

EFFETTO DI PRODOTTI NATURALI CONTRO FUNGHI PATOGENI DI PIANTE OFFICINALI

A. ZECHINI D'AULERIO¹, A. ZAMBONELLI¹, A. BIANCHI²

¹Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, via Filippo Re 8, 40126 Bologna,

²Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale, viale delle Scienze, 43100 Parma.

Riassunto

E' stata saggiata l'attività antifungina delle polveri micronizzate di equiseto e di aglio, dell'olio di neem e della propoli *in vitro* ed in campo. *In vitro* soltanto l'aglio ha ridotto la crescita dei funghi patogeni saggiati, *Pythium ultimum* var. *ultimum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. In campo esclusivamente l'olio di neem ha esercitato una notevole protezione contro *Puccinia menthae* e *Puccinia dracunculina* rispettivamente ruggini della menta (*Mentha x piperita*) e del dragoncello (*Artemisia dracunculoides*).

Parole chiave: prodotti naturali, piante officinali, funghi patogeni, efficacia.

Summary

EFFECT OF SOME NATURAL PRODUCTS AGAINST PATHOGENIC FUNGI OF MEDICINAL PLANTS

The fungicidal properties of extracts of *Equisetum*, garlic, neem and propolis were tested *in vitro* and in the field. *In vitro* only garlic reduced the growth of *Pythium ultimum* var. *ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. In the field, neem oil gave a marked protection to *Mentha x piperita* and *Artemisia dracunculoides* against *Puccinia menthae* and *Puccinia dracunculina*.

Key words: natural products, medicinal plants, pathogen fungi, effectiveness.

Introduzione

L'uso di sostanze naturali per combattere le avversità delle piante è oggi di notevole interesse per la loro presunta minore tossicità rispetto ai prodotti di sintesi e, soprattutto, per il loro ridotto impatto ambientale dovuto all'impiego di molecole già presenti in natura e quindi meno perturbatrici degli equilibri preesistenti (Brunelli, 1995). Fra queste l'estratto di aglio (Fliermans, 1973; Tansey e Appleton, 1975; Sing *et al.*, 1979 e 1984; Tarig e Magee, 1990), l'olio di neem (Rovesti *et al.*, 1992; Grewal e Grewal, 1988) e la propoli (Brunelli *et al.*, 1990) sono state recentemente sperimentate nella lotta contro patogeni fungini.

La coltivazione delle piante officinali riveste anche in Italia un crescente interesse per una sempre maggiore richiesta dei prodotti da esse derivati con un conseguente ampliamento delle aree di produzione, soprattutto nei terreni marginali collinari e montani (Savoia, 1983). Le malattie crittogamiche, tuttavia, ne limitano la resa sia per il calo produttivo sia per le modificazioni qualitative degli estratti che ne derivano (Tarabeih e Abou-El-Fadl, 1979; Pisi e Bellardi, 1988; Zechini D'Aulerio *et al.*, 1995); in più su queste colture in Italia non è consentito effettuare trattamenti con prodotti anticrittogamici tradizionali.

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare, *in vitro* ed in campo, l'efficacia di alcune sostanze naturali contro alcuni funghi agenti di gravi malattie di piante officinali.

Materiali e metodi

Prodotti naturali

Per le prove sia di laboratorio sia di campo sono stati impiegati: polveri micronizzate di aglio (*Allium sativum* L.) e di equisetto (*Equisetum arvense* L.), olio di neem (*Azadirachta indica* Juss.) e propoli. Questi prodotti sono stati forniti della ditta Fitofarmaceutica Medica, Italia, che li ha preparati con le seguenti metodiche.

La polvere micronizzata di aglio è stata ottenuta da bulbi di provenienza italiana, essiccati in stufa alla temperatura di 35°C per 4 giorni. L'essicato è stato quindi ridotto in polvere con un micronizzatore ad aria compressa fino ad ottenere il 98% delle particelle con un diametro di 40 µm.

La polvere micronizzata di equisetto è stata ottenuta da fusti sterili di piante spontanee raccolte in provincia di Forlì essiccati all'aria. Essi sono stati quindi micronizzati con la medesima tecnica fino ad ottenere il 98% delle particelle con un diametro variabile fra i 40 µm ed i 100 µm.

