

## EFFETTO DELLA MICRONIZZAZIONE DEL DEPOSITO E DEI COFORMULANTI SULL'ATTIVITÀ DI FUNGICIDI ANTIODIDICI

P. FLORI, M. BANORRI, A. CESARI

Centro di Fitofarmacia - Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare -  
Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna  
pflori@agrsci.unibo.it

### RIASSUNTO

È stato condotto uno studio sull'azione esercitata dalla micronizzazione del deposito e dall'aggiunta di coadiuvanti naturali sull'attività di alcuni antioidici, utilizzando allo scopo piante test di zuccino sulle quali, dopo trattamento controllato in ambiente di serra, si è valutata l'attività manifestata da depositi di entità nota e predefinita. Questi erano formati da n.1, 2, 4, 10 gocce, rispettivamente del volume di 10; 5; 2,5 ed 1  $\mu$ l, mentre i fungicidi saggiati, con e senza aggiunta di coadiuvante, erano rappresentati dai principi attivi: zolfo, penconazole e azoxystrobin. Al trattamento fungicida delle piante test faceva seguito la loro inoculazione per aspersione con una sospensione conidica di *Sphaerotheca fuliginea*, a seguito della quale era possibile rilevare il numero di macchie di oidio sviluppatesi. La stima del livello d'infezione delle piante ha permesso di valutare, primariamente l'influenza esercitata della micronizzazione del deposito e secondariamente l'azione dovuta all'aggiunta del coadiuvante.

**Parole chiave:** micronizzazione, deposito, fungicidi, coadiuvanti

### SUMMARY

#### BIOLOGICAL EFFECT OF THE DEPOSIT MICRONIZATION AND ADJUVANT'S ADDITION ON THE FUNGICIDE ACTIVITY

A study was carried out in green-house on the biological activity showed by fungicides as the consequence of deposit micronization and adjuvant's addition. Courgette plants were used in the experiment as biological tests, on which a different and know fungicide deposits was made. For the tested fungicides four deposits was examined, made by 1; 2; 4 and 10 drops, which volume was respectively of 10; 5; 2.5 and 1  $\mu$ l. The tested active ingredients, with and without adjuvant's addition, was sulphur, penconazole and azoxystrobin, which was manually applied to courgette tests by means of pipetman. The day after the treatment plants were inoculated with a conidial suspension of *Sphaerotheca fuliginea*, as a result of which it was possible to detect and to count, on the upper surface of the leaves, the number of powdery white colonies. The study shows that the biological activity of fungicide was directly or adversely influenced firstly by deposit micronization and secondly by adjuvant's addition.

**Keywords:** micronization, deposit, fungicides, adjuvants

### INTRODUZIONE

L'entità del deposito e la sua formazione risultano essere parametri critici e fondamentali nell'espressione dell'attività antiparassitaria di un agrofarmaco. Per tale ragione studi recenti (Cesari e Flori, 2000; Cross *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2000; Doruchowski *et al.*, 2003; Godyn *et al.*, 2003), si sono interessati alla comprensione degli effetti che volume e dose esercitano sulla natura ed entità del deposito e conseguentemente sulla sua attività biologica, essendo questi i parametri che determinano, direttamente ed indirettamente, il livello di copertura della pianta e la concentrazione dell'agrofarmaco per unità di superficie. Nello specifico alcuni studi hanno evidenziato come l'attività antiparassitaria di un agrofarmaco

risultati strettamente connessa alla struttura del suo deposito, ovvero al numero di gocce che lo compongono, alle loro dimensioni, alla concentrazione del principio attivo (Ebert *et al.*, 1999; Ebert *et al.*, 1999b; Rehman *et al.*, 1999). Allo scopo di studiare l'influenza che la micronizzazione del deposito esercita sull'attività dell'agrofarmaco, oltre che per esaminare l'influenza che l'aggiunta di coadiuvanti naturali esercita sullo stesso, è stata sviluppata una metodologia di laboratorio facente uso di piante test inoculate con *Sphaerotheca fuliginea*, agente dell'oidio delle Cucurbitacee. L'obiettivo era quello di sviluppare una tecnica, in parte già sperimentata nei confronti degli insetti (Rehman *et al.* 1999), che consentisse lo studio del grado di efficacia biologica di un deposito in funzione della sua struttura (numero e dimensione delle gocce), contribuendo in tal modo all'approfondimento di alcuni aspetti applicativi che risultano determinanti per lo sviluppo di strategie finalizzate ad un uso più razionale e sostenibile degli agrofarmaci [COM (2002)349].

