

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI ESTRATTI VEGETALI NEI CONFRONTI DI *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*, AGENTE CAUSALE DEL CANCRO BATTERICO DEL KIWI

N. PUCCI¹, G. SIMONETTI², E. CARNEVALE², I. SAMMARCO³, A. VALLETTA³, S. LORETI¹, G. PASQUA³

¹ Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria - Centro di Ricerca Difesa e Certificazione (CREA-DC)

Sede di Roma- Via C.G.Bertero,22, 00156 Roma

²Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Università di Roma "La Sapienza" Piazzale Aldo Moro, 5, 00185 Roma

³Dipartimento di Biologia Ambientale, Università di Roma "La Sapienza" - Piazzale Aldo Moro, 5 00185 Roma

nicoletta.pucci@crea.gov.it

RIASSUNTO

Nel presente lavoro è stata valutata la minima concentrazione inibente la crescita batterica (MIC) e la minima concentrazione battericida (MBC) di estratti ottenuti da diverse matrici vegetali nei confronti di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa). Psa è l'agente causale del cancro batterico dell'actinidia che ha determinato una vera e propria pandemia a partire dal 2008 su specie a polpa gialla (*Actinidia chinensis*) e verde (*A. deliciosa*). Sono stati saggiati vari estratti vegetali caratterizzati dalla presenza di diverse classi di polifenoli. Risultati promettenti sono stati ottenuti da estratti di radici di *Polygonum cuspidatum*. Al fine di valutare un'eventuale fitotossicità degli stessi è stato condotto un saggio su dischi fogliari di *A. chinensis* cv. Belen, utilizzando concentrazioni di estratti superiori a quelle attive su Psa. Le valutazioni sono state condotte sia visivamente, per evidenziare eventuali danni macroscopici, che eseguendo un test biochimico sensibile, quale l'analisi della variazione quantitativa della clorofilla totale nei dischi fogliari trattati. Le analisi hanno permesso di escludere fitotossicità di tutti gli estratti nei confronti dei tessuti della pianta.

Parole chiave: *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa*, MIC, MBC, fitotossicità

SUMMARY

***IN VITRO* ASSESSMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BOTANICAL EXTRACTS IN RELATION TO *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*, THE CAUSAL AGENT OF KIWI BACTERIAL CANCER**

In the present study the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of several extracts from different plant matrices were evaluated on *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA). Psa is the causal agent of kiwifruit bacterial canker, causing a pandemic since 2008 on yellow (*Actinidia chinensis*) and green (*A. deliciosa*) kiwifruit. The tested extracts are characterized by the presence of different classes of polyphenols. The most promising results were obtained from the roots of *Polygonum cuspidatum*. To evaluate possible phytotoxicity of the extracts, a leaf disc assay on *A. chinensis* cv. Belen was performed using extract concentrations higher than MIC. The evaluations were carried out both by visual observation of the treated tissues and by a sensitive biochemical test, i.e. the analysis of the quantitative variation of total chlorophyll in foliar disks. These analyses didn't show any phytotoxicity of the extracts in the plant tissues.

