

ESPERIENZE PRELIMINARI SUL CONTENIMENTO DI ALCUNI BATTERI FITOPATOGENI ATTRAVERSO L'ESTRATTO DI *PUNICA GRANATUM*

D. RONGAI¹, N. PUCCI²

¹ CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia - Viale Petruzzi, 75, 65013 Città Sant'Angelo (PE)

² CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale - Via C. G. Bertero, 22, 00156 Roma
domenico.rongai@entecra.it

RIASSUNTO

Le mutevoli condizioni climatiche degli ultimi anni hanno reso le colture agrarie più vulnerabili alle batteriosi che, in alcune circostanze, hanno provocato ingenti danni. L'uso di antibiotici non è consentito per il contenimento delle malattie batteriche delle piante, per cui gli unici mezzi di difesa consistono in misure preventive di diffusione dell'infezione. Con una ricerca preliminare si è valutata l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* (melograno) su alcuni ceppi batterici (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* del pomodoro, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* dell'actinidia, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* polifago ed altri). Le prove condotte *in vitro* hanno mostrato un effetto inibitorio verso le sospensioni batteriche, anche alla concentrazione più bassa saggiata (1%). L'estratto quindi si inserirebbe nel settore degli agrofarmaci naturali e potrebbe essere usato tal quale, come coadiuvante o per la produzione di co-formulati.

Parole chiave: sostanze naturali, melograno, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

SUMMARY

PRELIMINARY TESTS ON THE USE OF *PUNICA GRANATUM* EXTRACT AGAINST SOME PLANT PATHOGENIC BACTERIA

The changing weather conditions in recent years made crops more vulnerable to bacterial diseases, which, in some circumstances, caused considerable damages. The use of antibiotics is not allowed for the control of bacterial diseases of plants, therefore the only means of defense consist of preventive measures. This preliminary research evaluates the effectiveness of *Punica granatum* (pomegranate) on some bacterial strains (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on actinidia, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and others). The tests conducted *in vitro* showed an inhibitory effect towards bacterial suspensions, even at the lowest concentration tested (1%). The extract could therefore fit in the sector of natural pesticides and could be used as such, or as an adjuvant for the production of co-formulates.

Keywords: natural substances, effectiveness, pomegranate, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni l'incidenza e la gravità delle malattie batteriche di specie erbacee ed arboree appaiono incrementate nel nostro Paese. La frequente introduzione dall'estero di nuove cultivar non sufficientemente o per nulla saggiate nei nostri ambienti nei confronti dei patogeni batterici rappresenta un forte fattore di rischio. I cambiamenti climatici in atto, con primavere caratterizzate da forti sbalzi termici e ritorni di freddo intenso, unitamente a una

prolungata e mite stagione autunnale, sembrano favorire l'insorgenza di nuovi quadri sintomatologici, indotti da batteri già conosciuti, mai osservati in precedenza (Scortichini, 2007). Inoltre, alcuni patogeni appaiono endemici e, a seconda dell'andamento climatico stagionale, possono rivestire differente pericolosità.

Il controllo delle malattie batteriche resta sempre difficile a causa della limitata disponibilità di sostanze ad azione battericida. L'uso di antibiotici è proibito a causa dei rischi di sviluppo di resistenza crociata di patogeni umani; la somministrazione di composti rameici è fortemente limitata (Reg. EU n° 473/2002) per l'impatto sull'ambiente. In conseguenza di tutto ciò le misure per controllare le malattie batteriche sono principalmente legate alla prevenzione: buone pratiche agronomiche per limitare l'infezione iniziale e la disseminazione fra piante, utilizzo di materiale di propagazione sano (la disponibilità per es. di seme sano è un problema molto sentito in batteriologia dove i metodi di sanificazione includono procedure fisiche o chimiche la cui efficacia molto spesso va a discapito della germinabilità), disinfezione delle macchine e degli attrezzi utilizzati per la normale conduzione della coltura, concimazioni ed irrigazioni equilibrate, etc. La disponibilità di nuovi ed ecocompatibili battericidi sarebbe molto utile per il controllo delle principali malattie batteriche.

