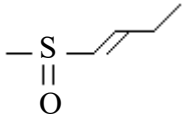
permettano una migliore espressione dell'effetto biofumigante) (Matthiessen e Kirkegaard, 2006).

Gli isotiocianati provocano tassi di mortalità diversi in funzione di:

- specie vegetale e cultivar
- stadio di crescita
- composizione chimica della catena laterale
- concentrazione
- tempo di esposizione
- specie del nematode (Zasada e Ferris, 2003).

Ad esempio, il principale glucosinolato in *Raphanus sativus* è il 4-metilsulfinil-3-butenil glucosinolato (glucorafanina); *B. juncea* (colza) produce principalmente il propenil glucosinolato (sinigrina); *B. oleracea* (cavolo) propenil e 2-idrossi-3-butenil glucosinolato (epiprogoitrina); *B. napus* ne contiene quattro: 2-idrossi-3-butenil, 3-butenil, 4-pentenil e 2-idrossi-4-pentenil glucosinolato (Sang *et al.*, 1984).

Tab. 1 - Struttura dei gruppi R di alcuni glucosinolati, isotiocianati liberati per idrolisi enzimatica, e principali specie vegetali che le contengono (Buskov *et al.*, 2002; Zasada e Ferris, 2003).

Glucosinolato	**Struttura del gruppo R**	**Isotiocianato**	**Specie vegetale**
Sinigrina	CH_2=CH-CH_2-	Allil	*B. carinata, B. napus, B. juncea*
Erucina	CH_3-S-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-	4-metiltiobutil	*Eruca sativa*
Sinalbina	HO- -CH_2-	p-idrossibenzil	*Sinapis alba*
Gluconasturtina		2-feniletil	*B. juncea, B. hirta, B. verna*
Glucotropeolina		Benzil	*B. hirta, Lepidium sativum*
Glucorafanina		4-metilsulfinil but-3-enil	*R. sativus, Rapistrum rugosum*

I prodotti dell'idrolisi dei glucosinolati possono esercitare un'azione erbicida, fungicida, battericida, insetticida e nematocida.

In base alla composizione chimica della catena laterale, possiamo distinguere gli isotiocianati in alifatici e aromatici. Sebbene i test *in vitro* abbiano mostrato un maggiore potenziale degli isotiocianati aromatici nel contenere insetti, microrganismi e nematodi, in prove svolte in terreno la loro attività è drasticamente ridotta e molto più influenzata dalle condizioni ambientali rispetto a quanto avviene per gli isotiocianati alifatici. È possibile che la maggiore attività di contatto degli aromatici, attribuita a caratteristiche della loro struttura molecolare che influenzano la loro reattività con enzimi essenziali, possa accrescere anche la loro reattività con altri substrati, come i componenti organici del terreno, il che spiegherebbe anche la loro bassa volatilità. La risposta degli organismi bersaglio ai tessuti disgregati di *Brassicaceae* ha confermato la maggiore attività biocida degli isotiocianati alifatici rispetto a quelli aromatici, nonostante i risultati opposti ottenuti *in vitro* (Matthiessen e Shackleton, 2005). La parte aerea della pianta contiene principalmente glucosinolati precursori di isotiocianati alifatici; le radici, i precursori di quelli aromatici (Kirkegaard e Sarwar, 1998).

È importante determinare il tipo, la concentrazione e la distribuzione dei glucosinolati nelle diverse specie, per determinarne le potenzialità d'impiego; l'individuazione di glucosinolati i cui prodotti di idrolisi mostrano elevata attività nematocida (Curto *et al*., 2005), ed eventualmente anche fungicida nei confronti di una o più specie target consente di perseguire due possibili strategie:

- selezionare specie e cultivar di *Brassicaceae* ad elevato contenuto in glucosinolati che liberano composti biocidi. Tali accessioni sono da utilizzare come colture intercalari e da sovescio nell'ambito di avvicendamenti colturali (piante biocide);
- ottenere farine disoleate e pellet dai panelli di semi da destinare alla distribuzione in campo o in serra per la difesa delle colture (Lazzeri *et al.*, 2004b; Curto e Lazzeri, 2006; Lazzeri *et al.*, 2009; Curto *et al*., 2016).

In particolare, per l'ottenimento di pellet essiccati è necessario limitare, durante il processo di disidratazione, la perdita di glucosinolati e la riduzione dell'attività della mirosinasi, così che siano effettivamente in grado di liberare i composti attivi in campo

quando vengono bagnati con l'irrigazione. Utilizzando una semplice tecnica di essiccamento in laboratorio si è avuta, per alcune selezioni di *Brassicacee*, una perdita di glucosinolati inferiore al 40%, e si è preservata una sufficiente attività della mirosinasi. Tali risultati vengono ulteriormente migliorati disidratando le piante con processi di tipo industriale. I pellet ottenuti sono stati in grado di esercitare *in vitro*, dopo una bagnatura, lo stesso effetto fungitossico verso *Pythium* spp. e *Rhizoctonia solani* ottenuto in altre prove con l'impiego di glucosinolati e mirosinasi puri (Lazzeri *et al.*, 2004b).

1.4.8 Piante biocide

Si distinguono in piante trappola e piante ad azione biofumigante.

- **Piante trappola o "catch crops".**

  Contengono elevate concentrazioni di glucosinolati nelle radici; le larve del nematode possono penetrare in esse, innescando la reazione di idrolisi, ma l'isotiocianato prodotto non permette il completamento del ciclo di sviluppo del nematode entro il periodo di coltivazione della pianta, come avviene per esempio in *E. sativa* cv. Nemat e *R. sativus* cv. Boss (Curto e Lazzeri, 2006; Curto *et al.*, 2006). Nel nord Europa sono state selezionate cultivar di *R. sativus* e di *Sinapis alba* da usare come piante trappola per *H. schachtii* prima della coltivazione della barbabietola (Müller, 1999; Schlathoelter, 2004), che sono state efficacemente utilizzate anche in Italia (Beltrami *et al*., 2006; Beltrami *et al.*, 2007; Curto, 2008).

- **Piante ad azione fumigante.**

  Contengono elevate concentrazioni di glucosinolati anche nella parte aerea, per cui la loro azione si esplica soprattutto a seguito di trinciatura e interramento, come in *B. juncea* sel. ISCI 99 e *Crambe abyssinica* cv. Mario.

  Nel nord Italia sono state individuate due possibili epoche di coltivazione delle specie intercalari: estivo-autunnale e tardo primaverile; la coltivazione si protrae per circa 10 settimane. Il sovescio viene effettuato in piena fioritura e la trinciatura deve essere immediatamente seguita dall'interramento e dall'irrigazione, che

innesca la reazione di idrolisi; la semina o il trapianto della coltura devono essere effettuati dopo almeno 7-10 giorni per evitare fenomeni di fitotossicità.

Le selezioni biocide possono essere efficacemente impiegate per il contenimento dei nematodi galligeni (gen. *Meloidogyne*) e cisticoli (gen. *Heterodera* e *Globodera*).

Le *Brassicaceae* biocide, inserite come intercalari in avvicendamenti con specie ospiti di nematodi, apportano inoltre elevate quantità di sostanza organica e migliorano la struttura del terreno grazie al loro apparato radicale profondo e ramificato, e nel complesso portano ad un aumento della produttività della coltura (Curto *et al.*, 2005; Curto *et al*., 2014).

Avvicendamenti colturali di fragola con colza o senape sono state in grado di arrestare la diffusione di *Pratylenchus penetrans* (nematode delle lesioni radicali endoparassita migratore) a differenza di rotazioni con patata o altre *Leguminoseae*; il sovescio con *Brassicaceae* (colza e senape) ha ridotto la popolazione del nematode (Winkler e Otto, 1980).

Analogamente, sovesci di colza sono stati in grado di ridurre significativamente la popolazione di *M. chitwoodi* in confronto a quella del terreno non ammendato (Mojtahedi *et al.*, 1991).

Altre specie vegetali ad azione sostanzialmente biofumigante, appartengono a famiglie diverse dalle *Brassicaceae* e basano la loro azione tossica per i nematodi su sostanze chimiche contenute nei loro tessuti. Fra queste ricordiamo il sorgo (*Sorghum bicolor*), il sudangrass (*S. sudanensis*) e gli ibridi sorgo-sudangrass (*S. bicolor* × *S. sudanensis*) che nelle cellule dell'epidermide di foglie e radici contengono dhurrina, un glucoside cianogenico che può degradare in acido cianidrico, ben conosciuto per la sua tossicità per molti organismi, incluso i nematodi (Curto *et al*., 2012). Un'altra specie molto promettente è la *Crotalaria juncea*, una Leguminosa di origine tropicale, che contiene nei suoi tessuti alcaloidi ad alta attività biologica quali le dehydropyrrolizidine (Colegate *et al*., 2012; Curto *et al*., 2015).

In tutti i casi finora descritti la trinciatura e l'interramento delle colture da sovescio, oltre a sviluppare sostanze tossiche per gli organismi nocivi, apportano al terreno grandi quantitativi di sostanza organica e nel caso di Crotalaria, grazie alla

simbiosi con il rizobio, anche di azoto, contribuendo a superare fenomeni di stanchezza, a rivitalizzare il microbioma del terreno e a ridurre i quantitativi di concimi e fertilizzanti chimici.

1.4.9 Metodi di controllo biotecnologici

Le ricerche omiche in ambito biotecnologico e metodi innovativi di sequenziamento genico hanno contribuito ad arricchire le conoscenze molecolari delle interazioni pianta-nematode, permettendo di inserire ed esprimere geni endogeni e eterologhi per migliorare la resistenza delle piante contro i nematodi (Ibrahim *et al*., 2019).

Tali necessità portano a focalizzare l'attuazione di tale strategia di controllo con la tecnologia dell'RNAi, molto utilizzata per controllare le infezioni da parte di agenti patogeni delle piante. L'interferenza dell'RNA è un meccanismo di difesa naturale che innesca la degradazione dell'mRNA, per regolare l'espressione genica a livello post trascrizionale e degradare l'RNA estraneo durante l'infezione da virus negli eucarioti (Fire *et al*., 1998; Rosso *et al*., 2009; Sharp, 2001). Esistono diverse tecniche per produrre piante con difese dedicate a contrastare un determinato patogeno a livello trascrizionale e post trascrizionale, come ad esempio il silenziamento genico indotto da virus (VIGS) e il (miRNA) un silenziamento genico mediato da microRNA (Mmeka *et al*., 2014).

Il problema di applicare tale tecnica sui nematodi, nonostante il silenziamento dell'RNA sia altamente specifico, si traduce sulla possibilità di silenziare geni non target, andando ad incidere quindi sulla fauna microbica. Si può ulteriormente intervenire con maggiore precisione, andando ad agire su geni specie specifici e un'accurata analisi bioinformatica, evitando anche l'uso di famiglie geniche con un alto grado di somiglianza delle sequenze, tra i regni vegetale e animale. Tali requisiti permettono di aumentare la biosicurezza di queste tecniche.

Infine, l'RNAi dei geni costruttivi come quelli ribosomiali e delle proteine dello splicesoma, interferiscono sul processo riproduttivo e parassitario dei nematodi (Klink *et al*., 2009; Yadav *et al*., 2006). Sebbene questi tipi di geni abbiano effettivamente un'evidente e documentata efficacia riducendo notevolmente l'infezione, tali geni relativi allo sviluppo e costruttivi non possono essere utilizzati a tale scopo, essendo

altamente conservati tra gli animali e attraverso i phyla. D'altro canto, RNAi riguardanti i geni del parassitismo, possono essere una valida alternativa e altamente specifica per proteggere le piante evitando gli effetti su gli organismi non bersaglio, poiché spesso riguardano proteine specie specifiche, come gli effettori (Ibrahim *et al*., 2019).

Questi approcci sono alla base per poter ampliare l'allevamento di cultivar resistenti ai nematodi, grazie anche al crescente sviluppo della tecnica mediante l'utilizzo di CRISPR/Cas9, modificando direttamente il genoma delle piante, come già fatto nelle piante di cece e alcune leguminose (Li *et al*., 2015; Meng *et al*., 2017). Anche se tale tecnica molto precisa, efficace e ad impatto ambientale prossimo allo zero, porta alla produzione di piante geneticamente modificate, dove rigidi regolamenti specialmente in Europa, ne vietano la coltivazione.

Grazie a queste evidenze e al progresso delle tecniche di laboratorio, si è potuto gettare le basi per possibili alternative di lotta future contro i nematodi.

2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

I nematodi galligeni appartenenti al genere *Meloidogyne* rappresentano una problematica fitosanitaria di assoluto rilievo su colture orticole in serra e pieno campo, colture da seme e talora anche su piante arboree, soprattutto in vivai o giovani impianti (Di Vito *et al*., 1985; Sasanelli, 1994; Curto *et al*., 2005). Questi fitoparassiti, largamente presenti nelle aree costiere italiane, caratterizzate prevalentemente da terreni sabbiosi. Le in condizioni climatiche caldo-umide, associate ad una spiccata polifagia di piante ospiti, determinano il rapido sviluppo delle popolazioni, rendono tale genere responsabile di gravi danni e di rilevanti decrementi produttivi sulle colture indicate, in particolare sulle *Solanaceae* e *Cucurbitaceae* coltivate in ambiente protetto (Sasanelli *et al*., 2014). La revisione europea delle sostanze attive dall'applicazione del Regolamento 1107/2009/CE ha determinato l'eliminazione di alcuni nematocidi dalla lista positiva, riducendo il numero dei trattamenti e dei formulati.

Negli ultimi anni sono state effettuate prove sperimentali nelle quali sono state saggiate nuove sostanze di origine chimica (Risi *et al.*, 2014; Faske e Hurd, 2015; Ramella *et al*., 2016), naturale e microbiologica (Carletti e Maistrello, 2012; D'Addabbo *et al*., 2012; Ladurner *et al*., 2014; Curto *et al*., 2014; Bargiacchi *et al*., 2017) con risultati incoraggianti. L'integrazione di tutti i mezzi disponibili (chimici, microbiologici, naturali, agronomici, fisici) con strategie di produzione integrata IPM rendono fondamentali la possibilità di contenere infestazione di nematodi fitoparassiti riducendo l'impatto ambientale. Tali strategie si sono affermate soprattutto nelle colture ortive in serra, o sotto tunnel, per contenere le popolazioni di nematodi galligeni del genere *Meloidogyne* (Lamberti, 1979) attraverso la distribuzione di prodotti liquidi in manichetta forata (Lazzeri *et al*., 2009; Curto *et al*., 2012; De Nicola *et al*., 2013).

