

PROVE DI LOTTA CONTRO BOTRYTIS CINEREA PERS. SU VITE: ASPETTI FITOIATRICI E RESIDUALI

R. DUGHERA*, C. ALOI*, A. LEANDRI **, M. MONCHIERO*

* Dipartimento di valorizzazione e protezione delle risorse agroforestali, Università degli studi di Torino, via Giuria 15, 10126 Torino.

**Istituto sperimentale per la patologia vegetale, via G.C. Bertero 22, 00156 Roma.

RIASSUNTO

Si è valutata l'attività di diversi principi attivi impiegati da soli, in alternanza o in miscela per la protezione dell'uva da attacchi di muffa grigia e la conseguente presenza di residui sulle uve alla raccolta.

L'utilizzazione di un dicarbossimmidico + thiram ha consentito di ottenere i migliori risultati di protezione anche in presenza di popolazioni di Botrytis cinerea resistenti.

Tra i principi attivi utilizzati: il thiram, il procymidone ed il carbendazim, sono stati ritrovati sulle uve in quantità superiore al limite massimo ammesso dalla nostra legislazione anche nel rispetto dei tempi di carenza.

SUMMARY

CHEMICAL CONTROL OF BOTRYTIS CINEREA PERS. ON GRAPEVINE: ASPECTS OF EFFICACY AND RESIDUES.

Several fungicides, were tested alone or in mixture for their activity against grey mould. The consequent presence of residues on the grapes was also evaluated.

The association of a dicarboximide with thiram gave the best protection, even in presence of resistant strains of Botrytis cinerea.

Although pre harvest intervals were satisfied, residues on grapes of thiram, procymidone and carbendazim resulted higher than the maximum amount fixed by Italian regulation.

INTRODUZIONE

La difesa della vite dagli attacchi di Botrytis cinerea Pers. è risultata complicata a partire dagli anni '70 a causa della comparsa di ceppi del parassita resistenti nei confronti dei fungicidi benzimidazolici prima e dei dicarbossimmidici in seguito (Leroux e Fritz, 1984; Gullino e Garibaldi, 1986).

Il fenomeno della resistenza ha indotto da un lato a ricercare nuovi principi attivi efficaci nel contenere la muffa grigia e dall'altro a valutare la possibilità di integrare l'azione dei fungicidi tradizionalmente impiegati e non più totalmente efficaci con quella di prodotti a diverso meccanismo d'azione (Aloi *et al.*, 1989; Gullino, 1992).

Le più comuni strategie anti-resistenza adottate nei vigneti piemontesi, nel caso di vitigni particolarmente sensibili agli attacchi di B. cinerea e interessati dal fenomeno della resistenza quali il "Moscato", sono consistiti nell'impiego di miscele di benzimidazoli o dicarbossimmidici con fungicidi cosiddetti tradizionali quali thiram e chlorthalonil o di miscele di benzimidazoli con il diethofencarb, fungicida dotato di resistenza incrociata negativa nei confronti dei benzimidazolici (Kato *et al.*, 1984) e nella razionalizzazione degli interventi, limitati alle fasi più critiche per le infezioni (Gullino *et al.*, 1988; Leroux e Moncomble, 1993).

Nel presente lavoro si è voluto valutare nelle annate 1990 e 1991 l'attività di diversi principi attivi impiegati in uno o due trattamenti, da soli, in alternanza o in miscela nella protezione dell'uva dagli attacchi di muffa grigia e l'influenza delle diverse modalità di intervento sui residui dei principi attivi riscontrabili su uva al momento della raccolta.

MATERIALI E METODI

CAMPO

Le 6 prove di lotta, condotte in vigneti situati a Mango (1990) e Valdivilla (1990 e 1991) sono state impostate secondo lo schema del blocco randomizzato con 4 replicazioni di 30 viti ciascuna: i

trattamenti sono stati eseguiti alle fasi fenologiche di pre-chiusura del grappolo (B) e di invaiatura (C), utilizzando un atomizzatore a spalla, distribuendo 250 litri di acqua/ettaro. I rilievi sulla gravità della malattia sono stati effettuati al momento della vendemmia valutando la percentuale di grappolo colpita su 100 grappoli per ogni parcella, secondo una scala di intensità a 7 classi precedentemente descritta (Di Punzio *et al.* 1978). I valori percentuali sono stati trasformati nei rispettivi valori angolari e sottoposti all'analisi della varianza e al test di Duncan.

