

ATTIVITÀ INIBENTE DEGLI ESTRATTI ACQUOSI DI *INULA VISCOSA* E *PELARGONIUM GRAVEOLENS* SULL'ACCRESIMENTO *IN VITRO* DI FUNGHI FITOPATOGENI

G. PIRAJNO, A. SALAMONE, G. SCARITO

Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo.- Sez. Patologia vegetale e Microbiologia agraria
Università degli Studi – Viale delle Scienze 2, 90128 Palermo gscarito@unipa.it

RIASSUNTO

E' stata saggiata *in vitro* l'attività inibente degli estratti acquosi, ottenuti per ebollizione, infusione e macerazione delle parti epigee fiorite di *Inula viscosa* e *Pelargonium graveolens*, su *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Phoma tracheiphila*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cactorum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Gli estratti acquosi di *I. viscosa*, ottenuti per ebollizione e infusione hanno mostrato una interessante attività fungitossica su tutti i microrganismi saggiati ad eccezione di *V. dahliae*; attività inibente blanda o nulla hanno fornito gli estratti acquosi di geranio.

Parole chiavi: attività antifungina, *Inula viscosa*, *Pelargonium graveolens*, estratti acquosi

SUMMARY

ACTIVITY OF *INULA VISCOSA* AND *PELARGONIUM GRAVEOLENS* WATER EXTRACTS ON *IN VITRO* DEVELOPMENT OF PLANT PATHOGENIC FUNGI

The antifungal activity of the water extracts, obtained by boiling, infusing and macerating the flowering plants of *Inula viscosa* (L.) Aiton and *Pelargonium graveolens* L'Her. ex Ait., was tested *in vitro* on *Verticillium dahliae* Kleb., *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder et Hansen, *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc et Ghik., *Botrytis cinerea* Pers., *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet., *Rhizoctonia solani* Kühn e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Water extracts of *I. viscosa*, obtained by ebullition and infusion showed an interesting antimicrobial activity against all fungi tested, except on *V. dahliae*; water extracts of geranium, instead showed a lower antifungal activity.

Keywords: antifungal activity, *Inula viscosa*, *Pelargonium graveolens*, water extracts

INTRODUZIONE

Dalle prime esperienze effettuate *in vitro* e *in planta* (Ark e Thompson, 1959) dalle quali sono emerse le ottime proprietà antimicrobiche dell'estratto acquoso ottenuto dai bulbi di *Allium sativum* L., l'interesse per tali ricerche è andato sempre più crescendo, vista anche la necessità di disporre di tecniche semplici e a basso costo allo scopo di ridurre i problemi di inquinamento causati dai prodotti di sintesi.

Diverse sono state le specie vegetali i cui estratti acquosi sono stati saggiati *in vitro* nei confronti di vari patogeni (Pariya *et al.*, 1977; Verona e Gheraducci, 1980; Yam *et al.* 1997; Sisti *et al.*, 2003; Pirajno *et al.*, 2004), con risultati di un certo interesse.

Allo scopo di apportare un ulteriore contributo in questo settore della ricerca, si è ritenuto opportuno valutare *in vitro* l'attività antifungina degli estratti acquosi ottenuti da *Inula viscosa* (L.) Aiton e *Pelargonium graveolens* L'Her. ex Ait, due specie vegetali tipiche del bacino del Mediterraneo.

MATERIALI E METODI

I funghi utilizzati nel corso della prova sono stati: *V. dahliae* Kleb. e *F. o. f. sp. lycopersici* (Sacc.) Snyder *et* Hansen isolati da pomodoro, *P. tracheiphila* (Petri) Kanc *et* Ghik isolato da limone, *B. cinerea* Pers. e *P. cactorum* (Leb. *et* Cohn) Schröet. isolato da fragola, *R. solani* Künn isolato da melanzana e *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary isolato da cavolfiore.

Gli estratti acquosi sono stati ottenuti dalla parte epigea fiorita di *I. viscosa* e *P. graveolens* con i seguenti metodi:

- ebollizione di 200 g di parte epigea della pianta in fase di fioritura in 1000 ml di acqua distillata, per 15 min;
- infusione di 250 g di parte epigea della pianta in fase di fioritura in 1000 ml di acqua distillata a 90°C, in continua agitazione per 15 min;
- macerazione di 200 g di essenza parte epigea della pianta in fase di fioritura in 1000 ml di acqua distillata a 5-6°C, per 48 h.

La sterilizzazione degli estratti acquosi è avvenuta mediante filtrazione sottovuoto con membrane dai pori di 0,22 µm di diametro (Millipore, USA). La loro attività antifungina è stata saggiata *in vitro* adottando il metodo messo a punto da Grover e Moore (1961) che consiste nell'aggiungere le sostanze da saggiare ai substrati ottimali di crescita, previamente sterilizzati, quando questi hanno raggiunto la temperatura di 40-45°C.