In questo scenario abbiamo intrapreso uno studio pluriennale relativo alle annate 2017, 2018, 2019 per saggiare l'efficacia di nuovi prodotti chimici, biofumiganti, microbiologici o fitostimolanti nei confronti di *M. incognita*, su coltura protetta di peperone in Romagna. Con queste finalità per poter quantificare le differenze tra varie strategie sono stati effettuati rilievi sulla produzione, con peso e numero di frutti per pianta, sui danni, mediante l'indice galligeno utilizzando le classi di infestazione presenti nella scala Zeck (1971).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Caratteristiche del sito di prova

La prova ha avuto come scopo quello di valutare nel triennio (2017, 2018, 2019) l'efficacia delle diverse strategie alternative utilizzando nuovi formulati di origine naturale biostimolanti e microbiologici nel contenimento di nematodi galligeni in particolare *M. incognita.*

La sperimentazione è stata condotta in un'azienda agricola di Bellaria-Igea Marina in provincia di Rimini (44°7'18.58" N – 12°29'27.89" E) a circa 2 m s.l.m. (Fig. 9) su coltura di peperone, varietà Senior F1 (qg), in tunnel di materiale plastico non riscaldato delle dimensioni di 400 m^2 (8 m x 50 m), con un sesto d'impianto di 1 m tra le file e 0,4 m sulla fila. Il terreno si presenta sciolto con un'alta percentuale di sabbia. La morfologia del terreno è pianeggiante con esposizione est/ovest.

Fig. 9 - Ubicazione della prova, con indicazione della serra.

3.2 Impostazione della sperimentazione

Le prove sono state svolte seguendo il disegno sperimentale split plot randomizzato, costituite da un tratto di fila della dimensione di 12,5 m^2 (12,5 m x 1 m) con circa 29 piante ciascuna, con quattro ripetizioni (Fig. 10).

Sono state messe a confronto diverse strategie, più un testimone non trattato secondo lo schema dei formulati riportato in tabella 2.

In primavera, prima del trapianto è stata verificata la presenza e l'omogeneità dell'infestazione di *M. incognita* nel terreno, specie di nematode galligeno determinata mediante identificazione morfologica.

Le piantine di peperone sono state trapiantate rispettivamente il 28 aprile 2017, 27 aprile 2018, 05 maggio 2019. Le colture in precessione sono state lattuga primaverile e bietola da coste, anche esse ospiti di nematodi galligeni. Prima del trapianto è stato

Tab. 2 - Programma dei trattamenti per il contenimento di *M. incognita*, nelle annate 2017, 2018, 2019.

Sostanza attiva	**Anno**	**Formulato commerciale**	**Sostanza attiva su 100 g prodotto (g)**	**Dose**
1,3 Dicloropropene	2017	Telone EC® (Corteva Agriscience)	94 g (1161,8 g/L)	200 L/ha
Terpeni (Timolo, geraniolo)	2018, 2019	Cedroz (Eastman)	Timolo 41,25 g/L Geraniolo 123,75 g/L	10,8 L/ha
B. firmus I-1582	2017, 2018	Flocter (Bayer)	5 g ($3,55 \times 10^{12}$ CFU/kg)	80 kg/ha
Fluopyram	2017, 2018	Velum Prime (Bayer)	34,5 g (400 g/L)	0,625 L/ha
Estratto di aglio granulare	2017, 2018, 2019	NemGuard Granules (CBC Europe Srl)	45 g (450 g/kg)	20 kg/ha
Estratto di aglio liquido	2017, 2018, 2019	NemGuard SC (CBC Europe Srl)	100 g (1000 g/L)	4 L/ha
Sfarinato di panelli proteici di *B. carinata*	2017	BioFence Dieci (Agrium - Italia)	Non determinata	2000 kg/ha
Formulato liquido di panelli proteici di *B. carinata*	2017	BioFence FL (Agrium - Italia)	Non determinata	20 L/ha
Tannino di castagno microgranuli	2017	Microgranuli solubili (Sadepan Chimica)	100 g (1000 g/kg)	90 kg/ha e 15 kg/ha
Tannino C idrolizzabile	2018	Agritan - polvere solubile (Silvateam)	100 g (1000 g/kg)	90 kg/ha e 15 kg/ha
Tannino T condensato	2018	Agritan - polvere solubile (Silvateam)	46 g (460 g/L)	30 L/ha
Miscela di *V. chlamydosporium*, con funghi e batteri della rizosfera + attivatore	2018	Pochar + Nutriaction (Microspore)	Non determinata	2 L/ha + 2 L/ha
P. lilacinus ceppo 251	2017, 2018, 2019	Bioact Prime DC (Bayer)	(216 g/L, pari a $5,1 \times 10^{13}$ spore/L)	0,75 L/ha
Tannino C idrolizzabile	2019	Agritan - liquido (Silvateam)	50 g (500g/kg)	180 L/ha e 30 L/ha

predisposto il sistema di irrigazione per mezzo di manichetta forata a 10 cm, dove per ogni fila sono state assicurate due ali gocciolanti in modo da avere il giusto apporto di acqua per la coltura. In testa all'impianto, è stato applicato un connettore di tubo venturi per permettere l'erogazione dei prodotti liquidi direttamente nelle manichette, diluiti nella proporzione di 1:5 parti di acqua. Prima dell'erogazione dei prodotti liquidi è stata sempre assicurata la presenza di terreno umido e dopo l'erogazione si è provveduto in ogni caso a lavare l'impianto con sola acqua per circa 10 minuti, in modo da permettere anche una migliore la traslocazione dei prodotti lungo il profilo del terreno. Nel caso dell'intervento chimico ad azione fumigante con 1,3-D (Telone EC®) utilizzato nel 2017, l'applicazione è stata effettuata 19 giorni prima del trapianto, dopo che il terreno era stato irrigato in modo da raggiungere un'umidità del 50-70% della capacità di campo e temperatura del terreno ≥ 12 °C.

Fig. 10 - Predisposizione della prova, con particolare del sistema di erogazione dei prodotti liquidi.

3.3 Rilievi in campo

I rilievi eseguiti in tutti e tre gli anni di sperimentazione sono stati a carico, del terreno, delle radici e della produzione in frutti, riguardando la presenza di larve di seconda età di *M. incognita* nel terreno, l'indice galligeno sulle radici e la produzione commerciale totale in bacche.

Sono stati effettuati:

- 4 campionamenti di terreno: 1 in pre-trapianto, 2 in piena produzione e 1 a fine ciclo;
- 3 rilievi radicali: 2 in piena produzione e 1 a fine ciclo
- n° di stacchi produttivi: 6 nel 2017, 6 nel 2018, 5 nel 2019

I rilievi radicali sono stati eseguiti esaminando 6 piante per parcella nei primi 2 rilievi e 10 piante centrali di ciascuna parcella all'ultimo rilievo. La valutazione dell'indice galligeno è stata eseguita secondo la scala Zeck (1971), (Fig.11). Questa è suddivisa in 10 classi di infestazione progressiva così espresse:

- 0 = assenza di galle
- 1 = poche e piccole galle
- 2 = numerose piccole galle
- 3 = numerose piccole galle, alcune di queste crescono insieme
- 4 = numerose piccole galle e alcune grandi
- 5 = 25 % delle radici presenta galle
- 6 = 50 % delle radici presenta galle
- 7 = 75 % delle radici presenta galle
- 8 = nessuna radice sana ma la pianta è verde
- 9 = radici marcescenti e pianta in deperimento
- 10 = morte della pianta

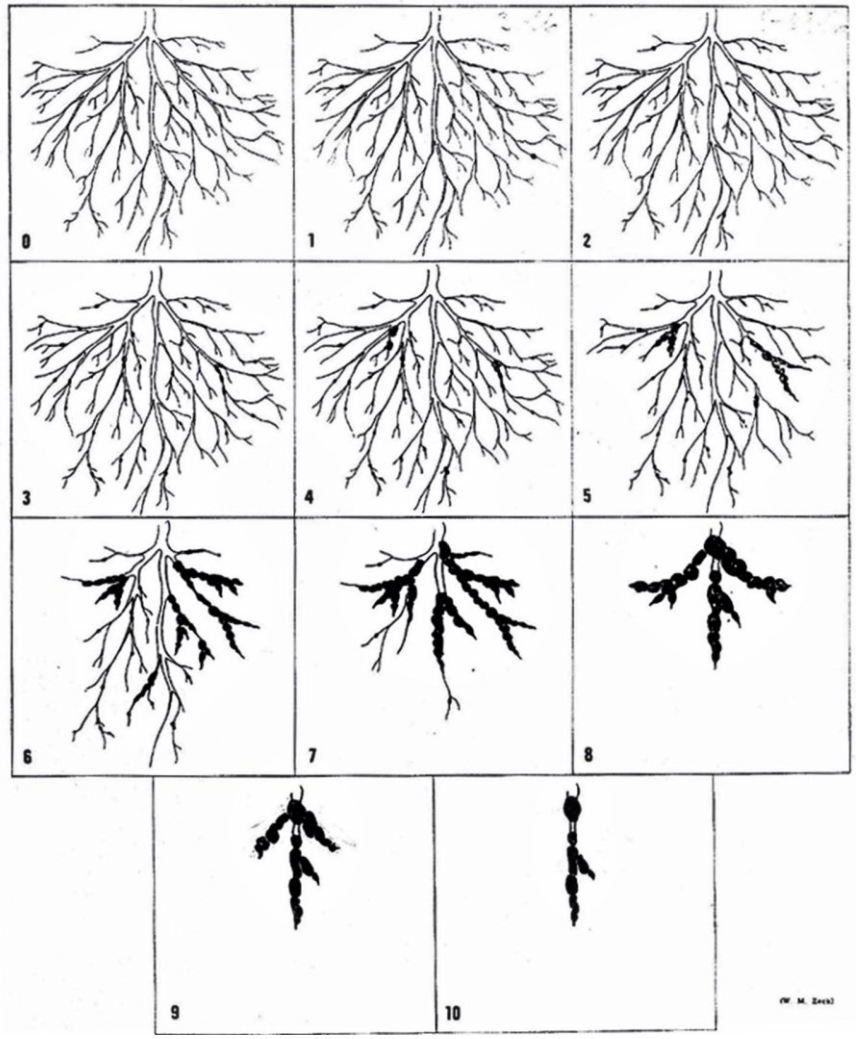


Fig. 11 - Rappresentazione grafica scale Zeck (Zeck, 1971).

In base alla valutazione del danno è stato calcolato il seguente indice con la seguente formula:

$$Indice\ galligeno = \frac{\sum(n°\ radici\ x\ classe\ di\ infestazione)}{n°\ totale\ di\ radici}$$

In concomitanza a tale valutazione sono stati prelevati campioni di circa 1500 grammi di terreno da ogni parcella, da cui poi estrarre in laboratorio le larve di seconda età (L2) di *M. incognita*. Infine i rilievi produttivi sono stati eseguiti raccogliendo da ogni parcella le bacche al raggiungimento della maturità commerciale, considerando la produzione commerciale e quella di scarto (bacche deformi e marcescenti). La produzione totale infine è stata espressa in valore medio di grammi per pianta.

3.4 Estrazione delle larve infestanti dal terreno campionato

I campioni di terreno sono stati processati in laboratorio con il metodo del filtro di carta lana (Tacconi e Ambrogioni, 1995), estraendo le larve di seconda età (L2) di *M. incognita* da ciascun campione opportunamente mescolato.

Viene di seguito descritto il metodo di estrazione prescelto. Si pone in una bacinella di plexiglass o acciaio di 18 cm di diametro, un setaccio con maglie di 2-3 mm, su cui si è adagiato un filtro di carta lana, che ha la capacità di bloccare il terreno ma di essere attraversato da larve di piccole dimensioni come quelle di *Meloidogyne* spp. Si pongono quindi 100 cc di terreno sul filtro e si inserisce acqua nell'intercapedine, tra bacinella e setaccio fino a coprire completamente il terreno, si lascia poi in estrazione per 6 giorni, tempo necessario per permettere alle uova di schiudere, curandosi che il livello dell'acqua rimanga costante.

Trascorso il tempo stabilito, l'acqua di estrazione viene passata in un setaccio con maglie di 40 μm, in grado di trattenere le larve. Per mezzo di acqua corrente, facendo roteare il setaccio, le larve sono convogliate in un unico punto, insieme ad un'esigua quantità di acqua, eliminando le eventuali impurità presenti e trasferite in una capsula conta nematodi (Fig. 12). Quest'ultima viene poi posta sotto lo stereomicroscopio e le larve di *M. incognita* identificate e contate.

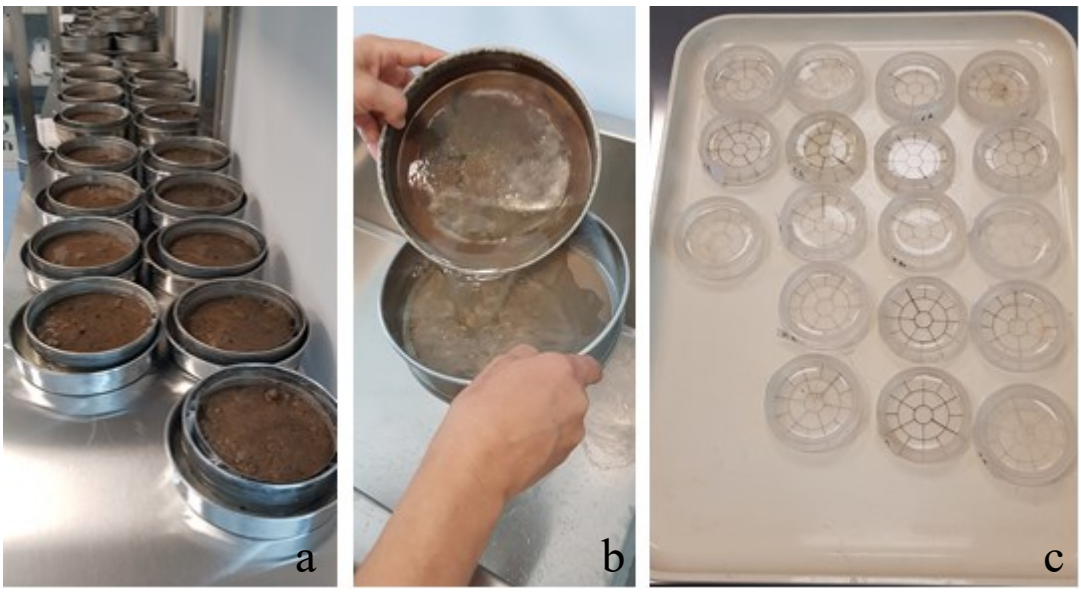


Fig. 12 - Procedimento di estrazione del terreno con il metodo carta lana (a), filtraggio dell'acqua di estrazione (b), campione di acqua con nematodi nella piastra per il conteggio (c).

