

## ATTIVITÀ BIOLOGICA DELL'ESTRATTO ALCOOLICO DI *SYZYGIUM AROMATICUM* CONTRO ALCUNI FUNGHI FITOPATOGENI: RISULTATI PRELIMINARI

F. CLEMATIS, F. REBECCHI, P. CURIR

Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura – Unità di Ricerca per la  
floricoltura e le specie ornamentali, corso Inglesi 508, 18038 Sanremo (IM)  
francesca.clematis@entecra.it

### RIASSUNTO

Questo lavoro riporta una prima valutazione dell'attività dell'estratto alcoolico di *Syzygium aromaticum* contro 4 funghi fitopatogeni *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*. Le prove sono state condotte *in vitro* con la tecnica del substrato avvelenato. L'estratto applicato a una dose pari a 3,42 mg di acido gallico equivalenti (AGE)/mL di substrato liquido ha mostrato valori di inibizione di *V. dahliae* pari al 92,4%. Al dosaggio di 9,12 mg AGE/mL ha evidenziato valori di inibizione di 84,6% e 55,0% , rispettivamente per *R. solani* e *F. o. f.sp. lilii*. Nel caso di *B. cinerea* la dose più alta 11,4 mg AGE/mL ha fatto registrare percentuali di inibizione del 65,03%. I dati ottenuti hanno confermato l'azione biocida dell'estratto a diversi dosaggi in relazione alla specie fungina. Ulteriori studi saranno necessari per la valutazione dell'estratto di *S. aromaticum* *in vivo* nell'ottica di una Gestione Integrata delle Colture.

**Parole chiave:** *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*

### SUMMARY

#### EFFECT OF ALCOHOLIC EXTRACT OF *SYZYGIUM AROMATICUM* ON FOUR PLANT PATHOGENIC FUNGI: PRELIMINARY RESULTS.

The *in vitro* activity of alcoholic clove extract was studied against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* using the poisoned agar method. These fungi were found to be highly sensitive to clove alcoholic extract. At concentration of 9.12 mg GAE/mL (Gallic Acid Equivalents) of extract per mL of medium, inhibition of mycelia growth detected for *R. solani*, *F. oxysporum* f.sp. *lilii* was 87.9 and 59.2 % respectively. At a higher concentration (11.4 mg GAE/mL) *B. cinerea* was inhibited significantly (65.03% mean inhibition value). Only for *V. dahliae* , 1.14 mg GAE/mL of plant extract could control the mycelia with a mean value of 92.4%. The findings indicated that clove extracts have fungicidal activity against phytopathogenic fungi. Further studies are required to determine whether it could find application in the management of plant diseases.

**Keywords:** clove extract, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*

### INTRODUZIONE

L'importanza dello studio e sviluppo di prodotti di origine naturale ("botanicals") utilizzabili per la protezione delle piante è aumentato secondo i principi di Gestione Integrata delle colture (IPM), in questa ottica l'olio essenziale ottenuto dai boccioli fiorali, foglie e steli della specie *Syzygium aromaticum* (L.) è stato recentemente studiato per le proprietà biocide contro batteri patogeni umani e animali, contro nematodi ed alcuni funghi e batteri fitopatogeni (Cardier *et al.*, 2012). *S. aromaticum* (conosciuto anche come *Eugenia caryophyllata* Thunb.) appartiene alla famiglia Myrtaceae, genere *Eugenia*.

In questo lavoro è stata valutata la potenziale attività biocida di un estratto alcoolico ottenuto da boccioli fiorali essiccati di *S. aromaticum* (L.) (chiodi di garofano) attraverso prove *in vitro* con la tecnica del substrato avvelenato.

## MATERIALI E METODI

### Preparazione dell'estratto

Per le prove è stata utilizzata la polvere ottenuta dalla macinazione di boccioli fiorali essiccati di *S. aromaticum* (L.). Per ogni prova il materiale vegetale necessario è stato estratto in metanolo (MeOH) in Soxhlet per 45 minuti. La fase alcoolica è stata eliminata in evaporatore rotante ed il residuo secco è stato ripreso con acqua deionizzata fino a raggiungere le diluizioni necessarie per le prove. Il contenuto fenolico totale dell'estratto è stato determinato allo spettrofotometro secondo il metodo di Swain e Hillis, 1959 (Folin-Denis modificato) ed espresso come acido gallico equivalente (AGE) per mL di substrato liquido (PDA) utilizzato per i test *in vitro*.