Keywords: *Actinidia chinensis*, *Actinidia deliciosa*, MIC, MBC, phytotoxicity

INTRODUZIONE

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (Psa), agente causale del cancro batterico del kiwi a polpa gialla (*Actinidia chinensis*) e verde (*Actinidia deliciosa*), è stato segnalato per la prima volta in Italia nel 1992 (Scortichini, 1994). In Italia esso rimase sporadico e con una bassa incidenza per 15 anni, tuttavia a partire dal 2008 si è avuto uno scoppio epidemico della malattia inizialmente nelle provincie di Latina e Roma e successivamente anche in Emilia-Romagna, Piemonte e provincia di Viterbo (Balestra et al., 2008; Ferrante e Scortichini, 2009). Si stima che questo patogeno abbia causato una perdita di produzione pari a 20.000 piante/ettaro/anno riducendo la produzione del frutteto del 10-50% (Cacioppo, 2012) con ingenti perdite economiche. Allo stato attuale non esiste una soluzione univoca e definitiva per il controllo di questa malattia, ma si possono mettere in atto misure di natura diversa che permettono di mantenere il patogeno al di sotto di una soglia di dannosità. Tali misure comprendono, oltre all'utilizzo di mezzi chimici, la coltivazione di varietà di kiwi resistenti, la pratica di rigorose norme igieniche nei frutteti, l'utilizzo di strategie di controllo biologico e di elicitori in grado di stimolare le risposte di difesa della pianta. L'impiego di trattamenti chimici, utilizzati per Psa come misura preventiva, si basa soprattutto sull'impiego di composti battericidi e fitofarmaci a base di rame. Essendo in Europa vietato l'utilizzo di antibiotici nei confronti dei patogeni vegetali, il loro controllo avviene principalmente applicando composti rameici. In considerazione dei recenti obblighi previsti dalla legge "Regolamento di esecuzione (UE) 2015/408 che prevedono la sostituzione di diversi composti chimici fra cui il rame, e dei problemi legati all'insorgenza in Giappone di ceppi di Psa resistenti al rame stesso, appare molto importante indagare su nuovi composti (soprattutto quelli con basso impatto ambientale) da utilizzare in combinazione con altre molecole per contribuire ad un controllo integrato e sostenibile della malattia. L'uso di estratti di origine vegetale come antibatterici ed antifungini può rappresentare un'alternativa valida all'uso di composti sintetici. La letteratura riporta risultati interessanti sia in campo animale che vegetale. Le specie appartenenti al genere *Morus* producono un'ampia gamma di metaboliti secondari antimicrobici. Le attività antimicrobiche in vitro e in vivo ottenute da foglie di *M. alba* e *M. nigra* sono state ampiamente studiate. Gli estratti acetonic e metanolic della corteccia radicale di *M. nigra* mostrano attività antifungina contro diversi funghi fitopatogeni, quali *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *A. carbonarius* e *A. terreus* (Simonetti et al., 2017). Le radici di *Hypericum perforatum* contengono xantoni, per i quali sono state dimostrate diverse attività biologiche tra cui antifungina (Simonetti et al., 2015), antiradicalica ed antinfiammatoria. La produzione di xantoni, scarsa nelle radici della pianta, è stata incrementata utilizzando radici coltivate in vitro elicitate con chitosano (Tocci et al., 2010). L'estratto di *Polygonum cuspidatum* ha azione antibatterica contro diversi batteri patogeni animali. Inoltre l'estratto grezzo mostra un'azione antibatterica contro alcuni batteri comunemente presenti negli alimenti (Shan et al., 2008). Le numerose proprietà biologiche del frutto di *Punica granatum* dipendono principalmente dai composti polifenolici, particolarmente abbondanti nell'esocarpo e nel mesocarpo del melograno, presenti anche nella parte edibile. Tali sostanze comprendono principalmente antocianine, acido ellagico ed ellagitannini, acido gallico e gallotannini, flavanoli e proantocianidine. Queste molecole bioattive svolgono azione preventive in malattie degli animali e dell'uomo (Dell'Agli et al., 2010). Tra i composti bioattivi prodotti da *Vitis vinifera* ci sono gli stilbeni, tra i quali quello maggiormente rappresentato è il resveratrolo; tale composto presenta attività antiossidante e antinfiammatoria. Estratti di semi di uva mostrano attività antimicrobica contro numerosi batteri e funghi patogeni dell'uomo (Pasqua e Simonetti, 2016; Simonetti et al., 2016).

Scopo del presente lavoro è stato valutare la minima concentrazione inibente la crescita batterica (MIC) e la minima concentrazione battericida (MBC) di estratti ottenuti da diverse

matrici vegetali su *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae per un loro potenziale utilizzo in strategie di lotta integrata contro il cancro batterico del kiwi.

MATERIALI E METODI

Attività antibatterica

Per valutare l'attività antibatterica degli estratti ottenuti nel laboratorio di Biotecnologie cellulari vegetali, è stato utilizzato il ceppo di Psa CREA-PAV 1625. Gli estratti saggati sono stati ottenuti dalle seguenti matrici vegetali: radici di *Hypericum perforatum* e *Polygonum cuspidatum*, corteccia radicale di *Morus nigra*, mesocarpo di *Punica granatum*, semi e vinaccia di *Vitis vinifera*. L'attività batteriostatica è stata valutata utilizzando il metodo per diluizione in piastre da 96 pozzetti a concentrazioni di 0, 125, 250 e 1000 µg/mL di ciascun estratto. Dopo 24 ore di incubazione a 25-27 °C, è stata valutata la Minima Concentrazione Inibente la crescita (MIC). La Minima Concentrazione Battericida (MBC) è stata valutata a partire da concentrazioni di estratto uguali o superiori alla MIC.