Nelle prove 3/1990 e 2/1991 non è stato eseguito alcun rilievo sulla malattia a causa della totale assenza di attacchi di muffa grigia (Tabb. 3 e 6).

CONTROLLO DEI RESIDUI

Al momento della raccolta sono stati effettuati prelievi casuali di grappoli per un totale di circa 10 kg per ogni parcella. I campioni sono stati trasferiti in laboratorio ed immediatamente deraspati ed omogeneizzati. Il mosto è stato conservato in bottiglie di PVC a 20°C fino al momento dell'analisi.

ANALISI

Per le analisi HPLC è stato usato uno strumento Varian 5020 con rivelatore UV/VIS corredato di colonna LiChrosorb RP18; il flusso della fase mobile era di 1ml/min.

DIETHOFENCARB

Estrazione: 25g di mosto + 30ml di esano; agitazione per 15 min (per tre volte) evaporazione a secco in evaporatore rotante; risospensione in acetonitrile: acqua 1:1 v/v.

Analisi a 244 nm; fase mobile: acqua acidificata a pH 3 con acido ortofosforico:acetonitrile 50:50 v/v in isocratica.

CHLOZOLINATE E METABOLITA

Estrazione: 25g di mosto + 25ml di etere di petrolio 40-60°C; agitazione per 10 min; prelievo di 5 ml della fase organica; evaporazione a secco; risospensione in acetonitrile: acqua 1:1 v/v.

Analisi in gradiente, dal 37% al 20% di A in 6 min. A: sodio lauril solfato 0.1% in acqua acidificata a pH 3 con acido ortofosforico; B: acetonitrile; lunghezza d'onda 210 nm.

PROCYMIDONE

Estrazione: 25g di mosto + 50ml di esano, agitazione per 20 min (per tre volte); evaporazione a secco in evaporatore rotante; risospensione in acetonitrile.

Analisi a 220 nm; fase mobile: acqua acidificata a pH 3 con acido ortofosforico:acetonitrile 35:65 v/v in isocratica.

VINCLOZOLIN

Estrazione: 25g di mosto + 50ml di esano; agitazione per 20 min (per tre volte); evaporazione a secco in evaporatore rotante; risospensione in acetonitrile.

Analisi a 225 nm; fase mobile: acqua acidificata a pH 3 con acido ortofosforico:acetonitrile 28:72 v/v in isocratica.

THIRAM

E' stato usato il metodo di Keppel(1971): a 100g di mosto sono stati aggiunti 200ml di acqua, 40 ml di HCl concentrato, 20 ml di Sn Cl₂ al 40% in HCl concentrato; il tutto è stato portato ad ebollizione e lasciato per 45 min. Il CS₂ sviluppatosi è stato fatto reagire con il reattivo di Viles, quindi misurato per via spettrofotometrica a 380 nm.

I risultati sono stati espressi in ppm di CS₂.

CARBENDAZIM

Estrazione: secondo il metodo di Mestres *et al.* (1970); estrazione con acetato di etile in ambiente alcalino e purificazione dell'estratto per ripartizioni successive in ambiente acido e basico.

Analisi a 273 nm; fase mobile: metanolo:tampone fosfatico pH 8 60:40 v/v in isocratica.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'andamento climatico delle annate 1990 e 1991 non è risultato particolarmente favorevole agli attacchi di B. cinerea su vite nelle zone in cui si è operato.

Proprio per la quasi totale assenza di attacchi del patogeno nella prova 3 del 1990 non si possono trarre considerazioni sull'efficacia dei prodotti impiegati (Tab. 3). Nelle altre prove, l'impiego della miscela di un dicarbossimmidico (vinclozolin) con thiram ha consentito una riduzione significativa degli attacchi, anche con un solo intervento in C, in presenza, peraltro, di un indice di malattia molto modesto (1,4% di acini colpiti nelle parcelle testimone nella prova 1 e 4,0% nella prova 2). Una efficace protezione, nelle situazioni in cui si è operato, è stata offerta anche impiegando le miscele diethofencarb + carbendazim e diethofencarb + thiram, in B e la miscela vinclozolin + thiram in C (Tabb. 2 e 3).

Nel 1991 nella sola prova 1 si sono verificate condizioni per un attacco leggermente più rilevante di muffa grigia (Tab. 5): in tale prova la miscela procymidone + thiram applicata in B e C ha fornito risultati migliori rispetto alla stessa miscela in C alternata all'impiego di una miscela di isolati di Trichodema in pre-fioritura (A), post fioritura (A), B e venti giorni prima della vendemmia (D) (Tab. 5).