### Prove *in vitro*

Le prove di efficacia sono state effettuate attraverso la valutazione dell'accrescimento dei patogeni fungini su substrato avvelenato (Nene *et al.*, 1982) ottenuto per addizione dell'estratto di *S. aromaticum*. L'estratto è stato aggiunto al mezzo sterile PDA (Agar destrosio Patata) a diversi dosaggi (1, 2, 3, 5, 8, 10% v/v) previa microfiltrazione. Il trattamento di controllo comprendeva l'aggiunta di acqua sterile al substrato. I funghi test, presenti nella Micoteca del CRA -FSO, sono stati prelevati da culture miceliche fresche cresciute per 4-6 giorni, sono stati inoculati nel mezzo addizionato o meno del trattamento e mantenuti in incubazione per 3-4 giorni in condizioni controllate (23-24 °C) fino al momento del rilievo.

I rilievi sono stati effettuati dopo 3-4 giorni misurando l'accrescimento delle colonie fungine (diametro della colonia) su substrato avvelenato e non, valutando la percentuale di inibizione rispetto al testimone, calcolando la media del diametro delle colonie e la deviazione standard (DS). Ogni prova è stata ripetuta 3 volte, ogni trattamento era costituito da 10 replicazioni. I risultati sono stati valutati secondo l'analisi Anova e con il test Tukey per  $P = 0,05$ .

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Il dosaggio dei componenti fenolici ha evidenziato un contenuto totale di questi composti pari a 114 g AGE/L nell'estratto tal quale. Solo nel caso di *A. dianthi* è stato efficace l'applicazione del dosaggio ai livelli più bassi (3,42 mg AGE/mL di substrato), evidenziando dei valori percentuali di inibizione medi pari a 92,4 % (Tabella 1). La concentrazione pari a 9,12 mg AGE/mL di substrato ha fornito un controllo significativo di *R. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *lilii* valori medi di inibizione pari a 87,9 e 59,2 % rispettivamente (Tabella 2). La concentrazione più alta utilizzata (11,4 mg AGE/mL) ha mostrato una significativa riduzione dello sviluppo di *B. cinerea*, con valori medi di efficacia pari a 65 % (Tabella 3).

Tabella 1. Effetto dell'attività fungistatica dell'estratto alcoolico di *S. aromaticum* sull'accrescimento del micelio di *V. dahliae*, espresso come percentuale di inibizione rispetto al controllo (0% inibizione). I valori sono la media di 10 replicazioni.

| Dose estratto mg AGE/ mL di substrato | Efficacia ( %) |         |         | Media (%) |
|---------------------------------------|----------------|---------|---------|-----------|
|                                       | Prova 1        | Prova 2 | Prova 3 |           |
| 1,14                                  | 0,3            | -7,2    | -13,7   | -6,9      |
| 2,28                                  | 6,8            | 17,4    | 10,1    | 34,3      |
| 3,42                                  | 94,2           | 90,0    | 93,0    | 92,4      |

Tabella 2. Effetto dell'attività fungistatica dell'estratto alcolico di *S. aromaticum* sull'accrescimento del micelio di due specie fungine, espresso come percentuale di inibizione rispetto al controllo (0% inibizione). I valori sono la media di 10 replicazioni.

| Patogeno            | Dose estratto mg AGE/ mL di substrato | Efficacia (%) |         |         |           |
|---------------------|---------------------------------------|---------------|---------|---------|-----------|
|                     |                                       | Prova 1       | Prova 2 | Prova 3 | Media (%) |
| <i>R. solani</i>    | 5,70                                  | 49,5          |         |         |           |
|                     | 9,12                                  | 83,2          | 96,0    | 84,6    | 87,9      |
| <i>F. oxysporum</i> | 5,70                                  | 39,5          |         |         |           |
| <i>f.sp. lilii</i>  | 9,12                                  | 66,0          | 57,4    | 55,0    | 59,2      |

Tabella 3. Effetto dell'attività fungistatica dell'estratto alcolico di *S. aromaticum* sull'accrescimento del micelio di *B. cinerea*, espresso come percentuale di inibizione rispetto al controllo (0% inibizione). I valori sono la media di 10 replicazioni.

| Dose estratto mg AGE /mL di substrato | Efficacia (%) |         |         |           |
|---------------------------------------|---------------|---------|---------|-----------|
|                                       | Prova 1       | Prova 2 | Prova 3 | Media (%) |
| 9,12                                  | 58,4          | 44,3    | -       | 51,35     |
| 11,4                                  | 65,5          | 68,7    | 60,9    | 65,03     |

Figura 1. *B. cinerea* cresciuta su substrato avvelenato con 11,4 mg AGE/mL (a sinistra) e testimone (a destra).

