

Utilizzo di oli essenziali per la concia delle sementi e per il controllo delle malattie trasmesse da seme

Tutti gli oli saggiati hanno provocato una riduzione dell'accrescimento dei funghi, a seconda della loro concentrazione nel terreno di coltura. I risultati ottenuti fanno ben sperare nella possibilità di individuare oli essenziali potenzialmente utilizzabili nella concia biologica.

Luca Riccioni*, Elvira Lotti*, Enzo Marinelli* e Laura Orzali*

Nell'ambito del "Piano Nazionale Sementiero Biologico" 2009-2011 il CRA-Centro di Patologia Vegetale di Roma (CRA-PAV) ha sviluppato una linea di ricerca con l'obiettivo di mettere a punto metodi/trattamenti di concia biologica efficaci nel contenimento di patogeni trasmessi dal seme e nel proteggere le plantule nei primi giorni di vita dagli attacchi di patogeni terricoli, e che allo stesso tempo non interferiscano con i principali parametri della qualità della semente (germinabilità, energia germinativa ecc.).

A tale fine è stata studiata la possibilità di utilizzare delle sostanze che negli ultimi anni hanno sviluppato un crescente interesse per il loro impiego in differenti settori (farmaceutico, cosmetico, alimentare ecc.): gli oli essenziali. Questi sono prodotti naturali che derivano dal metabolismo delle piante stesse e che vengono accumulati in vari organi, quali foglie, fiori, frutti, radici e cortecce e dai quali è possibile estrarli. I prin-

cipi attivi presenti negli oli sono generalmente dei "metaboliti secondari" (alcaloidi, fenoli, flavonoidi, isoprenoidi monoterpene e sesquiterpeni), che secondo alcuni studiosi svolgono la funzione di "ormoni vegetali", di biostimolanti, di fattori prodotti in risposta a stress abiotici e di fattori di difesa diretta contro funghi, batteri o insetti; secondo altri svolgerebbero funzione termoregolatrice. Gli oli essenziali rappresentano, quindi, un serbatoio tuttora poco esplorato di metaboliti naturali bioattivi il cui impiego in agricoltura, ed in agricoltura biologica in particolare, potrebbe rivelarsi importante per la risoluzione di problemi fitopatologici.

Attività

Nello specifico sono stati presi in considerazione i seguenti oli essenziali: olio di timo (Reddy et al. 1998, *Phytochemistry* 47(8):1515-1520; Tinivella F. et al., 2005, In-

formatore Fitopatologico, 9, 19-23); olio di melaleuca (tea tree oil) (Hammer et al. 2003, *Journal of Applied Microbiology* 95, 853-860; Terzi et al., 2007, *Letters in Applied Microbiology* 44, 613-618); olio di rosmarino (Özcan e Chalchat, 2008, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59, 691-698), olio di alloro (Baratta, 1998, *J. Essent. Oil Res.* 10, 618-627), olio di chiodi di garofano (Viuda-Martos et al., 2007, *Journal of Food Safety* 27,91-101), olio di menta piperita (Edris et al., 2003, *Food/Nahrung*, 47: 117-121), e olio di origano. Questi oli sono stati saggiati per la loro attività fungicida, fungistatica e fitotossicità, attraverso prove in vitro e in vivo, sui principali agenti patogeni trasmissibili dalle sementi: *Diaaporthe phaseolorum* e *Phomopsis longicolla* da soia, *Micosphaerella pinodes*, *Phoma pinodella*, *Phoma medicaginis* da pisello proteico, *Aschochyta lentis* da lenticchia, *Colletotrichum gloeosporioides* da lupino e *Fusarium fujikuroi* da

riso. La semente utilizzata in questo studio è stata ottenuta grazie alla collaborazione con l'ENSE di Vercelli e l'ENSE di Verona.

Prove "in vitro"

Su terreno di coltura artificiale (PDA-agar di patate) è stata saggiata l'attività fungistatica o fungicida di tutti gli oli su elencati, misurando lo sviluppo radiale della colonia fungina a 3 e a 7 giorni, in presenza di diverse concentrazioni di olio (0,01 % - 0,025 % - 0,05% - 0,1 % - 0,25% - 0,5 % - 1% - 2%), rispetto alla crescita miceliale in assenza di olio (Foto 1). Per ogni patogeno preso in considerazione è stata calcolata la concentrazione minima necessaria a ridur-

re del 90% la crescita del fungo (MIC90- Minimum inhibitory concentration).