Per quanto riguarda gli aspetti fitoiatrici, l'impiego di un dicarbossimmidico + thiram consente di conseguire risultati assai soddisfacenti anche in presenza di popolazioni del patogeno resistenti ai dicarbossimmidici. Tali dati confermano risultati precedentemente ottenuti, in presenza di attacchi molto più elevati in Italia (Gullino *et al.* 1988) e in Francia (Leroux e Moncomble, 1993).

L'impiego della miscela di un dicarbossimmidico con il thiram costituisce, al momento attuale, la migliore strategia di lotta, in presenza di popolazioni di B. cinerea resistenti.

L'efficacia fitoiatrice delle diverse miscele saggiate (diversi dicarbossimmidici in miscela con differenti dosaggi di thiram) è risultata del tutto confrontabile (Tabb. 1, 4, 5, 6). Ciò, alla luce dei risultati ottenuti con l'analisi dei residui, induce a considerare positivamente l'impiego del thiram in miscela con un dicarbossimmidico a dosaggi più bassi.

Per i residui rilasciati sulle uve dai trattamenti antiparassitari effettuati si possono fare le seguenti osservazioni:

THIRAM

La dose incide significativamente sulla concentrazione del residuo mentre il numero dei trattamenti incide solo in alcuni casi a livelli non statisticamente significativi. Considerando che se somministrato una sola volta il thiram viene applicato nella fase fenologica C si può affermare che l'entità del residuo dipende dalla dose dell'ultimo trattamento. In numerosi casi il residuo superava notevolmente il limite legale (3,8 mg/kg) anche se il tempo di carenza è stato ampiamente rispettato. Questo si è manifestato esclusivamente nell'annata agraria 1990 caratterizzata da temperature medie generalmente più basse rispetto all'annata 1991. La piovosità è stata in ogni caso molto scarsa, ma lievemente più alta nell'anno 1990, per cui sembra che la pioggia non abbia contribuito ad abbassare significativamente il livello dei residui.

VINCLOZOLIN

Il vinclozolin, somministrato alla dose di 500g/ha sia una che due volte (fasi fenologiche C e B+C), è stato riscontrato al momento della raccolta a concentrazioni inferiori alle 0,6 mg/kg. Non sembra che si verifichi un effetto di accumulo poiché il livello dei residui nelle tesi trattate una o due volte non differiva significativamente. Anche in questo caso, sebbene in minor misura rispetto al thiram, si è riscontrata una differenza significativa del decadimento del p.a. tra le aziende.

PROCYMIDONE

Per questo principio attivo, pur dotato di elevata persistenza (Agnello *et al.* 1980), non è univocamente evidenziabile un effetto di accumulo in base a trattamenti ripetuti. Infatti il livello dei residui di procymidone è risultato condizionato significativamente dal numero di trattamenti solo nella prova 1 del 1991, dove il limite di tolleranza non è stato mai superato, mentre nella prova 2 dello stesso anno il livello dei residui è stato superiore al limite legale (1,5 mg/kg) sia nel caso di un solo trattamento in C sia con due trattamenti in B e C (vedi Tabb. 5 e 6).

CARBENDAZIM

In tutte le prove in cui è stato utilizzato questo principio attivo si sono riscontrati sulle uve residui superiori al limite legale (1 mg/kg) nonostante i trattamenti siano stati effettuati sempre molto prima della vendemmia, cioè con intervalli di sicurezza molto maggiori di quelli previsti per legge (15 gg). Analoghi risultati hanno ottenuto Faretra *et al.* (1991) trattando la vite con una miscela di carbendazim e diethofencarb in epoche successive all'invaiaatura. Tale comportamento può essere ascritto all'elevata stabilità della molecola ed alla sua sistemicità e conseguente protezione dagli agenti atmosferici.

DIETHOFENCARB

La sua degradazione sembra piuttosto rapida ma sui livelli ritrovati, sempre inferiori a 0,3 mg/kg non si può fare alcuna considerazione essendo solo recentemente presentata domanda di registrazione per questo p.a. e non ancora fissati limiti per i residui e per i tempi di carenza.

CHLOZOLINATE

E' stato utilizzato solo in due prove e non sembra presentare problemi dal punto di vista residuale anche in considerazione dell'elevato limite legale (5 mg/kg).

