

STRATEGIE INTEGRATE DI DIFESA DALL'OIDIO DELLO ZUCCHINO CON FORMULATI A BASE DI OLI ESSENZIALI

T. ANNESI¹, F. MILANO¹, P. PULCINI¹, A. MATERE¹, L. DONNARUMMA¹
¹CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria
Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale - Via C. G. Bertero, 22, 00156 Roma
lucia.donnarumma@entecra.it

RIASSUNTO

L'agricoltura e i prodotti fitosanitari stanno subendo una profonda riorganizzazione a seguito della Direttiva 2009/128/CE sull'utilizzo sostenibile dei pesticidi, che mira a ridurre i rischi per la salute umana e l'ambiente legati al loro uso. In questo contesto sono state sperimentate strategie integrate di difesa dello zucchini dall'oidio, comprendenti l'utilizzo di formulati a basso impatto ambientale a base di oli essenziali quali: Tea tree oil, Garofano + Rosmarino. Le prove sono state condotte nel 2015 in coltura protetta in due areali diversi della regione Lazio. I risultati ottenuti, nonostante l'elevata pressione della malattia, hanno evidenziato un decremento della stessa pari a circa il 60 % in entrambi i programmi di difesa, comprendenti trattamenti con formulati a base di oli essenziali alternati ad applicazioni di un fungicida di sintesi. Gli esiti delle prove condotte hanno indicato un possibile approccio innovativo a basso impatto ambientale per la difesa delle cucurbitacee.

Parole chiave: *Podosphaera fusca*, *P. xanthii*, *Melaleuca alternifolia*, garofano, rosmarino, difesa integrata

SUMMARY

INTEGRATED PROTECTION STRATEGIES AGAINST ZUCCHINI POWDERY MILDEW WITH FORMULATES BASED ON ESSENTIAL OILS

Agriculture and plant protection products are undergoing a major reorganization following the adoption of Directive 2009/128/EC on the sustainable use of pesticides aimed at reducing risks to human health and the environment associated with their use. In this context, integrated strategies for the containment of "powdery mildew" on zucchinis were tested including the use of formulations based on essential oils such as Tea tree oil and Clove + Rosemary oils. The trials were conducted on protected crops in two different areas in the Lazio region during the year 2015. The results obtained, despite the high disease pressure, led to a decrease by about 60% in both protection programs including treatments with formulations based on essential oils alternated with applications of synthetic fungicides. The tests showed a possible innovative approach with low environmental impact for the protection of cucurbits.

Keywords: *Podosphaera fusca*, *P. xanthii*, *Melaleuca alternifolia*, Clove oil, Rosemary oil, IPM

INTRODUZIONE

L'oidio o mal bianco rappresenta una delle principali avversità delle cucurbitacee che negli ultimi decenni ha manifestato i maggiori problemi di contenimento sia in pieno campo che in coltura protetta, (Arbizzani *et al.*, 2014). In Italia la coltivazione delle cucurbitacee è attuata sia nelle aree settentrionali che in quelle centrali e meridionali. Nell'ambito di questa famiglia botanica rientra lo zucchini che in coltura protetta riveste un'importanza strategica nel comparto produttivo della regione Lazio (dati ISTAT 2012) con una superficie coperta di 1653 ha e 981.500 q di produzione raccolta.

