

INFLUENZA DEL pH SULL'ATTIVITÀ PREVENTIVA E CURATIVA DI CYMOXANIL NEI CONFRONTI DI *PLASMOPARA VITICOLA*

S. L. TOFFOLATTI¹, G. VENTURINI¹, J. L. GENET², D. BELLOTTO³, A. VERCESI¹

¹DI.PRO.VE, sez. Patologia vegetale, Università degli Studi – Via Celoria, 2, 20133 Milano

²DuPont de Nemours France, Crop Protection - 24 rue du Moulin, 68740 Nambenheim (FR)

³Sipcam Italia SpA- via Sempione, 195, 20016 Pero (MI)

annamaria.vercesi@unimi.it

RIASSUNTO

Cymoxanil, uno tra i primi antiperonosporici presenti sul mercato in grado di penetrare all'interno dei tessuti della pianta trattata, è ancor oggi utilizzato in miscela con altre sostanze attive per la protezione della vite nei confronti di *Plasmopara viticola*. La sua efficacia potrebbe essere compromessa dalla rapida idrolisi della molecola a pH elevati. Per tale motivo l'attività antiperonosporica di sospensioni di cymoxanil a pH 6, 7, 8 e 9 è stata valutata mediante prove sperimentali effettuate inoculando sperimentalmente due ceppi del patogeno uno sensibile e l'altro resistente su viti da seme trattate sia preventivamente sia al 30% del periodo di incubazione. Cymoxanil, completamente inefficace nei confronti del ceppo resistente, ha conseguito un'ottima protezione nei confronti del ceppo sensibile, indipendentemente dal pH della sospensione utilizzata, somministrata sia preventivamente sia allo scadere del 30% del periodo di incubazione.

Parole chiave: peronospora della vite, efficacia, periodo di incubazione

SUMMARY

INFLUENCE OF pH ON THE PREVENTATIVE AND CURATIVE ACTIVITY OF CYMOXANIL AGAINST *PLASMOPARA VITICOLA*

Cymoxanil, used against downy mildew agents, is one of the first pentrant fungicides introduced into the market and is still employed nowadays in mixture with other active substances in vineyard against *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berlese and De Toni. The rapid degradation of cymoxanil in solutions characterized by high pH values however could hamper its efficacy. In the present work the activity of cymoxanil was evaluated by experimentally inoculating a sensitive and a resistant strain of *P. viticola* on grapevine seedlings treated both preventatively and at 30% of the incubation period with aqueous suspensions of the fungicide at pH 6, 7, 8 and 9. Totally ineffective against the resistant strain, cymoxanil, applied both preventatively and at the beginning of the incubation period, almost completely protected the grapevine seedlings, regardless of the pH of the fungicide suspension.

Keywords: grapevine downy mildew, efficacy, incubation period

INTRODUZIONE

Cymoxanil, introdotto sul mercato da più di trent'anni, ha rappresentato una svolta nel panorama dei fungicidi antiperonosporici: si tratta infatti della prima sostanza attiva nei confronti degli agenti delle peronosspore in grado di penetrare all'interno delle strutture erbacee delle piante, sfuggendo al dilavamento ed inibendo la colonizzazione dell'ospite da parte del patogeno (Douchet *et al.*, 1977). Cymoxanil è in grado di inibire la germinazione delle zoospore e lo sviluppo del micelio nei tessuti dell'ospite, nonché la formazione di rami sporangiofori e di sporangi. Una delle caratteristiche più interessanti di questa sostanza attiva è la rapidità con la quale viene assorbito dalla pianta nella quale, grazie alla sua elevata

solubilità in acqua si muove rapidamente (Cohen e Gisi, 1993). La sua degradazione è tuttavia rapida con conseguente breve durata dell'attività nei confronti del patogeno (Belasco *et al.*, 1981). Per tale ragione cymoxanil è solitamente formulato insieme con altre sostanze attive più persistenti sia di superficie sia penetranti. Ancora sconosciuto rimane il meccanismo d'azione di cymoxanil, ma gli studi sinora effettuati hanno evidenziato che la molecola non esercita alcun effetto negativo sulla respirazione né sulla sintesi di DNA, RNA e proteine (Ziogas *et al.*, 1987). Molto interessanti sono i risultati ottenuti somministrando cymoxanil a un ceppo suscettibile di *Botrytis cinerea* Pers.: è stato infatti accertato che cymoxanil viene metabolizzato dal fungo con conseguente formazione di una serie di metaboliti, uno dei quali, l'*N*-acetilcianoglicina è dotato di notevole attività fungicida (Tellier *et al.*, 2009). Secondo gli autori, questo indicherebbe che cymoxanil è un precursore del fungicida vero e proprio che in realtà viene prodotto dalla pianta nel corso della trasformazione metabolica del cymoxanil stesso.