Test di fitotossicità degli estratti vegetali su dischi fogliari di kiwi

Sono state prelevate foglie completamente espanse di *A. chinensis* cv. Belen dalle quali sono stati ottenuti dischi fogliari del diametro di 23 mm. Dopo randomizzazione, cinque dischi sono stati trattati con estratto vegetale; come controllo è stato utilizzato DMSO alla concentrazione finale pari all'1% (Brunetti et al., 2014).

Al fine di indagare la fitotossicità degli estratti vegetali, oltre all'osservazione fenotipica dei dischi fogliari trattati con le sostanze, è stato preso in esame il dosaggio delle clorofille a e b totali prodotte da tali dischi. La clorofilla è stata estratta prelevando tre dischi per campione, macerandoli con un micropestello in soluzione di acetone all'80%, utilizzando un rapporto peso/volume pari a 1 g/5 mL. Ciascun estratto, conservato al buio a -20 °C per 72 ore, è stato portato ad un volume di 5 mL, posto per 10 minuti in un bagnetto ad ultrasuoni (sonicatore) contenente acqua e ghiaccio, e successivamente filtrato per eliminare eventuali residui. E' stato quindi misurato l'assorbimento del campione allo spettrofotometro a due lunghezze d'onda, 645 e 663 nm, corrispondenti, rispettivamente, al picco massimo di assorbimento della clorofilla b e della clorofilla a. Applicando le seguenti formule si è calcolato:

$$\text{Clorofilla a (mgl)} = (12,7 \times A663) - (2,69 \times A645)$$

$$\text{Clorofilla b (mgl)} = (22,9 \times A645) - (4,68 \times A663)$$

Il contenuto totale di clorofilla è stato ottenuto sommando algebricamente la quantità delle due clorofille. Per ogni campione sono state eseguite tre estrazioni a tempo diverso: dopo 24 ore, 48 ore e 15 giorni dalla somministrazione del trattamento; per i controlli è stata eseguita un'estrazione anche a tempo zero.

RISULTATI

Attività antibatterica

La più alta attività antibatterica e battericida (corrispondente, rispettivamente, al più basso valore di MIC e di MBC) è stata dimostrata dall'estratto commerciale di radici di *P. cuspidatum* (Polydatin; tabella 1). Anche l'estratto di semi di *V. vinifera* cv. Italia (tabella 1) ha mostrato soddisfacenti valori di MIC e di MBC. Nella tabella 1 sono riportati anche i valori di MIC ed MBC delle altre sostanze saggate.

Tabella 1. Saggio di attività antibatterica (MIC,MBC) degli estratti di *H. perforatum* e *P. cuspidatum*, di corteccia radicale di *M. nigra*, di mesocarpo di *P. granatum*, di semi di *V. vinifera* e di vinaccia di *V. vinifera* nei confronti di *P. syringae* pv. *actinidiae* (CREA-PAV 1625)

Estratti vegetali	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)
Radici di <i>H. perforatum</i>	500	500
Corteccia radicale <i>M. nigra</i>	>1000	>1000
Radici di <i>P. cuspidatum</i>	125 - 250	250
Mesocarpo di <i>P. granatum</i>	da >250 a >500	da >250 a >500
Semi di <i>V. vinifera</i> cv. Italia	>125	>125
Vinacce di <i>V. vinifera</i> cv. Italia	>250	>250

Test di fitotossicità degli estratti vegetali su dischi fogliari di kiwi

Per valutare l'assenza di fitotossicità degli estratti saggianti, quelli con migliore attività battericida sono stati valutati sia attraverso un esame fenotipico sia mediante analisi del parametro fisiologico clorofilla totale. L'analisi morfologica dei dischi fogliari, dopo 15 giorni dalla somministrazione del trattamento con l'estratto commerciale di radici di *P. cuspidatum* ed estratti di semi di uva non hanno evidenziato comparsa di aree necrotiche e clorotiche sui dischi rispetto ai controlli. In relazione all'analisi del parametro fisiologico quantità di clorofilla totale (tabella 2) i dischi fogliari sottoposti al trattamento con l'estratto di radici di *P. cuspidatum*, ad entrambe le concentrazioni (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) ed a tutti i tempi considerati mostrano un aumento nel contenuto di clorofilla rispetto al controllo. I dischi sottoposti al trattamento con la concentrazione di semi *V. vinifera* di cv. Italia (tabella 2) più bassa (500 $\mu\text{g/mL}$), dopo 24 ore dalla somministrazione della sostanza mostrano un decremento nel contenuto di clorofilla rispetto al controllo mentre dopo 48 ore e 15 giorni un incremento. I dischi trattati con la concentrazione di estratto più alta (1000 $\mu\text{g/mL}$) presentano un incremento in tutti i tempi analizzati.

