

## 3LOGY® NUOVO FUNGICIDA A BASE DI TERPENI PER LA PROTEZIONE DELLA VITE DA *BOTRYTIS CINEREA*

P. QUERZOLA<sup>1</sup>, D. BELLOTTO<sup>1</sup>, C. ABBIATI<sup>1</sup>, M. CAPRIOTTI<sup>1</sup>, V. SERRATORE<sup>1</sup>,  
A. NOACCO<sup>1</sup>, M. ROMANINI<sup>1</sup>, F. GUASTAMACCHIA<sup>1</sup>, A. CAPELLA<sup>1</sup>, M. RUIZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sipcam Italia SpA, via Sempione 195 Pero (MI)

<sup>2</sup>Sipcam Iberia S.L., Valencia (ES)

pquerzola@sipcam.it

### RIASSUNTO

3Logy è una sospensione di capsule a base di timolo, geraniolo ed eugenolo, terpeni ad azione fungicida scoperta e sviluppata da Eden Research plc e Sipcam Italia SpA. I terpeni contenuti nel 3Logy sono dotati di elevata attività nei confronti della botrite della vite e dell'oidio della vite e di altre colture in trattamenti pre e post infezionali. Sono costituiti da due unità isopreniche a formare fenoli e alcoli, sono volatili, lipofili e insolubili in acqua. Agiscono a carico delle sostanze lipidiche contenute nelle pareti e nelle membrane delle cellule fungine e degli organelli cellulari, determinando lisi e morte cellulare. Timolo, geraniolo ed eugenolo possiedono un profilo tossicologico, ecotossicologico ed ambientale favorevole. Nelle prove sperimentali su vite, 3Logy ha mostrato di possedere un'efficacia paragonabile a quella dei migliori standard di mercato. Per questo motivo e per le sue caratteristiche innovative, 3Logy, inserita in diversi programmi di difesa, ha dimostrato di poter contribuire a migliorare l'efficacia della protezione della vite dalla botrite.

**Parole chiave:** *Vitis vinifera*, timolo, geraniolo, eugenolo

### SUMMARY

#### 3LOGY®, NEW TERPENE FUNGICIDE AGAINST GRAPE GREY MOLD (*BOTRYTIS CINEREA*)

3Logy is a capsule suspension of thymol, geraniol and eugenol, terpenes with fungicidal activity discovered and developed by Eden Research plc and Sipcam Italia SpA. The 3Logy terpenes are very effective against grape grey mold and powdery mildew on grape and various crops in pre and post infection treatment. They are based on two isoprene units forming phenols and alcohols, are volatile, lipophilic and water insoluble. They act as cell membrane disrupters leading to cell lysis and death. Thymol, geraniol and eugenol have favorable toxicological, ecotoxicological and environmental profile. In field trials against grape grey mold, 3Logy showed efficacy comparable to the market reference standards. For this reason, 3Logy, when included into grape grey mold management strategies with fungicides with different mode of action, can improve grape grey mold protection.

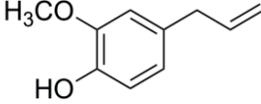
**Keywords:** *Vitis vinifera*, thymol, geraniol, eugenol

### INTRODUZIONE

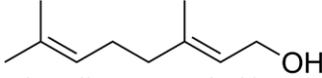
3Logy è una sospensione acquosa di capsule contenenti tre sostanze attive di natura terpenica: timolo, geraniolo ed eugenolo, molecole incluse in annesso I della Dir. 91/414 CEE dal 1 dicembre 2013 (Ruiz García *et al.*, 2015). Si caratterizza per una spiccata attività nei confronti di *Botrytis cinerea*, benché risulti attivo anche nei confronti delle Erysiphaceae (agenti di oidi). 3Logy è un prodotto scoperto dalla società inglese Eden Research plc e sviluppato in Italia da Sipcam Italia SpA. 3Logy è stato oggetto di attività sperimentale, *in vitro*, *in vivo* e in campo, su *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator*, *Podosphaera fusca* (sin. *Sphaerotheca cucurbitae*).

Gli obiettivi di questo lavoro sono la presentazione delle caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche, eco-tossicologiche e biologiche di 3Logy e dei risultati ottenuti in prove sperimentali di campo su vite nel contenimento di popolazioni italiane di *B. cinerea*.