La malattia si manifesta inizialmente con piccole macchie sulle foglie, ma una volta individuati i primi sintomi, è importante tenere sotto controllo l'infezione che altrimenti può proliferare causando ingenti perdite di prodotto. L'agente causale, *Podosphaera fusca* (Fr.) U. Braun & Shishkoff (sinonimo *Podosphaera xanthii*) (Braun e Takamatsu, 2000), si sviluppa esternamente sui tessuti fogliari e sul fusto producendo numerosi conidi che diffondono rapidamente l'infezione. Indagini condotte in Italia su zucchini, sia in pieno campo che in coltura protetta, hanno evidenziato in alcune regioni quali Emilia-Romagna e zone collinari della Campania, la presenza anche di *Golovinomyces cichoracearum* (Branzanti e Brunelli, 1987; Branzanti e Brunelli, 1992; Del Sorbo *et al.*, 1992). Le due specie, *G. cichoracearum* e *P. fusca*, hanno una distribuzione temporale diversa che si avvicina, il primo si ritrova soprattutto nella parte iniziale della stagione mentre in estate ed autunno risulta essere prevalente la seconda specie. Il controllo dell'oidio mediante l'utilizzo di fungicidi di sintesi mantiene ancora un ruolo preminente nella strategia di difesa della coltura, anche se la Direttiva 2009/128/CE si è proposta di delineare le azioni comunitarie necessarie al raggiungimento dell'uso sostenibile dei pesticidi riducendone il rischio e l'impatto sulla salute umana e l'ambiente. A tal proposito, molti oli essenziali ed i loro principali costituenti hanno evidenziato ampio spettro di attività antifungina nei confronti di funghi patogeni delle piante (Isman, 2000) e, inoltre, la loro applicazione per il contenimento dell'oidio è ben documentata in letteratura (Aly *et al.*, 2013). Gli oli essenziali sono miscele complesse di composti organici naturali costituiti prevalentemente da terpeni (idrocarburi) e terpenoidi (idrocarburi ossigenati) che si ottengono da una matrice vegetale sottoposta generalmente ad idro-distillazione, tecnica a basso impatto ambientale dal momento che non utilizza solventi di estrazione. Il loro maggiore utilizzo nell'Unione Europea è negli alimenti come aromi e nei prodotti farmaceutici per le loro proprietà funzionali (Oosterhaven *et al.*, 1995; Burt, 2004). Gli oli essenziali sono caratterizzati dall'aver bassa tossicità per l'uomo e l'ambiente e basso rischio di sviluppo di resistenza verso microrganismi patogeni (Daferera *et al.*, 2000; Isman e Machial, 2006).

L'obiettivo del presente lavoro è consistito nello sviluppo di una strategia di difesa dall'oidio dello zucchini, in coltura protetta, che ha previsto l'applicazione di fungicidi di sintesi in alternanza a formulati di oli essenziali, sulla base delle esperienze maturate nei precedenti anni di sperimentazione in serra (Annesi *et al.*, 2011; Sturchio *et al.*, 2014; Milano *et al.*, 2014; Donnarumma *et al.*, 2015).

MATERIALI E METODI

Le sperimentazioni sono state condotte nel 2015 su due varietà di zucchini, "Sibilla" e "Romanesco", in coltura protetta in due areali diversi della regione Lazio: Terracina (LT) presso un'azienda agricola e Monterotondo (RM) presso l'azienda sperimentale CREA-PAV.

Il patogeno è stato identificato attraverso indagini morfologiche e molecolari utilizzando campioni fogliari infetti, da cui è stato estratto il DNA (Chen *et al.*, 2008; Donnarumma *et al.*, 2015).

Le caratteristiche dei prodotti saggiate nelle prove sono riportate in tabella 1; le due formulazioni a base di oli essenziali, non ancora in commercio, sono state fornite da ditte del settore. Gli oli essenziali saggiate sono: olio essenziale di rosmarino (R), olio essenziale di chiodi di garofano (G), olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* noto anche come "Tea tree oil" (TTO). Nelle prove sono state poste a confronto diverse strategie di difesa, basate su trattamenti a cadenza settimanale (tabella 2).

Ogni tesi era costituita da quattro blocchi randomizzati di 20 piante. I trattamenti sono stati effettuati con pompa a spalla con capacità massima di 14,5 L e volume copertura di 1000 m². I

prodotti sono stati distribuiti con volumi di acqua crescenti in relazione allo sviluppo vegetativo della coltura, fino al gocciolamento fogliare. I trattamenti sono stati iniziati a manifestazione dei primi sintomi della malattia (rilievo al tempo 0) e lo sviluppo della malattia è stato monitorato durante tutta la durata della prova. Sono stati effettuati nel corso delle due prove più rilievi (su 160 foglie per tesi per rilievo) per valutare l'efficacia dei trattamenti attraverso l'incidenza della malattia, stimata come presenza percentuale di foglie con sintomi, e l'indice di severità della malattia, come percentuale di superficie fogliare colpita, secondo le linee guida EPPO 1/57 (European and Mediterranean Plant Protection Organization). I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (Anova) e al test della differenza minima significativa LSD per $P \leq 0,05$.