Tabella 2. Variazioni percentuali di clorofilla totale prodotta da dischi fogliari di *A. chinensis* cv. Belen sottoposti a trattamento con estratti di radici di *P. cuspidatum* e Vinaccia di *V. vinifera* alla concentrazione di 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$. I rilievi sono stati effettuati a 24 ore, 48 ore e 15 giorni dal trattamento

	24 ore		48 ore		15 giorni	
	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
Radici <i>P. cuspidatum</i>	4,69	3,8	7,09	2,21	34,29	54,17
Semi <i>V. vinifera</i>	-14,17	0,01	3,36	19,40	14,08	4,85

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La coltivazione di kiwi (*A. chinensis* e *A. deliciosa*) riveste un ruolo di particolare rilievo in Italia, attualmente il secondo Paese produttore mondiale. Nell'ultimo decennio *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, agente causale del cancro batterico del kiwi, ha devastato queste coltivazioni provocando ingenti perdite economiche in Italia e in tutto il mondo. Attualmente non esiste una soluzione definitiva per il controllo della malattia, che resta a tutt'oggi basato prevalentemente sulla prevenzione. Ciò è in parte legato alle rigide normative vigenti in Italia che limitano l'utilizzo dei composti chimici somministrati in campo agricolo a causa della loro fitotossicità, della possibilità di insorgenza di forme di resistenza batterica e della problematica dell'accumulo di residui di sostanze dannose nei frutti e nell'ambiente. Questo ha stimolato un crescente interesse nella ricerca di sostanze alternative naturali, non fitotossiche e con minor impatto ambientale.

Sebbene l'effetto antibatterico ed antifungino di questi estratti sia stato già indagato in diversi studi nei confronti di microrganismi patogeni dell'uomo/animale (Pasqua e Simonetti, 2016; Simonetti et al., 2015; Simonetti et al., 2016; Simonetti et al., 2017), i dati di letteratura in campo vegetale sono rari. È stato dimostrato che l'estratto di radici di *P. cuspidatum* presenta azione antifungina contro *Botryosphaeria dothidea*, patogeno del genere *Populus* (Zhou et al., 2008). L'estratto di semi di uva ha azione antifungina contro *Botrytis cinerea* (Xu et al., 2007). L'estratto di vinaccia di *Vitis vinifera* cv. Mandilari è stato saggiato su alcune specie batteriche affini a quella indagata nel presente lavoro, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (agente causale della picchiettatura batterica del pomodoro) e *Pseudomonas viridiflava* (agente causale della maculatura batterica del kiwi); contro tali patogeni, dopo 48 ore dalla somministrazione dell'estratto la MIC 100% risultava elevata (1500 µg/mL) (Mavrakis, 2009), indicando una bassa attività. Nello stesso lavoro sono stati testati anche estratti ottenuti da foglie di olivo ricche in oleuropeina, in questi esperimenti la MIC 100% risultava inferiore pari a 500 µg/mL. Rossetti et al. (2017) studiando gli effetti in vitro ed in vivo di acido gallico ed ellagico nei confronti dei principali batteri del kiwi (Psa, *P. viridiflava* e *P. syringae* pv. *syringae*) hanno mostrato che entrambi presentano alle concentrazioni saggiate (0,1 mg/mL) un'azione antimicrobica equiparabile a quella della streptomicina e che il loro incapsulamento in microparticelle di natura diversa può prolungare la loro efficacia fino a 14 giorni dopo il trattamento in serra o in pieno campo.

In questo studio sono stati saggiati estratti ottenuti da diverse matrici vegetali ed è stata dimostrata l'attività antibatterica nei confronti di Psa di alcuni di essi. Due estratti commerciali hanno dimostrato la più alta attività batteriostatica e battericida contro Psa, uno ottenuto dalle radici di *P. cuspidatum*, l'altro da semi di uva di *V. vinifera*. L'estratto di vinaccia di *V. vinifera* cv. Italia, ottenuto e caratterizzato in laboratorio, ha mostrato un'attività antibatterica minore rispetto agli altri due, ma essendo un prodotto di scarto del comparto vitivinicolo rappresenta un'interessante fonte economica ed ecosostenibile.