3.5 Calcoli e analisi statistica

I dati raccolti sono stati utilizzati per calcolare il peso medio dei frutti delle diverse frazioni e l'incidenza di ogni frazione (prodotto commerciale, frutti piccoli e frutti non commerciabili) sul totale. Tale calcolo è stato condotto sia su base numerica, sia di produzione complessiva.

Le produzioni sono state rese per singola piante aggregate per tutte le raccolte o al variare della singola raccolta, in tal caso espresse come prodotto (in peso o numero) cumulato all'avanzare delle raccolte per anno di prova.

L'analisi dei dati è stata effettuata con un modello lineare generalizzato misto (GLMM) attraverso la procedura Glimmix in ambiente SAS/STAT 9.2. Un modello simile è presentano nei materiali supplementari in Saia e*t al*., 2019. In particolare, i singoli trattamenti sono stati annidati nel gruppo. La sproporzione numerica di trattamenti tra i gruppi e la relativa e variabile frequenza tra i cicli colturali, sono state tenute in conto attraverso una correzione dei gradi di libertà con il metodo di Kenward-Roger e l'imposizione di un fattore random. Nei fattori random sono state inserite anche le repliche.

Nell'analisi per epoca di raccolta, il tempo è stato inserito come fattore di variazione. In tale procedura, la variazione temporale viene inserita come fattore random ma imponendo come unità di riferimento la fila di presenza delle singole piante. Ciò è stato dovuto al fatto che il rilievo delle rese è avvenuto per fila e quindi reso per pianta e non direttamente per pianta all'interno della fila.

Quando l'effetto dei trattamenti è stato significativo, le medie tra i trattamenti sono state separate tramite un test delle 'pdifferences' delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS). Per aumentare il grado di salvaguardia dell'analisi, e quindi la bontà dei risultati forniti, le differenze tra medie sono state ulteriormente raggruppate applicando un test conservativo di Tukey Kramer al 5% alle LSMEANS.

4. RISULTATI

4.1 Presenza di nematodi nel terreno e nella radice

La presenza di larve di nematode nel terreno durante i tre cicli colturali è stata influenza più dal momento di rilievo che dai trattamenti applicati (Tab. 3) e ciò è stato evidente soprattutto nei primi due cicli colturali. In particolare, nel 2017 è stato evidenziato un forte decremento delle larve nel terreno, con differenze tra i trattamenti evidenti soprattutto al primo rilievo, in cui i controlli positivi e l'applicazione di aglio hanno ridotto il numero di larve rispetto al controllo negativo del 48-92%, mentre la variazione del numero di larve nel terreno dovuto all'applicazione di *B. carinata* non è apparso evidente.

Tab. 3 - Analisi della varianza con un modello generale linearizzato ad effetti misti e stime dei minimi quadrati (LSmeans per rilievo) della presenza di nematodi nel terreno e indice galligeno di Zeck in peperone allevato in serra per tre anni. Variabili con p <0.05 sono mostrate in grassetto. Nell'ambito di ciascuna annualità, dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

		Numero di larve / 100 cc di terreno		**Indice Galligeno di Zeck**	
		F	***p***	***F***	***p***
2017	**Trattamento (T)**	1,58	0,2396	**8,03**	**0,0016**
	Rilievo (R)	**20,17**	**<.0001**	**24,25**	**<.0001**
	T×R	2,05	0,0727	2,04	0,0738
2018	**Trattamento (T)**	**2,91**	**0,0235**	**22,51**	**<.0001**
	Rilievo (R)	**19,69**	**<.0001**	**52,14**	**<.0001**
	T×R	**3,63**	**0,0004**	**2,56**	**0,008**
2019	**Trattamento (T)**	2,54	0,0525	**30,78**	**<.0001**
	Rilievo (R)	2,29	0,1134	**20,88**	**<.0001**
	T×R	1,3	0,2548	**3,69**	**0,0008**
	Rilievo (R)	***LSmeans dei rilievi***			
2017	**1**	113,89	A	1,86	B
	2	29,28	B	3,1	A
	3	10,89	B	2,97	A
2018	**1**	1,19	C	0,47	C
	2	81,88	B	0,84	B
	3	171,59	A	1,49	A
2019	**1**	301,79		2,54	B
	2	358,75		2,46	B
	3	260,71		3,06	A

A differenza del primo anno, nel secondo anno è apparso evidente un incremento nel tempo della quantità di larve nel terreno (Tab. 3), con un anticipo dell'incremento in particolare per il controllo negativo rispetto agli altri trattamenti. Nel terzo rilievo del 2018 (Fig. 13), in prossimità della fine del ciclo, un decremento dall'81% al 91% del numero di larve rispetto al controllo è stato osservato nel trattamento in cui sono stati aggiunti terpeni da soli o insieme a aglio o prodotto di sintesi.

Infine, i trattamenti non hanno mostrato effetti sul numero di nematodi per unità di terreno nel terzo anno, facendo osservare sempre un incremento per il tempo (Tab. 3).

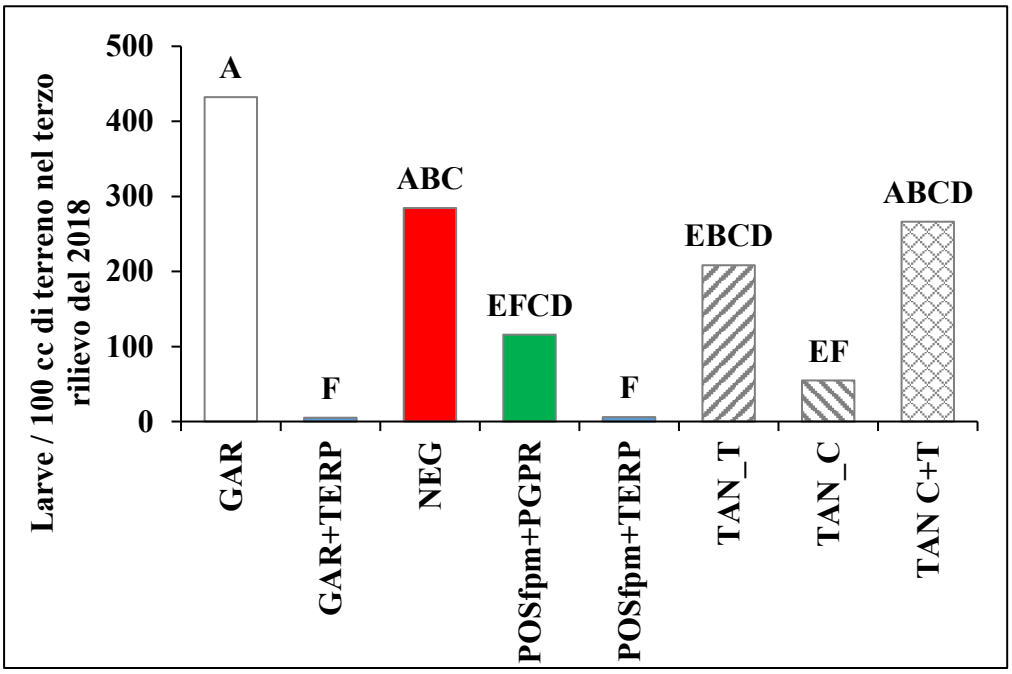


Fig. 13 - Effetto dei trattamenti sui nematodi nel terzo rilievo del 2018. I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS). I codici rappresentano trattamento con aglio (GAR), terpeni (TERP), *P. lilacinus* (PGPR), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con 2 diversi tannini o loro mix (TAN). Dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli. Si tenga conto che le differenze mostrate tengono conto anche della differenza per i trattamenti negli altri rilievi dello stesso anno (dati non mostrati).

A differenza di quanto osservato per il numero di nematodi nel terreno, l'indice galligeno di Zeck è variato notevolmente per effetto dei trattamenti applicati in tutti e 3 gli anni di prova (Tab. 3), mentre l'effetto del trattamento è stato evidente in particolare nel terzo rilievo del 2018 e 2019, il cui andamento non è stato dissimile

dalla media dell'anno (Fig. 14), con particolare efficacia mostrata da parte dei trattamenti che includevano terpeni. Altri trattamenti hanno mostrato una efficacia analoga o leggermente superiore al controllo positivo nel ridurre l'indice galligeno.

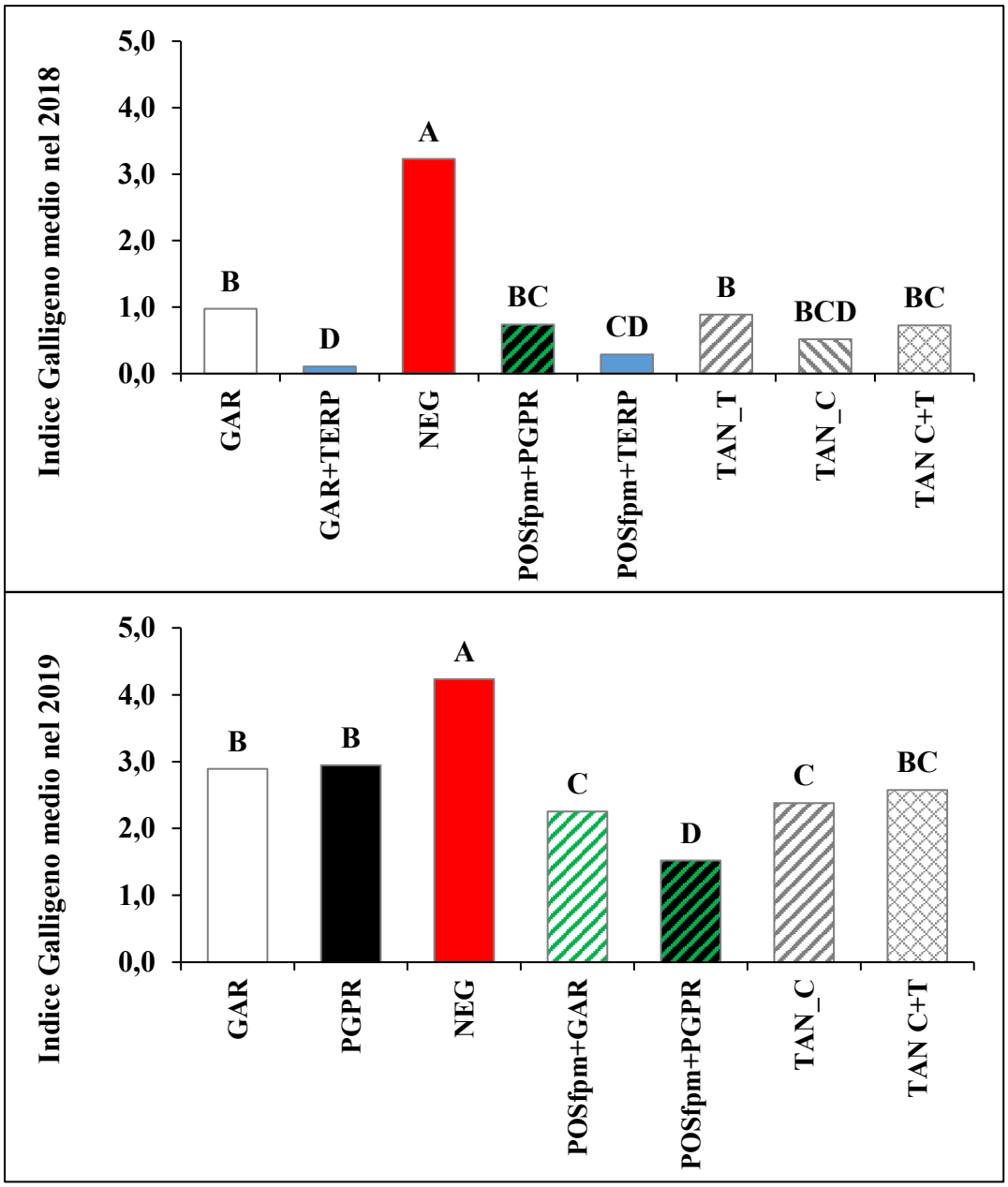


Fig. 14 - Effetto dei trattamenti sull'indice galligeno di Zeck medio nel 2018 (sopra) e 2019 (sotto). I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS). I codici rappresentano trattamento con aglio (GAR), terpeni (TERP), *P. lilacinus* (PGPR), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con 2 diversi tannini o loro mix (TAN). Nell'ambito di ciascun anno, dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

4.2 Risultati relativi alla produzione aggregati tra le raccolte

Il gruppo a cui un trattamento è stato attribuito più che lo specifico trattamento ha influenzato i risultati aggregati per tutte le epoche di raccolta (Tab. 4). I singoli trattamenti hanno mostrato effetti evidenti solo nei confronti del peso medio dei frutti commerciabili e del peso medio dei frutti piccoli.

Tab. 4 - Analisi della varianza con un modello generale linearizzato ad effetti misti delle variabili in studio aggregate tra le raccolte di ogni ciclo colturale. Variabili con p <0.05 sono mostrate in grassetto, variabili con p <0.1 sono mostrate in corsivo.