Per la prova sono state utilizzate piastre Petri del diametro di 90 mm contenenti 25 ml di agar-patata-destrosio (PDA) per *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* e *R. solani*; brodo di carota agarizzato per *P. tracheiphila* e brodo di piselli + V8 (Campbell) agarizzato per *P. cactorum*. A tali substrati sono stati aggiunti gli estratti acquosi alle concentrazioni di 5, 50 e 500 ml/l. Al substrato delle piastre testimoni è stata aggiunta acqua distillata sterile. Per ogni concentrazione e per ogni estratto sono state allestite 5 piastre.

L'inoculazione è stata effettuata ponendo al centro delle piastre un dischetto di agar micelio di 8 mm di diametro, prelevato al margine di colture di 10 giorni di età. Le piastre sono state quindi sigillate con parafilm e incubate in un termostato al buio ad una temperatura di 22±1°C. Dopo 4, 8 e 12 giorni è stata valutata l'efficacia del trattamento calcolando la percentuale di inibizione, prendendo come riferimento la tesi con acqua. La percentuale di inibizione è stata calcolata secondo l'equazione di Zygodlo e collaboratori (1994):

$$I = 100 (C-T)/C^{-1}$$

dove I = inibizione; C = diametro della colonia cresciuta in assenza dell'estratto; T = diametro della colonia cresciuta in presenza dell'estratto.

I dati relativi all'accrescimento sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando il programma Statistica 5.0 e le differenze tra le medie confrontate con il test di Duncan (1955).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Le tabelle 1 e 2 riportano l'effetto inibente degli estratti acquosi ottenuti per ebollizione, infusione e macerazione della parte epigea fiorita di *I. viscosa* e *P. graveolens* sui patogeni saggiati. I valori dell'inibizione sono stati espressi in %. Dalle tabelle si evince che l'estratto ottenuto da *I. viscosa* ha mostrato, su tutti i funghi, una maggiore attività inibente rispetto a quello ottenuto da *P. graveolens*. Solo nel caso di *V. dahliae* l'aggiunta degli estratti acquosi al substrato ha stimolato la crescita delle colonie e la percentuale di inibizione ha pertanto assunto valore negativo.

L'estratto acquoso ottenuto per infusione ed ebollizione di *I. viscosa* (tabella 1), alla dose più alta (500 ml/l), ha inibito del 40 % la crescita delle colonie di *B. cinerea*, intorno al 50-60 % quella di *S. sclerotiorum* e dell'85 % lo sviluppo di *P. cactorum*. Quest'ultimo micete è stato inibito del 63 % anche dall'estratto ottenuto per macerazione, che è risultato meno

efficace anche sugli altri patogeni rispetto agli estratti della stessa pianta ottenuti per ebollizione ed infusione. Solo la dose più elevata dell'estratto della composita ottenuto per infusione ha determinato una riduzione dell'accrescimento di *P. tracheiphila* pari al 51 % .

Indipendentemente dal metodo di estrazione, l'estratto di *I. viscosa* alla dose massima (500 ml/l) è stato in grado di inibire del 50 % la crescita delle colonie di *F. oxysporum*. Analoghe percentuali di inibizione ha conseguito l'estratto ottenuto per infusione e macerazione su *R. solani*.

L'efficacia degli estratti è aumentata in varia misura all'aumentare della dose saggiata.

Ad esclusione di quanto riscontrato per *V. dahliae*, tutte le percentuali di inibizione ottenute in presenza di 500 ml/l dell'estratto di *I. viscosa* si sono differenziate in modo statisticamente significativo ($P \leq 0,01$) dal testimone. Inibizioni significative della crescita dei miceti saggiati sono state osservate anche per quanto concerne la dose pari a 50 ml/l, ad eccezione della sola *B. cinerea*.

Tabella 1 – Effetto inibente degli estratti acquosi ottenuti per ebollizione, infusione e macerazione dalla parte epigea di *Inula viscosa* sui funghi saggiati: (inibizione % rispetto al testimone*)

Metodo di estrazione	Dose (ml/l)	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Phoma tracheiphila</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora cactorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Ebollizione	5	(-)5,0 bdBC**	0 aA	14,8 cB	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	50	(-)16,0 bB	7,6 bB	15,1 cB	0 aA	12,2 bB	0 aA	0 aA
	500	(-)35,7 aA	36,0 eD	48,5 eD	38,0 cC	82,4 eE	24,6 cC	58,8 dD
Infusione	5	(-)6,6 bdBC	16,8 dC	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	50	(-)12,4 bcBC	20,0 dC	17,3 cB	0 aA	40,0 cC	6,1 bB	0 aA
	500	(-)9,5 bdBC	50,9 fE	57,5 fE	40 cC	86,0 fF	53,6 eE	53,4 cC
Macerazione	5	(-)3,8 cdBC	11,7 cE	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	50	(-)7,1bdBC	11,7 cE	4,1 bA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	500	(-)10,0 bdBC	19,6 dC	40,5 dC	31,2 bB	62,6 dD	48,8 dD	24,0 bB
Testimone		0 dC	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA

L'estratto ottenuto da *P. graveolens* (tabella 2), alla dose massima, ha inibito in modo blando, con percentuali di inibizione sempre inferiori al 40 %, la crescita delle colonie di *V. dahliae* e *P. tracheiphila*. Una lieve inibizione è stata riscontrata anche nel caso di *F. oxysporum* e *P. cactorum*. Inibizione nulla è stata rilevata per tutti gli altri funghi saggiati..