## MATERIALI E METODI

Lo studio della correlazione tra attività biologica e micronizzazione del deposito e parallelamente dell'azione manifestata dall'aggiunta di coadiuvanti naturali, è stato condotto in serra facendo uso di piante test di zuccino, sulle quali, dopo trattamento manuale delle foglie con fungicidi antioidici rappresentativi di differenti gruppi chimici, si è stimata l'attività biologica manifestata. Il successivo inoculo delle piante con una sospensione conidica di *S. fuliginea*, ha consentito di valutare l'influenza esercitata sull'attività fungicida, in primo luogo dalla micronizzazione del deposito ed in secondo luogo dall'aggiunta del coadiuvante, operando secondo i protocolli sperimentali sotto riportati.

a) Piante Test – Erano utilizzate piante di zuccino cv Consul allevate in serra per 15÷20 giorni, alla temperatura di 22°C ed UR del 75÷80%. Ciascuna tesi sperimentale era costituita da 5 vasi, ciascuno contenente 2 piante delle quali venivano utilizzate esclusivamente le prime due foglie cotiledonari.

b) Coadiuvanti naturali – Lo studio ha interessato la sperimentazione dei due recenti coadiuvanti naturali Fitoil (Lameri e Paci, 2002) e Nufilm, rispettivamente a base di olio di soia e di olio di pino, i quali erano addizionati alle soluzioni acquose dei formulati fungicidi alle dosi d'impiego consigliate.

c) Tipologia dei depositi – Sono stati presi in esame agrofarmaci a base dei principi attivi: zolfo, azoxystrobin e penconazole, di ciascuno dei quali si è valutata l'attività biologica manifestata da 4 diverse tipologie di deposito, ciascuno costituito da n.1; 2; 4; 10 gocce, del volume rispettivamente di 10; 5; 2,5; 1 µl. Di ciascun principio attivo erano posti a confronto sia il formulato tal quale che aggiunto del coadiuvante, ciascuno alla dose di campo consigliata. A fianco dei principi attivi citati era esaminato anche il formulato commerciale Heliosoufre (a base di zolfo), il quale, per la sua formulazione a base terpenica, risultava particolarmente appropriato al confronto con i preparati addizionati dei coadiuvanti naturali.

d) Trattamento delle piante test - Ciascuna foglia cotiledonare era trattata con la soluzione di agrofarmaco come descritto al punto c), depositando manualmente, tramite siringa Pipetman, il volume ed il numero di gocce considerato. Queste erano deposte nel medesimo ordine su tutte le foglie cotiledonari ed erano lasciate asciugare per 24 h prima dell'inoculo delle piante.

e) Inoculo delle piante test – La tecnica si articolava in due fasi distinte, rispettivamente di “preparazione della sospensione conidica” e di “inoculo delle foglie cotiledonari”.

Preparazione della sospensione conidica:

1. da piante allevate in serra per il mantenimento di *S. fuliginea*, si prelevano 2÷3 foglie diffusamente coperte di oidio;

2. si irrorano le foglie con micro-getti d'acqua raccogliendo il dilavato in un baker;

3. si porta la sospensione acquosa contenente i conidi di oidio ad un volume di 500 ml;
4. tramite uso di cella Thoma e per osservazione al microscopio, si determina infine la concentrazione conidica della sospensione, il cui valore deve essere di almeno 250÷300.000 conidi/ml.

Inoculazione delle foglie cotiledonari:

1. la sospensione conidica citata viene irrorata in ugual misura sulle piante test, evitando il gocciolamento. Qualora rimanga parte della sospensione, questa viene distribuita in modo uniforme sino ad esaurimento;

2. dopo bagnatura si collocano infine le piante in cella termostatica, per lo sviluppo dell'oidio, alla temperatura media di 22°C.

f) Rilevazione dell'attività biologica - L'attività manifestata da ciascun deposito è determinata conteggiando, alla comparsa dei primi sintomi della malattia (7÷10 giorni dall'inoculazione), il n° di macchie di oidio presenti su ciascuna foglia cotiledonare.

g) Schema sperimentale della prova – Lo studio è stato condotto sulla base dello schema sperimentale di tabella 1, effettuando, in tempi successivi, tre prove per ciascun principio attivo in esame.

