NUOVO NEMATOCIDA A BASE DI TERPENI PER LA PROTEZIONE DI SOLANACEE E CUCURBITACEE DA NEMATODI GALLIGENI

E. MEDICO, E. VAN HENDE, K. EL OUADI, M. M. VILLAGRA
Eastman Chemical B.V.
emanuele.medico@eastman.com

RIASSUNTO

Il prodotto è una innovativa sospensione di capsule (CS) a base di timolo e geraniolo (meglio conosciuti come terpeni) denominata Cedroz®. Questi terpeni hanno un'azione nematocida identificata, sviluppata e comprovata da Eden Research plc e Eastman Chemical B.V. Timolo e geraniolo sono rispettivamente fenoli ed alcoli con la caratteristica di essere volatili, lipofili e insolubili in acqua. Grazie all'innovativa formulazione di capsule che promuove la sospensibilità senza l'ausilio di solventi, i terpeni possono essere disciolti in soluzione ed applicati al suolo con un lento e graduale rilascio. La modalità di azione di timolo e geraniolo è spiegata dalla loro interazione sinergica a carico delle sostanze lipidiche contenute nelle membrane delle pareti cellulari dei nematodi e delle loro uova. Nelle prove sperimentali su solanacee e cucurbitacee Cedroz ha mostrato di possedere un'efficacia soddisfacente e paragonabile a quella delle esistenti soluzioni di controllo post-trapianto. Timolo e geraniolo possiedono un profilo tossicologico, ecotossicologico ed ambientale favorevole. Il prodotto commerciale Cedroz non avrà tempi di carenza e sarà esente da LMR.
Parole chiave: timolo, geraniolo, difesa, Cedroz

SUMMARY

A NEW TERPENE NEMATICIDE AGAINST ROOT KNOT NEMATODES ON SOLANACEOUS AND CUCURBITS

The new product (Cedroz®) is an innovative suspension of capsules (CS) based on thymol and geraniol better known as terpenes. These terpenes have a nematicide action identified, developed and tested by Eden Research plc and Eastman Chemical B.V. Thymol and geraniol are phenols and alcohols respectively with the characteristic of being volatile, lipophilic and insoluble in water. Thanks to the innovative formulation of capsules that promotes suspensibility without the use of solvents, these terpenes can be dissolved in solution and applied to the soil with a slow and gradual release. The mode of action of thymol and geraniol is explained by their synergistic interaction on the lipid substances contained in the cell membranes of nematodes and their eggs. In experimental tests on solanaceous plants and cucurbits Cedroz showed an efficacy level comparable to that of the existing post-transplant control solutions. Thymol and geraniol have a favorable toxicological, ecotoxicological and environmental profile. The commercial product will not have pre-harvest interval and will be exempt from LMR.
Keywords: thymol, geraniol, nematodes, control, Cedroz

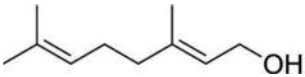
INTRODUZIONE

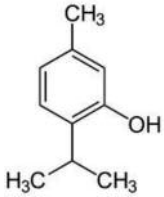
Il nuovo prodotto (denominato Cedroz) è una sospensione acquosa di capsule contenenti due sostanze attive di natura terpenica (timolo 41 g/L e geraniolo 121 g/L), molecole incluse in allegato I della Dir. 91/414 CEE dal 1 dicembre 2013 e approvate dal regolamento di esecuzione (UE) N. 568-570/2013 a norma del regolamento (CE) n. 1107/2009, esenti da MRLs secondo l'allegato IV del Reg. (EC) No 396/2005.