Nel presente lavoro sono stati condotti saggi preliminari *in vitro* per verificare l'efficacia dell'estratto di *Punica granatum* (melograno) su tre batteri fitopatogeni: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Pseudomonas syringae pv. *syringae* van Hall (Pss) è un batterio polifago che sopravvive come epifita sulle piante ospiti diventando patogeno in presenza di condizioni ambientali adeguate. E' in grado di provocare gravi perdite soprattutto al momento della ripresa vegetativa e in presenza di gelate autunnali inducendo una varietà di sintomi: necrosi fogliari, cancri corticali e gommosi di tessuti legnosi. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), agente del cancro batterico del pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è considerato una delle più importanti batteriosi della coltura (inserito dall'Eppo in lista A2 di quarantena) in grado di causare gravi perdite nelle principali aree di coltivazione di questa solanacea soprattutto a causa della mancanza di cultivar resistenti. Il cancro batterico dell'actinidia, causato da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), ha determinato, a partire dal 2008 (Balestra *et al.*, 2008), danni talmente ingenti a carico delle cultivar di actinidia a polpa gialla (*Actinidia chinensis*) e verde (*A. deliciosa*) da essere stato definito come una vera e propria pandemia (Scortichini *et al.*, 2012). Eppo nel settembre 2012 ha aggiunto questa malattia alla lista A2 di quarantena.

MATERIALI E METODI

Estratto utilizzato

Per le prove è stato utilizzato un estratto acquoso ottenuto dalla buccia del melograno (*Punica granatum* varietà dente di cavallo) secondo la metodica descritta da Rongai (2013).

Ceppi batterici utilizzati

Gli isolati batterici utilizzati in questi studi *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall (Pss), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) e *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), sono stati mantenuti liofilizzati a 4°C nella collezione del CREA-Pav di Roma; le sub-culture utilizzate per l'inoculo sono state allevate su NAG (Nutrient agar 28 g, glucosio 2,5 g/L) per 48h.

Esperimento *in vitro*

L'effetto antibatterico dell'estratto di melograno è stato saggiato in accordo con il protocollo di Rhouma *et al.*, (2009) leggermente modificato, miscelando 100 µL di sospensione batterica a concentrazione di 1×10^8 CFU/mL di ciascuna specie oggetto di studio con 3 mL di NAG contenente solo lo 0,6% agar di Nutrient agar mantenuto a 45°C (dopo aver preventivamente verificato che in queste condizioni i tre batteri rimangono perfettamente vitali). Tale gel è stato velocemente versato in piastre Petri (diametro 9 cm) contenenti NAG solidificato. Dopo il raffreddamento del gel con un foratappi del diametro di 5 mm sono state praticati 5 pozzetti nelle piastre (quattro laterali equidistanti ed uno centrale) per Psa e Pss ed un solo pozzetto centrale per Cmm (per problemi di colorazione cinque pozzetti creavano confusione nella misurazione). Successivamente tali pozzetti vengono riempiti con l'estratto di melograno alla concentrazione dell'1%. Le piastre inoculate sono state incubate per 48h alla loro temperatura ottimale di crescita (25°C per Psa, 27 °C per Cmm e Pss) per procedere poi alla misura del diametro della zona di inibizione. Nelle piastre di controllo i pozzetti sono stati riempiti con acqua sterile. La prova è stata replicata tre volte.

Analisi statistica

La significatività dei trattamenti è stata determinata usando Tukey's HSD test ($P \leq 0,05$).

RISULTATI

Efficacia *in vitro* dell'estratto di *P. granatum* contro *Psa*, *Cmm* e *Pss*

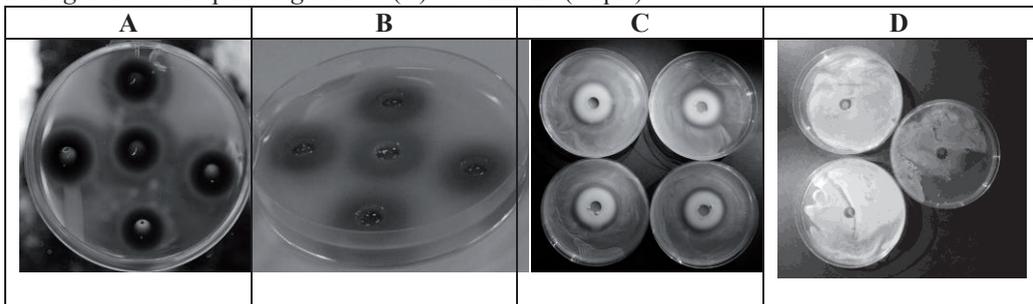
Tali prove preliminari hanno evidenziato che dopo 48 h dall'inoculazione l'estratto di melograno usato alla concentrazione dell'1% è stato in grado di inibire un'area di 23,25; 21,3 e 24,33 mm in piastre Petri contenenti rispettivamente i ceppi batterici Psa, Pss e Cmm. (tabella 1). Nelle piastre trattate con acqua i batteri hanno invaso tutta la piastra (figura 1).

Tabella 1. Effetto antibatterico dell'estratto di *P. granatum* su *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) e *C. michiganensis* subsp *michiganensis* (Cmm): diametro (mm) dell'area di inibizione su agar nutritivo dopo 48 h di incubazione

^a = Media di tre repliche; ^b = Deviazione standard.