## RISULTATI

Il grado d'infezione manifestato dalle piante (figura 1) consente di apprezzare solo in parte la significatività delle differenti attività biologiche rilevate e le correlazioni con la tipologia del deposito. Gli effetti della micronizzazione del deposito e dell'aggiunta del coadiuvante risultano infatti meglio valutabili attraverso l'espressione del grado d'efficacia (figura 2), con riferimento al quale i prodotti manifestano i seguenti comportamenti:

- il preparato indicato come “Zolfo 1” (Heliosoufre), scelto come riferimento in quanto a base di coadiuvanti terpenici, manifesta un'efficacia variabile dal 35% al 60%, con valori più elevati per i depositi costituiti da gocce numerose e di minor volume (4 gocce da 2,5 µl; 10 gocce da 1 µl);

- il preparato indicato come “Zolfo 2”, sperimentato sia singolarmente che in miscela con i coadiuvanti, rivela un significativo aumento della propria attività a seguito dell'aggiunta di questi ultimi, manifestando un grado d'efficacia rispettivamente del 20÷40%, per il formulato tal quale, del 40% dopo aggiunta di Fitoil e del 50% dopo aggiunta di Nufilm. Mentre per il formulato tal quale sono i depositi costituiti da gocce numerose e di minor volume a fornire la migliore efficacia, con l'aggiunta dei coadiuvanti si osserva un aumento generalizzato del grado d'attività indipendentemente dalla tipologia del deposito;

- azoxystrobin si rivela l'antioidico meno influenzato dalla micronizzazione del deposito e dall'aggiunta dei coadiuvanti. Sia per il prodotto tal quale, che addizionato dei coadiuvanti, l'efficacia varia dal 40% al 60%, con il migliore grado d'attività per i depositi costituiti da gocce numerose e di volume minore;

- penconazole infine, avente un'efficacia variabile dal 30% al 65% in funzione della micronizzazione, manifesta la tendenza alla riduzione dell'attività se addizionato sia di Fitoil (25÷55%) che di Nufilm (10÷67%). Come per gli altri preparati i depositi costituiti da gocce numerose e di piccolo volume risultano fornire la migliore efficacia.

Una più significativa valutazione dell'attività del deposito in relazione al grado di copertura del trattamento, viene fornita dal grado di “efficacia/unità di copertura”. Poiché infatti le gocce di diverso volume determinano, su cartina idrosensibile, macchie di diversa superficie e considerando la superficie totale delle macchie come rappresentativa della copertura registrabile sul vegetale, è possibile esprimere l'attività di ciascun deposito come rapporto tra “efficacia %” (figura 2) e “copertura %” (tabella 2).

Tabella 1 – Fungicidi antioidici esaminati e loro condizioni sperimentali

Tesi <sup>(1)</sup>	Agrofarmaco <sup>(2)</sup>	Dose del f.c. (g/hl o ml/hl)	Concentrazione della soluzione (µg p.a./ µl)	Trattamento fogliare		Deposito	
				Gocce (n°)	Volume goccia (µl)	µg p.a./ foglia	µg p.a./ cm <sup>2</sup> <sup>(3)</sup>
1	Zolfo 1	400	2,04	1	10	20,4	1,7
2	“	“	“	2	5	20,4	1,7
3	“	“	“	4	2,5	20,4	1,7
4	“	“	“	10	1	20,4	1,7
5	Zolfo 2	400	3,2	1	10	32	2,66
6	“	“	“	2	5	32	2,66
7	“	“	“	4	2,5	32	2,66
8	“	“	“	10	1	32	2,66
9	Zolfo 2 + Nufilm	400+30	3,2+0,3	1	10	32+3	2,66+0,25
10	“	“	“	2	5	32+3	2,66+0,25
11	“	“	“	4	2,5	32+3	2,66+0,25
12	“	“	“	10	1	32+3	2,66+0,25
13	Zolfo 2 + Fitoil	400+100	3,2+1	1	10	32+10	2,66+0,83
14	“	“	“	2	5	32+10	2,66+0,83
15	“	“	“	4	2,5	32+10	2,66+0,83
16	“	“	“	10	1	32+10	2,66+0,83
17	Azoxystrobin	100	0,5	1	10	5	0,41
18	“	“	“	2	5	5	0,41
19	“	“	“	4	2,5	5	0,41
20	“	“	“	10	1	5	0,41
21	Azoxystrobin + Nufilm	100+30	0,5+0,3	1	10	5+3	0,41+0,25
22	“	“	“	2	5	5+3	0,41+0,25
23	“	“	“	4	2,5	5+3	0,41+0,25
24	“	“	“	10	1	5+3	0,41+0,25
25	Azoxystrobin + Fitoil	100+100	0,5+1	1	10	5+10	0,41+0,83
26	“	“	“	2	5	5+10	0,41+0,83
27	“	“	“	4	2,5	5+10	0,41+0,83
28	“	“	“	10	1	5+10	0,41+0,83
29	Penconazole	60	0,6	1	10	6	0,5
30	“	“	“	2	5	6	0,5
31	“	“	“	4	2,5	6	0,5
32	“	“	“	10	1	6	0,5
33	Penconazole + Nufilm	60+30	0,6+0,3	1	10	6+3	0,5+0,25
34	“	“	“	2	5	6+3	0,5+0,25
35	“	“	“	4	2,5	6+3	0,5+0,25
36	“	“	“	10	1	6+3	0,5+0,25
37	Penconazole + Fitoil	60+100	0,6+1	1	10	6+10	0,5+0,83
38	“	“	“	2	5	6+10	0,5+0,83
39	“	“	“	4	2,5	6+10	0,5+0,83
40	“	“	“	10	1	6+10	0,5+0,83
41	Testimone	-	-	-	-	-	-