Tabella 1. Formulati utilizzati nelle due prove

| Formulato e sigla | Sostanza attiva | Concentrazione sostanza attiva | Dose formulato (mL/ha) |
|---------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Vivando (V) | Metrafenone | 500 g/L | 200 |
| Topas 10 EC (T) | Penconazolo | 100 g/L | 250 |
| Formulato 1 (TTO) | Olio essenziale di <i>Melaleuca alternifolia</i> | 23,8% | 1.000 |
| Formulato 2 (G + R) | Olio essenziale di rosmarino + o. e. di chiodi di garofano | 9%+9% | 600 |

Tabella 2. Schema dei trattamenti effettuati nelle due prove

| Trattamenti | Tesi 1 Testimone | Tesi 2 | Tesi 3 Riferimento | Tesi 4 | Tesi 5 |
|-------------|------------------|--------|--------------------|--------|--------|
| 1° | Acqua | V | V | V | V |
| 2° | Acqua | TTO | V | G + R | - |
| 3° | Acqua | V | T | V | V |
| 4° | Acqua | TTO | - | G + R | - |
| 5° | Acqua | TTO | T | G + R | - |
| 6° | Acqua | TTO | - | G + R | - |

RISULTATI

Le indagini morfologiche e molecolari hanno evidenziato la presenza della sola specie *P. fusca*. Nell'indagine morfologica eseguita, è stata evidenziata nei conidi la presenza di corpi fibrosi (figura 1a) e tubo germinativo laterale (figura 1b), che corrispondono alla specie *P. fusca*. Il profilo elettroforetico dei prodotti di PCR (Polymerase Chain Reaction) amplificati con due coppie di primers S1/S2 (specifici per *P. fusca*) e G1/G2 (specifici per *G. cichoracearum*) ha evidenziato una sola banda di circa 450 bp, stessa altezza della banda prodotta amplificando il DNA con la sola coppia di primers S1/S2 (figura 2) (Chen *et al.*, 2008; Donnarumma *et al.*, 2015).

In tabella 3 si riportano i risultati dei rilievi effettuati a 7 e 15 giorni dall'ultimo trattamento relativi alla prova condotta a Terracina. Per la prova condotta a Monterotondo si riportano i rilievi fatti a 7 giorni rispettivamente dopo il quarto e l'ultimo trattamento (tabella 4).

Nella prova svolta a Terracina, al rilievo del 7/5 (7 giorni dopo l'ultimo trattamento), riguardo all'incidenza della malattia su testimone, si è riscontrato un valore di 88,8%, differente significativamente dalle tesi con oli e formulati di sintesi (incidenza mediamente del 60,0%). In particolare con i formulati a base di oli alternati con fungicidi di sintesi, l'indice di severità ha evidenziato una protezione pari a quella della tesi di riferimento con fungicidi di sintesi (decremento del 60,0 % della malattia rispetto al testimone non trattato). Un ulteriore rilievo è stato effettuato a quindici giorni dall'ultimo trattamento e per quanto riguarda l'incidenza della malattia su testimone si è riscontrato un valore di 98,8%, differente significativamente dalle tesi con oli e formulati di sintesi (mediamente 77,5%). Anche in questo caso le strategie basate su formulazioni di oli essenziali hanno prodotto un decremento della severità della malattia del 60% (TTO) e del 55% (G+R), mentre la tesi con soli fungicidi di sintesi ha determinato un decremento inferiore (44%).

La prova svolta a Monterotondo, al rilievo dopo 7 giorni dal quarto trattamento (13/7), ha fatto registrare un'incidenza della malattia sul testimone del 77,2%, differente significativamente solo dalla tesi di riferimento. Relativamente all'indice di severità, invece, sia i trattamenti a base di oli essenziali alternati al fungicida di sintesi che il trattamento di riferimento, sono significativamente differenti dal testimone e dalla tesi trattata due volte con il solo fungicida di sintesi (decremento del 57,0% per la tesi 2, del 41,0% per la tesi 4 e del 51,0% per il riferimento). Per quanto riguarda il rilievo effettuato a 7 giorni dall'ultimo trattamento (27/7), l'incidenza della malattia sul testimone è aumentata rispetto al precedente rilievo (88,6%). I valori riscontrati per le tesi trattate con oli e prodotti di riferimento, differiscono significativamente dal testimone e dalla tesi trattata con il solo fungicida. Relativamente all'indice di severità si riscontra lo stesso andamento evidenziato nel rilievo precedente (decremento del 54% per la tesi 2, 52% per la tesi 4 e 50% per il riferimento).

In nessuna delle prove effettuate sono stati evidenziati fenomeni di fitotossicità sulle piante ai dosaggi applicati.