Cymoxanil è ancor oggi una delle sostanze attive maggiormente utilizzate, in miscela con altri antiperonosporici, nell'ambito di strategie antiperonosporiche volte a limitare i danni dovuti a *Plasmopara viticola* (Berk. *et* Curt.) Berlese e De Toni e *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. La sua efficacia nei confronti dell'agente della peronospora della patata rimane pressoché inalterata a più di tre decenni dall'introduzione del fungicida, mentre in Europa il livello di sensibilità delle popolazioni di *P. viticola* mostra una notevole variabilità (Genet e Vincent, 1999) ed è stata segnalata sporadicamente la presenza di ceppi resistenti (Gullino *et al.*, 1997). L'efficacia di interventi con fungicidi contenenti cymoxanil in vigneto può essere compromessa dalla degradazione della molecola indotta da fattori abiotici quali il pH della sospensione acquosa: Morricca e collaboratori (2004) hanno infatti accertato che l'idrolisi della molecola avviene rapidamente a pH elevati, mentre è molto più lenta a pH ridotti.

Scopo di questo lavoro è la valutazione dell'efficacia di cymoxanil nei confronti di *P. viticola* in funzione del pH della sospensione somministrata alla vite sia preventivamente sia successivamente all'infezione da parte del patogeno.

MATERIALI E METODI

Piantine da seme. I saggi sperimentali sono stati effettuati su piantine di vite ottenute da seme, cv Chardonnay. I semi sono stati posti a germinare all'interno di piastre Petri di 12 cm di diametro su carta da filtro imbibita di H₂O sterile a 24 °C per un periodo di almeno 2 settimane. I semi germinati sono stati trasferiti in vassoi di plastica a 92 pozzetti riempiti con il substrato Vigor Plant (Vigorplant Italia srl, Fombio, LO) e posti in cella di allevamento a 28 °C, fotoperiodo 16-8, 70% di umidità relativa (U.R.). I vassoi sono stati regolarmente innaffiati ogni 2 giorni. Allo stadio fenologico caratterizzato dalla presenza di 2 foglie completamente distese, le piantine sono state trasferite in vasi di plastica di 7 cm di diametro e incubate secondo quanto prima descritto. Ogni due giorni le piante sono state innaffiate con una soluzione fertilizzante (N:K:P = 20:20:20). L'inoculazione sperimentale con *P. viticola* è stata effettuata quando l'altezza delle piantine dal bordo del vaso era compresa tra gli 11 e i 23 cm.

Inoculazioni sperimentali. Due ceppi di *P. viticola*, l'uno sensibile e l'altro resistente a cymoxanil, forniti da DuPont de Nemours, sono stati utilizzati per le inoculazioni sperimentali. I ceppi sono stati propagati su foglie staccate di cv Cabernet franc, non trattate nel caso dell'individuo sensibile e trattate con cymoxanil per quanto riguarda il ceppo resistente. Le foglie sono state poste con la superficie inferiore verso l'alto in piastre Petri, 9 cm di diametro, contenenti agar acqua (1%, Bacto agar, Difco®) addizionato con chinetina

(0,002%) e incubate a 22 °C, fotoperiodo 12:12. Una sospensione di sporangi (50.000 sporangi/ml) in acqua distillata sterile di ciascun ceppo è stata allestita ed immediatamente distribuita sulla pagine inferiore delle foglie completamente distese delle piantine mediante un nebulizzatore sterile. Un cartellino è stato posto sulla seconda e la terza foglia completamente distesa a partire dall'apice in modo da renderne più agevole l'individuazione in fase di valutazione dei sintomi della malattia. Le piantine inoculate sono state poste in camera di incubazione per 12 ore a 22 °C e 100% di U.R. e nel periodo successivo alla stessa percentuale di U.R. durante il periodo di buio e al 70% di U.R. durante il periodo di luce.