(1) Ciascuna costituita da 5 vasi, per complessive 10 piante e 20 foglie cotiledonari. Di ciascuna tesi erano eseguite 3 ripetizioni in epoche successive

(2) Zolfo 1= Heliosufre al 51% di zolfo (formulato a base di alcoli terpenici); Zolfo 2 = Tiovit all'80% di zolfo; Penconazole = Topas al 10% di p.a.; Azoxystrobin = Quadris al 50% di p.a.; Nufilm = bagnante naturale a base di olio di pino; Fitoil = coadiuvante naturale a base di olio di soia (40%)

(3) Determinato per rapporto tra quantità di p.a. depositata su ciascun cotiledone (µg/foglia) e superficie fogliare media del cotiledone (cm<sup>2</sup> 12)

Alla luce di tale parametro l'attività da ciascun principio attivo ci appare più appropriatamente valutabile ed evidenza come anche i depositi costituiti da gocce di grandi dimensioni (1 goccia da 10 $\mu$ l; 2 gocce da 5 $\mu$ l) manifestino un buon grado d'attività, analogo, od in alcuni casi superiore, a quello fornito dai depositi con gocce piccole, ma numerose (10 gocce da 1 $\mu$ l). Differentemente dai comportamenti evidenziabili in base alla sola efficacia, è possibile rilevare come i dati di minore attività siano registrati soprattutto per i depositi formati da gocce intermedie (4 gocce da 2,5 $\mu$ l), i quali presentano la minore efficacia/unità di copertura nella totalità dei test sperimentati.

Figura 1 – Grado d'infezione di *S. fuliginea*, espresso come n° medio di macchie per foglia, manifestato da ciascun fungicida in relazione al tipo di micronizzazione del deposito ed all'aggiunta o meno del coadiuvante