Questi risultati e la caratterizzazione chimica degli estratti suggeriscono che le molecole efficaci per l'attività antibatterica contro Psa siano gli stilbeni (abbondanti nelle radici di *P. cuspidatum*) e le procianidine oligomeriche (abbondanti nell'estratto commerciale di semi di *V. vinifera*). Gli altri estratti testati, ricchi in altre molecole fenoliche come xantoni (*H. perforatum*), flavonoidi prenilati (*M. nigra*), ellagitannini (*P. granatum*), non hanno dato i risultati sperati con un effetto antibatterico minore (MIC variabile da >125 a >1000 µg/mL). Gli stilbeni, in particolare, il cis- e trans-resveratrolo, sono metaboliti secondari coinvolti nelle

risposte di difesa delle piante, sintetizzati in modo costitutivo nella buccia dell'uva quindi abbondanti nella vinaccia (estratto ottenuto da buccia più semi) ma non nei semi. Il resveratrolo ha azione antimicrobica contro numerosi batteri e funghi fitopatogeni, tra cui *Xylella fastidiosa* (Maddox et al., 2010), *Botrytis cinerea* (Chalal et al., 2014), *Plasmopara viticola* (Chalal et al., 2014). Le proantocianidine, principali componenti dell'estratto dei semi, sono composti polifenolici con funzione di difesa contro microrganismi patogeni, insetti ed erbivori. È stato recentemente dimostrato che estratti di semi di uva della cv. Michele Palieri sono molto attivi su funghi patogeni dell'uomo (Simonetti et al., 2014) ed *in vitro* nei confronti di *Malassezia furfur* e *Trichophyton mentagrophytes* (rispettivamente, MIC 100% di 64 µg/mL e 128 µg/mL) (Simonetti et al., 2016).

Le prove effettuate al fine di escludere l'effetto fitotossico degli estratti vegetali saggiati nei confronti dei tessuti fogliari di actinidia evidenziano l'assenza di segni macroscopici di danno nei dischi fogliari di *A. chinensis* cv. Belen in seguito al trattamento con gli estratti a più elevata attività antibatterica. Non risultano inoltre variazioni del contenuto di clorofilla totale rispetto al controllo non trattato. È stato quindi possibile escludere che tali estratti, alle concentrazioni testate (500 e 1000 µg/mL), presentino fitotossicità nei confronti di *A. chinensis* cv. Belen. L'assenza di tossicità degli estratti da semi di *V. vinifera*, di vinaccia e di radici di *P. cuspidatum* è stata da tempo accertata su sistemi animali ed umani. L'estratto di semi di *V. vinifera* è considerato "sostanza generalmente riconosciuta sicura (Generally Recognized as Safe -GRAS) dalla Federal Food, Drug Administration (FDA). In campo vegetale è stata dimostrata assenza di fitotossicità della vinaccia su piantine di lattuga, pomodoro, pepe e melone (Carmona et al., 2012).

Sebbene ulteriori indagini siano necessarie per indagare le proprietà antibatteriche degli estratti attivi *in planta*, in una prospettiva futura tali estratti, non essendo fitotossici, potrebbero essere utilizzati come pesticidi naturali nel controllo di questo pericoloso fitobatterio. Alla luce delle recenti disposizioni sulla riduzione dell'utilizzo di rame, oggi molto diffuso per il controllo della malattia, l'uso di questi estratti naturali consentirebbe l'individuazione di strategie alternative di controllo nell'ambito di un'agricoltura sostenibile a basso impatto ambientale.