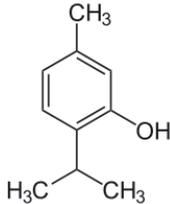
### Caratteristiche chimiche e fisiche

Eugenolo	: No nome comune ISO
IUPAC name	: 4-allyl-2-methoxyphenol
CA name	: ( <i>E</i> )-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol
CAS no.	: 97-53-0
EC no.	: 202-589-1
Struttura molecolare	

Gruppo chimico : Plant oil – phenylpropanoid

Geraniolo	: No nome comune ISO
IUPAC name	: ( <i>E</i> )-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol
CA name	: ( <i>E</i> )-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol
CAS no.	: 106-24-1
EC no.	: 203-377-1
Struttura molecolare	

Gruppo chimico : Plant oil – monoterpinoide

Timolo	: No nome comune ISO
IUPAC name	: 5-methyl-2-propan-2-yl-phenol
CA name	: 5-methyl-2-propan-2-yl-phenol
CAS no.	: 89-83-8
EC no.	: 201-944-8
Struttura molecolare	

Gruppo chimico : Plant oil – monoterpene phenol

### Caratteristiche tossicologiche

Timolo		
Tossicità acuta orale	Ratto	DL <sub>50</sub> : 980 mg/kg
Tossicità dermale acuta	Ratto	DL <sub>50</sub> : > 2.000 mg/kg
Geraniolo		
Tossicità acuta orale	Ratto	DL <sub>50</sub> : 3.600 mg/kg
Tossicità dermale acuta	Ratto	DL <sub>50</sub> : > 5.000 mg/kg
Eugenolo		
Tossicità acuta orale	Ratto	DL <sub>50</sub> : 1.930 mg/kg
Inalatoria	Ratto	DL <sub>50</sub> : > 2,58 mg/L/4h

### Caratteristiche ecotossicologiche

Timolo	
<i>Pimephales promelas</i>	CL <sub>50</sub> (96h): 3,2 mg/L
<i>Dafnia magna</i>	EC <sub>50</sub> (48h): 1,7 mg/L
Alga	IC <sub>50</sub> (72h): 2,33 mg/L
Geraniolo	
<i>Brachydanio rerio</i>	CL <sub>50</sub> (96h): 9,8-19,9 mg/L
Eugenolo	
<i>Pimephales promelas</i>	CL <sub>50</sub> (96h): 24 mg/L

### **Caratteristiche biologiche**

3Logy è particolarmente efficace nei confronti di diversi ascomiceti, tra cui *B. cinerea* ed Erysiphaceae. L'attività antibotritica della molecola è documentata sia con applicazioni pre infezionali sia post infezionali. 3Logy è un prodotto a base di terpeni: eugenolo, timolo e geraniolo.

L'eugenolo è di estrazione naturale mentre geraniolo e timolo derivano da processi di sintesi da cui si ottengono terpeni assolutamente identici a quelli presenti in natura ma con grado di purezza molto più elevato. Questi agiscono sulla germinazione delle spore, la penetrazione delle ife e la crescita di miceli e ife (Ruiz García *et al.*, 2015). Hanno effetto diretto sulle pareti, le membrane e gli organelli delle cellule dei microrganismi (Di Pasqua *et al.*, 2007). In funzione della loro natura lipofila, la modalità d'azione primaria di eugenolo, timolo e geraniolo consiste nella disgregazione della membrana cellulare dei funghi, che è associata alla capacità di dissolvere i lipidi con conseguente fuoriuscita delle sostanze cellulari, lisi e morte della cellula. Alcuni studi hanno confermato che i terpeni si accumulano nelle membrane cellulari causando la perdita di integrità delle membrane stesse associata alla variazione di composizione degli acidi grassi e dei fosfolipidi. Si ritiene che questo fenomeno sia associato alla formazione di lesioni della membrana citoplasmatica per interruzione della sua biosintesi di ergosterolo. A causa di questo effetto, si ritiene esserci anche un impatto sul trasporto attivo di ATP attraverso le membrane, che determina esaurimento del suo accumulo e perdita delle sostanze cellulari con danneggiamento del metabolismo energetico (Kalemba e Kunicka, 2003). Si possono verificare anche la disorganizzazione della struttura mitocondriale ed effetti sulle membrane con conseguente perdita del gradiente di pH e di potenziale elettrico. Si sono osservate anche interferenze a carico di enzimi respiratori ed enzimi responsabili della sintesi delle pareti cellulari (Ruiz García *et al.*, 2015). Questo meccanismo d'azione ne ha suggerito l'inclusione da parte del FRAC, Fungicide Resistance Action Committee, al codice 46, target site F7 "cell membrane disruptor". Non sono noti fenomeni e meccanismi di resistenza. Le sostanze attive eugenolo, geraniolo e timolo sono esenti da Limiti Massimi di Residuo (LMR) in quanto inserite nell'Allegato IV del Reg. CE n. 396/2005 che riporta l'elenco delle sostanze attive per le quali non sono necessari LMR.