	Gruppo		**Trattamento nel gruppo**	
	F	***p***	***F***	***p***
N° frutti commerciabili per pianta	**13.82**	**<.0001**	0.70	0.6532
Produzione di frutti commerciabili (g/pianta)	**15.29**	**<.0001**	1.77	0.1224
Peso medio dei frutti commerciabili (g/frutto)	**9.19**	**<.0001**	**12.46**	**<.0001**
Peso medio dei frutti piccoli (g/frutto)	**2.77**	**0.0248**	**3.61**	**0.0038**
Rapporto tra peso dei frutti piccoli e produzione totale (g/g)	**13.26**	**<.0001**	2.00	0.0802
Rapporto tra peso dei frutti commerciabili e produzione totale (g/g)	**13.21**	**<.0001**	2.19	0.0569
Rapporto tra abbondanza dei frutti piccoli e produzione totale (n°/n°)	**10.45**	**<.0001**	1.16	0.3406
Rapporto tra abbondanza frutti commerciabili e produzione totale (n°/n°)	**10.17**	**<.0001**	1.27	0.2844

Lo studio effettuato ha permesso di rilevare come nelle componenti produttive, il fattore "gruppo" sia stato significativo nel determinare il numero di frutti commerciali per pianta (Tab. 4 e Tab. 5). Rispetto al testimone, tutte le altre tesi si sono differenziate determinando un aumento del numero di bacche, in particolare la strategia con l'utilizzo dello sfarinato di *B. carinata* e l'estratto liquido, determinando un aumento di 79,5 bacche per pianta in riferimento al testimone, rispetto al controllo positivo

(DCP) di 17,6. In aggiunta è possibile affermare come la differenza assoluta rispetto al testimone sia di 5,5 frutti in più, determinando un'efficienza rispetto al controllo positivo del 151,1% (in questa sede, l'efficienza esprime il rapporto tra l'incremento del trattamento dal controllo negativo al numeratore e l'incremento del controllo positivo dal controllo negativo al denominatore). Nel complesso, gli altri trattamenti non sono apparsi dissimili tra di loro per questo carattere.

Tab. 5 - Numero e peso dei frutti ottenuti. Effetto medio del gruppo di trattamenti nei tre anni, come somma della resa aggregata tra le raccolte di ogni ciclo colturale. I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS) e la relativa stima dell'errore standard e non rappresentano le medie aritmetiche del gruppo. I gruppi rappresentano trattamento con *B. carinata* (BRC), aglio (GAR), *P. lilacinus* (MIC), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con tannini (TAN). Dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

	N° di frutti commerciabili per pianta				**Produzione di frutti commerciabili (g/pianta)**			
	LSmeans		**Standard error**		**LSmeans**		**Standard error**	
BRC	12,5	±	1,1	A	2887	±	312	A
GAR	10,84	±	0,73	A	2334	±	255	B
MIC	10,37	±	1	A	2372	±	294	AB
NEG	6,96	±	0,72	B	1458	±	254	C
POS	10,62	±	0,66	A	2348	±	247	B
TAN	11,4	±	0,67	A	2344	±	248	B
	Peso medio dei frutti commerciabili (g/frutto)				**Peso medio dei frutti piccoli (g/frutto)**			
	LSmeans		**Standard error**		**LSmeans**		**Standard error**	
BRC	227,5	±	20,3	AB	107,02	±	10,71	A
GAR	214,4	±	19,5	BC	88,06	±	7,8	AB
MIC	230,3	±	20	A	102,34	±	9,83	A
NEG	203,3	±	19,4	D	83,98	±	7,73	B
POS	227,9	±	19,3	A	99,14	±	7,32	A
TAN	210,7	±	19,3	CD	91,43	±	7,38	AB

La produzione commerciale di frutti per pianta è stata significativa per i fattori ottenuti dal gruppo (Fig. 15), mostrando come tutte le tesi si siano differenziate dal testimone, in particolare nella tesi trattata con *B. carinata* la cui efficienza rispetto al controllo positivo è stata di un incremento relativo del 160.5%.

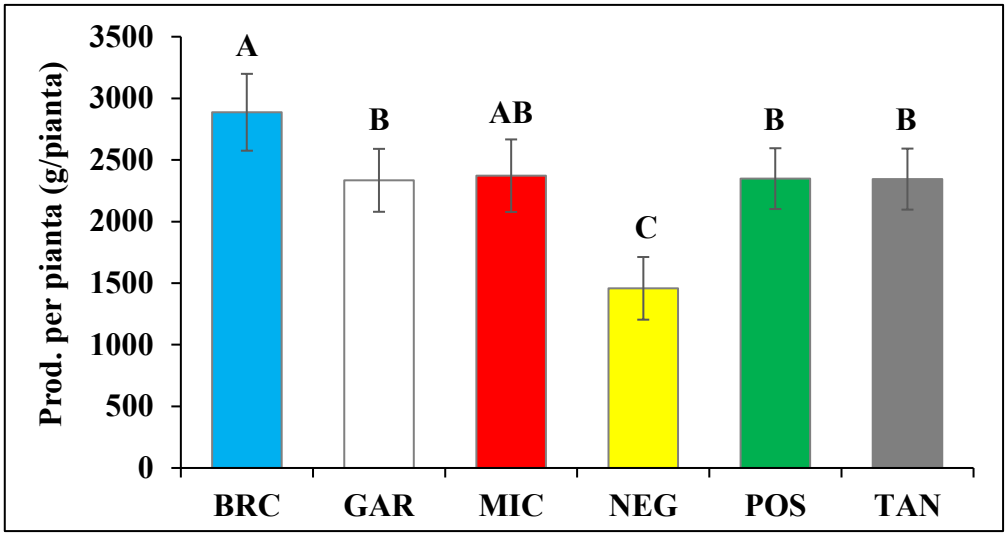


Fig. 15 - Effetto del gruppo di trattamenti sulla produzione per pianta. I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS) e la relativa stima dell'errore standard e non rappresentano le medie aritmetiche del gruppo. I gruppi rappresentano trattamento con *B. carinata* (BRC), aglio (GAR), *P. lilacinus* (MIC), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con tannini (TAN). Dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

Analizzando il peso medio dei frutti commerciali (Fig. 16) si è potuto costatare come i risultati siano stati significativi sia per il gruppo di trattamenti, sia per i trattamenti all'interno del gruppo.

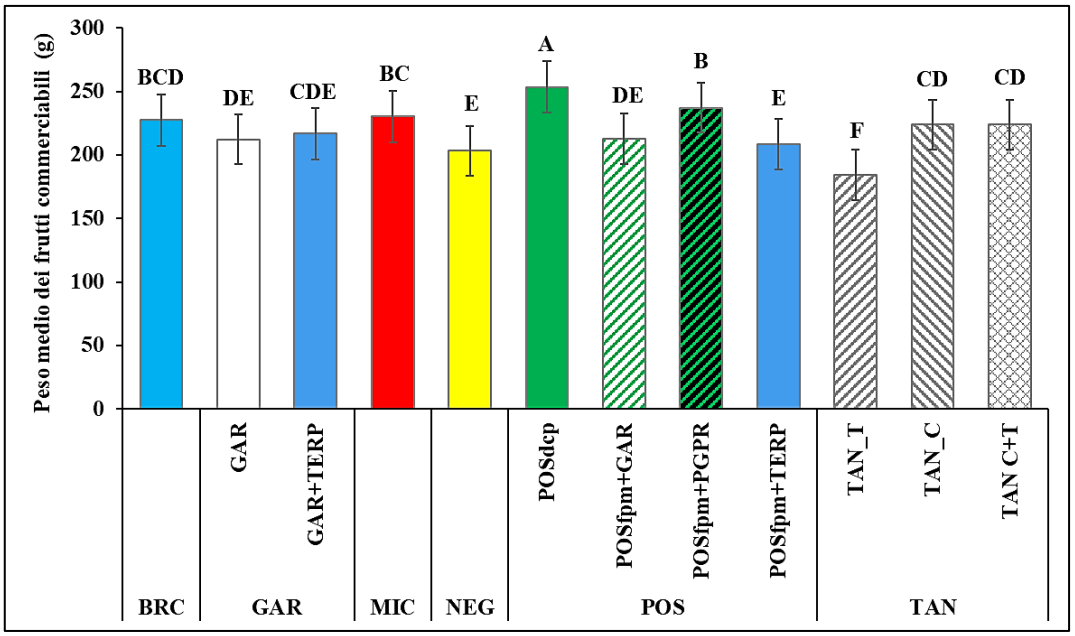


Fig. 16 - Effetto dei trattamenti sul peso medio dei frutti commerciabili. I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS) e la relativa stima dell'errore standard e non rappresentano le medie aritmetiche del gruppo.
I gruppi rappresentano trattamento con *B. carina*ta (BRC), aglio (GAR), microrganismi promotori della crescita vegetale (MIC o PGPR), applicazione di terpeni (TERP), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con 2 diversi tannini (TAN) e loro mix. Dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

In particolare nel gruppo è interessante notare come il controllo positivo ha permesso di aumentare il peso medio dei frutti di 24,6 g, risultati simili sono stati ottenuti nella tesi trattata con *B. carinata* e l'estratto liquido e il consorzio di microrganismi, invece l'aglio rispetto al controllo negativo ha permesso di aumentare il peso solamente di 5,4 g, risultato equiparabile nella tesi trattata con i tannini attestando valori simili al testimone non trattato. Nei trattamenti all'interno del gruppo si sono particolarmente distinte la tesi con applicazione del Fluopyram seguito da *P. lilacinus* (POSfpm+PGPR nelle figure) determinando un'efficienza rispetto al controllo positivo del 67,5%. D' altro canto è possibile notare come il trattamento con tannino T abbia inciso negativamente, portando ad una riduzione del peso delle bacche di 9,3 g rispetto al testimone non trattato.

In riferimento al peso medio dei frutti piccoli nel gruppo non sono state evidenziate differenze notevoli se comparate alla variabilità complessiva (p=0,0248), seppur la differenza tra i trattamenti rispecchia quanto già osservato per le variabili precedentemente descritte. Sono state fatte delle considerazioni mettendo in relazione il peso dei frutti piccoli rispetto al totale (Tab. 4 e Tab. 6). Notando come solamente sul gruppo i risultati siano stati significativi, in particolare il testimone non trattato ha dimostrato avere un rapporto maggiore probabilmente dato da una maggiore sofferenza delle piante nella crescita, in relazione alla crescente infestazione di nematodi.

Tab. 6 - Rapporto tra singole frazioni (frutti piccoli e frutti commerciabili) e totale espressi sia come abbondanza numerica, sia come peso complessivo. Effetto medio del gruppo di trattamenti nei tre anni, come somma della resa aggregata tra le raccolte di ogni ciclo colturale. I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS) e la relativa stima dell'errore standard e non rappresentano le medie aritmetiche del gruppo. I gruppi rappresentano trattamento con *B. carinata* (BRC), aglio (GAR), microrganismi promotori della crescita vegetale (MIC), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con tannini (TAN). Dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

	Peso frutti piccoli / produzione totale (g/g)				**Peso frutti commerciabili / produzione totale (g/g)**			
	Lsmeans		**Errore standard**		**Lsmeans**		**Errore standard**	
BRC	0,13	±	0,03	B	0,86	±	0,03	A
GAR	0,15	±	0,02	B	0,85	±	0,02	A
MIC	0,18	±	0,03	B	0,81	±	0,03	A
NEG	0,27	±	0,02	A	0,73	±	0,02	B
POS	0,17	±	0,02	B	0,83	±	0,02	A
TAN	0,16	±	0,02	B	0,84	±	0,02	A
	Abbondanza frutti piccoli / produzione totale (n°/n°)				**Abbondanza frutti commerciabili / produzione totale (n°/n°)**			
	Lsmeans		**Errore standard**		**Lsmeans**		**Errore standard**	
BRC	0,15	±	0,03	BC	0,84	±	0,02	AB
GAR	0,15	±	0,02	C	0,85	±	0,02	A
MIC	0,16	±	0,02	BC	0,84	±	0,02	AB
NEG	0,23	±	0,02	A	0,76	±	0,02	C
POS	0,18	±	0,02	B	0,82	±	0,02	B
TAN	0,16	±	0,02	BC	0,84	±	0,02	AB

L'analisi sul rapporto del peso di frutti commerciali è stata significativa per il gruppo, dove tutte le tesi si sono differenziate dal testimone non trattato, ma nessuna si è particolarmente distinta. In merito ai trattamenti nel gruppo anche in questo caso i risultati ottenuti sono significativi ma in minor ragione.

Valutando il rapporto sul numero dei frutti piccoli, solamente i risultati del gruppo sono stati significativi, anche in questo caso si conferma l'evidenza mostrata in precedenza per il seguente fattore. Il testimone non trattato ha prodotto un numero significativamente più alto di frutti piccoli. Ulteriore differenza si può notare nella tesi trattata con aglio dove l'efficienza rispetto al controllo positivo è di 150,2%.

Infine analizzando il rapporto sul numero dei frutti commerciali si può affermare che la tesi trattata con aglio ha portato ad un'efficienza rispetto al controllo positivo del 148,2%, con 11,5 frutti in più rispetto al controllo negativo.

4.3 Risultati relativi alla produzione aggregati per evento di raccolta

Nei primi due anni di prova sono stati eseguite 6 raccolte, mentre nel terzo anno solo 5 raccolte (Tab. 7 e Fig. 17). Ad ogni modo, l'andamento della produzione espresso come numero di frutti per pianta è stato analogo nei tre anni di prova e presumibilmente legato alle temperature. I rilievi centrali, effettuati in momenti più caldi, hanno anche presentato una minore resa complessiva rispetto ai rilievi precoci e tardivi.
Tale trend è stato evidente anche per singolo trattamento (Fig. 17) e le differenze tra i trattamenti sono apparse più evidenti con l'avanzare del ciclo colturale.