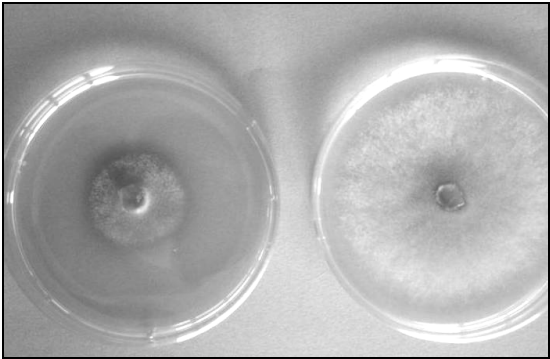


Figura 2. *F. oxysporum f.sp. lilii* cresciuto su substrato avvelenato con 9,12 mg AGE/mL (foto a destra) e testimone (foto a sinistra).

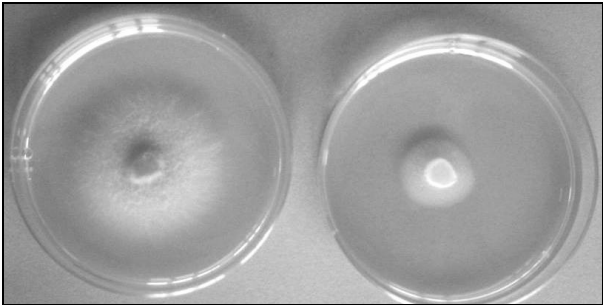
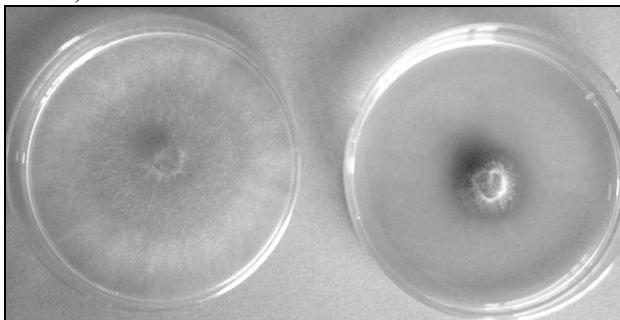


Figura 3. *R. solani* cresciuta su substrato avvelenato con 9,12 mg AGE/mL (foto a destra) e testimone (foto a sinistra).



Questi test preliminari hanno messo in evidenza una significativa attività antifungina dell'estratto applicato a concentrazioni diverse a seconda dei funghi patogeni, che evidentemente dimostrano sensibilità differente all'azione dell'estratto.

In letteratura veniva finora riportata l'attività biologica dell'olio essenziale di chiodi di garofano (Cardiet *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2010, Van der Wolf *et al.*, 2008) per il controllo di funghi e batteri anche fitopatogeni. Questo lavoro riporta invece per la prima volta l'attività fungistatica di sole molecole idrosolubili dell'estratto alcolico di *S. aromaticum* su quattro funghi fitopatogeni. L'olio essenziale di chiodi di garofano è costituito da un mix di molecole, principalmente eugenolo, eugenil acetato, cariofillene ed altri costituenti minori (The Merck Index 2011), quale sia l'effetto singolo di queste sostanze è ancora da investigare. Parimenti, la composizione e l'effetto dei componenti dell'estratto alcoolico sarà oggetto di attività future così come di ulteriori test in vitro ed in vivo.

Sono in corso prove per saggiare l'attività biologica dell'estratto in vivo anche su artropodi.

### Ringraziamenti

Questo Lavoro è stato supportato dal Progetto n° 67 Alcotra 2007-2013, Fioribio II

### LAVORI CITATI

- Cardiet G., Fuzeau B., Barreau C., Fleurat-Lessard F., 2012. Contact and fumigant toxicity of some essential oil constituents against a grain insect pest *Sitophilus oryzae* and two fungi, *Aspergillus westerdijkiae* and *Fusarium graminearum*. *Journal of Pest Science*, 85, 351–358.
- Huang Q., Lakshman D.K., 2010. Effect of clove oil on plant pathogenic bacteria and bacterial wilt of tomato and geranium. *Journal of Plant Pathology*, 92 (3), 701-707.
- Nene Y. L. and Thapliyal P. N., 1982. Fungicides in plant disease control. III. Edition: Oxford and IBH publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, pp.325.
- Swain T., Hillis W. E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L - The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 10, 63–68.
- The Merck Index, 2001. 13<sup>th</sup> ED. Merck & CO, Whitehouse Station, NJ, USA.
- Van Der Wolf, J.M., Birnbaum, Y., Van Der Zouwen, P.S., Groot, S.P.C., 2008. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. *Seed Science and Technology*, 36 (1), 76-88.