Prove "in vivo"

L'analisi della fitotossicità dell'olio di timo e di melaleuca su seme è stata effettuata trattando i semi a spruzzo e per immersione con una soluzione acquosa contenente olio alle concentrazioni di 0,1 - 0,3%, e 1 - 2,5%, rispettivamente. Subito dopo il trattamento i semi sono stati posati con la tecnica del 'between paper' (Foto 2) e dopo 8-15 gg sono stati rilevati i semi germinati ed eventuali semi anormali (test di germinabilità). L'analisi dell'efficacia del trattamento con l'olio di timo e di melaleuca



Foto 2 - Valutazione della germinabilità dei semi trattati con la tecnica del between paper

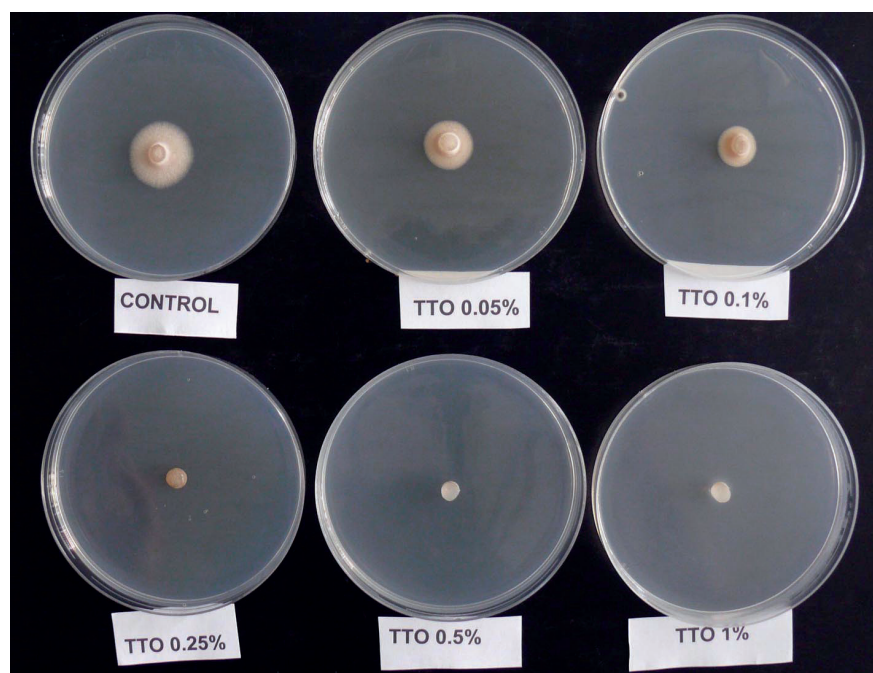


Foto 1 - Prova di efficacia dell'olio di melaleuca (TTO) verso *Aschochyta lentis*.

su seme è stata eseguita su riso naturalmente infetto con *F. fujikuroi*, e su soia, lupino, lenticchia e pisello artificialmente infetti con i rispettivi patogeni trasmissibili per seme (*D. phaseolorum*, *P. longicolla*, *M. pinodes*, *P. pinodella*, *P. medicaginis*, *A. lentis*, *C. gloeosporioides*). I trattamenti di concia sono stati eseguiti per immersione (100 ml per 30 gr di seme), utilizzando una soluzione acquosa contenente Tween20 (0,05% v/v) per stabilizzare l'emulsione, tenendo in agitazione per 30' la soluzione contenente l'olio di timo in due

concentrazioni 0,1% e 0,2%, e per 24h la soluzione contenente l'olio di melaleuca nelle concentrazioni di 1% e 2%. Successivamente, essendo il trattamento per 24 h di immersione risultato fitotossico sui semi di leguminosa, tale trattamento è stato ridotto per questi semi ad 1h. Le concentrazioni di olio utilizzate sono state individuate grazie alle prove *in vitro* e alle prove di fitotossicità. Il controllo era rappresentato da seme trattato per immersione con soluzione acquosa contenente solo 0,05% (v/v) di Tween20 per 30' (controllo olio di timo) e 24h (controllo olio di melaleuca). Per confrontare gli oli con trattamenti standard sono stati aggiunti alla prova anche semi trattati a spruzzo con Cutril (Solfato di Rame tribasico) ammesso in agricoltura biologica e con due prodotti chimici, Octave (Procloraz) per il riso e Silfur (Thiram) per gli altri semi, utilizzando le dosi riportate in etichetta. Tutte le prove sono state ripetute in doppio. I semi così trattati sono stati quindi analizzati con il metodo del "blotter test" per valutare lo sviluppo dei funghi (Foto 3)

Risultato

Tutti gli oli saggiati hanno avuto effetto sui funghi riducendone l'accrescimento, a seconda della concentrazione dell'olio nel terreno di coltura, risultando pertanto più o meno sensibili agli oli essenziali.



Foto 3 – Blotter test per valutare l'efficacia del trattamento per immersione (30') con 2% di olio di timo su semi di pisello artificialmente infetto con Phoma pinodella.