Tab. 7 - Distribuzione della produzione (numero di frutti per pianta) per momento di raccolta e trattamento nell'ambito di ciascun anno di prova. I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS, g per pianta) e la relativa stima dell'errore standard e non rappresentano le medie aritmetiche del gruppo. I gruppi rappresentano trattamento con *B. carinata* (BRC), aglio (GAR), microrganismi promotori della crescita vegetale (MIC o PGPR), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con tannini (TAN). Dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

Numero di frutti totali per pianta						
	2017		**2018**		**2019**	
	F	***p***	***F***	***p***	***F***	***p***
Trattamento (T)	**9,4**	**0,0008**	**4,5**	**0,0026**	**4,7**	**0,0035**
Raccolta (R)	**125,8**	**<.0001**	**231,2**	**<.0001**	**156,9**	**<.0001**
T×R	**4,2**	**<.0001**	**3,8**	**<.0001**	**5,2**	**<.0001**

Trattamento								
	2017			**2018**			**2019**	
	Lsmeans			Lsmeans			Lsmeans	
BRC	2,76	AB	**GAR**	2,9	C	**GAR**	3,9	AB
GAR	2,83	A	**GAR+TERP**	2,94	C	**MIC**	3,32	AB
NEG	1,63	C	**NEG**	2,65	C	**NEG**	2,38	C
POSdcp	2,46	AB	**POSfpm+PGPR**	2,57	C	**POSfpm+GAR**	4,02	A
POSfpm+PGPR	2,7	AB	**POSfpm+TERP**	3,06	CB	**POSfpm+PGPR**	3,81	AB
TAN C	2,37	B	**TAN T**	3,53	AB	**TAN C**	3,18	B
			TAN C	3,61	A	**TAN C+T**	3,59	AB
			TAN C+T	2,89	C			

Raccolta								
	2017			**2018**			**2019**	
	Lsmeans			Lsmeans			Lsmeans	
1	2,33	B	**1**	2,16	C	**1**	2,79	C
2	1,32	C	**2**	2,98	B	**2**	1,63	D
3	1,42	C	**3**	1,47	D	**3**	1,84	D
4	2,32	B	**4**	1,05	D	**4**	3,36	B
5	1,71	C	**5**	2,92	B	**5**	7,65	A
6	5,66	A	**6**	7,53	A			

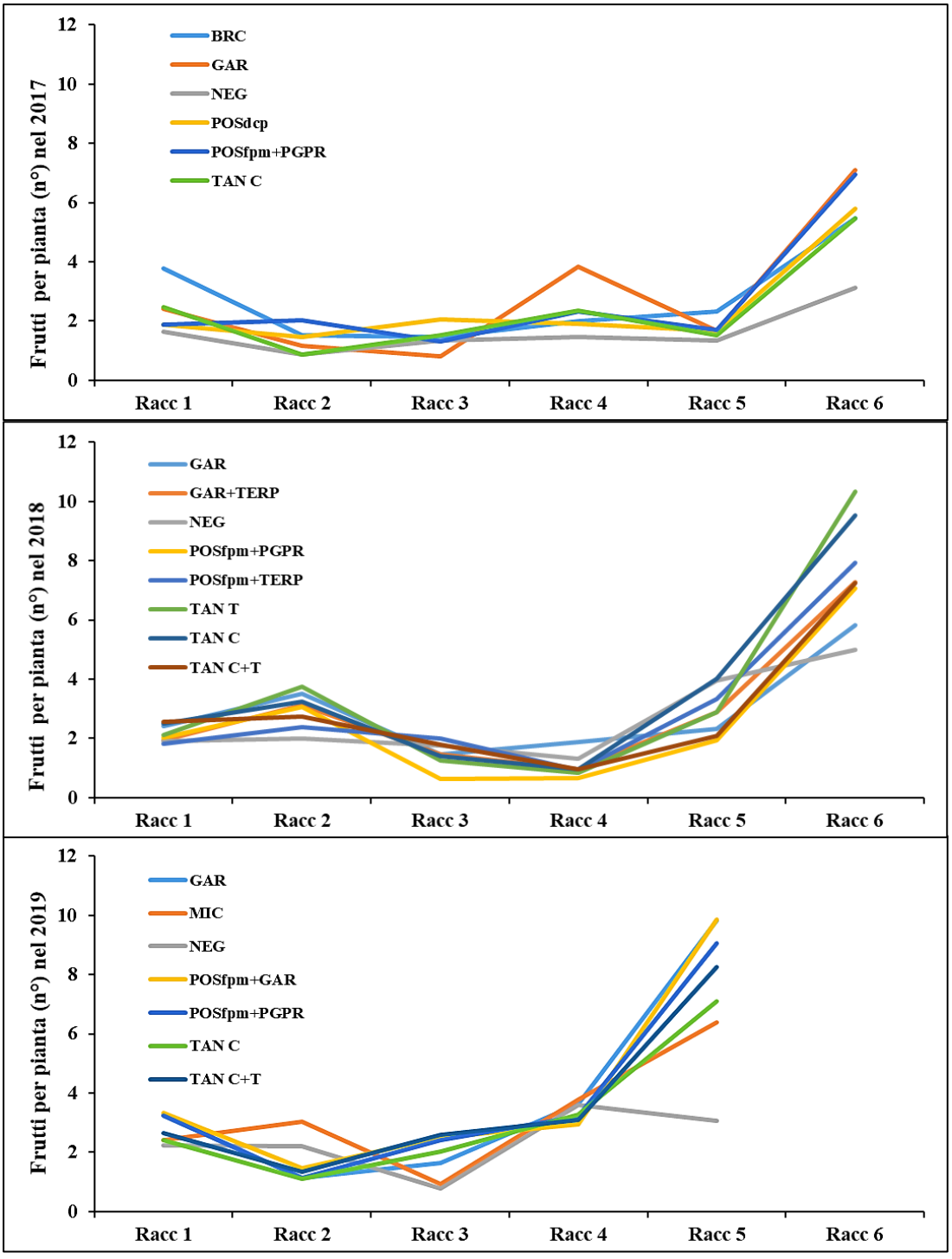


Fig. 17 - Distribuzione della produzione (numero di frutti per pianta) per epoca di raccolta nei trattamenti applicati nel 2017 (figura superiore), 2018 (figura centrale) e 2019 (figura inferiore). I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS). I codici rappresentano trattamento con aglio (GAR), terpeni (TERP), microrganismi promotori della crescita vegetale (MIC o PGPR), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con 2 diversi tannini o loro mix (TAN).

Il peso medio dei frutti si è ridotto con l'avanzare delle raccolte (Tab. 8 e Fig. 18). Tale riduzione è stata costante al variare dei trattamenti nel 2017, mentre nel 2018 e 2019 i frutti della prima raccolta hanno presentato un peso unitario inferiore delle raccolte centrali, dopo le quali il peso medio del frutto si è ridotto. Tale riduzione è stata sensibilmente più marcata nel controllo negativo rispetto agli altri trattamenti, con differenze. I trattamenti che includevano microrganismi benefici hanno mostrato le minori entità di riduzione in tutti e tre gli anni di prova.

Tab. 8 - Peso medio dei frutti al variare del momento di raccolta e del trattamento nell'ambito di ciascun anno di prova. I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS, g per pianta) e la relativa stima dell'errore standard e non rappresentano le medie aritmetiche del gruppo. I gruppi rappresentano trattamento con *B. carinata* (BRC), aglio (GAR), microrganismi promotori della crescita vegetale (MIC o PGPR), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con tannini (TAN). Dati con una lettera in comune non possono essere considerati diversi sulla scorta dei confronti a coppie (pdifferences delle LSMEANs) ai quali è stato ulteriormente applicato il test conservativo di Tukey-Kramer per tener conto dei confronti multipli.

Peso medio dei frutti (g)						
	2017		**2018**		**2019**	
	F	***p***	***F***	***p***	***F***	***p***
Trattamento (T)	**6,6**	**0,0036**	**12,3**	**<.0001**	**2**	**0,1055**
Raccolta (R)	**184,4**	**<.0001**	**289,9**	**<.0001**	**161,6**	**<.0001**
T×R	**1,1**	**0,3838**	**3**	**<.0001**	**2,3**	**0,0031**

Raccolta								
	2017			**2018**			**2019**	
Stacco	**Lsmeans**		**Stacco**	**Lsmeans**		**Stacco**	**Lsmeans**	
1	313,8	A	**1**	197,39	C	**1**	162,88	B
2	288,07	B	**2**	276,7	A	**2**	181,19	A
3	255,02	C	**3**	285,71	A	**3**	174,44	A
4	205,72	D	**4**	227,75	B	**4**	178,99	A
5	175,45	E	**5**	136,29	D	**5**	100,41	C
6	102,49	F	**6**	110,33	E			

Trattamento								
	2017			**2018**			**2019**	
	Lsmeans			Lsmeans			Lsmeans	
BRC	228,16	AB	**GAR**	212,66	CB	**GAR**	155,62	AB
GAR	210,71	CB	**GAR+TERP**	212,43	CB	**MIC**	171,69	A
NEG	183,14	C	**NEG**	174,16	E	**NEG**	144,19	B
POSdcp	252,66	A	**POSfpm+ PGPR**	230,77	A	**POSfpm+ GAR**	151,01	AB
POSfpm+ PGPR	233,22	AB	**POSfpm+ TERP**	196,46	CD	**POSfpm+ PGPR**	172,91	A
TAN C	232,66	AB	**TAN T**	182,96	ED	**TAN C**	164,64	AB
			TAN C	211,36	CB	**TAN C+T**	157	AB
			TAN C+T	224,77	AB			

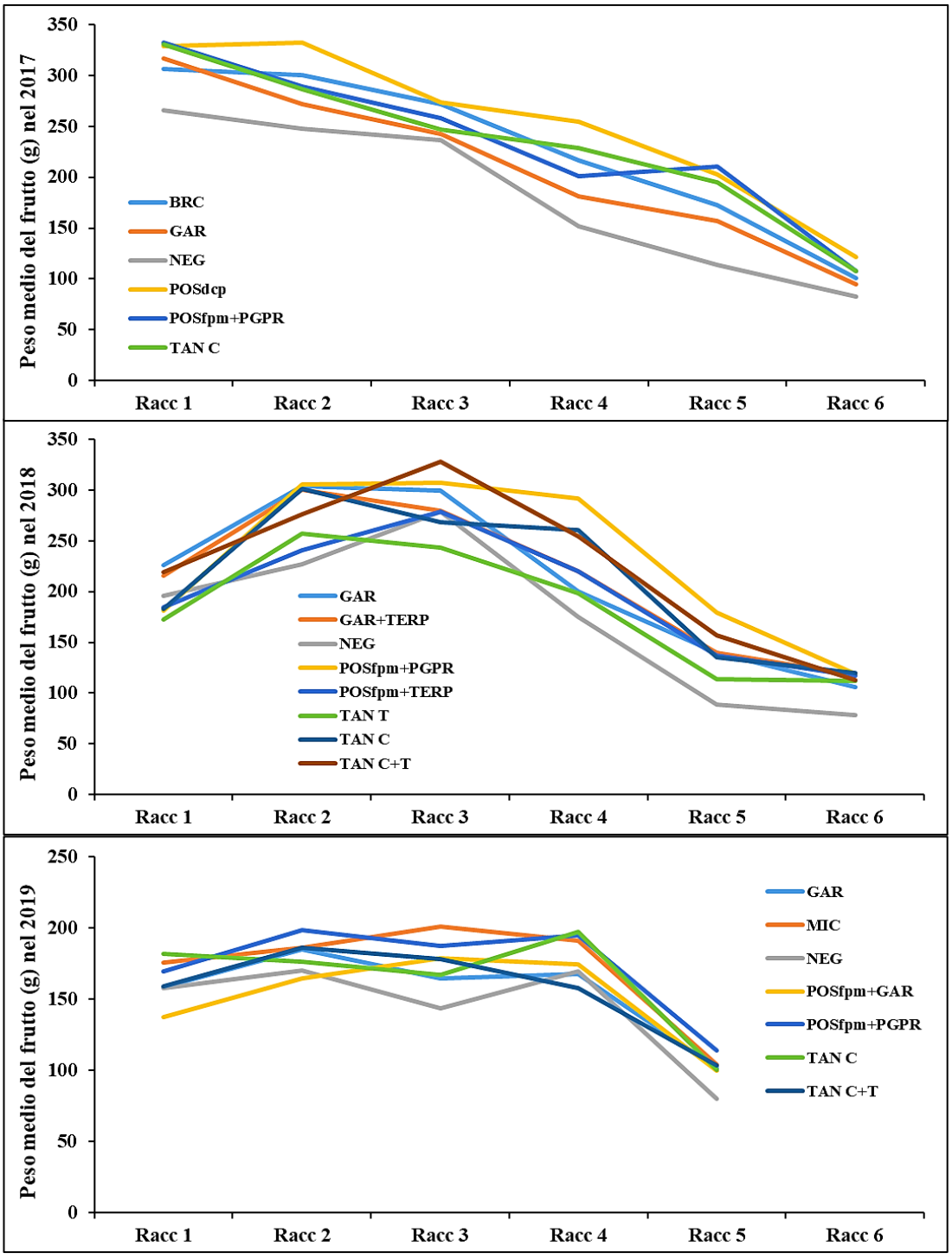


Fig. 18 - Peso medio di frutti per pianta per epoca di raccolta nei trattamenti applicati nel 2017 (figura superiore), 2018 (figura centrale) e 2019 (figura inferiore). I dati mostrati sono le stime delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS). I codici rappresentano trattamento con aglio (GAR), terpeni (TERP), microrganismi promotori della crescita vegetale (MIC o PGPR), controllo negativo (NEG), controllo positivo, ossia trattamento con prodotti di sintesi (POS) e trattamento con 2 diversi tannini o loro mix (TAN).

5. DISCUSSIONE

Il rapido aumento mondiale del tasso di crescita della popolazione nell'ultima decade, è una delle principali sfide in termini di sicurezza dell'approvvigionamento alimentare. Lo scenario è reso ancora più critico, dalla presenza sempre più capillare su tutto il territorio di nematodi galligeni, tra gli organismi nocivi alle piante più dannosi a livello globale (Trudgill e Blok, 2001).

La lotta contro tali organismi negli anni, si è sempre concentrata su due mezzi di lotta; chimico e fisico. Nel tempo, gli studi sono stati indirizzati soprattutto sulla lotta chimica e sulla ricerca di nuove molecole efficaci.