L'olio di neem è stato ottenuto per spremitura di semi decorticati di provenienza indiana.

La propoli utilizzata, di provenienza italiana, è stata titolata in galangine (8,5 - 9 ppm mediamente); congelata e macinata è stata poi macerata prima in alcool etilico 95° per un mese e quindi lasciata in acqua demineralizzata per 7 giorni, con un rapporto soluto/solvente 1/5, con miscela finale delle due soluzioni fino ad ottenere una soluzione alcoolica del 50%.

Prove in laboratorio

I funghi patogeni impiegati nelle prove di laboratorio sono stati *Rhizoctonia solani* Kühn isolata da semenzali di timo, *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum* (CBS collection n. 264.38) e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (CBS collection n. 231.31). Queste tre specie fungine sono responsabili di morie di semenzali di piante officinali. I funghi sono stati mantenuti in coltura in agar patata (PDA, Difco).

Le prove sono state condotte in scatole Petri di 8,5 cm di diametro contenenti PDA.

L'olio di neem e la propoli sono stati saggianti alle concentrazioni di 2500, 5000 e 10.000 ppm, aggiunti direttamente al PDA dopo sterilizzazione, prima di essere versato nelle scatole Petri, alla temperatura di 40-45°C. I testimoni riferiti a neem sono stati fatti sviluppare su solo PDA, mentre quelli riferiti a propoli hanno ricevuto dosi di alcool etilico assoluto corrispondenti a quelle presenti nella soluzione idroalcolica saggiana. Le polveri micronizzate di aglio e di equisetto sono state saggiate alle concentrazioni di 1000 di 10.000 ppm sia tal quali sia sotto forma di estratti acquosi sterilizzati per filtrazione ed aggiunti al PDA sterile prima di essere versato nelle scatole Petri. Gli estratti acquosi sono stati ottenuti con la seguente metodologia: 20 g di ciascun prodotto sono stati posti in 200 ml di acqua bidistillata, mantenuti in agitazione per 30 minuti quindi lasciati decantare per 24 ore alla temperatura di 5°C. La sospensione acquosa di equisetto è stata poi filtrata con un filtro Whatman n. 2 e sterilizzata per filtrazione mediante passaggio sotto vuoto attraverso una membrana di nitrato di cellulosa Whatman avente pori di 0,2 µm. La sospensione acquosa di aglio è stata dapprima centrifugata a 2000 giri al minuto per 2 minuti, quindi il sovrantante filtrato due volte con filtri Whatman n.2, una volta sotto vuoto con una membrana di nitrato di cellulosa con pori di 0,45 µm e, infine, sterilizzato per filtrazione con la medesima metodologia impiegata con l'estratto di equisetto. Gli estratti sterili sono stati quindi aggiunti in quantità di 10 ml/l e di 100 ml/l, al PDA sterile alla temperatura di 40-45°C. Nelle piastre testimoni è stato aggiunto al PDA solo H₂O bidistillata sterile. I funghi patogeni sono stati inoculati immediatamente dopo la preparazione delle scatole Petri ponendo al centro di queste un disco di micelio (0,5 cm di diametro) prelevato dal margine di colonie fungine di sette giorni di età fatte sviluppare sempre su PDA. Le scatole petri sono state mantenute avvolte in fogli di alluminio alla temperatura di 22±1°C. I rilievi sono stati effettuati dopo 3, 5, 7 e 10 giorni, misurando l'accrescimento delle colonie fungine lungo due linee diametrali prefissate. La fungitossicità è stata espressa come inibizione percentuale dello sviluppo miceliare diametrale rispetto al testimone. Nelle piastre in cui è stata osservata inibizione totale delle colonie fungine trattate (inibizione 100%) è stata determinata la natura di tale fungitossicità, fungistatica o fungicida, con la tecnica di Thompson (1989) e Carta e Arras (1987). Le prove sono state ripetute quattro volte.