Geraniolo e timolo insieme forniscono un effetto contro la schiusa delle uova, la migrazione e la mortalità dei nematodi (Ntalli et al., 2010). Geraniolo è un composto naturale (olio essenziale) ottenuto da diverse piante, tra cui *Cymbopogon* spp. (Poaceae) comunemente noto come olio di limone o olio di palmarosa (Chen e Viljoen, 2010) e varie specie appartenenti alla famiglia delle *Lamiaceae.* Timolo è presente nell'olio essenziale di diverse piante, tra cui *Thymus* spp. e *Origanum* spp. (Lamiaceae). Timolo e geraniolo sono stati segnalati come biofumiganti per il controllo di Nematodi da diversi autori (Kong et al., 2007; Choi et al., 2007; Park et al., 2007; Faria et al., 2013). Questi monoterpeni si caratterizzano per una spiccata attività nei confronti di *Meloidogyne* spp, benché risultino attivi anche nei confronti di diversi altri targets grazie al meccanismo di azione ad ampio spettro e aspecifico come la *Botrytis cinerea* su vite (Querzola et al., 2014). Cedroz è un prodotto brevettato dalla società inglese Eden Research plc e sviluppato da Esatman Chemical B.V per il controllo dei nematodi. Cedroz è stato oggetto di attività sperimentale in campo con un ampio numero di prove di efficacia ai fini registrativi per il sud Europa.

Gli obiettivi di questo lavoro sono la presentazione delle caratteristiche chimico-fisiche, tossicologiche, eco-tossicologiche e biologiche di Cedroz e di parte dei risultati ottenuti nelle prove condotte su solanacee e cucurbitacce nel contenimento dei nematodi galligeni.

Caratteristiche chimiche e fisiche

Geraniolo	: No nome comune ISO
IUPAC name	: (*E*)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol
CA name	: (*E*)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol
CAS no.	: 106-24-1
EC no.	: 203-377-1
Struttura molecolare	
Gruppo chimico	: Plant oil – monoterpinoid

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	DL50: 980 mg/kg
Tossicità dermale acuta	Ratto	DL50: > 2.000 mg/kg
Geraniolo		
Tossicità acuta orale	Ratto	DL50: > 4000 mg/kg
Tossicità dermale acuta	Ratto	DL50:> 5000 mg/kg
Cedroz		

Tossicità acuta orale	Ratto	DL50: > 2.000 mg/kg
Tossicità dermale acuta	Ratto	DL50: > 2.000 mg/kg
Caratteristiche ecotossicologiche		
Timolo		
Oncorhynchus mykiss		CL50 (96h): 3 mg/L
Daphnia magna		EC50 (48h): 4,9 mg/L
Algae		EyC50 = 4,89 mg/L
		ErC50 = 11,1 mg/L
Geraniolo		
Oncorhynchus mykiss		CL50 (96h): 11,6 mg/L
Daphnia magna		EC50 (48h): 16,1 mg/L
Algae		EyC50 = 10,3 mg/L
		ErC50 = 48 mg/L
Cedroz		
Oncorhynchus mykiss		CL50 (96h): 35 mg/L
Daphnia magna		EC50 (48h): 41 mg/L
Algae		EyC50 = 21 mg/L
		ErC50 = 48 mg/L

Caratteristiche biologiche

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 più elevato. In funzione della loro natura lipofila, la modalità d'azione primaria di timolo e geraniolo è quella di accumularsi nelle membrane cellulari causando la perdita di integrità delle membrane stesse associata alla variazione di composizione degli acidi grassi e dei fosfolipidi con conseguente fuoriuscita delle sostanze cellulari, lisi e morte della cellula. L'attività di timolo ed geraniolo contro i nematodi è ampia e complessa. Il geraniolo inibisce efficientemente la formazione delle galle dei nematodi, la schiusa di uova e la mobilità degli stadi giovanili J2 (Ntalli et al., 2010; Albuquerque et al., 2007) e può agire come gli inibitori degli enzimi Glutathione S-transferases (GST) principali sistemi di difesa dei nematodi responsabili dei loro processi antiossidanti e detossificanti (Babu et al., 2012). Il timolo possiede anch'esso la capacità di immobilizzare lo stagio giovanile J2 ostacolando la schiusura delle uova dei nematodi (Albuquerque et al., 2007) come *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Xiphinema* spp.