Trattamenti sperimentali. I trattamenti con cymoxanil sono stati eseguiti utilizzando il formulato fornito da Sipcarn contenente cymoxanil 25% WP (batch n° 1304) alla concentrazione finale di 120 mg/l di sostanza attiva. Quattro diverse sospensioni di fungicida caratterizzate da valori di pH variabili da 6 a 9 sono state preparate utilizzando i seguenti tamponi: KH₂PO₄ 0,1 M, NaOH 0,1 M, TRIS 0,1 M e HCl 0,1 M secondo quanto indicato in tabella 1. La sospensione di fungicida è stata distribuita sulla pagina inferiore delle foglie delle piantine mediante un nebulizzatore. Ogni sospensione di fungicida è stata utilizzata per trattare 20 piantine che sono state suddivise in 4 gruppi: le piantine appartenenti al primo e al secondo gruppo sono state trattate 24 ore prima dell'inoculazione sperimentale, quelle comprese nei rimanenti gruppi allo scadere del 30% del periodo di incubazione calcolato secondo Goidanich e collaboratori (1957). Nell'ambito di ogni gruppo, metà delle piantine sono state inoculate con il ceppo suscettibile di *P. viticola* e metà con il ceppo resistente. Inoculazioni sperimentali con entrambi i ceppi sono inoltre state effettuate su piantine non trattate (TNT).

Tabella 1. Quantità di tamponi e di acqua utilizzati per ottenere i diversi valori di pH

| pH | Tampone n. 1 | Tampone n. 2 | acqua |
|----|---|--------------------|---------|
| 6 | KH ₂ PO ₄ 0,1 M 50 ml | NaOH 0,1 M 5,6 ml | 44,4 ml |
| 7 | KH ₂ PO ₄ 0,1 M 50 ml | NaOH 0,1 M 29,1 ml | 20,9 ml |
| 8 | TRIS 0,1 M 50 ml | HCl 0,1 M 29,2 ml | 20,8 ml |
| 9 | TRIS 0,1 M 50 ml | HCl 0,1 M 5,7 ml | 44,3 ml |

Modalità di rilievo dell'infezione e analisi statistica. L'entità dell'infezione è stata valutata 8, 10 e 15 giorni dopo l'inoculazione sperimentale sulla seconda e la terza foglia distesa a partire dall'apice del germoglio individuate secondo le modalità prima illustrate. La valutazione è stata effettuata utilizzando una scala a 8 classi (0: nessun sintomo; 1: fino al 2,5% di superficie sporulata; 3: 5-10% superficie sporulata; 4: 10-25% superficie sporulata; 5: 25-50% superficie sporulata; 6: 50-75% superficie sporulata; 7: 75-100% superficie sporulata). Il corrispondente indice % d'infezione (I % I) è stato calcolato secondo la formula di Townsend e Heuberger (1947). L'esistenza di differenze significative tra le medie degli I%I è stata verificata mediante Anova e confronto multiplo secondo REGW-F.

RISULTATI

I risultati ottenuti a seguito delle inoculazioni sperimentali sono riportati nelle tabelle 3 e 4.

Tabella 3. I % I rilevati sulle piantine trattate preventivamente con sospensioni di cymoxanil a pH variabili tra 6 e 9 ed inoculate con un ceppo sensibile (S) e uno resistente (R) di *P. viticola*

| Trattamento preventivo | I%I | | |
|------------------------|---------------------------------------|-------|--------|
| | Giorni dall'inoculazione sperimentale | | |
| | 8 gg | 10 gg | 15 gg |
| TNT S | 53,6 | 62,5 | 73,2 a |
| pH 6 SP | 0,0 | 0,0 | 0,0 b |
| pH 7 SP | 0,0 | 0,0 | 0,0 b |
| pH 8 SP | 0,0 | 0,0 | 0,0 b |
| pH 9 SP | 0,0 | 7,1 | 12,5 b |
| TNT R | 12,9 | 31,4 | 51,4 a |
| pH 6 RP | 0,0 | 12,9 | 45,7 a |
| pH 7 RP | 0,0 | 7,1 | 42,7 a |
| pH 8 RP | 0,0 | 10,0 | 54,3 a |
| pH 9 RP | 0,0 | 14,3 | 57,1 a |

Legenda: S: ceppo sensibile; SP: ceppo sensibile inoculato dopo un trattamento preventivo; R: ceppo resistente; RP: ceppo resistente inoculato dopo un trattamento preventivo