Prove di campo

Nel biennio 1994-95 sono state condotte prove di lotta nel vivaio sperimentale di Casola Valsenio (Ravenna) su *Mentha x piperita* L. e *Artemisia dracunculul* L., colture già risultate, in tale vivaio, colpite da pesanti attacchi di ruggine causate rispettivamente da *Puccinia menthae* Pers. e *Puccinia dracunculina* Fahr. (Zechini D'Aulerio et al., 1991). Sono state poste a confronto le seguenti tesi:

- propoli, 5 ml/l acqua,
- polvere micronizzata di aglio, 5 mg/l acqua,
- polvere micronizzata di equiseto, 5 mg/l acqua,
- olio di neem, 5 ml/l acqua,
- penconazolo (Topas® al 10% di p.a.) 0,8 g/l,
- testimone con sola acqua.

Alle miscele preparate estemporaneamente è stato addizionato il bagnante tween 80 (Fluka), 2 ml/l. I prodotti sono stati somministrati con una pompa a spalla, irrorando la parte aerea delle piante fino a sgocciolamento. I trattamenti sono stati effettuati a distanza di 15 giorni, da maggio a settembre di ogni anno. La prova è stata impostata secondo lo schema sperimentale del blocco randomizzato, con quattro ripetizioni su parcelle sperimentali di 2 m². A fine settembre di ogni anno è stato valutato il grado di attacco come percentuale media di superficie fogliare infetta rilevata su un campione casuale di 200 foglie per ciascuna parcella. I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA). Le medie relative a ciascuna tesi sono state quindi confrontate impiegando il test di Student Neuman Keul.

Risultati

Prove di laboratorio

Soltanto l'estratto acquoso di aglio alla massima concentrazione (100.000 ppm di estratto acquoso corrispondenti a 10.000 ppm di polvere micronizzata) ha ridotto lo sviluppo di tutti i patogeni saggiati (Tab. 1), esercitando tuttavia solo attività fungistatica essendo i patogeni in grado di crescere normalmente se trapiantati in substrato non trattato.

Tabella 1 - Effetto dell'estratto di aglio, dell'estratto di equiseto, dell'olio di neem e della propoli sui funghi patogeni saggiati.

fungo patogeno	% DI INIBIZIONE				
	estratto di aglio		olio di neem		
	1000ppm	10.000ppm	2500ppm	5000ppm	10.000ppm
<i>F. solani</i> ^o	0	14,5	3	5	9
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> ^{oo}	0	100*	72	80	94
<i>R. solani</i> ^{ooo}	0	85	41	44	44
	estratto di equiseto		propoli		
	1000ppm	10.000ppm	2500ppm	5000ppm	10.000ppm
<i>F. solani</i> ^o	0	0	52	59	61
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> ^{oo}	0	0	nr	nr	nr
<i>R. solani</i> ^{ooo}	0	0	25	0 ⁺	0 ⁺

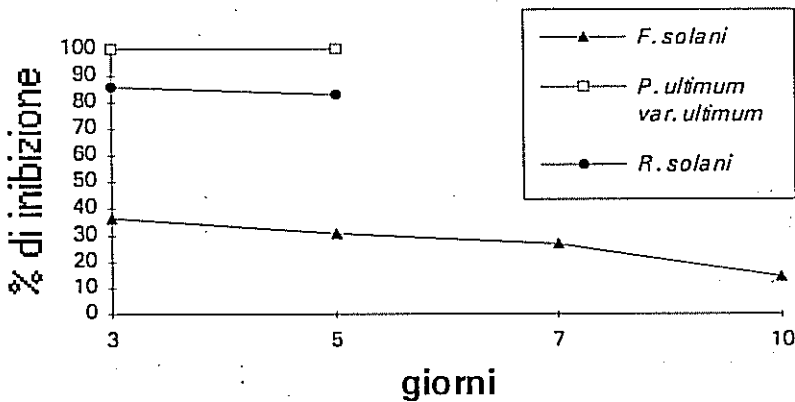
* = attività fungistatica. + = il prodotto ha stimolato leggermente la crescita del fungo patogeno. nr = dato non rilevato in quanto anche i testimoni sono stati completamente inibiti.

Rilievi eseguiti al termine di sviluppo del testimone e precisamente dopo: ^o dieci giorni, ^{oo} cinque giorni, ^{ooo} sette giorni.