In alcuni studi, il geraniolo ha dimostrato di essere più attivo contro alcune specie di nematodi rispetto al timolo (Kong et al., 2007) e viceversa (Ibrahim et al., 2006). I due composti insieme forniscono un effetto additivo contro la schiusa, la migrazione e la mortalità dei nematodi (Ntalli et al., 2010). Il contributo di ciascun componente segue un complesso schema di interazioni (Ntalli et al., 2010) comprese le interazioni sinergiche e / o antagoniste che contribuiscono alla tossicità complessiva (Faria et al., 2013). Inoltre, poiché gli oli essenziali in studio sono una miscela di componenti che agiscono sinergicamente tra di loro, è probabile che siano più resistenti all'evoluzione della resistenza dei parassiti. Grazie alla loro modalità d'azione multisito, difatti non sono previsti problemi di resistenza o resistenza incrociata.

Cedroz 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 che altrimenti, senza questa tecnologia sarebbero impossibili da formulare. Le capsule sono microsfere di origine naturale della dimensione di 2 -4 µm caratterizzate da una parete a frazione proteica, lipidica e polisaccarida 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 timolo e geraniolo.

Una volta applicate nel suolo le capsule garantiscono il rilascio modulato e graduale dei due 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

Tutte le prove di efficacia sono state eseguite in GEP (Good Experimental Practice) secondo le linee guida EPPO PP 1/135(4), 1/152(4), 1/181(4), PP 1/48(4) al fine di meglio valutare l'attività di Cedroz su solanacee e cucurbitacee. In totale tra il 2016 ed il 2017 sono state effettuate oltre 100 prove nei vari Paesi tra cui Italia, Spagna, Portogallo, Francia e Grecia molte delle quali sono ancora in fase di finalizzazione ed elaborazione. Di seguito vengono riportate una serie di prove rappresentative, svolte in Spagna nel 2016. Tali prove hanno previsto un singolo protocollo con un unico standard di riferimento, Vydate 10 L (oxamyl 10 % - 100 g/L). Questo, oltre ad essere un prodotto ben consolidato e di riferimento nel mercato dei nematocidi, è stato selezionato anche per le proprie dosi e tempi di applicazioni che più si avvicinano a quelle di Cedroz.

Cedroz è stato applicato al suolo attraverso il sistema di irrigazione con un volume totale di acqua dai 2000 ai 20000 L/ha frazionati secondo le buone partiche agricole che consistono, in fase iniziale, nella sola applicazione di acqua in modo da umidificare il terreno e quindi creare le migliori condizioni per la successiva distribuzione del prodotto in soluzione. Il protocollo di prova, standard per tutte le prove, ha previsto sei applicazioni di Cedroz al dosaggio individuato di 9 L/ha per un totale di 54 L/ha dallo stadio fenologico BBCH 12-14 fino allo stadio BBCH 72-89 con un intervallo tra i trattamenti di 8-10 giorni, messo a confronto con un prodotto standard riferimento, Vydate 10 L, applicato seguendo le indicazioni di etichetta ed un testimone non trattato. I parametri di valutazione sono stati la produzione e la percentuale di efficacia (secondo la formula Abbott) rispetto al testimone non trattato, basato sulla severità di danno radicale valutato come indice di danno radicale di seguito indicato come RGS (*Root Galling Severity*) secondo la scala Zeck 0-10 (Zeck, 1971) dove 0 rappresenta una pianta sana con apparato radicale senza infezioni e 10 una pianta con sistema radicale completamente distrutto. Le valutazioni di severità sono state condotte su un campione di 10 piante per tesi estirpate in media 90 giorni dopo il trapianto e 30 giorni circa dall'ultimo trattamento con Cedroz. La produzione è stata invece valutata come media cumulativa di quattro raccolte effettuate in diversi momenti. Non si sono effettuate inoculazioni artificiali ma sono stati utilizzati campi con infestazioni naturali. Tutte le serre non erano state trattate in pre-trapianto con fumiganti. Ulteriori dettagli sono riportati nella tabella 1.