3Logy è formulato mediante una tecnologia di incapsulazione innovativa e brevettata che promuove la sospensibilità senza l'ausilio di solventi dell'emulsione in ambiente acquoso nonché l'attività fitosanitaria dei terpeni. Le capsule sono microsfele della dimensione di 2-4 µm costruite a partire da estrazione enzimatica a carico di pareti di lievito e sono in grado di "caricare" al loro interno una quantità di terpeni liberi in emulsione acquosa pari al doppio del loro peso. Ogni capsula contiene al suo interno una quantità omogenea di eugenolo, timolo e geraniolo in rapporto 1:2:2. Una volta distribuite sulla coltura e in presenza di elevata umidità le capsule garantiscono il rilascio modulato e graduale dei tre terpeni attraverso la microporosità della parete. In condizioni asciutte il rilascio dei terpeni viene impedito dalla chiusura delle pareti delle capsule ad opera della frazione polisaccaridica che forma una sorta di "vetrificazione" della parete. Ulteriori cicli di reidratazione riattivano il processo di rilascio dei terpeni da parte delle capsule.

## MATERIALI E METODI

### Prove sperimentali di campo

Numerose prove sperimentali sono state effettuate in Italia nell'ultimo biennio 2014 e 2015.

Le singole prove sono state realizzate adottando uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con 4 ripetizioni e parcelle elementari di 8 - 12 viti. I fungicidi sono stati applicati con motopompa a spalla erogando volumi compresi tra 600 e 1.000 L/ha per un'ottimale bagnatura della fascia a grappolo. L'attività biologica di 3Logy è stata valutata effettuando fino ad un massimo di quattro trattamenti con il formulato sperimentale 3AEY (geraniolo 6,4% + timolo 6,4% + eugenolo 3,2%) alla dose di 4 L di prodotto formulato ad ettaro, posizionato nelle fasi di maggiore suscettibilità della vite agli attacchi di *B. cinerea*: pre-chiusura grappolo, invaiatura e pre-raccolta, sia in successione a se stesso (quattro interventi) che in successione ad un prodotto standard posizionato in pre-chiusura grappolo, con interventi effettuati dalla fase di invaiatura grappolo a 3 giorni dalla raccolta o con interventi effettuati a seguito di piogge ritenute infettanti nel periodo compreso fra invaiatura e 3 giorni dalla raccolta.

Nel 2014 si sono realizzate 5 prove sperimentali condotte sulle varietà di uva da vino Pinot nero, Moscato bianco, Merlot, Pinot grigio e uva da tavola della varietà Italia. Come fungicidi di riferimento per le prove su uve da vino sono stati impiegati, in prechiusura grappolo mepanipirim (Frupica) alla dose di 500 g s.a./ha e nel periodo compreso fra invaiatura e raccolta fenexamide (Teldor) alla dose di 750 g s.a./ha. Nella prova su uva da tavola come prodotto standard è stato impiegato fluopyram (Luna Privilege) alla dose di 250 g s.a./ha da prechiusura grappolo a invaiatura alternato ad uno sperimentale di origine naturale fino alla raccolta. Nel 2015 si sono realizzate 7 prove sulle varietà da vino Chardonnay, Barbera, Pinot grigio, Trebbiano, Negramaro e uva da tavola della cultivar Italia. Come fungicida di riferimento per le prove su uve da vino sono stati utilizzati, in prechiusura grappolo ciprodinil + fludioxonil (Switch) alla dose di 300 + 200 g s.a./ha (mepanipirim (Frupica) a 500 g s.a./ha in una prova su "Chardonnay") e nel periodo compreso fra invaiatura e raccolta fenexamide (Teldor) alla dose di 750 g s.a./ha. Nella prova effettuata su uva da tavola come prodotti standard sono stati impiegati fluopyram (Luna Privilege) alla dose di 250 g s.a./ha in prechiusura grappolo e invaiatura e fludioxonil (Geoxe) a 500 g s.a./ha in pre-raccolta.