Questo prodotto ha, inoltre, dimostrato una diminuzione di efficacia nel tempo; infatti procedendo con i rilievi la percentuale di inibizione è andata diminuendo (Fig.1). L'estratto acquoso di equiseto non ha rivelato alcuna efficacia (Tab.1). Nelle prove con polveri micronizzate, aggiunte al PDA dopo la sterilizzazione, si è verificato un notevole sviluppo di funghi inquinanti nelle piastre che non hanno permesso di rilevare i dati relativi alla crescita dei funghi saggiati.

L'olio di neem ha manifestato debole attività inibitrice verso tutti i funghi saggiati a tutte le dosi saggate (Tab.1). La soluzione idroalcolica di propoli ha avuto un debole effetto inibente solo su *F. solani* ed ha causato una totale inibizione di sviluppo di *P. ultimum* var. *ultimum*, da attribuirsi all'alta concentrazione di alcool presente nel prodotto; la stessa inibizione si è, infatti, riscontrata anche nella tesi testimone. *R. solani* è stata addirittura stimolata dalla propoli che nelle piastre trattate si è sviluppata più che nel testimone (Tab.1).

Figura 1 - Effetto dell'aglio nel tempo sulla crescita miceliare dei funghi saggiati.



Prove di campo

In entrambi gli anni le colture sono risultate colpite da ruggine; nel 1994 l'entità delle infezioni è stata maggiore a causa delle condizioni climatiche, caratterizzate da una maggiore frequenza ed entità delle precipitazioni nei mesi di maggio e giugno (Servizio Meteorologico Regionale, Emilia Romagna, Stazione n°39057), che hanno favorito lo sviluppo dei patogeni.

Dall'esame della tabella 3 emerge che tra le sostanze naturali soltanto l'olio di neem ha sempre esercitato una buona protezione contro le ruggini.

Nei confronti di *M. piperita* l'olio di neem ha fornito sempre protezione contro *P. menthae*; in particolare nel 1994 la percentuale di superficie fogliare infetta nella tesi trattata con questo prodotto è stata statisticamente inferiore al testimone. Nei confronti di *A. dracunculula* la protezione dell'olio di neem contro *P. dracunculina* è stata ancora maggiore: in entrambi gli anni la percentuale di infezione fogliare è stata significativamente inferiore al testimone e nel 1995 inferiore anche alla tesi trattata con penconazolo.

Tabella 2 - Percentuali della superficie fogliare infetta rilevate nella prova di campo

Tesi	<i>Mentha x piperita</i>		<i>Artemisia dracuncululus</i>	
	1994	1995	1994	1995
propoli	33,8 a	26,8 a	40,5 a	21,8 a
equiseto	34,0 a	25,3 a	41,3 a	19,3 a
aglio	35,3 a	29,5 a	38,5 a	18,6 a
neem	21,3 b	21,5 a	19,8 b	3,3 c
penconazolo	12,5 c	7,5 b	15,6 b	12,5 b
testimone	37,8 a	30,6 a	41,8 a	21,3 a

A lettere uguali corrispondono differenze non significative secondo il test di Student-Newman-Keul per $P=0,05$.

Discussione e conclusioni

L'aglio ha dimostrato *in vitro* un'attività fungistatica, seppure scarsa, limitatamente all'estratto acquoso. Tale attività sembra essere dovuta alla presenza di sostanze solforate (Amonkar e Banerij, 1971; Cavallito *et al.*, 1944), che essendo volatili (Tariq e Magee, 1990) perdono parte della loro efficacia nel tempo come dimostrato dalle prove *in vitro*. Per questo motivo, probabilmente, non è risultato efficace in campo e sarebbe necessario studiare una formulazione che ne aumenti la persistenza sui tessuti fogliari. L'estratto di aglio è già risultato, peraltro, efficace *in vitro* contro vari miceti (Fliermans, 1973; Tansey e Appleton, 1975; Sing *et al.*, 1979) ed in campo solo contro il mal bianco del pisello (Sing *et al.*, 1984).