In sintesi, per quanto riguarda l'entità del residui, si può constatare come problemi dal punto di vista sanitario e legale si possono avere per thiram, procymidone e carbendazim, anche rispettando i relativi tempi di sicurezza tra l'ultimo trattamento e la vendemmia. Per quanto riguarda l'impiego di miscele di un dicarbossimmidico + thiram, considerato che costituisce attualmente in presenza di resistenza la soluzione fitolatrice migliore, sarà opportuno orientarsi verso dosaggi non eccessivamente elevati. Del resto, in alcune prove, condotte su diverse colture, è stato dimostrato che si ottengono buoni risultati anche con dosi ridotte di questo fungicida (Gullino *et al.*, 1989, 1990)

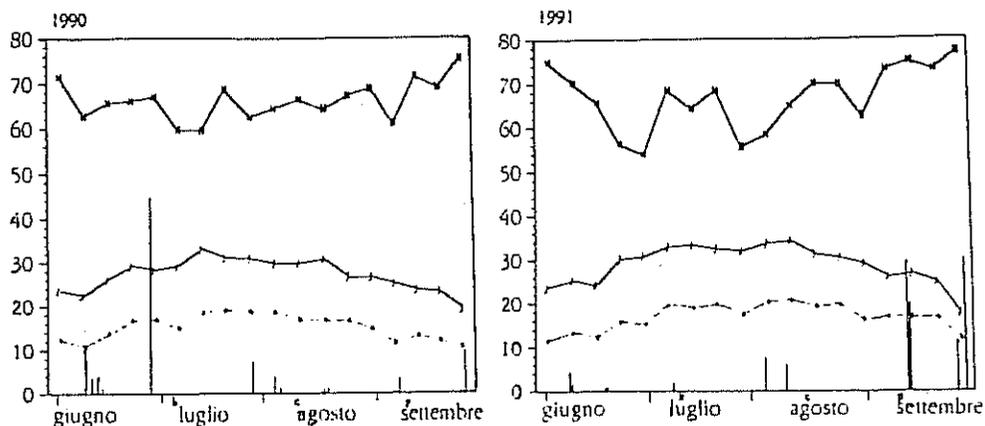
Un'altra considerazione riguardante tutti i principi attivi esaminati è la difficoltà di trovare giustificazioni al diverso comportamento degradativo di stessi principi attivi usati alle stesse dosi, nei vigneti sede della prova e nella stessa annata agraria.

Astraendo da possibili errori di distribuzione dei prodotti antiparassitari, poiché i trattamenti sono stati effettuati in condizioni standardizzate da un unico operatore, e da errori di campionamento, essendo stato eseguito un prelievo di campioni di uva molto ampio e seguendo le opportune norme, il variare del comportamento dei principi attivi utilizzati può essere ricondotto al diverso microclima che si instaura nei vari vigneti della prova. L'esposizione degli stessi, ad esempio, influenzando sull'arieggiamento della coltura può aver portato a condizioni di temperatura ed umidità diverse ed è noto come questi fattori condizionino la degradazione dei principi attivi.

L'unico principio attivo che ha permesso di riscontrare dati coerenti nelle varie situazioni climatiche della prova è il carbendazim il quale a causa della sua sistemicità si sottrae in qualche misura al destino degradativo in funzione dei fattori climatici.

Per una puntuale conoscenza dell'effetto di pioggia, umidità, temperatura, insolazione sulla degradazione dei prodotti utilizzati sarebbe necessaria la presenza di impianti di rilevamento in grado di valutare i differenti microclimi.

Fig.1 Temperatura minima () e massima () in °C ed umidità relativa % () settimanali del periodo Giugno-Settembre 1991-1992.



b = pre-chiusura del grappolo; c = invaiatura; p = vendemmia (prelievo dei campioni).

Tabella 1 - Efficacia di diversi fungicidi contro la muffa grigia della vite e loro residuo sulle uve. Prova 1, 1990, azienda Tranchero, Mango (CN).