Dai risultati forniti da questo studio, è evidente la maggiore attività inibitoria mostrata dall'estratto acquoso di *I. viscosa* ottenuto per ebollizione e per infusione. L'attività tossica dell'estratto acquoso di questa specie, ottenuto per ebollizione, sembra quindi dovuta a metaboliti, che non vengono alterati da elevate temperature, presenti in tale essenza. Tali risultati non concordano con quelli ottenuti precedentemente da Qasem e collaboratori (1995) che mettono in evidenza come le alte temperature siano in grado di ridurre l'attività inibente dell'estratto sui funghi.

Gli estratti acquosi di inula ottenuti per ebollizione ed infusione sono risultati particolarmente efficaci nei confronti di *F. oxysporum*, *P. cactorum* e *S. sclerotiorum*.

Tabella 2 – Effetto inibente degli estratti acquosi ottenuti per ebollizione, infusione e macerazione dalla parte epigea di *Pelargonium graveolens* sui funghi saggiati: (inibizione % rispetto al testimone*)

Metodo di estrazione	Dose (ml/l)	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Phoma tracheiphila</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora cactorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Ebollizione	5	(-)2,4 cdCD**	(-)1,4 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	50	(-)17,6 bB	(-)0,4 abA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	500	2,3 cdCD	31,6 eD	23,0 cB	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
Infusione	5	(-)3,3 cdCD	(-)0,8 abA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	50	(-)27,6 aA	3,1 bA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	500	39,2 fF	33,7 eD	20,7 bB	0 aA	22,7 bB	0 aA	0 aA
Macerazione	5	3,8 dD	22,7 dC	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	50	(-)21,4 cC	14,4 cB	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
	500	23,3 eE	21,4 bC	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
Testimone		0 cdCD	0 abA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA

* A causa del differente tasso di crescita i dati relativi a *V. dahliae*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *P. tracheiphila* si riferiscono al rilievo effettuato 12 gg. dopo l'inseminamento, quelli relativi a *P. cactorum* a 8 gg. e quelli relativi a *B. cinerea*, *R. solani* e *S. sclerotiorum* a 4 gg.

** Lettere uguali nell'ambito di una stessa colonna indicano assenza di differenze statisticamente significative per $P \leq 0,05$ (lettere minuscole) e $P \leq 0,01$ (lettere maiuscole) secondo il test di Duncan (elaborazione effettuata sui dati di accrescimento)

LAVORI CITATI

- Ark P.A., Thompson J.P., 1959. Control of certain disease of plant with antibiotic from garlic (*Allium sativum* L.) *Plant Disease Reporter*, 43 (2), 276-282.
- Duncan D.B., 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Grover R.K., Moore D., 1961. Adaption of *Sclerotinia fructicola* and *Sclerotinia laxa* to higher concentrations of fungicides. *Phytopathology*, 51, 399-401.
- Pariya S., Chakravarty D.K., 1977. Antifungal activity of some indian medicinal plant extract on phytopathogenic fungi. *Phytopathologia mediterranea*, 16, 33-34.
- Pirajno G., Scarito G., Salamone A., 2004. Attività inibente di estratti acquosi di piante sulla crescita di funghi fitopatogeni. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 87-92.
- Qasem J.R., Al Abed A.S., Abu-Blan H.A., 1995. Antifungal activity of clammy inula (*Inula viscosa*) on *Helmintosporium sativum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathologia mediterranea*, 34, 7-14
- Sisti M., Amagliani G., Brandi G., 2003. Antifungal activity of *Brassica oleracea* var. *botrytis* fresh aqueous juice. *Fitoterapia*, 74, 453-458.
- Verona O., Gheraducci V., 1980. Azione delle sostanze diffuse nel mezzo dai semi di *Brassica rapa* L. in fase di imbibizione idrica sullo sviluppo di alcuni micromiceti. *Agricoltura Italiana*, 109, (35 n. s.), 157-165.
- Yam T.S., Saroj S., Hamilton- Miller J.M.T., 1997. Microbiological activity of whole and fractioned crude extracts of tea (*Camelia sinensis*) and tea components. *FEMS Microbiology Letters*, 152, 169-174.
- Zygadlo J.A., Guzman C.A., Grosso N.R., 1994. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal Essential Oil Research*, 6, 617-621.