Considerando la riduzione dell'accrescimento del 90% rispetto al non trattato, i più attivi sono risultati gli oli di timo (p.a. timolo), di chiodi di garofano (p.a. eugenolo), di menta piperita (p.a. mentolo) e di origano (p.a. timolo), i quali hanno ridotto la crescita di tutti i funghi saggiati in modo variabile ma compreso, rispettivamente, nei seguenti intervalli di concentrazioni 0,05-0,07%, 0,04-0,07%, 0,09-0,11% e 0,07%. L'olio di melaleuca (p.a. terpinen-4-ol e γ -terpinene) è risultato invece attivo alla concentrazione di 0,300-0,463%, e l'olio di alloro e di rosmarino (p.a. euca-liptolo) alla concentrazione di 0,7-1%. Per quanto riguarda lo studio della fitotossicità dei due oli sag-

giati, di timo e di melaleuca, entrambi hanno mostrato un effetto tossico sui semi alle concentrazioni più alte, in modo variabile a seconda del tipo di seme, poiché hanno determinato una riduzione significativa di germinabilità. Ciò è avvenuto in particolare con il metodo di immersione alla concentrazione di 0,3% per l'olio di timo su seme di riso e di 2,5% per l'olio di melaleuca su seme di lenticchia e pisello. Tali concentrazioni sono comunque superiori alle concentrazioni che si sono dimostrate utili nelle prove *in vitro* per eventuali trattamenti di concia. Ulteriori studi sono quindi necessari per modulare la concentrazione con il metodo di trattamento, i tempi

di esposizione del seme alla soluzione contenete l'olio e il tipo di seme stesso. Infatti i semi più resistenti sono risultati i semi di riso, su cui il trattamento con l'olio di melaleuca non ha prodotto effetto tossico neanche alla concentrazione più alta saggiata, e, tra le leguminose, i semi di soia e lupino, che hanno invece mostrato resistenza alle concentrazioni più alte di entrambi gli oli. L'analisi dell'efficacia in vivo, cioè con trattamenti su seme valutati in laboratorio attraverso l'analisi in "blotter test", ha prodotto i risultati riportati nella tabella 1. Entrambi gli oli con entrambe le concentrazioni utilizzate si sono mostrati efficaci nel ridurre la percentuale di seme infetto, con valori paragonabili, se non migliori in alcuni casi, ai controlli chimici.

Rispetto ai risultati attesi dal progetto, che prevedevano l'individuazione dello spettro di azione di estratti naturali (oli essenziali) verso i patogeni trasmessi da seme, e l'individuazione della concentrazione (grado di efficacia) in grado di contenere sulla semente lo sviluppo di patogeni fungini e allo stesso tempo priva di fitotossicità sulla semente stessa, i ri-

sultati ottenuti fanno ben sperare nella possibilità di individuare oli essenziali potenzialmente utilizzabili nella concia biologica, considerando che: i) gli oli essenziali trovano spazio nell'allegato IIB del Reg. CE 889/08 come insetticidi, acaricidi, fungicidi e inibitori della germinazione; ii) alcuni di essi sono stati inclusi nell'Annex I della Dir. 91/414/CEE (Dir. 2008/127/CE del 18.12.2008) e, fra questi l'olio di menta, attualmente è già registrato come fitoregolatore, mentre l'olio di melaleuca e l'olio di garofano sono in fase di registrazione.

Abstract

Within the "Organic National Seed Program", the CRA-Center for Plant Pathology Research has developed a research line with the objective to improve seed treatments allowed in organic farming that are effective in containing pathogens transmitted by seed and protecting seedlings in the first stage from soil pathogen attacks. In recent years many studies have been focused on the pharmacological actions of essential oils derived from aromatic and

medicinal plants due to their antimicrobial and antioxidant properties. In this study, essential oils of thyme, tea tree, rosemary, laurel, cloves, peppermint and oregano have been tested for their antifungal activities against some important pathogenic seed-borne fungi on seeds of rice, lupine, soybean, pea and lentil, through in vitro and in vivo assays. Results show that each oil tested had a clear reducing effect on fungal growth, depending on the oil concentration and on the fungus species; moreover, oils tested are effective on reducing seed contamination, but the concentrations used for seed treatment should be chosen carefully because of their phytotoxicity on seed that cause a decrease in germination percentage. Results obtained are consistent with what was expected by the project, that is to determine the essential oils effective-spectrum against seed-borne pathogen fungi, and to determine the best concentration (effectiveness degree) able to control fungi development on seeds without inducing phytotoxicity.

Specie	Fungo	Controllo timo	timo 0,1%	timo 0,2%	Controllo TTO	TTO 1%	TTO 2%	Cutril	Octave ¹ /Silfur ²
Riso*	<i>F. fujikuroi</i>	89	21	13	90	17,5	20	37,5	17,5 ¹
Soia	<i>D. phaseolorum</i>	98	38,5	14,5	94	22	17	15	10,5 ²
Soia	<i>P. longicolla</i>	95,5	56	18,5	95	24,5	18,5	18,5	12,5 ²
Pisello	<i>P. pinodella</i>	80,5	21	14,5	77,5	33,5	24,5	23,5	11,5 ²
Pisello	<i>M. pinodes</i>	52,5	24	12	59,5	23	20,5	11	4 ²
Lupino	<i>C. gloeosporioides</i>	41	28,5	14,5	31,5	16	14	28,5	15,5 ²

*Infetto Naturalmente

Tabella 1 – Risultati della concia della semente valutata con il metodo del blotter test (% di seme infetto)