Da anni è stata praticata la fumigazione del terreno, con sostanze attive di origine chimica, la maggior parte attualmente vietate, spesso usati indiscriminatamente anche in virtù di una carente legislazione nel settore, apportando ingenti danni all'ecosistema e alla salute umana. Attraverso la concessione degli "usi d'emergenza", l'utilizzo di alcune di queste molecole è tuttavia ancora consentito nella fase di pre-impianto come nel caso del 1,3-D e del metam sodio (Desaeger *et al*., 2017) e del dimetildisolfuro (DMDS) (Curto *et al*., 2014)

Vista le necessità, attualmente sono stati sviluppati nuovi formulati che presentano un miglior profilo tossicologico e buona efficacia rispetto ai precedenti. È il caso della sostanza attiva Fluopyram, in origine un antioidico, la cui azione nematocida è stata scoperta di recente, divenuto attualmente il testimone chimico di riferimento, per molte ricerche riguardanti nematodi galligeni e nematodi reniformi (Faske e Hurd, 2015). Nella lista del Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), tale principio attivo è riportato nel gruppo MOA C, coinvolto nel meccanismo d'azione riguardante l'inibizione dell'enzima succinato deidrogenasi, con codice FRAC 7.

I metodi fisici di contenimento dei nematodi galligeni sono rappresentati principalmente dalla sommersione prolungata dell'appezzamento, con il rischio di danni per asfissia radicale nella coltura in successione e dalla solarizzazione, dove il terreno preventivamente bagnato, viene ricoperto con un film plastico trasparente per 5-6 settimane durante il periodo di maggiore insolazione. In questo modo la temperatura del terreno raggiunge 50-60 °C, determinandone quindi la disinfezione e la disinfestazione da patogeni e parassiti, nonché la devitalizzazione dei semi delle

erbe infestanti. La limitazione di questa pratica riguarda sostanzialmente l'assenza della coltura durante il periodo di permanenza dei film plastici sul terreno.

Da quanto finora affermato ne deriva che l'efficace introduzione e la continuità delle pratiche agricole nel contenimento delle infestazioni dei nematodi galligeni richiedono una pianificazione impegnativa e continua nel tempo con dei considerevoli investimenti (Ibrahim *et al*., 2019).

In questo scenario, il lavoro di tesi ha avuto tra gli scopi quello di saggiare per tre anni, su peperone in coltura protetta formulati innovativi a base di sostanze naturali ad azione nematocida, nematostatica o fitostimolante e microrganismi antagonisti dei nematodi, con l'obiettivo di evidenziarne persistenza ed efficacia. Obiettivo ulteriore della tesi è stato evidenziare se nel tempo, ma pur sempre nell'ambito del ciclo colturale, l'effetto è persistente e quindi attribuirgliene un'efficacia.

Analizzando i risultati abbiamo potuto riscontrare come nel 2017 tutti i prodotti in prova, hanno determinato un'efficacia statisticamente significativa sull'infestazione, rispetto al testimone non trattato, riducendo l'indice galligeno come nel caso dell'1,3-D e del Fluopyram, ed evidenziando, nel caso delle tesi rappresentate da prodotti ad azione biostimolante, una buona rigenerazione radicale, con fruttificazione continua, anche in presenza di danni all'apparato radicale originario, come già rilevato in precedenti lavori (Curto *et al.*, 2012).

I trattamenti in manichetta con i tannini hanno confermato un'attività nematocida se applicati ad alte dosi in pre-trapianto e un'azione protettiva e biostimolante quando distribuiti durante la coltura (Curto *et al*., 2012; Miele, 2012; De Nicola *et al*., 2013).

Interessanti sono stati i risultati ottenuti dalle applicazioni di sfarinati proteici di *B. carinata*, anche in formulazione liquida (Lazzeri *et al*., 2009; Curto *et al*., 2012) e dall'estratto d'aglio in formulazione granulare e liquida. Per gli sfarinati proteici di *B. carinata* è stato possibile osservare come l'aumento della produzione totale possa essere imputata ad un aumento della frazione organica grezza nel terreno, la cui presenza può aver avuto ripercussioni positive sulla flora microbica e quindi aver incrementato la disponibilità di nutrienti per le piante.

Anche per l'anno 2018 tutti i prodotti sono stati in grado di permettere un contenimento efficace dell'infestazione rispetto al testimone non trattato, anche se la pressione del nematode è stata inferiore rispetto l'anno precedente, attestando valori

di indice galligeno al di sotto di 1, con un leggero incremento nel secondo rilievo, condotto a 1 mese dall'ultimo trattamento; per il terzo rilievo effettuato a distanza di 2 mesi dall'ultimo trattamento è stato registrato un significativo incremento dell'infestazione, che tuttavia non ha mai raggiunto valori elevati di classi di danno; particolare efficacia (classe di danno < 1) è stata riscontrata nelle due tesi con un trattamento in pre-trapianto seguito da terpeni e in quella trattata con tannino C. In merito ai rilievi produttivi, il testimone ha prodotto significativamente meno, rispetto a tutte le altre tesi, sia come produzione totale, sia come numero e come peso medio di frutti; produzioni più elevate sono state, inoltre, ottenute da quelle strategie che, oltre ad esplicare un buon effetto nematocida, hanno determinato un effetto biostimolante sulla rigenerazione dell'apparato radicale.

Nella sperimentazione del 2019, l'indice galligeno ha raggiunto nel testimone valori superiori alla classe 4 della scala Zeck nonostante la carica nematica del terreno registrasse valori simili a quelli delle annate precedenti, in questa prova, la migliore efficacia è stata evidenziata dalle tesi in cui era presente il *P. lilacinus*, il tannino C e il Fluopyram. Stando ai risultati produttivi si è potuto osservare come la strategia riguardante l'utilizzo alternato di *P. lilacinus* e Fluopyram abbia fornito ottimi risultati, anche riguardo alla produzione totale, al peso e al numero di peperoni.

L'efficacia dei tannini, in particolare di castagno, è risultata ricorrente. Essi svolgono un ruolo significativo in numerosi processi ecologici (Kraus *et al*., 2003), essendo naturalmente presenti nelle piante a protezione dagli erbivori (Feeny, 1976). Molti studi dimostrano come questi siano tossici per numerosi batteri e funghi, evidenziando, di conseguenza, effetti battericidi e fungicidi (Scalbert, 1991; Baldwin *et al*., 1983; Benoit *et al*., 1968; Benoit e Sarkey, 1968; Fierer *et al*., 2001; Harrison, 1971; Lewis e Starkey, 1968; Schimel *et al*., 1996; Schimel *et al*., 1998, Schulz *et al*., 1992).

Molto studiato è anche il meccanismo d'azione dei tannini nei confronti dei nematodi; Hewlett *et al*. (1997) suggeriscono che le risposte comportamentali all'acido tannico varino in base alle diverse specie di nematodi e che tale sostanza sia risultata attrattiva verso *M. arenaria* e *M. incognita*, repellente per *Radophulus similis* e indifferente per *H. glycines.* I tannini sono composti fenolici, più o meno polimerizzati, la cui struttura chimica li rende recalcitranti alla degradazione da parte degli organismi

saprofiti; proprio per quest' aspetto possono essere definiti come meno "appetibili" da parte della pedofauna e quindi avere un effetto di disturbo nei confronti dei nematodi galligeni, con efficacia nematocida o nematostatica a seconda della loro concentrazione del terreno.

Nelle strategie testate in tutti e tre gli anni di prova, è stata inoltre confermata l'efficacia di formulati a base di microrganismi nei confronti di *M. incognita*, in considerazione della crescente attenzione e possibilità di applicazione di tali prodotti nella lotta ai nematodi.

In particolare, risultati soddisfacenti sono stati evidenziati dall'utilizzo del formulato a base di *P. lilacinus* ceppo 251; questo fungo è presente naturalmente nel terreno e svolge la sua attività contro le uova dei più importanti nematodi fitoparassiti (Vasanthi e Kumaraswamy, 1999; Brand et. al., 2010); Jatala *et al*., 1985, hanno evidenziato come esso causi una sostanziale deformazione delle uova di *M. incognita*, inibendone la maturazione e di conseguenza la schiusa; in questo la serin-proteasi prodotta da *P. lilacinus* potrebbe giocare un ruolo nel facilitare la penetrazione dell'ifa fungina attraverso il guscio dell'uovo del nematode (Bonants *et al*., 1995);

P. lilacinus oltre a infettare i nematodi del genere *Meloidogyne*, ha determinato inoltre un incremento dei parametri di crescita delle piante trattate (Ahmed e Monjil, 2019).

Nel 2019 è stata valutata anche l'efficacia, nei confronti di *M. incognita* di un formulato a base di un consorzio di microrganismi utili, fra i quali *V. chlamydosporium*, evidenziando una tendenza positiva riguardo al numero, al peso medio, alla produzione commerciale di peperoni e al buono stato fisiologico delle piante. Tale evidenza è stata confermata anche dal lavoro di Khan *et al*. (2005), dove è stato registrato un miglioramento della crescita e della resa in melanzane, dovuto alla soppressione della formazione di galle in seguito all'utilizzo di agenti di biocontrollo come *V. chlamydosporium*, *P. lilacinus* e *Trichoderma harzianum.* L'effetto nematocida di *V. chlamydosporium* sulle uova di *M. incognita* è stato inoltre studiato da Segers *et al*. (1994), che hanno identificato una proteasi simile all'elastasi, prodotta dai funghi del genere *Verticillium*, in particolare dalla specie *V. chlamydosporium* che ne determina l'idrolisi del guscio. Tale enzima sembra essere termostabile, come risulta allo studio di Meyer (1998), condotto su *V. lecanii*, in cui due diversi ceppi del

fungo sono stati precedentemente autoclavati e inoculati nel terreno, mantenendo l'attività ovicida. L'effetto ovicida di *V. chlamydosporium*, nonché la sua efficacia nel contenere i nematodi e nel favorire la crescita delle piante, sono stati ulteriormente confermati anche da studi italiani (Tosi *et al*., 2012; Sellitto *et al*., 2016).

I batteri invece, anche essi studiati per il contenimento dei nematodi galligeni, producono sostanze inibenti l'attività dei nematodi, come nel caso del batterio *Pseudomonas fluorescens*, in uno studio di Meyer *et al*., (2009) che produce 2,4-diacetilfloroglucinolo (DAPG); tale sostanza è risultata tossica per gli adulti di *X. americanum*, ha ridotto la schiusa delle uova di *M. incognita*, ma ha stimolato le ovature di *C. elegans*, nematode batteriofago, mentre non ha influenzato la vitalità delle larve che sono nate.

6. CONCLUSIONE

Grazie alla seguente sperimentazione della durata di tre anni è stato possibile verificare l'attività di formulati alternativi naturali, ad effetto nematocida, nematostatico o fitostimolante. Le indagini sono servite a mettere in relazione l'attività di tali sostanze, su pattern di produzione del peperone, presenza di *M. incognita* sulle radici nel terreno.

In tutte le annate si è assistito ad una riduzione dell'infestazione e assicurato produzioni soddisfacenti, pur non facendo ricorso ai soli prodotti chimici, portando quindi a definire come tali sostanze, possano interagire con la pedofauna e con la pianta.

È importante sottolineare che tali prodotti spesso presentano alti titoli di azoto e quindi, alla stessa stregua di un concime azotato, determinano risposte importanti sulla crescita delle piante fino a raggiungere una rapida e completa rigenerazione dell'apparato radicale, che può favorire il ritardo dell'entrata in senescenza dell'impianto e la riduzione dell'attività dei nematodi.

Il controllo integrato dei nematodi galligeni viene raggiunto attraverso l'associazione di buone tecniche agronomiche, rotazioni con piante non ospiti, sovesci di piante biocide, aumento della vitalità del terreno attraverso sostanze biostimolanti, utilizzo di prodotti abbattenti in caso di alte infestazioni e mantenimento di basse popolazioni del nematode con prodotti naturali a scarso impatto ambientale; tale integrazione può, anche dopo pochi cicli colturali, ridurre le infestazioni di nematodi galligeni nel terreno, assicurando buone produzioni e salvaguardando la fauna microbica e gli organismi utili non bersaglio.

Queste evidenze necessitano tuttavia di ulteriori studi, che serviranno ad evidenziare la relazione tra sinergia delle varie molecole, meccanismi coinvolti nell'attività nematocida o nematostatica delle varie strategie e cambiamenti nella fisiologia della pianta; ciò servirà a definire in maniera più puntuale, una possibile alternativa di controllo a minor impatto ambientale, associata sempre a delle corrette pratiche agronomiche e di gestione del suolo.

Nel 2017 i trattamenti in pre-trapianto con *B. firmus* e Fluopyram in manichetta, i tannini e sfarinati di *B. carinata* anche in formulazione liquida durante il ciclo, sono state le strategie che si sono dimostrate più efficaci. Nel 2018, una spiccata attività è

stata riscontrata nelle due tesi con un trattamento in pre-trapianto seguito da terpeni e in quella trattata con tannino C. Infine nel 2019, le strategie che hanno fornito risultati soddisfacenti sono state relative alla tesi dove sono state previste, quattro applicazioni (una in pre-trapianto) di *P. lilacinus*, in associazione a due applicazioni di Fluopyram, la tesi con quattro applicazioni (una in pre-trapianto) di *P. lilacinus*, seguita da quattro applicazioni durante il ciclo di tannino C, confermando quindi nuovamente l'efficacia di tale sostanza.

Attualmente, lo studio su ulteriori strategie utilizzate per il contenimento dei nematodi, oltre all'applicazione di composti di sintesi ad attività nematodica e fumiganti, sono: a) il trasferimento dei geni di resistenza *Mi*, *Me* e *Ma* da piante resistenti a differenti specie di piante (Barbary *et al*., 2015; Claverie *et al*., 2011; Williamson *et al*., 1996), b) sovraespressione di diversi inibitori della proteasi (Lilley *et al*., 1999; Papolu *et al*., 2016; Tripathi *et al*., 2015) e c) silenziamento di quei geni specifici dei nematodi che sono necessari per far sì che si verifichi l'infezione (Ibrahim *et al*., 2011b).

Grazie a queste tecniche è stato possibile fare grandi passi nella ricerca e protezione delle piante dai nematodi, riducendo considerevolmente gli impatti ambientali, anche se attualmente la maggior parte sono in via sperimentale e di difficile attuazione per motivi legislativi.