Figura 1. 1a: corpi fibrosi nei conidi di *P. fusca*; 1b: tubo germinativo laterale di *P. fusca*

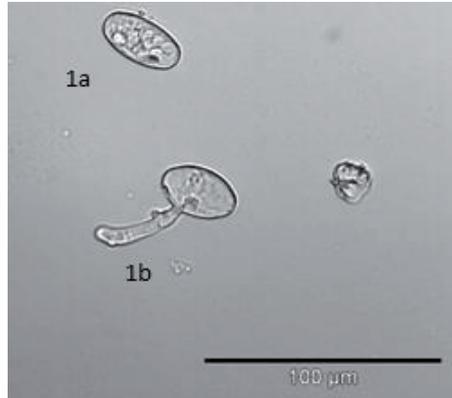


Figura 2. Profilo elettroforetico dei prodotti di PCR amplificati con primers S1/S2 e G1/G2: linee 1-3 e S1/S2 linea: 4 controllo positivo *P. fusca*, linea 5 controllo negativo

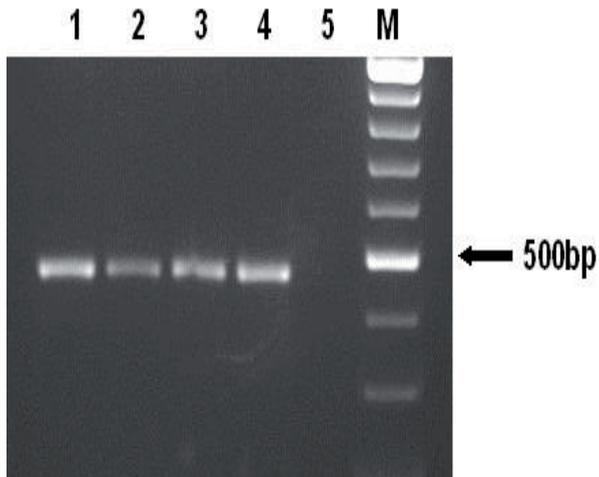


Tabella 3. Prova di Terracina (LT): risultati dei due rilievi eseguiti a 7 e 15 giorni dall'ultimo trattamento

| N° | Tesi | Rilievo del 7/5 | | Rilievo del 15/5 | |
|----|------------------------------|-----------------|------------|------------------|------------|
| | | Incidenza % | Severità % | Incidenza % | Severità % |
| 1 | Testimone (acqua) | 88,8 a* | 72,8 a | 98,8 a | 81,3 a |
| 2 | TTO alternato a metrafenone | 60,0 b | 26,8 c | 76,3 b | 33,0 c |
| 3 | Metrafenone / penconazolo | 57,5 b | 27,5 c | 78,8 b | 45,3 d |
| 4 | G+R alternato a metrafenone | 61,3 b | 28,3 c | 77,5 b | 37,3 c |
| 5 | Metrafenone (due interventi) | 86,3 a | 64,0 b | 95,0 a | 70,0 b |

*I valori della stessa colonna contrassegnati da lettere differenti differiscono significativamente tra di loro al test LSD ($P \leq 0,05$)

Tabella 4. Prova di Monterotondo (RM): risultati dei due rilievi eseguiti a 7 giorni dal 4° trattamento e 7 giorni dopo il 6° (ultimo) trattamento

| N° | Tesi | Rilievo del 13/7 | | Rilievo del 27/7 | |
|----|------------------------------|------------------|------------|------------------|------------|
| | | Incidenza % | Severità % | Incidenza % | Severità % |
| 1 | Testimone (acqua) | 77,2 a | 71,3 a | 86,3 a | 74,2 a |
| 2 | TTO alternato a metrafenone | 65,2 ab | 31,0 b | 68,6 b | 34,0 b |
| 3 | Metrafenone / penconazolo | 63,7 b | 35,0 b | 68,0 b | 37,0 b |
| 4 | G+R alternato a metrafenone | 69,7 ab | 42,0 b | 65,3 b | 36,0 b |
| 5 | Metrafenone (due interventi) | 75,8 ab | 62,4 a | 80,5 a | 74,8 a |

*Vedi tabella 3

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come già evidenziato in sperimentazioni effettuate precedentemente in serra, le strategie di contenimento dell'oidio dello zucchini proposte risultano promettenti. In entrambe le prove, nonostante l'elevata pressione della malattia riscontrata in tutti i rilievi, i formulati a base di oli essenziali applicate in alternanza ad un fungicida di sintesi, relativamente all'indice di severità hanno contenuto in maniera significativa lo sviluppo della malattia, allo stesso livello delle tesi a base esclusivamente di fungicidi di sintesi. Ciò si è verificato in entrambe le prove in tutti e due i rilievi effettuati. Si sottolinea a tal proposito che, nell'ottica di ridurre l'impatto dei fungicidi utilizzati, sono stati applicati i dosaggi più bassi riportati in etichetta. Solo nel rilievo effettuato nella prova di Terracina dopo 15 giorni dall'ultimo trattamento, la tesi di riferimento a base di fungicidi di sintesi è risultata meno efficiente rispetto alle tesi con oli essenziali alternati al fungicida.