L'epidemia botritica è stata monitorata costantemente e la malattia quantificata come diffusione e intensità (gravità), analizzando alla raccolta campioni di 100 grappoli in ogni parcella. L'analisi dei dati è stata realizzata con l'applicazione ARM ST 8 (Summary Across Trials) che consente di combinare e mediare prove simili condotte in località e anni diversi (test di Student-Newman-Keuls con  $p \leq 0,05$ ). Il grado percentuale di protezione è stato calcolato con la formula di Abbott.

## RISULTATI

Le due annate sono state caratterizzate da andamenti meteorologici molto diversi tra loro: temperature nel periodo primaverile estivo inferiori alla media con piovosità superiore alla media nel corso del 2014, andamento caldo siccitoso nel periodo estivo fino a metà-fine agosto, seguito da periodi piovosi anche intensi nelle fasi di maturazione dei vitigni medio tardivi nel 2015. I dati sono espressi come media di prove sperimentali condotte in località diverse nelle singole annate e i livelli di protezione valutati con formula di Abbott.

Nel 2014 la vite è stata sottoposta a continua successione di infezioni di muffa grigia dalla fase di chiusura grappolo alla raccolta, con sintomi già evidenti in alcuni casi su foglie e grappoli in fioritura. I dati del 2014 sono espressi come media di 5 prove sperimentali e i livelli di protezione realizzati su varietà da vino Pinot nero, Moscato bianco, Merlot, Pinot

grigio e varietà da tavola Italia e mostrano come, a fronte di una diffusione media di botrite su grappolo del 48% ed una gravità media del 11%, 3Logy distribuito alla dose di 4 L/ha nelle fasi di maggiore suscettibilità alla malattia, ha fornito livelli di protezione da *B. cinerea* in linea con i migliori standard di mercato con una tendenza a una migliore efficacia quando posizionato dopo una pioggia infettante (tabella 1).

Tabella 1. 2014: efficacia di 3Logy nei confronti di *B. cinerea*, (media di 5 prove)

Tesi Sostanze attive ed epoca di applicazione <sup>1</sup>	Dose sostanza attiva g/ha	Rilievo su grappolo			
		Diffusione %	% Protezione diffusione	Intensità %	% Protezione intensità
Testimone non trattato	-	47,7 a <sup>2</sup>	-	11,2 a	-
Mepanipyrim (B) <sup>3</sup> Fenexamide (D)	500 750	38,3 b	29,3	6,5 b	35,7
3Logy (B+C+D)	128+256+256	38,2 b	26,5	6,0 b	39,7
Mepanipyrim (B) 3Logy (D)	500 128+256+256	34,8 b	32,0	5,9 b	38,7
Mepanipyrim (B) 3Logy (D+)	500 128+256+256	35,5 b	34,2	5,7 b	48,2

<sup>1</sup> B: pre-chiusura grappolo; C: invaiatura; D: pre-raccolta; D+: pre-raccolta post evento infettivo

<sup>2</sup> Medie nella stessa colonna con lettere uguali non si differenziano significativamente al test SNK per  $p \leq 0,05$

<sup>3</sup> su Italia: fluopyram 250 g s.a./ha in B+C e sperimentale in D

Nel 2015 le infezioni di muffa grigia si sono concentrate nel periodo successivo all'invaiatura con una diffusione media di botrite su grappolo del 46% e una gravità di circa il 12%. I dati sono espressi come media di 7 prove sperimentali realizzate sulle varietà da vino Chardonnay, Barbera, Pinot grigio, Trebbiano, Negroamaro e da tavola Italia (tabella 2).