Trattamento	g p.a./ha	Fase fenologica	% di acini colpiti	Residui (mg/kg)				
				Thiram	Vinclozolin	Chlozolate	Diethofencarb	Carbendazim
1-Testimone	-	-	1,4 c*	n.r.**	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
2-Vinclozolin + thiram	500 + 3200	BC	0,3 a	2,47 a	0,17 a	-	-	-
3-Vinclozolin + thiram	500 + 3200	C	0,5 a	1,45 a	0,18 a	-	-	-
4-Chlozolate + thiram	800 + 1600	BC	0,8 b	0,55 b	0,17 (0,24)***	-	-	-
5-Carbendazim + diethofencarb	500 + 500	BC	0,4 a	-	-	0,28	-	1,34

* I valori della stessa colonna seguiti dalla medesima lettera non differiscono significativamente tra loro secondo il test di Duncan (P= 0,05)

** n.r. = non rilevabile

*** I valori tra parentesi si riferiscono al metabolita del chlozolate

Date trattamenti: B 4/7 ; C 8/8. Data rilievo e prelievo campioni: 11/9/1990

Tabella 2 - Efficacia di diversi fungicidi contro la muffa grigia della vite e loro residuo sulle uve. Prova 2, 1990, azienda Giachino, Valdivilla (CN).

Trattamento	g p.a./ha	Fase fenologica	% acini colpiti	Residui (mg/kg)			
				Thiram	Vinclozolin	Carbendazim	Diethofencarb
1-Testimone	-	-	4,0 c*	-	-	-	-
2-Vinclozolin + thiram	500 + 3200	BC	1,7 ab	4,25 a	-	-	-
3-Diethofencarb + thiram	500 + 1250	BC	1,5 ab	1,12 b	-	-	0,69
4-Diethofencarb + thiram/	500 + 1250	B	1,4 a	2,42 ab	-	-	n.r.
Vinclozolin + thiram	500 + 3200	C	-	-	-	-	-
5-Carbendazim + diethofencarb	500 + 500	B	2,4 b	2,75 a	1,41	-	n.r.
Vinclozolin + thiram	500 + 3200	C	-	-	-	-	-

* e ** vedi Tabella 1

Date trattamenti: B 4/7; C 8/8. Data rilievo e prelievo campioni: 11/9/1990

Tabella 3 - Efficacia di diversi fungicidi contro la muffa grigia della vite e loro residuo sulle uve. Prova 3, 1990, azienda Giachino, Vaidivilla (CN).

Trattamento	g p.a./ha	Fase fenologica	Residui (mg/kg)				
			Thiram	Vinclozolin	Carbendazim	Chlozolinate	Diethofencarb
1-Testimone	-	-	n.r.**	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
2-Vinclozolin + thiram	500 + 3200	BC	3,22 ab*	0,36 a	-	-	-
3-Vinclozolin + thiram	500 + 3200	C	4,58 a	0,30 a	-	-	-
4-Chlozolinate + thiram	800 + 1600	C	1,55 b	-	-	0,83 (0,65***)	-
5-Carbendazim + diethofencarb	500 + 500	BC	-	-	1,49	-	1,12

* ** e *** vedi Tabella 1
Date trattamenti: B 4/7; C 8/8. Rilievo e prelievo campioni: 11/9/1990

Tabella 4 - Efficacia di diversi fungicidi contro la muffa grigia della vite e loro residuo sulle uve. Prova 4, 1990, azienda Aimasso, Vaidivilla (CN).

Trattamento	g p.a./ha	Fase fenologica	% di acini colpiti	Residui (mg/kg)		
				Thiram	Vinclozolin	Carbendazim
1-Testimone	-	-	3,5c*	n.r.**	n.r.	n.r.
2-Vinclozolin + thiram	500 + 3200	BC	1,4a	5,77 a	0,52 a	-
3-Diethofencarb + thiram	500 + 1250	BC	1,7a	2,15 b	-	-
4-Diethofencarb + thiram/	500 + 1250	B	1,5a	4,85 a	-	-
Vinclozolin + thiram	500 + 3200	C	-	-	-	-
5-Carbendazim +	500 + 500	B	2,2b	4,30 a	0,37 a	1,68
diethofencarb/ Vinclozolin + thiram	500 + 3200	C	-	-	-	-

* e ** vedi Tabella 1
Date trattamenti : B 4/7; C 8/8. Data rilievo e prelievo dei campioni: 11/9/1990

Tabella 5 - Efficacia di diversi trattamenti contro la muffa grigia della vite e loro residuo sulle uve. Prova 1, 1991, azienda Aimasso, Valdivilla (CN).