*Gli autori hanno contribuito nella stessa misura al lavoro

LAVORI CITATI

- Balestra G.M., Mazzaglia A., Quattrucci A., Spinelli R., Graziani S., Rossetti A. 2008. Cancro batterico su *Actinidia chinensis*. *L'Informatore Agrario* 38: 75 -77
- Brunetti A., Pucci N., Lumia V., Modesti V., Di Nicola E., Latini A., Gallelli A., Di Lernia G., Matera A., Loreti S., M Pilotti. 2014. Screening di molecole/prodotti per il controllo di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, agente del cancro batterico del kiwi. *Kiwi informa* 10-12 : 38-41).
- Cacioppo O., 2012. Aggiornamento dell'actinidicoltura mondiale. *Kiwi Informa*; 10:12.
- Carmona E., Moreno M. T., Avilés M., Ordovás J., 2012. Use of grape marc compost as substrate for vegetable seedlings. *Scientia Horticulturae*, 137:69-74.
- Chalal M., Klinguer A., Echairi A., Meunier P., Vervandier-Fasseur D., Adrian M., 2014. Antimicrobial Activity of Resveratrol Analogues. *Molecules*, 19(6):7679-7688.
- Dell'Agli M., Galli G. V., Bulgari M., Basilico N., Romeo S., Bhattacharya D., Taramelli D., Bosisio E., 2010. Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (*Punica granatum*) antagonize *in vitro* the host inflammatory response mechanisms involved in the onset of malaria. *Malaria Journal*, 9(1),208.

- Ferrante P., Scortichini M. 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as Causal Agent of Bacterial Canker of Yellow Kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in Central Italy. *J Phytopathol*, 157,768–770.
- Maddox C. E., Laur L. M., Tian L., 2010. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Against the Phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*, 60:53.
- Mavrikis T. N., 2009. Exploitation of bioactive constituents of olive leaves, grape pomace, olive mill waste water and their applications in phytoprotection. Tesi di Dottorato non pubblicata. *Cranfield University; Applied Mycology Group, Cranfield Health, Faculty of Medicine and BioSciences*.
- Pasqua G. e Simonetti G., 2016. Antimicrobial and antiviral activities of grape seed extracts. In *Grape Seeds: Nutrient Content, Antioxidant Properties and Health Benefits*, Rodriguez JML, Ruiz DF (eds). *Nova Science Publishers: New York*, 211–224.
- Rossetti A., Mazzaglia A., Muganu M., Paolucci M., Sguizzato M., Esposito E., Cortesi R., Balestra G:M. 2017. Microparticles containing gallic and ellagic acids for the biological control of bacterial diseases of kiwifruit plants. *J Plant Dis Prot*, DOI 10.1007/s41348-017-0096-6
- Scortichini M., 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Italy. *Plant Pathology*, 43,1035–1038.
- Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., Corke H., 2008. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry*; 109(3):530-537.
- Simonetti G., Brasili E., D'Auria F., Corpolongo S., Ferrari F., Pasqua G., Valletta A., *in press*. 2017 Prenylated flavonoids and total extracts from *Morus nigra* L. root bark inhibit *in vitro* growth of plant pathogenic fungi. *Plant Biosystems*, 1-5
- Simonetti G., D'Auria F. D., Mulinacci N., Innocenti M., Antonacci D., Angiolella L., Santamaria A. R., Valletta A., Donati L., Pasqua G., 2016. Anti-Dermatophyte and Anti-*Malassezia* Activity of Extracts Rich in Polymeric Flavan-3-ols Obtained from *Vitis vinifera* Seeds. *Phytotherapy Research*, 31(1),124-131.
- Simonetti G., Tocci N., Valletta A., Brasili E., D'Auria F. D., Idoux A., Pasqua G., 2015. *In vitro* antifungal activity of extracts obtained from *Hypericum perforatum* adventitious roots cultured in a mist bioreactor against planktonic cells and biofilm of *Malassezia furfur*. *Natural product research*, 1-7
- Tocci N., Ferrari F., Santamaria A. R., Valletta A., Rovardi I., Pasqua, G., 2010. Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. *Natural product research*, 24(3):286-293.
- Valletta A., De Angelis G., Badiali C., Brasili E., Miccheli A., Di Cocco M. E., Pasqua G., 2016. Acetic acid acts as an elicitor exerting a chitosan-like effect on xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* L. root cultures. *Plant Cell Reports*, 35(5):1009–1020.
- Xu W. T., Huang K. L., Guo F., Qu W., Yang J. J., Liang Z. H., Luo Y. B., 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1):86-94.
- Yang J. e Xiao Y. Y., 2013. Grape Phytochemicals and Associated Health Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53,11.
- Zhou Y., Liu H., Zhao J., Tan M., Sui P., Wang J., Zhou L., 2008. Poplar stem blister canker and its control strategies by plant extracts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24,1579- 1584.