D'altro canto anche la sperimentazione su tecniche che prevedono l'utilizzo di prodotti di origine naturale è molto promettente e possono offrire soluzioni per mantenere l'efficacia del controllo, riducendone l'impatto ambientale. È possibile definire, grazie anche a questo lavoro di tesi, come un controllo integrato dei nematodi galligeni, associando buone tecniche agronomiche, rotazioni con piante non ospiti e fissando delle soglie economiche di intervento, sia possibile ridurre le infestazioni e ottenere nel contempo buone produzioni, salvaguardando quindi la fauna microbica e gli organismi utili non bersaglio.

7. BIBLIOGRAFIA

Abad P., Gouzy J., Aury J.M., Castagnone-Sereno P., Danchin E.G.J., Deleury E., Perfus Barbeoch L., Anthouard V., Artiguenave F., Blok V.C., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* **26**, 909-915.

Abad P., Williamson V.M., 2010. Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. Advances in *Botanical Research Journal*. **53**, 147–192.

Ahmed S., and Monjil M.S., 2019. Effect of *Paecilomyces lilacinus* on tomato plants and the management of root knot nematodes. *Journal of Bangladesh Agricultural University* **17(1)**, 9-13.

Baldwin I.T., Olson R.K., Reinersw A., 1983. Protein binding phenolics and the inhibition of nitrification in subalpine balsam fir soils. *Soil Biology and Biochemestry* **15**, 419-423.

Barbary A., Djian-Caporalino C., Palloix A., Castagnone-Sereno P., 2015. Host genetic resistance to root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Solanaceae: from Genes to the Field. *Pest Managment Science*.

Bargiacchi E., Campo M., Romani A., Milli G., Miele S., 2017. Hydrolysable Tannins from Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) to improve Tobacco and Food/Feed Quality. Note 1: Fraction characterization, and Tobacco biostimulant effect for gall-nematode resistance. *Agriculture and Food* **2(3)**, 324-338.

Beltrami G., Curto G., Zavanella M., 2006. Lotta biologica e selezione varietale per la resistenza al nematode *Heterodera schachtii*. *Informatore Fitopatologico* **10**, 16-20.

Beltrami G., Zavanella M., Curto G., 2007. Piante biocide e varietà tolleranti contro il nematode della bietola. *L'Informatore Agrario* **2**, 57-61.

Benoit R.E, Starkey R.L., 1968a. Inhibition of decomposition of cellulose and some other carbohydrates by tannin. *Soil Science* **105**, 291-296.

Benoit R.E, Starkey R.L., Basaraba J., 1968. Effect of purified plant tannin on decomposition of some organic compounds and plant materials. *Soil Science* **105**, 153-158.

Bonants P.J., Fitters P.F., Thijs H., den Belder E., Waalwijk C. and Henfling J.W.D., 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology* **141(4)**, 775-784.

Brand D., Soccol C.R., Sabu A., and Roussos S., 2010. Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: A case study on *Paecilomyces lilacinus* against root knot nematodes. *Micologia Aplicada International* **22**, 31-48.

Brown P.D., Morra M.J., 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. *Advances in Agronomy* **61**, 167-231.

Buskov S., Serra B., Rosa E., Sorensen H., Sorensen J.C., 2002. Effect of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Cv. Woll). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **50**, 690-695.

Carletti B., Maistrello L., 2012. Il controllo dei nematodi nelle colture ortive: prove in vitro con i tannini di castagno. *Atti Accademia dei Georgofili* 339-344.

Chitwood D.J., 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annuual Revew of Phytopathology* **40**, 221-249.

Claverie M., Dirlewanger E., Bosselut N., Van Ghelder C., Voisin R., Kleinhentz M., Lafargue B., Abad P., Rosso M.N., Chalhoub B., Esmenjaud D., 2011. The *Ma* gene for complete spectrum resistance to *Meloidogyn*e species in prunus is a TNL with a huge repeated C-terminal post-LRR region. *Plant Physiology* **156**, 779-792.

Colegate S.M., Gardner D.R., Joy R.J., Betz J.M., Panter K.E., 2012. Dehydropyrrolizidine alkaloids, including monoesters with an unusual esterifying acid, from cultivated *Crotalaria juncea* (sunn hemp cv. Tropic Sun). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 3541-3550.

Coyne D.L., Cortada L., Dalzell J.J., Claudius-Cole A.O., Haukeland S., Luambano N., Talwana H., 2018. Plant-parasitic nematodes and food security in sub-Saharan Africa. *Annual Review of Phytopathology* **56**, 381-403.

Curto G., Dallavalle E., Lazzeri L., 2005. Life cycle duration of *Meloidogyne incognita* and host status of *Brassicaceae* and *Capparaceae* selected for glucosinolate content. *Nematology* **7**, 203-212.

Curto G., 2006. Sistemi ecocompatibili contro i nematodi. *Colture protette* **5**, 36-41.

Curto G, Lazzeri L, Dallavalle E, Santi R, Malaguti L., 2006. Effectiveness of crop rotation with *Brassicaceae* species for the management of the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Second International Biofumigation Symposium* 51.

Curto G., Lazzeri L, Dallavalle E., Santi R., Malaguti L., 2006. Efficacia della rotazione delle colture con specie di *Brassicaceae* per la gestione del nematode del nodo radicale meridionale *Meloidogyne incognita*. *Secondo simposio internazionale sulla biofumigazione* 51.

Curto G., Santi R., Dallavalle E., Lazzeri L., 2007. Contenere *Meloidogyne* nel pomodoro in coltura protetta. *L'Informatore Agrario* **13**, 57-60.

Curto G., 2008. Sustainable methods for management of cyst nematodes. In: Ciancio A., Mukerji K.G., (eds) Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. *Springer Berlin* 221-237.

Curto G., Dallavalle E., De Nicola G.R., and Lazzeri L., 2012. Evaluation of the activity of dhurrin and sorghum towards *Meloidogyne incognita. Nematology* **14(6)**, 759-769.

Curto G., Antoniacci L., Lazzeri L., 2014. Pratiche Agronomiche. Piante biocide e biofumigazione. In: Difesa fitosanitaria in produzione integrata. Manuale dei metodi e delle tecniche a basso impatto. (Butturini A., e Galassi T., eds). Edagricole. *Edizioni Agricole di New Business Media srl, Milano* 20-22.

Curto G., Di Silvestro D., 2014. Lotta agronomica. In: Nematologia Agraria generale e applicata. (Ambrogioni L., D'Errico F.P., Greco N., Marinari Palmisano A., e Roversi P.F., eds). *Società Italiana di Nematologia* 199-206.

Curto G., Dongiovanni C., Sasanelli N., Santori A., & Myrta A., 2014. Efficacy of dimethyl disulfide (DMDS) in the control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the cyst nematode *Heterodera carotae* on carrot in field condition in Italy. *Acta Horticulturae* **1044**, 405-410.

Curto G., Dallavalle E., Santi R., Casadei N., D'Avino L., & Lazzeri L., 2015. The potential of *Crotalaria juncea* L. as a summer green manure crop in comparison to *Brassicaceae* catch crops for management of *Meloidogyne incognita* in the Mediterranean area. *European Journal of Plant Pathology* **142**, 829-841.

Curto G., Dallavalle E., Matteo R., Lazzeri L., 2016. Biofumigant effect of new defatted seed meals against the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Annals of Applied Biology* **169**, 17-26.

D'Addabbo T., Curto G., Greco P., Di Silvestro D., Coiro M.I., Lamberti F., Ferrari V., Santi R., Carella A. 2005. Prove preliminari di lotta contro nematodi galligeni mediante estratti di *Quillaja saponaria*. *Nematologia Mediterranea* **33**, 29-34.

D'Addabbo T., Curto G., Santi R., Carella A. 2006. Prove di lotta contro il nematode galligeno *Meloidogyne incognita* mediante trattamenti con estratti di *Quillaja saponaria*. *Atti Giornate Fitopatologiche* **1**, 239-242.

D'Addabbo T., Bernad D., Lucarelli G., Radicci V., Carella A., 2012. Efficacia di formulati di olio di sesamo nella lotta contro il nematode galligeno *Meloidogyne incognita* su pomodoro. *Atti giornate fitopatologiche* **1**, 477-482.

De Nicola G.R., D'Avino L., Curto G., Malaguti U.L., Cinti S., Patalano G., Lazzeri L., 2013. A new biobased liquid formulation with biofumigant and fertilizing properties for drip irrigation distribution. *Industrial Crop and Products* **42**, 113-118.

Desaeger J., Dickson W., Locascio S.J., 2017. Methyl bromide alternatives for control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in tomato production in Florida. *Journal of Nematology* **49**, 140-149.

Di Vito M., Greco N., and Zaccheo G., 1985. On the host range of *Meloidogyne artiellia*. *Nematologia mediterranea* **13**, 207-212.

Djian-Caporalino C., Fazari A., Arguel M.J., Vernie T., Van de Casteele C., Faure I., Bround G., Pijarowski L., Palloix A., Lefebvre V., Abad P., 2007. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum*

annuum L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theoretical and Applicated Genetics* **114**, 473-486.

Dropkin V.H., 1969. Necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology* **59**, 1632-1637.

Dutta T.K., Banakar P., Rao U., Moffett P., Day B., 2015. Mini review article the status of RNAi-based transgenic research in plant nematology. *Frontiers in Microbiology* **5**, 760.

Faske T.R., and Hurd K., 2015. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Fluopyram. *Journal of Nematology* **47**, 316-321.

Feeny P., 1976. Plant appearance and chemical defence. *Recent Advances in Phytochemestry* **10**, 1-40.

Fenwick G.R., Heaney R.K., Mullin W.J., 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **18**, 123-201.

Fierer N., Schimel J.P., Cates R.G., Zou Z., 2001. The influence of balsam poplar tannin fractions on carbon and nitrogen dynamics in Alaskan taiga floodplain soils. *Soil Biology and Biochemestry* **33**, 1827-1839.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

Grob K. Jr., Matile P.H., 1979. Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Science Letters* **14**, 327-335.

Harrison A.F., 1971. The inhibitory effect of oak leaf litter tannins on the growth of fungi, in relation to litter decomposition. *Soil Biology and Biochemestry* **3**, 167-172.

Hewlett T.E., Hewlett E.M., Dickson D.W., 1997. Response of *Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines* and *Radopholus similis* to Tannic Acid. *Journal of Nematology* **29**, 737-741.

Huang Y., Xu C., Ma L., Zhang K., Duan C. and Mo M., 2010. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* **26**, 417-422.

Ibrahim H.M.M., Alkharouf N.W., Meyer S.L.F., Aly M.A.M., Gamal El-Din A.E.K.Y., Hussein E.H.A., Matthews B.F., 2011a. Post-transcriptional gene silencing of rootknot nematode in transformed soybean roots. *Experimental Parasitology* **127**, 90-99.

Ibrahim H.M.M., Hosseini P., Alkharouf N.W., Hussein E.H.A., Gamal El-Din A.E.K.Y., Aly M.A.M., Matthews B.F., 2011b. Analysis of Gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. *BMC Genomics* **12**, 220.

Ibrahim H.M.M., Ahmad E.M., Martínez-Medina A., and Aly M.A.M., 2019. Effective approaches to study the plant-root knot nematode interaction. *Plant Physiology and Biochemestry* **141**, 332-342.

Iqbal S., Fosu-Nyarko J., Jones M.G.K., 2016. Genomes of parasitic nematodes (*Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne incognita*, *Ascaris suum* and *Brugia malayi*) have a reduced complement of small RNA interference pathway genes: knockdown can reduce host infectivity of *M. incognita*. *Functional & Integrative Genomics* **16**, 441-457.

Jaouannet M., Magliano M., Arguel M.J., Gourgues M., Evangelisti E., Abad P., Rosso M.N., 2013. The root-knot nematode calreticulin mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 97-105.

Jatala P., 1985. Biological control of Nematodes, In an Advached Treatise on *Meloidogyne* spp. Sasser JN and Carter CC (eds), *North carolina State University Graphicd Raleigh*, *NC. USA*. pp. 303-308.

Jones J., Gheysen G., Fenoll C., 2011. Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Dordrecht, the Netherlands: *Springer*.

Joseph B., Ranjan Patra R. and Lawrence R., 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production* **1**, 141-152.

Kaur P., Shukla N., Joshi G., VijayaKumar C., Jagannath A., Agarwal M., Goel S., Kumar A., 2017. Genome-wide identification and characterization of miRNAome from tomato (*Solanum lycopersicum*) roots and root-knot

nematode (*Meloidogyne incognita*) during susceptible interaction. *PLoS One* **12**, e0175178.

Kavitha J., Jonathan E.I., and Nakkeeran S., 2012. Effects of crude antibiotic of *Bacillus Subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea* **40**, 203-206.

Khan M.R., Mohiddin F.A., Khan S.M., and Khan B., 2005. Effect of seed treatment with certain biopesticides on root-knot of chickpea. *Nematologia Mediterranea* **33**, 107-112.

Kirkegaard J.A., Sarwar M., 1998. Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant soil* **201**, 71-89.

Klink V.P., Kim K.H., Martins V., MacDonald M.H., Beard H.S., Alkharouf N.W., Lee S.K., Park S.C., Matthews B.F., 2009. A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*. *Planta* **230**, 53-71.

Kraust E.C., Dahlgren R.A., Zasoski R.J., 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems. A review. *Plant and Soil* **256(1)**, 41-66.

Ladurner E., Benuzzi M., Fiorentini F., Lucchi A., 2014. Nemguard® granules, nuovo nematocida a base di estratto di aglio, contro i nematodi galligeni delle colture orticole. *Atti giornate fitopatologiche* **1**, 301-308.

Lamberti F., 1979. Economic importance of *Meloidogyne* spp. in Subtropical and Mediterranean climates. *In*: Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species) Systematics, Biology and Control (Lamberti F., and Taylor C.E., coord.). Academic Press, London, U.K., 341-357.

Lazzeri L., D'Avino L., Malaguti L., 2005. Con le piante biocide migliora anche la fertilità dei terreni. *Agricoltura* **4**, 95-97.

Lazzeri L., Leoni O., Manici L.M., 2004b. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products* **20**, 59-65.

