

UN METODO RAPIDO PER L'ESTRAZIONE
DI UOVA DI NEMATODI DAL SUOLO E DAI TESSUTI VEGETALI (1)

di
G. ZACHEO e F. LAMBERTI (2)

Delle tecniche messe a punto per l'estrazione di uova di nematodi dal terreno e dai tessuti vegetali, a nostro avviso, alcune sono troppo lunghe (Caveness e Jensen, 1955; Flegg e McNamara, 1968), altre troppo laboriose (Byrd *et al.*, 1972; Coolen e D'Herde, 1972; Gooris e D'Herde, 1972).

La necessità di dover procedere all'estrazione, dal terreno e da tessuti vegetali, di uova di nematodi fitoparassiti, sulla cui biologia sono in corso presso questo Laboratorio indagini, ci ha indotto a intraprendere una serie di tentativi per mettere a punto un metodo di estrazione efficiente, semplice e rapido, che ci permettesse di esaminare in breve lasso di tempo numerosi campioni.

Dopo varie prove abbiamo ritenuto che una modificazione dei metodi per centrifugazione in saccarosio già esistenti, si adattasse particolarmente alle nostre esigenze. Ci è sembrato, pertanto, utile rendere noto il metodo da noi adottato.

Descrizione del metodo

1) Versare in un becker da 1/2 litro 50 ml di terreno e 150 ml di acqua e stemperare per mezzo di un agitatore elettromagnetico;

(1) A rapid method for separating nematode eggs from soil and plant tissues.

(2) Si esprimono vivi ringraziamenti al Sig. A. Melillo per la collaborazione prestata.

per terreni di medio impasto sono sufficienti 2'; questo intervallo va raddoppiato per terreni pesanti, ad alto contenuto d'argilla.

2) Decantare la sospensione per 30'' onde permettere alle particelle di terreno più pesanti di depositarsi sul fondo del recipiente.

3) Versare e bilanciare la sospensione in due tubi da centrifuga del volume di 100 ml ed aggiungere in ciascuno 2 g di caolino lavato; agitare nuovamente per 30''.

4) Centrifugare per 2' a 5000 g.

5) Scartare il sopranatante ed aggiungere al « pellett » di ciascun tubo 60 ml di saccarosio 1 M.

6) Risospendere bene su agitatore e dopo aver ribilanciato i tubi centrifugare ancora per 2': a 4000 g per terreni sciolti e 5000 g per terreni argillosi.

7) Filtrare il sopranatante su un filtro con maglie dell'apertura di 5 μ collegato ad una pompa aspirante ad una depressione di 1/2 atmosfera/pollice quadrato.

8) Raccogliere il contenuto del filtro in un becker inviando sulla membrana uno spruzzo d'acqua a pressione moderata.

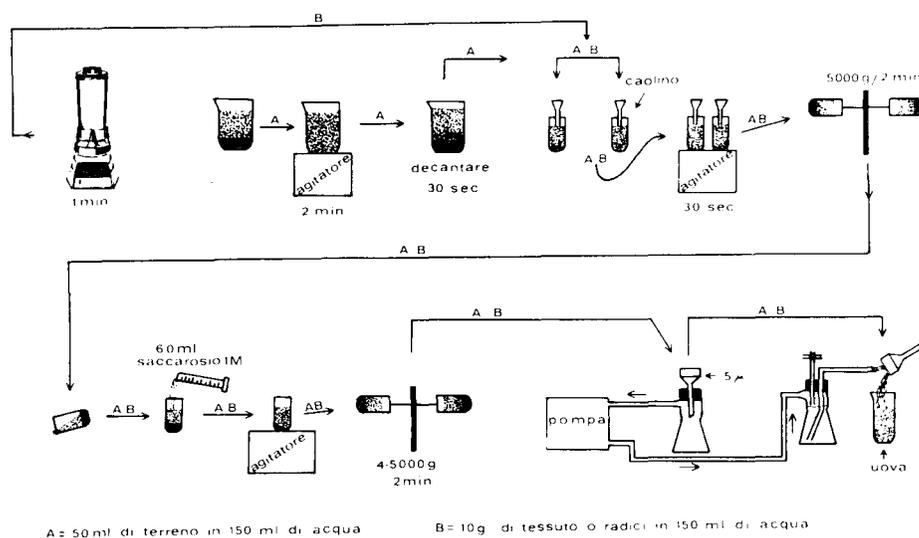


Fig. 1 - Prospetto schematico del metodo di estrazione di uova di nematodi fitoparassiti dal terreno e da tessuti vegetali.

9) Versare la sospensione in piastre o camere con reticolo e contare allo stereomicroscopio.

Per estrarre uova di endoparassiti, omogeneizzare in un comune frullatore a bassa velocità, in 150 ml di acqua, 10 g di radici o di altri tessuti vegetali; successivamente eseguire tutte le operazioni già descritte.

L'intero procedimento è schematizzato nella figura 1.

Discussione

Sono state provate diverse concentrazioni di saccarosio tra 0,25 e 2,5 M. Di queste, quella ottimale è risultata essere la 1 M, la quale permette l'estrazione di circa l'80% delle uova presenti nel terreno (Tab. I).

La concentrazione 1 M, poi, permette di recuperare anche le uova di specie di grandi dimensioni come *Xiphinema* spp. e *Longidorus* spp. se si riduce la seconda centrifugazione a 3000 g.

