



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e  
Ambiente

Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di Laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Effetto di molecole naturali su *Botrytis cinerea* in vitro e in vivo. Prospettive di  
sviluppo per fungicidi naturali.

Effect of natural compounds on *Botrytis cinerea* growth in vitro and in vivo.  
Perspectives of development for natural fungicides.

Relatore

Prof. Francesco Favaron

Correlatore

Dott. Marco Lucchetta

Laureando

Riccardo Marcato

Matricola n. 1034753

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

A chi resiste

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1.0 Introduzione</b> .....	<b>7</b>
1.1 Molecole naturali.....	9
1.2 <i>Botrytis cinerea</i> e difesa della vite.....	12
1.3 Fattori di patogenicità, fattori di tolleranza, fattori di resistenza.....	14
<b>2.0 Scopo</b> .....	<b>16</b>
<b>3.0 Materiali e Metodi</b> .....	<b>19</b>
3.1 Materiale Biologico.....	19
3.2 Materiale Chimico.....	20
3.3 Saggio biologico su germinabilità e sulla crescita dei tubetti germinativi.....	20
3.4 Saggio biologico sulla crescita della colonia .....	21
3.5 Saggio di vitalità di <i>B.cinerea</i> con resazurina e pH con <i>4 allil-2-metossifenolo</i> .....	22
3.6 Saggio biologico su vite di trattamenti con alcune molecole naturali .....	23
3.8 Test di fitotossicità su foglia di vite di <i>4 allil-2-metossifenolo</i> .....	24
<b>4.0 Risultati</b> .....	<b>25</b>
4.1 Effetto di molecole naturali su germinabilità e crescita dei tubetti germinativi di <i>B. cinerea</i> .....	25
4.2 Effetto di trattamenti di alcune molecole naturali sulla crescita della colonia di <i>B. cinerea</i>	27
4.3 Saggio di vitalità sulle spore di <i>B. cinerea</i> trattate con <i>4 allil-2-metossifenolo</i> mediante resazurina.....	35
4.4 Effetto di trattamenti su vite con alcune molecole naturali .....	37
4.5 Test di fitotossicità .....	43
<b>5.0 Analisi struttura-attività</b> .....	<b>45</b>
<b>6.0 Discussione</b> .....	<b>48</b>
<b>7.0 Conclusioni e prospettive future</b> .....	<b>50</b>
<b>8.0 Bibliografia</b> .....	<b>52</b>



## RIASSUNTO

*B. cinerea* è il fungo necrotrofo responsabile della muffa grigia della vite. Questo patogeno attacca il grappolo specialmente nella fase fenologica dopo l'invasatura recando danni quantitativi e qualitativi. Quando le condizioni sono favorevoli per lo sviluppo della malattia la lotta chimica risulta necessaria. Tuttavia l'utilizzo di fungicidi di origine sintetica ha ripercussioni negative sull'ambiente e non è ben accettata dall'opinione pubblica. Una strategia alternativa alla lotta con prodotti chimici di origine sintetica è l'utilizzo di pratiche di lotta biologica. Per lotta biologica si intende l'utilizzo di agenti di biocontrollo o l'utilizzo di prodotti naturali. In questo lavoro di tesi è stata accertata la capacità di alcune molecole naturali di inibire lo sviluppo di *B. cinerea* sia in vivo che in vitro. 4 *allil-2-metossifenolo*, 2 *isopropil-5-metilfenolo*, (2*E*)-3-*fenilprop-2-enal*, 2 *metossi-4-propenilfenolo*, 5 *isopropyl-2-metilfenolo*, 2 *idrossi-3-metossibenzaldeide* si sono dimostrati tra i composti più attivi nell'inibire la germinabilità e ridurre la vitalità delle spore di *B. cinerea*. Inoltre è stata dimostrata la capacità di questi metaboliti di inibire la crescita della colonia dei ceppi PM10 e B05.10 di *B. cinerea*. Gli EC50 e gli EC80 calcolati per tali molecole risultano diversi tra i due ceppi. Queste molecole sono metaboliti secondari prodotti da molti vegetali e contenuti in molti oli essenziali. Si caratterizzano per un'elevata lipofilia e bassi valori di *polar surface area*, parametri che determinano una elevata affinità per il comparto fosfolipidico. In vivo sono state testate alcune molecole ed estratti ritenuti più interessanti per vari aspetti. Per esempio, trattamenti con 4 *allil-2-metossifenolo* si sono dimostrati in grado di rallentare fortemente l'infezione di *B. cinerea* sia su foglie che su acini. A concentrazioni di 2 mg/ml di 4 *allil-2-metossifenolo* la protezione delle foglie di vite cv Chardonnay era mantenuta anche fino a 10 giorni dopo l'inoculo. Tuttavia a tale concentrazione il trattamento è risultato moderatamente fitotossico per le foglie. Trattamenti combinati di 4 *allil-2-metossifenolo* e (2*E*)-3-*fenilprop-2-enal* utilizzati a concentrazioni di 0,5 mg/ml si sono dimostrati in grado di rallentare l'infezione e limitare i sintomi di malattia prodotti da *B. cinerea* su foglie di vite cv Chardonnay senza presentare sintomi di fitotossicità. È attualmente in corso una prova in campo che prevede l'utilizzo di una coformulazione tra 4 *allil-2-metossifenolo* e (2*E*)-3-*fenilprop-2-enal* come applicazione antibottrica, sarà analizzata l'eventuale capacità del trattamento proposto di abbattere la carica d'inoculo di *B. cinerea* presente nei tessuti di fiori e grappoli.