Questo risultato fornisce utili informazioni sulla possibilità di distanziare gli intervalli di trattamento con gli oli poiché possono proteggere la coltura più a lungo. L'uso di formulati a base di oli essenziali fornisce l'opportunità di limitare l'utilizzo dei prodotti di sintesi, con la riduzione dei rischi della loro distribuzione nell'ambiente e sulla parte edibile delle colture. Inoltre è importante sottolineare che la loro disponibilità costituisce una valida alternativa, utile per ridurre il rischio di sviluppo di fenomeni di resistenza dei patogeni, proprio dei prodotti di sintesi. Avere, quindi, a disposizione potenziali prodotti che assicurino un soddisfacente livello di protezione a basso rischio di induzione di resistenza, costituisce una valida alternativa.

Ringraziamenti

Parte del lavoro svolto è stato realizzato con il contributo del PSR Regione Lazio 2007/2013 Misura 124, nell'ambito del progetto "Utilizzo di oli essenziali per la difesa dello zucchini dall'oidio in coltura protetta". Si ringraziano le società Sipcam e Xeda per aver fornito i formulati a base di oli essenziali oggetto della sperimentazione.

LAVORI CITATI

- Aly A.A., Mohamed H.I., Mansour M.T.M., Omar M.R., 2013. Suppression of powdery mildew on flax by foliar application of essential oils. *Journal of Phytopathology*, 161, 376-381.
- Annesi T., Pompei V., Conte E., Cioffi C., Donnarumma L., 2011. Powdery mildew integrated control on zucchini with 'soft chemistry' materials and quinoxyfen. *Communications in agriculture and applied biological sciences*, 76 (2), 65-70.
- Arbizzani A., Myrta A., Medico E., Dimartino M.A., Cristiani C., Alvisi A., Ponti D., 2014. Cyflufenamid (TAKUMI®): valutazione di strategie di intervento nel controllo dell'oidio dello zucchini. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 485-490.
- Branzanti B., Brunelli A., 1987. Distribuzione e frequenza degli attacchi di *Erysiphe cichoracearum* e *Sphaerotheca fuliginea* su zucchini in Emilia-Romagna. *Informatore Fitopatologico*, 9, 39-45.
- Branzanti B., Brunelli A., 1992. Etiology study on powdery mildew of Cucurbitaceae family in Emilia-Romagna. *Informatore Fitopatologico*, 42, 37-44.
- Braun U., Takamatsu S., 2000. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microspora*, *Uncinula* and *Sphaerotheca* inferred from rDNA ITS sequences: some taxonomic consequences. *Schlechtendalia*, 4, 1-33.

- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Chen R.S., Chu C., Cheng C.W., Tsay W.Y., 2008. Differentiation of two powdery mildews of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by a PCR-mediated method based on ITS sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 1-8.
- Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G., 2000. GC-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2576-2581.
- Del Sorbo G., Aloj B., Scalcione M., Noviello C., 1992. Contributo alla conoscenza dell'eziologia dell'oidio delle cucurbitacee in Campania. *Ann Fac Sci Agr Univ Napoli*, 26, 40-59.
- Donnarumma L., Milano F., Trotta S., Annesi T., 2015. Use of essential oils in control strategies against zucchini powdery mildew. *Journal of Phytopathology*, 163, 877-885.
- EPPO Standards, 1996. Efficacy evaluation of fungicides. Powdery mildews on cucurbits and other vegetables. PP 1/57(3).
- Isman M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608.
- Isman M.B., Machial C.M., 2006. Pesticide based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *In: Advances in Phytomedicine, Naturally Occurring Bioactive Compounds* (Rai M, Carpinella MC). Cap. 2, Oxford, Elsevier B. V. (eds), 29-44.
- Milano F., Donnarumma L., Trotta S., Rosati S., Annesi T., 2014. Ulteriori esperienze sull'utilizzo di oli essenziali per la difesa dello zucchini dall'oidio. *Atti II Congresso Nazionale della Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali*, 138, 65.
- Oosterhaven K., Poolman B., Smid E.J., 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products*, 4, 23-31.
- Sturchio E., Donnarumma L., Annesi T., Milano F., Casorri L., Masciarelli E., Zanellato M., Meconi C., Boccia P., 2014. Essential oils: an alternative approach to management of powdery mildew diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 385-395.