Trattamenti	Psa	Pss	Cmm
	<i>mm</i>	<i>mm</i>	<i>mm</i>
Testimone trattato con acqua <i>P. granatum</i> (1%)	Nessuna inibizione 23,25 ^a ± 1,25 ^b	Nessuna inibizione 21,3 ^a ± 1,30 ^b	Nessuna inibizione 24,33 ^a ± 2,33 ^b

Figura 1. Aree di inibizione attorno al pozzetto contenente l'estratto di *P. granatum* su agar nutritivo inoculato con *P. syringae* pv. *actinidiae* (A), *P. syringae* pv. *syringae* (B), *C. michiganensis* subsp *michiganensis* (C) e testimone (acqua) (D)



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Quanto osservato in queste prove preliminari risulta in accordo con quanto riportato da precedenti autori. Prashanth *et al.* (2001) hanno provato le proprietà antibatteriche possedute dall'estratto di *Punica granatum*. Più recentemente, riguardo a questa pianta, Quattrucci *et al.* (2013) hanno dimostrato l'efficacia *in vitro* dell'estratto etanologico di melograno nei confronti del batterio *P. syringae* pv. *tomato*. Alla concentrazione dell'1 e 5%, hanno osservato un diametro di inibizione rispettivamente di 11 e 24 mm. In questo studio, utilizzando la stessa concentrazione dell'estratto di melograno, si è registrato un diametro di inibizione doppio. Addirittura, per ottenere la stessa efficacia è sufficiente utilizzare una concentrazione dell'estratto 5 volte inferiore. Ciò può essere spiegato dal fatto che noi abbiamo adoperato una diversa procedura estrattiva, usando l'acqua (come solvente) e il sonicatore, che distruggendo le pareti cellulari, è stato in grado di ottenere più soluto. Inoltre, per aumentare la concentrazione delle sostanze biologicamente attive come le punicalagine e l'acido ellagico, l'estratto è stato purificato con la tecnica SPE (Rongai, 2013).

La possibilità di contenere le infezioni batteriche con i composti di origine vegetale è di notevole interesse soprattutto per la mancanza di una valida alternativa all'uso dei prodotti rameici e alla scarsa disponibilità di cultivar resistenti ai batteri. Estratti di *Ficus carica* e *Allium sativum* si sono mostrati efficaci contro *P. syringae* e *C. michiganensis* subsp *michiganensis*, suggerendo il loro uso in agricoltura come alternativa o in combinazione con rame (Balestra *et al.*, 2009). Un uso eccessivo del rame in agricoltura, a causa del suo accumulo nell'ecosistema del suolo e nella catena alimentare, è osteggiato dalla regolamentazione europea la quale sta diventando sempre più restrittiva. I risultati ottenuti con le nostre prove, anche se preliminari, sono incoraggianti perché l'efficacia riscontrata *in vitro* è risultata superiore a quella riscontrata in altri lavori simili. Ulteriori studi dovranno essere condotti per identificare e caratterizzare le sostanze biologicamente attive presenti nell'estratto di melograno in modo da capire meglio i loro meccanismi di azione. Saranno infine eseguiti prove *in vivo* per verificare l'efficacia dell'estratto anche su larga scala, allo scopo di mettere a punto strategie di difesa per meglio contenere le malattie batteriche.

LAVORI CITATI

- Balestra G.M., Mazzaglia A., Spinelli R., Graziani S., Quattrucci A., Rossetti A., 2008. Cancro batterico su *Actinidia chinensis*. *L'Informatore Agrario*, 38, 75-76.
- Balestra G.M., Heydari A., Ceccarelli D., Ovidi E., Quattrucci A., 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28, 807-811.
- Prashanth D., Asha M.K., Amit A., 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72, 171-173.
- Quattrucci A., Ovidi E., Tiezzi A., Vinciguerra V., Balestra G.M., 2013. Biological control of tomato bacterial speck using *Punica granatum* fruit peel extract. *Crop Protection*, 46, 18-22.
- Rhouma A., Ben Daoud H., Ghanmi S., Ben Salah H., Romdhane M., Demak M., 2009. Antimicrobial activities of leaf extracts of pistacia and schinus species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 91(2), 339-345.
- Rongai D., 2013. Prodotto fitosanitario e metodo per l'ottenimento di detto prodotto fitosanitario. Brevetto per Invenzione in Italia N. TO2013A001085.
- Scortichini M., 2007. Le malattie batteriche delle Drupacee. *Informatore Fitopatologico*, 5, 10-14.