Trattamento	g p.a./ha	Fase fenologica	% acini colpiti	Residui (mg/kg)	
				Thiram	Procymidone
1-Testimone	-	-	7,8 c*	0,03	0,06
2-Trichoderma/Procymidone + thiram	306 + 1225	A'ABD C	2,6 b	0,27 a	0,64 a
3-Procymidone + thiram	306 + 1225	BC	1,7 a	0,58 a	1,00 b

* vedi Tabella 1

Date trattamenti: B 17/7; C 22/8 . Data rilievo e prelievo campioni: 25/9/1991

Tabella 6 - Efficacia di diversi trattamenti contro la muffa grigia della vite e loro residuo sulle uve. Prova 2, 1991, azienda Giachino, Valdivilla (CN).

Trattamenti	g p.a./ha	Fase fenologica	Residui (mg/kg)	
			Thiram	Procymidone
1-Testimone	-	-	0,01	0,44
2-Trichoderma/Procymidone + thiram	306 + 1225	A'ABD C	0,46 a*	1,70 a
3-Procymidone + thiram	306 + 1225	BC	0,44 a	1,63 a

* vedi Tabella 1

Date trattamenti: B 17/7; C 22/8 . Data rilievo e prelievo campioni: 25/9

BIBLIOGRAFIA

ALOI C., FARETRA F., PIGLIONICA V., GULLINO M.L., 1989. Evoluzione della sensibilità nei confronti di fungicidi in popolazioni di Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea) presenti nell'Italia settentrionale e meridionale. *Informatore Fitopatologico*, 39(12), 51-55.

AGNELLO A.V., G. IMBROGLINI e A. LEANDRI, 1980. Ulteriori prove di lotta antibiotrica sulla vite nel Lazio (1978-79). *Annali Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale*, VI, 55-63.

DI PUNZIO F., GARIBALDI A., GULLINO G., MANCINI G., 1978. Esperienze di lotta contro la muffa grigia dell'uva in Piemonte nel 1977. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1978, 2, 161-168.

FARETRA F., PIGLIONICA V., TACCHEO BARBINA M., ROMITO A., DI TONNO A., SANSIVIERO F., DE PAOLI M., MONDINI R., PEZZONI A., VALENTINO A., 1991. Protezione della vite dalla muffa grigia (Botryotinia fuckeliana): efficacia dei trattamenti, loro influenza sulle popolazioni del patogeno e residui di fungicidi sull'uva. *La Difesa delle Piante*, 14, 13-26.

GULLINO M.L., MONCHIERO M., GARIBALDI A., 1988. Possibilità di impiego del diethofencarb nella lotta contro la muffa grigia della vite. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1988, 1, 299-310.

GULLINO M.L., GARIBALDI A., 1986. Resistance to fungicides in Botrytis cinerea: present situation. *Notiziario Malattie delle Piante*, 107, 63-71.

GULLINO M.L., ALOI C., GARIBALDI A., 1989. Influence of spray schedules on fungicide resistant populations of Botrytis Cinerea Pers. on grapevine. *Netherland Journal Plant Pathology*, 95, Suppl. 1, 87-94.

GULLINO M.L., MORENO E., GARIBALDI A., 1990. Prove di lotta chimica e biologica contro la muffa grigia su pomodoro allevato in serra. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1990, 2: 225-232.

GULLINO M.L., 1992. Chemical control of Botrytis spp. *Proceedings 10th International Botrytis Symposium*, Heraklion, Greece, p.217-222.

KATO T., SUZUKI K., TAKAHASHI J. KAMOSHITA K., 1984. Negatively correlated cross-resistance between benzimidazole fungicides and methyl N-(3,5 dichlorophenyl) carbamate. *Journal of Pesticide Science*, 9, 489-495.

KEPPEL G.E. 1971. Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residues by modified carbon disulfide evolution method: *Journal of the AOAC*, 54:528-532.

LEROUX P., FRITZ R., 1984. Antifungal activity of dicarboximides and aromatic hydrocarbons and resistance to these fungicides. In: *Mode of action of antifungal agents* (Trinci A.P.J., Riley J.F. Coord.). Cambridge University Press, 207-237.

LEROUX P., MONCOMBLE D., 1993. Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne. Passé, présent, futur. *Phytoma*, 450, 27-30.

MESTRES R., M. CAMPO, J. TOURTE, 1970. Note sur le dosage des residus de benomyl, de thiabendazole et de thiophanate dans le fruits ou le legumes, separement ou associes. *Annales de Falsification Expertisse Chimique* 63, 160-163.

Ricerca effettuata con il finanziamento del Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste nell'ambito del Progetto Finalizzato "Lotta Biologica ed Integrata per la difesa delle piante agrarie e forestali"
Sottoprogetto: Residui e Viticoltura.