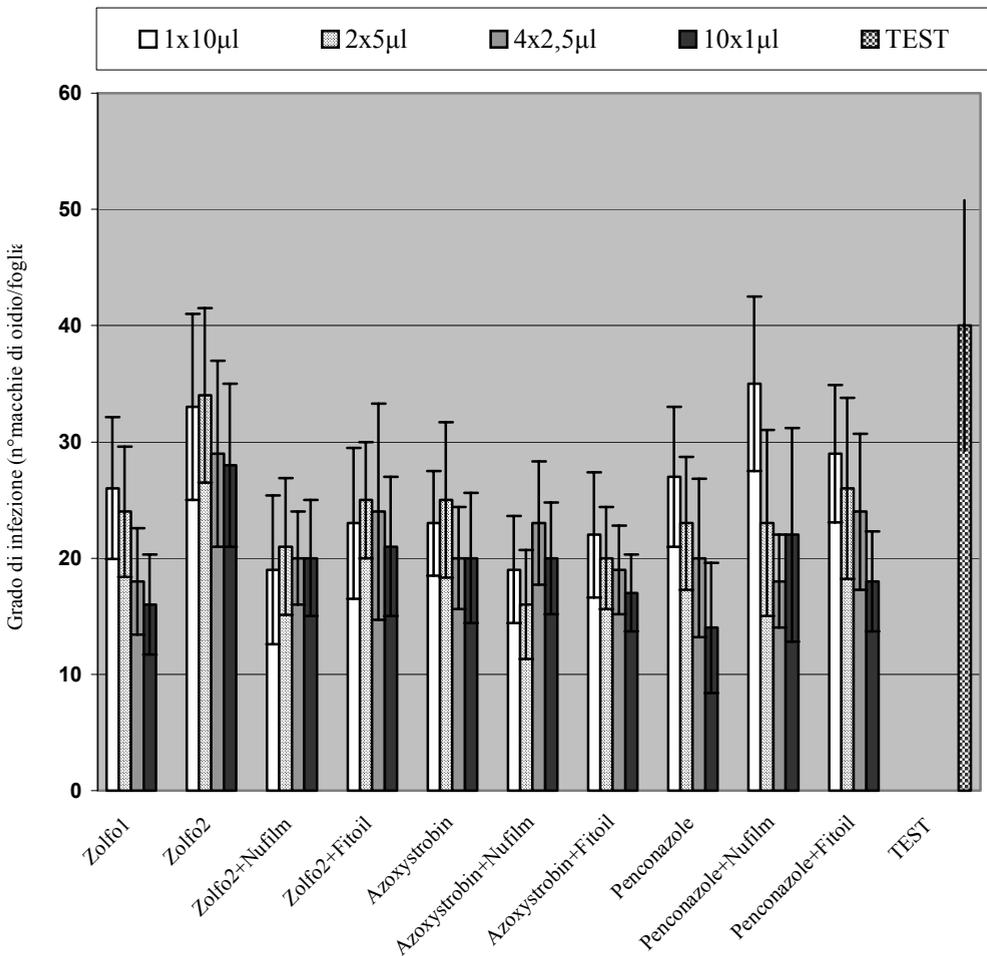


Figura 2 – Grado d’efficacia, espresso come percentuale rispetto al testimone, manifestato da ciascun fungicida in relazione al tipo di micronizzazione del deposito ed all’aggiunta o meno del coadiuvante