Lazzeri L., Curto G., Dallavalle E., D'Avino L., Malaguti L., Santi R., Patalano G., 2009. Nematicidal efficacy of biofumigation by defatted *Brassicaceae* meal

for control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid *et* White) Chitw. on a full field zucchini crop. *Journal of Sustainable Agriculture* ***33***, 349-358.

Lewis J.A., Starkey R.L., 1968. Vegetable tannins their decomposition and effects on decomposition of some organic compounds. *Soil Science* **106**, 241-247.

Li Z., Liu Z.B., Xing A., Moon B.P., Koellhoffer J.P., Huang L., Ward R.T., Clifton E., Falco S.C., and Cigan A.M., 2015. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiology* **169**, 960-970.

Lilley C., Devlin P., Urwin P., Atkinson H., 1999. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. *Parasitology Today* **15**, 414-417.

Lourenço-Tessutti I.T., Souza Junior J.D.A., Martins-de-Sa D., Viana A.A.B., Carneiro R.M.D.G., Togawa R.C., de Almeida-Engler J., Batista J.A.N., Silva M.C.M., Fragoso R.R., Grossi-de-Sa M.F., 2015. Knock-down of heat-shock protein 90 and isocitrate lyase gene expression reduced root-knot nematode reproduction. *Phytopathology* **105**, 628-637.

Manzali D., Curto G., 2014. Prodotti microbiologici. Batteri. *Bacillus firmus*. In: Difesa fitosanitaria in produzione integrata. Manuale dei metodi e delle tecniche a basso impatto. (Butturini A., e Galassi T., eds). Edagricole - Edizioni Agricole di New Business Media srl, Milano.

Matthiessen J.N., Shackleton M.A., 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. *Pest Management Science* **61**, 1043-1051.

Matthiessen J. N., Kirkegaard J. A., 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **25**, 235-265.

Meng Y., Hou Y., Wang H., Ji R., Liu B., Wen J., Niu L., Lin H., 2017. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports* **36**, 371-374.

Meyer S.L.F., 1998. HortTechnology. *American Society for Horticultural Science*.

Meyer S.L.F., Rice C.P., Zasada I.A., 2009. DIBOA: fate in soil and effects on root-knot nematode egg numbers. *Soil Biology and Biochemestry* **41**, 1555-1560.

Miele S., 2012. Le opportunità di impiego dei tannini di castagno a livello agronomico. Interazioni con azoto, fosforo e ferro. Atti Accademia dei Georgofili, 323-327.

Mmeka E.C., Adesoye A., Ubaoji K.I., Nwokoye A.B., 2014. Gene silencing technologies in creating resistance to plant diseases. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* **8**, 100-120.

Mojtahedi H., Santo G.S., Hang A.N., Wilson J.H., 1991. Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. *Journal of Nematology* **23**, 170-174.

Müller J., 1999. The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helmintologia* **36**, 205-213.

Niu J., Jian H., Xu J., Chen C., Guo Q., Liu Q., Guo Y., 2012. RNAi silencing of the *Meloidogyne incognita* Rpn7 gene reduces nematode parasitic success. *European Journal of Plant Pathology* **134**, 131-144.

Noling J. W., 2002. The practical realities of alternatives to methyl bromide: Concluding Remarks. *The American Phytopathological Society* **92**, 1373-1375.

Pan X., Nichols R.L., Li C., and Zhang B., 2019. MicroRNA-target gene responses to root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genomics* **111**, 383-390.

Papolu P.K., Dutta T.K., Tyagi N., Urwin P.E., Lilley C.J., Rao U., 2016. Expression of a cystatin transgene in eggplant provides resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1122.

Perry R.N., Moens M., 2011. Introduction to plant-parasitic nematodes; modes of parasitism. In: Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions (Jones, J.T., Gheysen, L., Fenoll, C. (Eds.). Heidelberg: Springer, pp. 3-20.

Pocock J.J., Heaney R.K., Wilkinson A.P., Beaumont J.E., Vaughan J.G., Fenwick G.R., 1987. Changes in myrosinase activity and isoenzyme pattern, glucosinolate content and the cytology of myrosin cells in the leaves of heads of three cultivars of english white cabbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **41**, 245-257.

Ramella S., Infantino A., Asero G., Gualco A., 2016. Caratteristiche ed efficacia di abamectina (Tervigo®) nel controllo dei nematodi galligeni delle colture orticole. *Atti giornate fitopatologiche* **1**, 423-428.

Risi C., Colombo A., Crescenzi A, D'Addabbo T., D'Errico F.P., D'Errico G., Di Silvestro D., Giacometti R., Offredi P.F., Roversi P., Troccoli A., 2014. Risultati di due anni di prove di lotta ai nematodi delle ortive con un bionematocida (Flocter®) a base di *Bacillus firmus*. *Atti giornate fitopatologiche* **1**, 325-336.

Rosso M.N., Jones J.T., Abad P., 2009. RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 207-232.

Saia S., Aissa E., Luziatelli F., Ruzzi M., Colla G., Ficca A.G., Cardarelli M., Rouphael Y., 2020. Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. *Mycorrhiza* **29**, 1-15.

Sànchez-Solana F., Ros C., Lacasa C.M., Palloix A., and Lacasa A., 2015. Nematode quantitative resistance conferred by the pepper genetic background presents additive effects and is stable against different isolates of *Meloidogyne incognita*. *Plant pathology* **65**, 673-681.

Sánchez-Solana F., Ros C., Guerrero M., Lacasa C., Sánchez-López E., Lacasa A., 2016. New pepper accessions proved to be suitable as a genetic resource for use in breeding nematode-resistant rootstocks. *Plant Genetic Resources* **14**, 28-34.

Sang J.P., Minchinton I.R., Johnstone P.K., Truscott R.J.W., 1984. Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Canadian Journal of Plant Science* **64**, 77-93.

Sansavini S., Ancarani V., Curto G., Tacconi R., 2008. Selezione di portinnesti franchi di pesco resistenti al nematode *Meloidogyne incognita*. *Atti del VI Convegno Nazionale Sulla Peschicoltura Meridionale* 28-35.

Sasanelli N., 1994. Tables of Nematode-Pathogenicity. *Nematologia mediterranea* **22**, 153-157.

Sasanelli N., Dongiovanni C., Leocata S., Arbizzani A., Santori A., Myrta A., Greco N., 2014. Esperienze di lotta contro il nematode galligeno *Meloidogyne*

incognita in coltura protetta con Dimetyi Disolfuro. *Atti Giornate Fitopatologiche* **1**, 317-324.

Scalbert A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875-3883.

Schimel J.P, Van Cleve K., Cates R.G., Clausen T.P., Reichardt P.B., 1996. Effects of balsam poplar (*Populus balsamifera*) tannins and low molecular weight phenolics on microbial activity in taiga floodplain: soil implications for changes in N cycling during succession. *Canadian Journal of Botany* **74**, 84-90.

Schimel J.P., Cates R.G., Ruess R., 1998. The role of balsam poplar secondary chemicals in controlling soil nutrient dynamics through succession in the Alaskan taiga. *Biogeochemistry* **42**, 221-234.

Schimel J.P., Van Cleve K., Cates R.G., Clausen T.P., Schlathoelter M., 2004. Biofumigation with nematode resistant crops. *Agroindustria* **3**, 407.

Schultz J.C., Hunter M.D., Appel H.M., 1992. Antimicrobial activity of polyphenols mediates plant-herbivore interactions. In: Plant Polyphenols. Synthesis, Properties, Significance. Hemingway R.W. & Laks P.E. Eds., Plenum Press, New York, 621-637.

Segers R., Butt T.M., Kerry B.R., Peberdy J.F., 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. *Microbiology* **140**, 2715-2723.

Sellitto V.M., Curto G., Dallavalle E., Ciancio A., Colagiero M., Pietrantonio L., Bireescu G., Stoleru V., Storari M., 2016. Effect of *Pochonia chlamydosporia*-based formulates on the regulation of root-knot nematodes and plant growth response. *Frontiers in life science* **9(3)**, 177-181.

Sharp P.A., 2001. RNA interference-2001. *Genes & Development* **15**, 485-490.

Shivakumara T.N., Chaudhary S., Kamaraju D., Dutta T.K., Papolu P.K., Banakar P., Sreevathsa R., Singh B., Manjaiah K.M., Rao U., 2017. Host-Induced Silencing of Two Pharyngeal Gland Genes Conferred Transcriptional Alteration of Cell Wall- Modifying Enzymes of *Meloidogyne incognita* vis-à-vis Perturbed Nematode Infectivity in Eggplant. *Frontiers in Plant Science* **8**, 473.

Shurtleff M.C., Averre C.W., 2000. Classification and descriptions of nematodes. In: Shurtleff M.C. e Averre C.W., Diagnosing plant diseases caused by nematodes, APS Press, St Paul, Minnesota, 99-102.

Siddiqui Z.A., and Mahmood I., 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technol* **69**, 167-179.

Siddiqui Z.A., 2006. PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens. PGPR: Biocontrol and Biofertilization, 111-142.

Tacconi R., 1980. Prove di lotta contro nematodi epigei della fragola (Apelenchoides fragarie (*Aphelenchoides fragariae* e *Ditylenchus dispaci*). *Informatore Fitopatologico* **30(3)**, 3-8.

Tacconi R., Ambrogioni L., 1995. Metodi di estrazione in Nematologia. *In*: Nematodi da Quarantena (Tacconi R. e Ambrogioni L., coord.). Lo Scarabeo, Edizioni Scientifiche, Bologna, Italia, 175-190.

Tosi S., Dallavalle E., Nicola L., Oro V., Curto G., 2012. In vitro nematophagous activity of fungi isolated from soil and some *Heteroderidae* (Nematoda: Tylenchida). *BIT's 2nd Annual World Congress of Microbes* 310.

Tripathi L., Babirye A., Roderick H., Tripathi J.N., Changa C., Urwin P.E., Tushemereirwe W.K., Coyne D., Atkinson H.J., 2015. Field resistance of transgenic plantain to nematodes has potential for future African food security. *Scientific Reports* **5**, 8127.

Trudgill D.L., and Blok V.C., 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopatholgy* **39**, 53-77.

Vasanthi D., and Kumaraswamy K., 1999. Efficacy of vermicompost to improve soil fertility and rice yield. *Journal of the Indian Society of Soil Science* **47(2)**, 268-272.

Wang K.H., Sipes B.S., & Schmitt D.P., 2002. Crotalaria as a cover crop for nematode management: areview. *Nematropica* **32**, 35-57.

Wesemael W.M., Viaene N., Moens M., 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology* **13**, 3-16.

Williamson V.M., Hussey R.S., Szabò V., Frost L.N., Schmidt R., Biezen E.A., Van der Moores T., Dean C., Daniels M.J., Jones J.D.G., 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* **8**, 1735-1745.

Winkler H., Otto G., 1980. Replant losses with strawberries and suggestions for their reduction. *Horticultural Abstracts* **50**, 344.

Yadav B.C., Veluthambi K., Subramaniam K., 2006. Host-generated double stranded RNA induce RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemical Parasitology* **148**, 219-222.

Zaidi S., Usmani S., Singh B.R. and Musarrat J. 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ 101 as a bioinoculant for concurrent plant growthpromotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* **64**, 991-997.

Zasada I. A., Ferris H., 2003. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. *Phytopathology* **93**, 747-750.

Zeck W.M., 1971. A rating scheme for field evaluation of root-knot infestations. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer AG* **24**, 141-144.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro di tesi determina la fine del mio lungo e naturale percorso di studi, che mi ha permesso di crescere intellettualmente e come persona.

Sono state tante le figure incontrate in tutti questi anni; professori, compagni di classe, colleghi di corso e i momenti difficili affrontati, ma dall'altra parte anche pieni di soddisfazioni, che hanno segnato la mia carriera da studente e che rimarranno indelebili.

Per queste ragioni, in primo luogo mi sento di ringraziare il *Prof. Sergio Saia*, che è stato e sarà la figura di riferimento nel settore, dimostrandomi piena competenza, disponibilità, grande pazienza nella stesura del seguente lavoro di tesi e che mi ha fornito gli strumenti fondamentali, per approfondire la conoscenza in questo campo.

I ringraziamenti vanno anche al Servizio Fitosanitario Regione Emilia Romagna e al personale tecnico, per avermi dato accesso all' utilizzo dei dati utilizzati nel seguente lavoro. In particolare il mio riconoscimento va ad una persona speciale, la *Dott.ssa Giovanna Curto*, per avermi sempre sostenuto, speso tempo per l'aiuto fornito nella stesura del seguente lavoro e dimostrandomi una grande competenza e passione per l'argomento trattato.

Un ringraziamento va anche all'Agenzia per la Sperimentazione ASTRA - Innovazione e Sviluppo, in particolare alla collega *Dott.ssa Silvia Paolini,* per il prezioso contributo fornito nella sperimentazione.

Desidero ringraziare dal più profondo mio padre, *Stefano Di Nunzio* e mia madre, *Stefania Barca*, genitori che per mia fortuna posso definire un vero e chiaro punto di riferimento, per tutto il sostegno dato, sia moralmente, che da un punto di vista economico, in tutti questi anni della mia carriera da studente.

Ringrazio anche tutta la mia famiglia (*nonni*, *zii*, *cugini*), per avermi sempre incoraggiato e sostenuto nei miei progetti.

Un sincero e profondo grazie va a *Roxana*, la mia ragazza, che nella sua unicità, ha sempre cercato di starmi vicino, in ogni ostacolo che ho dovuto affrontare in questi ultimi anni, sempre pronta a strapparmi un sorriso e nelle fragilità sapere come starmi accanto.

Un grazie infine, va anche a delle persone speciali, alcuni in maniera diretta, altri meno, ma dove tutti sono stati fondamentali per la mia carriera. In ogni mio cedimento e preoccupazione, c'è sempre stato qualcuno che era lì pronto a sorreggermi per permettere di rialzarmi e qualcuno invece che ha sempre sostenuto le mie idee così da poter raggiungere questo e tanti altri obiettivi. Queste persone sono *i miei amici*, che hanno contribuito a farmi diventare chi sono e che mai smetterò di ringraziare.