Come esposto in tabella 3, il ceppo di *P. viticola* sensibile a cymoxanil ha indotto un I%I pari al 53,6% otto giorni dopo l'inoculazione sperimentale che è poi ulteriormente aumentato nei 7 giorni successivi raggiungendo il 73,2% al termine della prova. Nessun sintomo della malattia è stato indotto dal ceppo sensibile sulle foglie di piante trattate preventivamente con sospensioni del fungicida a pH compresi tra 6 e 8, mentre un I % I pari a 12,5%, significativamente ridotto rispetto a quanto riscontrato sul TNT ma non sulle altre tesi, è stato riscontrato su piantine alle quali è stata applicata la sospensione di cymoxanil a pH 9. Il ceppo resistente di *P. viticola* ha causato un I%I del 51,4% sul TNT, statisticamente analogo a quello rilevato sulle piantine trattate con le diverse sospensioni di fungicida.

Tabella 4. I%I rilevati sulle piantine inoculate con un ceppo sensibile (S) e uno resistente (R) di *P. viticola* e trattate con sospensioni di cymoxanil a pH variabili tra 6 e 9 allo scadere del 30% del periodo di incubazione

| Trattamento al 30% del PI | I%I | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-------|--------|
| | Giorni dall'inoculazione sperimentale | | |
| | 8 gg | 10 gg | 15 gg |
| TNT S | 53,6 | 62,5 | 73,2 a |
| pH 6 S30% | 0,0 | 0,0 | 0,0 b |
| pH 7 S30% | 0,0 | 0,0 | 0,0 b |
| pH 8 S30% | 0,0 | 0,0 | 2,9 b |
| pH 9 S30% | 0,0 | 0,0 | 0,0 b |
| TNT R | 12,9 | 31,4 | 51,4 a |
| pH 6 R30% | 0,0 | 20,0 | 41,4 b |
| pH 7 R30% | 0,0 | 22,9 | 48,6 b |
| pH 8 R30% | 0,0 | 30,0 | 54,3 b |
| pH 9 R30% | 0,0 | 32,9 | 58,6 b |

Legenda: PI: periodo di incubazione; S: ceppo sensibile; S30%: ceppo sensibile trattato allo scadere del 30% del PI; R: ceppo resistente; R30%: ceppo resistente trattato allo scadere del 30% del PI

Il trattamento effettuato allo scadere del 30% del periodo di incubazione con le sospensioni di cymoxanil a diversi pH ha efficacemente protetto le piantine nei confronti del ceppo sensibile di *P. viticola*, se si eccettua l'infezione, benché contenuta e significativamente ridotta rispetto a quanto osservato sul TNT, rilevata su quelle trattate con la sospensione a pH 8. Risultati analoghi a quelli già illustrati per il trattamento preventivo sono stati ottenuti a seguito dell'inoculazione con il ceppo resistente del patogeno ed il successivo trattamento allo scadere del 30% del periodo di incubazione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Secondo quanto riportato da Morricca *et al.* (2004), la degradazione di cymoxanil negli ambienti acquatici naturali avviene abbastanza rapidamente: dato che il pH di tali ambienti varia tra 5,5 e 8, la corrispondente emivita della molecola a 25 °C si colloca in un intervallo compreso tra 19,6 e 0,3 giorni. Ciò significa che la permanenza di cymoxanil nelle acque presenti in natura è breve, tenendo presente inoltre che all'idrolisi si sommano i processi degradativi di tipo fotochimico (Chang *et al.*, 1987) e biologico (Belasco *et al.*, 1981). Oltre a contribuire al suo favorevole profilo ecotossicologico, la rapida degradazione di cymoxanil limita anche la pressione di selezione che la sostanza attiva esercita sugli organismi bersaglio, riducendo il rischio di proliferazione degli individui resistenti.

D'altro canto, l'utilizzo di acque caratterizzate da elevati valori del pH per la preparazione delle sospensioni di cymoxanil potrebbe comportare la rapida degradazione della molecola con conseguente compromissione dell'efficacia del successivo trattamento. Poiché il pH dell'acqua potabile in Europa deve essere compreso tra 6,5 e 9,5 (D. L. 31/2001), è plausibile che dalla stabilità della sospensione propria del pH più contenuto si passi ad un'emivita di circa mezz'ora qualora l'acqua utilizzata sia particolarmente basica.