Tabella 1. Dettagli delle prove di efficacia di Cedroz

Pomodoro (3 prove)	Superficie parcella	20 m²
	Numero repliche	4 per tesi, in blocchi randomizzati
	Varietà	Valderrama, Marinda, Boludo
	Periodo trapianto	Luglio - Agosto 2016
	Area geografica	Spagna: Siviglia, Murcia
	Tipo suolo	Franco-sabbioso argilloso e franco sabbioso

	Prodotto standard di riferimento	Vydate 10 L applicato a 50 L/ha suddivisi in quattro applicazioni rispettivamente di 20-10-10-10 dallo stadio BBCH 12-14 al 52-61 a intevalli di 10 giorni.
	Rilievi	RGS e produzione cumulativa a 90-100 giorni dopo il trapianto
Cetriolo (3 prove)	Superficie parcella	22 m^2
	Numero repliche	4 per tesi, in blocchi randomizzati (RCBD)
	Varietà	Corona, Renoir, Lucena.
	Periodo trapianto	Luglio – Settembre 2016
	Area geografica	Spagna: Càdiz, Murcia, Almeria
	Tipo suolo	Sabbioso, franco sabbioso
	Prodotto standard di riferimento	Vydate 10 L applicato a 30 L/ha suddivisi in 2 – 3 applicazioni rispettivamente di 20-10 o 10 -10 -10 L/ha dallo stadio BBCH 13-14 al 51-61 ad intevalli di 10 giorni.
	Rilievi	Severità di danno radicale (indice RGS) e produzione cumulativa a 90-100 giorni dopo il trapianto

RISULTATI

Per motivi di sintesi, di seguito vengono riportati i risultati di efficacia (tabella 2) e i risultati di produzione (tabella 3), relativi alla dose identificata per il prodotto Cedroz, benchè i protocolli di prova abbiano previsto diversi dosaggi come da procedura registrativa. Lo standard di riferimento di seguito riportato è Vydate 10 L benchè nel piano di prove siano stati usati anche altri standard e strategie varie.

Tabella 2. Risultati delle prove di efficacia svolte in serra con Cedroz e Vydate 10 L

Coltura	Prova	Indice RGS Zeck (0-10)			% Efficacia (Abbott)	
		Testimone	Cedroz	Vydate 10L	Cedroz	Vydate 10L
Pomodoro	1	6,30 a*	3,45 b	3,35 b	45,2 b*	46,8 b
	2	2,70 a	1,3 ab	1 b	51,5 a	62,8 a
	3**	3,95 a	1,13 c	0,85 c	69,9 a	81,2 a
Cetriolo	1	4,63 a	0,9 c	1,9 bc	80 a	58,2 b
	2	4,08 a	1,7 b	2 b	59,47 a	50,5 a
	3	4,6 a	0,9 b	1,5 b	74,2 a	66,9 a

*per ciascuna prova e separatamente per l'indice RGS e per l'efficacia % i valori seguiti dalla stessa lettera nella stessa riga non differiscono in modo significativo ($p \leq 0,05$, test di Student-Newman-Keuls) Poiché alcune tesi inserite nelle prove non sono state considerate, le lettere possono essere non sempre contigue. **Rilievo effettuato 131 giorni dopo il trapianto

Tabella 3. Produzioni ottenute nelle prove di efficacia svolte in serra con Cedroz e Vydate 10 L

Coltura	Prova	% produzione cumulativa rispetto al testimone considerato = 100	
		Cedroz 9 L/ha	Vydate 10 L 10-20 L/ha
Pomodoro	1	108,4	85,4
	2	116,1	117,2
	3	136,9	133,9
Cetriolo	1	109,5	109,2
	2	162,4	117,7
	3	107,7	115,4

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti mostrano come Cedroz, formulato innovativo a base di terpeni, applicato alla dose di 9 L/ha riesca a contenere l'attacco da nematodi del genere *Meloidogyne* spp. Dalle prove sperimentali è emersa infatti la capacità di contenere significativamente l'evoluzione delle popolazioni di nematodi garantendo sempre un incremento di produzione rispetto al testimone non trattato. Tali risulatti suggeriscono che Cedroz può essere considerato come un ottimo strumento da inserire in strategie di difesa da nematodi che prevedano l'uso di diverse soluzioni. Questo sarà l'obiettivo dell'ulteriore sperimentazione di campo che verrà effettuata nel periodo pre-registrativo.