La scarsa attività fungicida dimostrata dall'olio di neem *in vitro* conferma quanto già riferito da Grewal e Grewal (1988), che avevano osservato una debole efficacia degli estratti acquosi di semi di neem nei confronti di *F. solani* e di altri miceti. In campo, tuttavia, questo prodotto si è dimostrato più efficace, dimostrandosi in grado di contenere le infezioni di *P. menthae* e di *P. dracunculina* analogamente a quanto già osservato in serra nei confronti di *P. recondita* f. sp. *tritici* e dell'oidio di alcuni cereali (Rovesti *et al.*, 1992). La maggiore efficacia dell'olio di neem in campo potrebbe essere spiegata considerando che l'azione antifungina delle sostanze oleose sembra essere dovuta più che ad una loro fungitossicità ad una capacità di interferire sulla fisiologia delle interazioni patogeno-pianta (Brunelli, 1995).

La soluzione di propoli e la polvere micronizzata di equiseto confermano la scarsa attività contro i funghi già evidenziata da Brunelli *et al.* (1990).

Si ringrazia il Dr Carlo Bazzocchi per l'assistenza tecnica fornita

Lavori citati

- AMONKAR S. V., BANERJI A. (1971). Isolation and characterization of larvicidal principle of garlic. *Science*, 174, 1343-1344.
- BRUNELLI A. (1995). I prodotti naturali nella lotta alle malattie fungine. *La Difesa delle Pianta*, 18(2), 57-69.
- BRUNELLI A., DI MARCO S., SATANASSI L. (1990). Attività *in vitro* e in serra di sostanze naturali contro patogeni fungini. *Atti Giornate Fitopatologiche*. Vol. 2, 335-334.
- CARTA C., ARRAS G. (1987). Azione inibitrice *in vitro* di oli essenziali nei confronti di alcuni patogeni di piante ornamentali. *La Difesa delle Pianta*, 10(1), 195-202.

- CAVALLITO C. J., BUCK J. S., LEETER C. M. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II Determination of chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1952-1954.
- FLIERMANS C. B. (1973). Inhibition of *Histoplasma capsulatum* by garlic. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 50(3), 227-231.
- GREWAL P. S., GREWAL S. K. (1988). Selective fungicidal properties of some plant extracts to mushroom weed moulds. *Phytopathologia Mediterranea*, 27, 112-114.
- PISI A., BELLARDI M. G. (1988). Indagine fitopatologica su piante officinali ed aromatiche in Italia. *Informatore Fitopatologico*, 10, 57-62.
- ROVESTI L., DI MARCO S., PANCALDI D. (1992). Effect of neem kernel extract on some phytopathogenic fungi under greenhouse conditions. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 99(3), 293-296.
- SAVOIA G. (1983). Le piante officinali per la valorizzazione economica dei territori collinari e montani dell'Emilia Romagna. *Agricoltura*, 11, 20-22.
- SINGH U.P., PATHAK K. K., KHARE M. N., SINGH R.B. (1979). Effect of leaf extract of garlic on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cicci*, *Sclerotinia sclerotiorum* and on gram seeds. *Mycologia*, 71, 556-563.
- SINGH U.P., SINGH H. B., CHAUHAN V. B. (1984). Effect of some fungicides, plant extracts and an oil on inoculum density of different nodal leaves of pea infected by *Erysiphe polygoni*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 91 (1), 20-26.
- TANSEY M. R., APPLLETON J. A. (1975). Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia*, 67, 409-413.
- TARABEIH A.M., ABOU-EL-FADL I.A. (1979). Effect of *Sclerotinia sclerotiorum* on the volatile oil content of some medicinal plants. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 14(1-2), 31-35.
- TARIQ V. N., MAGEE A.C (1990). Effect of volatiles from garlic bulb extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research*, 94 (5), 617-620.
- THOMPSON D. P. (1989). Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia*, 81(1), 151-153.
- ZECHINI D'AULERIO A., ZAMBONELLI A., MORARA M. (1991). Ulteriori indagini sulle malattie crittogamiche di piante officinali in Emilia Romagna. *Informatore. Fitopatologico*, 12, 45-52.
- ZECHINI D'AULERIO A., ZAMBONELLI A., BIANCHI A., ALBASINI A. (1995). Micromorphological and chemical investigation into the effects of fungal diseases on *Melissa officinalis* L., *Mentha x piperita* L., and *Salvia officinalis* L. *Journal Phytopathology*, 143, 179-183.