Si è cercato, inoltre, di snellire ulteriormente il procedimento eliminando la prima centrifugazione con caolino. I risultati, in questo caso, sono stati insoddisfacenti. Infatti, il supernatante in saccarosio risultava ricco di detriti di sostanza organica che rendevano l'analisi del campione più difficile e lunga e mascheravano uova che sfuggivano, quindi, all'osservazione (Tab. I).

Tab. I - Percentuale di uova estratte per centrifugazione in saccarosio a 5000 g da aliquote di 50 ml di terreno a cui erano state mescolate 3000 uova di *Meloidogyne* spp.; ogni dato è la media di sei ripetizioni.

Trattamento	Concentrazione del saccarosio	Numero medio di uova estratte	% rispetto al numero aggiunto
Centrifugazione in soluzione acquosa di saccarosio preceduta da una centrifugazione con caolino	1 M	2413 A	80,4
	0,75 M	1640 B	54,7
	0,50 M	1613 B	53,8
Una sola centrifugazione in soluzione acquosa di saccarosio	1 M	1609 B	53,6
	0,75 M	1101 B	36,7
	0,50 M	704 C	23,5

N.B. - Dati affiancati dalle stesse lettere non sono statisticamente differenti tra loro ($P = 0,01$).

Per poter recuperare e concentrare rapidamente il supernatante della centrifugazione in saccarosio, il quale contiene le uova, è necessario poter disporre di un filtro collegato ad una pompa aspirante. Il filtro da noi costruito è costituito da un diaframma di rete di « nylon » avente maglie di 5μ di apertura, incastrato in un imbuto in « plexiglass » applicabile a tenuta su una beuta collegata ad una pompa a vuoto (Fig. 2).

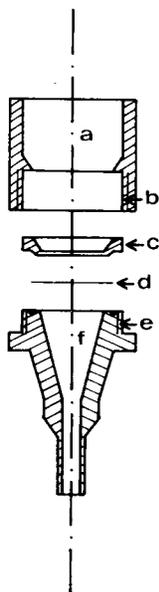


Fig. 2 - Filtro per la raccolta e la concentrazione delle uova dopo le operazioni di centrifugazione: la parte superiore, a, dell'imbuto viene avvitata alla parte inferiore, f, mediante le filettature b ed e, dopo aver piazzato l'anello, c, sulla membrana filtrante, d; l'anello ha la funzione di tenere ben tesa la membrana che può essere sostituita periodicamente.

Conclusioni

Il metodo sopradescritto permette di effettuare l'operazione completa in circa 10' per ogni campione, ma disponendo di centrifughe capaci e rotori a più posizioni l'estrazione può essere eseguita contemporaneamente con più campioni. Esso, inoltre, non richiede disponibilità di apparecchiature complicate, ha un'ottima percentuale di recupero delle uova presenti nel terreno, l'80%, non inferiore a quanto è possibile ottenere con gli altri metodi sopra citati ed, eliminando totalmente i detriti di sostanza organica presenti nel campione, facilita enormemente l'esame microscopico del campione stesso.

RIASSUNTO

È stato messo a punto un metodo rapido per l'estrazione di uova di nematodi fitoparassiti dal terreno e da tessuti di piante. Il metodo consiste nella doppia centrifugazione, con caolino e in soluzione acquosa di saccarosio 1 M, di quantità di 50 ml di terreno o di 10 g di frammenti di tessuti vegetali. Esso permette di estrarre l'80% delle uova presenti nel campione. Il processo di estrazione richiede circa dieci minuti.

SUMMARY

A rapid method for separating nematode eggs from soil and plant tissues.

A rapid method for extracting nematode eggs from soil and plant tissues was devised. The method which consists of the double centrifugation, with caoline and in 1 M sucrose aqueous solution, of aliquants of either 50 ml of soil or 10 g of plants tissue fragments, permits the recovery of 80% of the eggs present in the sample. The whole process requires about ten minutes.

RÉSUMÉ

Une méthode rapide pour séparer les oeufs des nématodes du terrain et des tissus végétaux.

Une méthode rapide pour l'extraction des oeufs des nématodes phyto-parasites se trouvant dans le sol ou dans les tissus des plantes est mise au point. Elle consiste à faire subir à 50 ml de terre ou à 10 g de fragments de tissus une double centrifugation: la première dans l'eau et le kaolin et la deuxième dans une solution de saccharose 1 M. Cette méthode permet d'extraire l'80% des oeufs présents dans les échantillons. Ce procédé exige 10 minutes de manipulation.

LAVORI CITATI

- BYRD D.W. Jr., FERRIS H. e NUSBAUM C.J., 1972 - A method for estimating numbers of eggs of *Meloidogyne* spp. in soil. *J. Nematol.*, 4: 266-269.
- CAVENESS F.E. e JENSEN H.J., 1955 - Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proc. helm. Soc. Wash.*, 22: 87-89.
- COOLEN W.A. e D'HERDE C.J., 1972 - A method for the quantitative extraction of nematode from plant tissue. Pubblicazione della Stazione Statale di Ricerca di Nematologia ed Entomologia, Merelbeke - Belgio. 77 pagg.
- FLEGG J.J.M. e McNAMARA D.G., 1968 - A direct sugar centrifugation method for the recovery of eggs of *Xiphinema*, *Longidorus* and *Trichodorus* from soil. *Nematologica*, 14: 156-157.
- GOORIS J. e D'HERDE C.J., 1972 - A method for quantitative extraction of eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. from soil. Pubblicazione della Stazione Statale di Ricerca di Nematologia ed Entomologia, Merelbeke, Belgio. 36 pagg.

Accettato per la pubblicazione il 10 gennaio 1974.