CONCLUSIONI

Cedroz è una miscela di terpeni, timolo e geraniolo in sospensione acquosa, dotata di un'elevata attività biologica nei confronti di nematodi. Sarà commercializzato in Italia da Eastman Chemical B.V. per l'impiego su pomodoro, melanzana, peperone, melone, zucchine, cetriolo, zucca e fragola nei confronti di *Meloidogyne* spp.

I risultati ottenuti nelle prove dimostrano come Cedroz rappresenti uno strumento efficace per il contenimento dei nematodi. Tra i principali vantaggi correlati all'uso di tale prodotto vanno citati l'assenza di residui nelle produzioni in quanto non è richiesto alcun Limite Massimo di Residuo, la possibilità di essere applicato in concomitanza con la raccolta in quanto non possiede tempi di carenza e la facilità di utilizzo in quanto va applicato utilizzando il sistema di irrigazione. Va inoltre rimarcato il profilo ecologico ed ambientale favorevole e la natura dei principi attivi, per cui non si prevede alcun sviluppo di resistenze, consentendo l'utilizzo ripetuto in totale sicurezza.

LAVORI CITATI

Albuquerque M, Costa S., Bandeira P., Santiago G., Andrade-Neto M., Silveira E., 2007. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of Pectis oligocephala and Pectis apodocephala. *Brazilian Academy of Sciences*, 79(2), 209-213.

Babu R., Moorkoth D., Azeez S., Eapen S., 2012. Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against Glutathione-S-Transferase of *Meloidogyne Incognita*. *Bioinformation,* 8(7), 319-325.

Barbosa P., Lima A., Vieira P., Dias L., Tinoco M., Barroso J.G., Pedro L.G., Figueiredo A., Mota M., 2010. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Journal of Nematology,* 42(1), 8–16.

Chen W., Viljoen A.M., 2010. Geraniol- a review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, 76, 643–651.

Choi Ho, J. Kim, Shin S., Park I., 2007. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode,Russian. *Journal of Nematology*, 15 (1), 35-40.

Dang Q., Chi Hwan Lim, Jin-Cheol Kim, 2012. Current Status of Botanical Pesticides for Crop Protection, Res. *Plant Disease*, 18(3), 175-185.

Faria J., Barbosa P., Bennett R., Mota M., Figueiredo A., 2013. Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: Nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters, *Phytochemistry,* 94, 220–228.

Ibrahim K., Traboulsi F., EL-HAJ, 2006, Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathol. Mediterr*.,45, 238–246.

Kong J., Park I., Sik Choi K., Shin S., Ahn Y., 2007. Nematicidal and Propagation Activities of Thyme Red and White Oil Compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology,* 39(3), 237-242.

Ntalli G., Ferrari F., Giannakouc I., Menkissoglu-Spiroudia U., 2010. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils. *Pest Manag Sci*, 67, 341-351.

Park Il-Kwon, Junheon Kim, Sang-Gil Lee, Sang-Chul Shin, 2007, Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components From Ajowan (Trachyspermum ammi), Allspice (Pimenta dioica) and Litsea (Litsea cubeba) Essential Oils Against Pine Wood Nematode (Bursaphelenchus Xylophilus) *Journal of Nematology, 39(3):275–279. 2007.*

Querzola P., 2014. 3LOGY®, new terpene fungicide against grape grey mold (*Botrytis cinereal*). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 141-146.

Zeck W. M., 1971. A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanzenschutz-Nachrichten*, 24(1), 141-14.