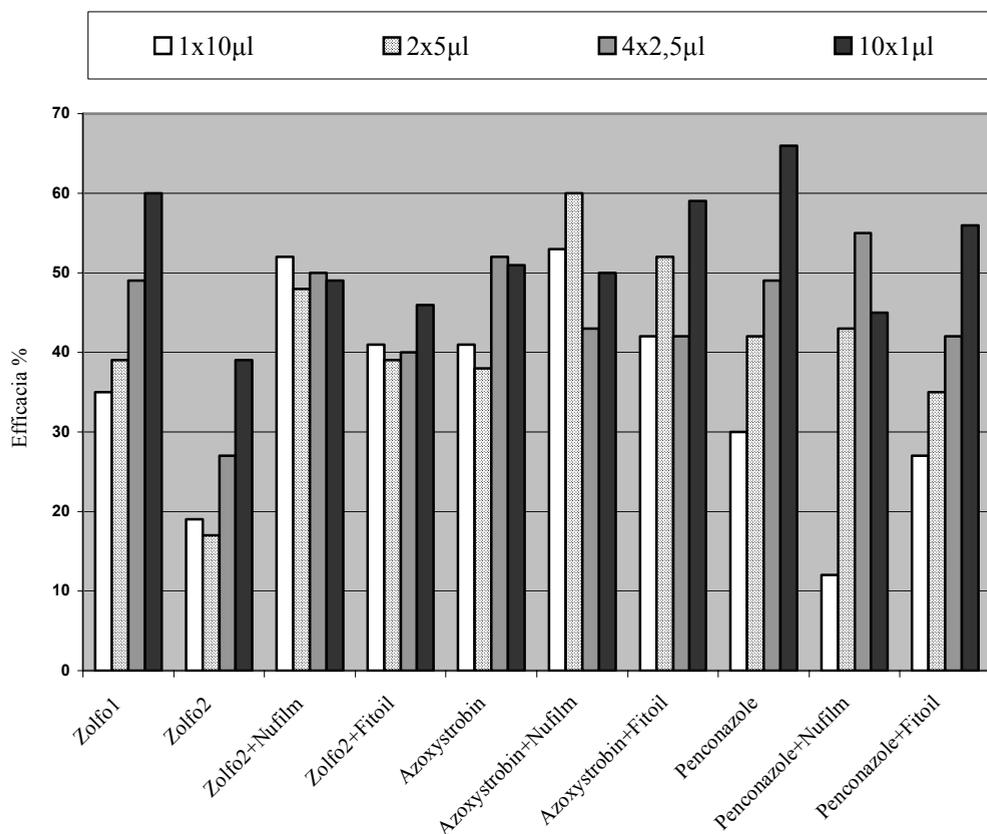


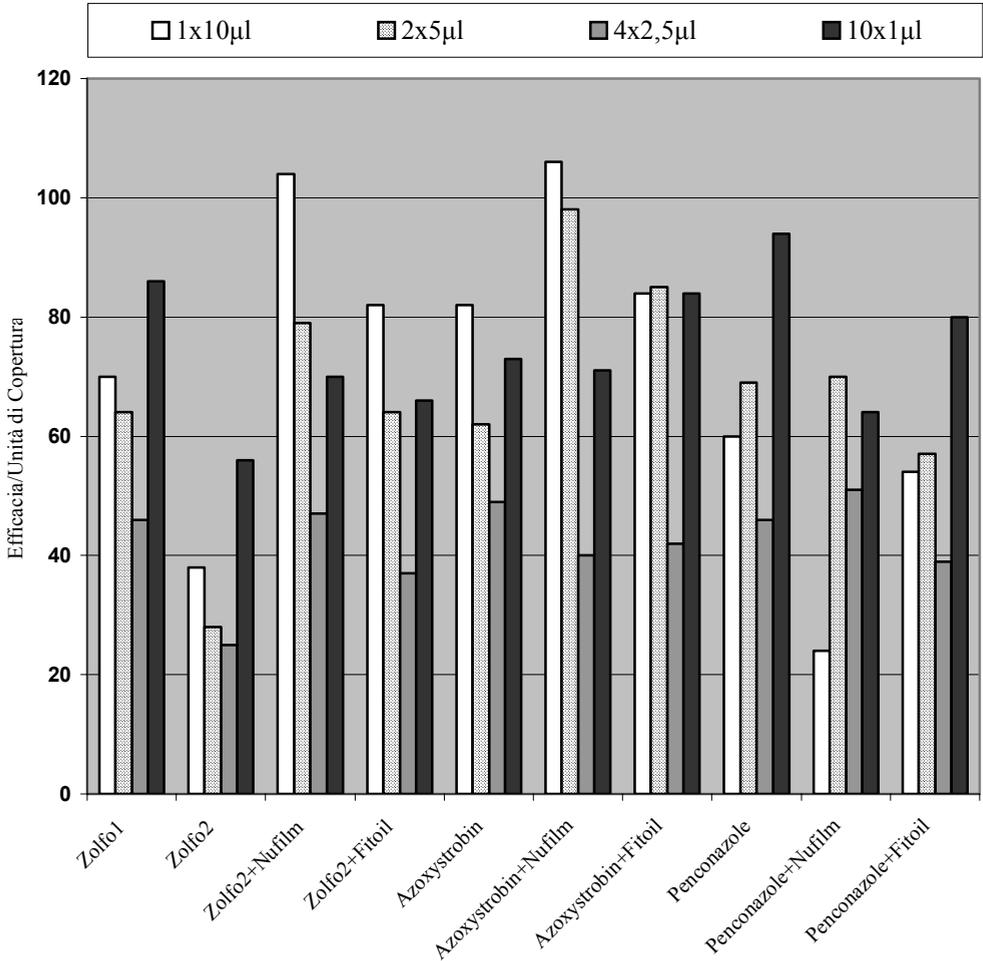
Tabella 2 – Grado di copertura delle gocce originato su cartina idrosensibile

Volume della goccia (µl)	Diametro della macchia <sup>(1)</sup> (µm)	Superficie coperta (mm <sup>2</sup> )		Grado di copertura <sup>(2)</sup> (%)
		della singola macchia	del totale delle macchie	
10	2783	6,08	6,08	0,50
5	2163	3,67	7,34	0,61
2,5	2027	3,22	12,88	1,07
1	1037	0,84	8,40	0,70