Tabella 2. 2015: efficacia di 3Logy nei confronti di *B. cinerea*, (media di 7 prove)

Tesi Sostanze attive ed epoca di applicazione <sup>1</sup>	Dose sostanza attiva g/ha	Rilievo su grappolo			
		Diffusione %	% Protezione diffusione	Intensità %	% Protezione intensità
Testimone non trattato	-	46,0 a <sup>2</sup>	-	11,5 a	-
Ciprodinil+fludioxonil (B) <sup>3</sup> Fenexamide (D)	300 + 200 750	23,1 b	57,2	3,0 b	70,7
3Logy (B+C+D)	128+256+256	18,9 b	61,9	3,3 b	75,6
Ciprodinil+fludioxonil (B) 3Logy (D)	300 + 200 128+256+256	22,9 b	56,9	2,8 b	76,8
Ciprodinil+fludioxonil (B) 3Logy (D+)	300 + 200 128+256+256	19,2 b	65,8	1,1 b	81,1

<sup>1</sup> B: pre-chiusura grappolo; C: invaiatura; D: pre-raccolta; D+: pre-raccolta post evento infettivo

<sup>2</sup> Vedi tabella 1

<sup>3</sup> su Chardonnay: mepanipyrim a 500 g s.a./ha in B; su Italia: fluopyram a 250 g s.a./ha in B+C e fludioxonil a 500 g s.a./ha in D

I risultati del 2015 mostrano come 3Logy, distribuito alla dose di 4 L/ha è stato in grado di proteggere la vite nei confronti di *B. cinerea* al livello dei migliori standard di mercato.

Interessanti livelli di protezione si sono ottenuti nelle diverse strategie di protezione in cui 3Logy è stato applicato nel periodo compreso fra invaiatura e raccolta, in successione ad un prodotto standard in pre-chiusura grappolo, con valori numerici di protezione più elevati, benché non statisticamente significativi, forniti dagli interventi posizionati successivamente a piogge infettanti cadute nelle ultime fasi di maturazione del grappolo.

### CONCLUSIONI

3Logy è una miscela di terpeni, eugenolo, timolo e geraniolo in sospensione acquosa di capsule dotata di un'elevata attività biologica nei confronti di diversi ascomiceti, tra cui *B. cinerea* ed Erysiphaceae. Sarà commercializzato in Italia da Sipcam Italia per l'impiego nei confronti di *B. cinerea*, muffa grigia della vite. Eugenolo, timolo e geraniolo agiscono sulla germinazione delle spore, la penetrazione delle ife e la crescita di miceli e ife. Hanno effetto diretto sulle pareti, le membrane e gli organelli delle cellule dei microrganismi. La modalità d'azione primaria consiste nella distruzione della parete cellulare che è associata alla capacità di dissolvere i lipidi con conseguente fuoriuscita delle sostanze cellulari, lisi e morte cellulare. Questo meccanismo d'azione ne suggerisce l'inclusione da parte del FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) al codice 46, target site F7 "cell membrane disruptor". Ad oggi non sono noti fenomeni e meccanismi di resistenza tanto da considerare 3Logy un valido strumento per la gestione della resistenza.

La sintesi dei risultati delle prove di campo effettuate nei confronti di *B. cinerea* su uve da vino e da tavola nel periodo 2014 e 2015 dimostra una buona attività del prodotto nei confronti del patogeno sia quando impiegato da solo per tutta la stagione fino ad un massimo di quattro interventi dalla pre-chiusura grappolo alla raccolta, che impiegato fra invaiatura e raccolta in successione a prodotti applicati in pre-chiusura grappolo. Interessanti indicazioni sono scaturite anche da applicazioni effettuate successivamente ad un decorso piovoso durante le ultime fasi di maturazione delle uve. L'elevata attività antibotritica, l'assenza di fenomeni di resistenza e la compatibilità tossicologica (assenza di MRL) ed ambientale, consentiranno di utilizzare 3Logy con successo nelle strategie di difesa dalla botrite della vite.

### LAVORI CITATI

- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Mike Edwards, Ercolini D., Mauriello G., 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compound from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4863-4870.
- Kalembe D., Kunicka A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10, 813-829.
- Ruiz García M., Mulas García D, Prades J., Ochoa de Erife J., Querzola P., Edmonds J., 2015. ARAW: Uva sin botritis y sin residuos. *Phytoma España*, N° 274.