Va sottolineato innanzitutto che l'utilizzo delle sospensioni di cymoxanil a diverso pH non ha mai dato luogo all'insorgenza di sintomi di fitossicità sulle piante trattate. Il valore del pH della sospensione di cymoxanil non ha influito sull'efficacia della sostanza attiva nel contenere le infezioni dovute al ceppo sensibile di *P. viticola* applicata sia preventivamente sia allo scadere del 30% del periodo di incubazione. I rilievi successivi hanno evidenziato che cymoxanil non esercita un'azione fungistatica, ma è in grado di inibire in modo efficace lo sviluppo del patogeno. Solo nel caso di sospensioni a pH 9, per quanto riguarda l'azione preventiva, e pH 8, nel caso dell'intervento allo scadere del 30% del periodo di incubazione, sono state rilevate alcune sporadiche sporulazioni. Il ceppo resistente è risultato meno aggressivo rispetto al ceppo sensibile e non ha risentito del trattamento con il fungicida.

Dai risultati ottenuti emerge che sospensioni di cymoxanil caratterizzate da valori di pH compresi tra 6 e 9, applicate alla pianta ospite immediatamente dopo la loro preparazione sono in grado di contenere le infezioni di ceppi sensibili di *P. viticola* sia in modo preventivo sia quando somministrate entro lo scadere del 30% del periodo di incubazione. E' probabile che la rapidità di assorbimento del cymoxanil possa controbilanciare il veloce processo di degradazione evidenziato in particolare in presenza di valori di pH prossimi o superiori a 9. E' tuttavia consigliabile, qualora le acque della zona sede del trattamento presentino un'elevata alcalinità, eseguire l'intervento alla minor distanza temporale possibile dalla preparazione della sospensione.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Grazyna Jaworska, DuPont de Nemours, Francia, per aver fornito i semi di vite cv Chardonnay, Mario Bertoli, DuPont Italia, Alberto Bellini Oxon e Pietro Querzola, Sipcam per il supporto e le utili discussioni.

LAVORI CITATI

- Belasco I. J., Han J. C. K., Chrzanowski R. L., Baude F. J., 1981. Metabolism of [¹⁴C] cymoxanil in grapes, potatoes and tomatoes. *Pestic. Sci.*, 12, 355-364.
- Chang F. H., Hult M., Noben N. N., 1987. Quantitative studies of biodegradation of petroleum and some model hydrocarbons in ground water and sediment environments. *In: Ground water quality and agricultural practices* (Fairchild D. M. ed.), Lewis Publishers, Chelsea; MI, 295-318.
- Cohen Y., Gisi U., 1993. Uptake, translocation and degradation of [¹⁴C] cymoxanil in tomato plants. *Crop Protection*, 12, 284-292.
- Douchet J. P., Absi M., Hay S. J. B., Mutan L., Villani A., 1977. European results with DPX3217 a new fungicide for the control of grapevine downy mildew and potato late blight. *Proc. Brit. Crop Prot. Conf. – Pests and Diseases*, 535-540.
- Genet J.-L., Vincent O., 1999. Sensitivity of European *Plasmopara viticola* population to cymoxanil. *Pestic. Sci.*, 55, 129-136.
- Goidanich G., Canarini B., Foschi S., 1957. Lotta antiperonosporica e calendario dei trattamenti in viticoltura. *Giornale di agricoltura*, 13 gennaio, 11-14.
- Gullino M. L., Mescalchin E., Mezzalama M., 1997. Sensitivity to cymoxanil in populations of *Plasmopara viticola* in northern Italy. *Plant Pathology*, 46, 729-736.
- Morricca P., Trabue S., Anderson J., Lawler S., Seccia S., Fidente P., Swan R. S., Mattson S. L. (2004). Kinetics and mechanism of cymoxanil degradation in buffer solutions. *J. Agric. Food Chemistry*, 52, 99-104.
- Reis A., Ribeiro F. H. S., Maffia L. A., Mizubuti, E. S. G., 2005. Sensitivity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans* to commonly used fungicides in tomato and potato crops. *Plant Disease*, 89, 1279-1284.
- Tellier F., Fritz R., Kerhoas L., Ducrot J.-P., Carlin-Sinclair A., Einhorn J., Leroux P., 2009. Metabolism of fungicidal cyanooximes, cymoxanil and analogues in various strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Science*, 65, 129-136.
- Townsend G. R., Heuberger G. W., 1947. Methods for estimating losses caused by disease in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*, 27: 340-343.
- Ziogas B. N., Davidse L. C., 1987. Studies on the mechanism of action of cymoxanil in *Phytophthora infestans*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 29, 89-96.