<sup>(1)</sup> Determinato per scannerizzazione dell’immagine della goccia su cartina idrosensibile (Spraying Systems Co. – U.S.A). Elaborazione tramite software “Image” della National Institutes of Health

<sup>(2)</sup> Determinato per rapporto tra la superficie totale delle macchie di ciascun deposito e la superficie media di una foglia cotiledonare (cm<sup>2</sup> 12)

Figura 3 – Attività biologica manifestata da ciascun fungicida in relazione al tipo di micronizzazione del deposito ed all’aggiunta o meno del coadiuvante. Attività espressa come “efficacia/unità di copertura” del fungicida



### CONCLUSIONI

La metodologia sviluppata può essere efficacemente utilizzata per lo studio di base di alcuni aspetti biologici e particolarmente per l’approfondimento degli effetti che la micronizzazione della miscela antiparassitaria e conseguentemente la tipologia del deposito, esercita sull’attività dell’agrofarmaco. L’utilizzo del dato di “efficacia/unità di copertura” riteniamo possa meglio spiegare taluni comportamenti dell’agrofarmaco (livello di copertura, concentrazione della soluzione, entità del deposito, micronizzazione delle gocce) non controllabili in modo stretto in condizioni naturali di campo.

L'indagine evidenzia in particolare come i depositi costituiti da 3 gocce di grandi e piccole dimensioni siano quelli che, a parità di concentrazione dell'agrofarmaco e soprattutto a parità di copertura del vegetale, forniscono la migliore attività biologica. A seguito dell'aggiunta dei coadiuvanti naturali questa può risultare identica, aumentata o diminuita rispetto al prodotto tal quale, così come evidenziato rispettivamente per azoxystrobin, zolfo 2 e penconazole.

### Ringraziamenti

Si ringraziano le Società Intrachem Bio Italia S.p.a. ed Agribiotec S.r.l. per la collaborazione e la messa a disposizione, la prima dei formulati Heliosoufre e Nufilm, la seconda del coadiuvante Fitoil.

### LAVORI CITATI

- Cesari A., Flori P., 2000. Experimental method for application of a pesticide-effective dose. *Aspects of Applied Biology*, 57, 343-350.
- COM (2002)349 definitivo. Comunicazione della Commissione al Consiglio, al Parlamento Europeo e al Comitato Economico e Sociale. Verso una strategia tematica per l'uso sostenibile dei pesticidi. Commissione delle Comunità Europee, Bruxelles, 1.7.2002,
- Cross J.V., Berrie A.M., Murray R.A., 2000. Effect of drop size and spray volume on deposits and efficacy of strawberry spraying. *Aspects of Applied Biology*, 57, 313-320.
- Doruchowski G., Bielenin A., Holownicki R., Swiechowski W., Godyn A., Olszak R., 2003. Efficacy of TRV based fungicide dose rates in apple orchards. *Proceedings VII Workshop on Spray Application Techniques in Fruit Growing*, Cuneo (I) June 25-27, 331-343.
- Ebert T.A., Robin A.J.T., Roger A.D., and Franklin R.H., 1999a. Deposit structure and efficacy of pesticide application. 1: Interactions between deposit size, toxicant concentration and deposit number. *Pesticide Science*, 55, 783-792.
- Ebert T.A., Robin A.J.T., Roger A.D., and Franklin R.H., 1999b. Deposit structure and efficacy of pesticide application. 2: *Trichoplusia ni* control on cabbage with fipronil. *Pesticide Science*, 55, 793-798.
- Godyn A., Doruchowski G., Holownicki R., Swiechowski W., 2003. Spray coverage in apple trees as affected by type of orchard, growth stage and spray volume. *Proceedings VII Workshop on Spray Application Techniques in Fruit Growing*, Cuneo (I) June 25-27, 201.
- Lameri P., Paci F., 2002. Fitoil® coadiuvante naturale a base di olio di soia per prodotti rameici: risultati di un biennio di prove sperimentali su vite e pomodoro. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 151-158.
- Leonard R., Brice B., Dowley L.J., Ward S., 2000. The effect of air assistance on spray deposition and biological effect in the control of *Phytophthora infestans* in potatoes. *Aspects of Applied Biology*, 57, 243-250.
- Rehmann S.U., Browning H.W., Salyani M., and Nigg H.N. 1999. Effect of pesticide deposit pattern on rate of contact and mortality of *Aphytis holoxanthus* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Florida Entomologist*, 82 (1), 28-33.