## ABSTRACT

*B. cinerea* is a necrotrophic fungus responsible of the gray mold disease that causes quantitative and qualitative damage to vineyard producing bunch rot especially during the ripening. Chemical control is necessary when environmental conditions are favorable to the disease, but the use of synthetic fungicides is not well accepted by community and lead to negative environmental impact. An alternative strategy to chemicals fungicides is the use of biological control practices. These practices include the use of biocontrol agents or the use of natural products. This thesis describes the ability of some natural molecules to inhibit the growth of *B. cinerea*, both in vivo and in vitro. 4 allyl-2-methoxyphenol, 2 isopropyl-5-methylphenol, (2E)-3-phenylprop-2-enal, 2 methoxy-4-propenylphenol, 5 isopropyl-2-methylphenol and 2 hydroxy-3-methoxybenzaldehyde inhibit the germination of *B. cinerea* conidia and reduce the viability of the spores. These compounds inhibit the growth of *B. cinerea* PM10 and B05.10 strains but the EC50 and the EC80 calculated for these molecules are different between the two strains. The essential oil components are secondary metabolites produced by many plants and have an high lipophilic and a low value of polar surface area, that indicate a high affinity for phospholipid compartment of these molecules. In vivo assay the treatment with 4 allyl-2-methoxyphenol protected the grapevine leaves from infection of *B. cinerea*. The treatment with 2 mg/ml of 4 allyl-2-methoxyphenol protected the leaves of cv Chardonnay up to 10 days after inoculation. However, at this concentration the molecule is moderately phytotoxic. Combined treatments of 4 allyl-2-methoxyphenol and (2E)-3-phenylprop-2-enal, at concentrations of 0.5 mg/ml, protected the leaves against *B. cinerea* infection limiting the disease symptoms without phytotoxicity. Currently we are testing the treatment of grapevine in the field with a co-formulate preparation of 4 allyl-2-methoxyphenol and (2E) 3-phenylprop-2-enal to assess the capacity to reduced the *B. cinerea* inoculum.





## 1.0 Introduzione

La protezione delle piante dalle malattie è di norma eseguita ricorrendo alle resistenze genetiche e a mezzi di difesa agronomici e chimici. Il ricorso all'impiego di questi strumenti è destinato a non cambiare radicalmente nel prossimo futuro (Morton et al., 2008). L'idea più diffusa è che sarà comunque indispensabile ricorrere ancora all'utilizzo della protezione chimica delle colture, integrando questa con il controllo biologico e la gestione genetico-agronomica. Dall'importante ma casuale scoperta di Alexis Millardet, che nel 1882 a Bordeaux notò come viti che erano state bagnate con una bluastra miscela "antiladro" di solfato di rame e calce mantenevano le foglie sane durante la stagione, ad oggi, il mercato dei fungicidi ha visto un enorme incremento, di prodotti e di valore. Il mercato mondiale dei fungicidi supera attualmente il valore dei 5 miliardi di euro, ed è secondo solo a quello degli erbicidi (Cools et al., 2012). Fino al 1940 il controllo chimico delle malattie prevedeva l'utilizzo di preparati chimici inorganici, a base di rame, dello zolfo e di alcuni sali di mercurio. Con la rivoluzione verde e i nuovi metodi di coltivazione l'impatto sull'ambiente e sull'agroecosistema si è fortemente modificato causando cambiamenti nelle popolazioni di patogeni e fitofagi e la necessità di modificare le strategie di difesa (Russell et al., 2005). L'esigenza di proteggere le colture dai patogeni per limitare le perdite di produzione era stringente, anche il premio Nobel *Norman Borlaug*, padre della rivoluzione verde, lavorò dal 1942 al 1944, gli inizi della sua carriera, come ricercatore della *DuPont*, incentrando i suoi studi proprio sui fungicidi. Dal 1940 al 1970 venivano introdotte una serie di novità nel panorama degli anticrittogamici, su tutte l'introduzione nel mercato di molecole organiche che rappresentarono un miglioramento notevole rispetto ai fungicidi inorganici precedentemente utilizzati: erano più attivi, meno fitotossici e più facili da preparare e usare. Fu notevole l'apporto di queste famiglie chimiche di sintesi sulla capacità di protezione delle produzioni agricole, tuttavia attualmente gli operatori si confrontano anche sulle conseguenze causate dall'utilizzo massivo di questi prodotti. L'intervento chimico rappresenta ancora oggi il metodo di intervento più efficiente ed efficace per la difesa delle colture, questo però ha effetti collaterali negativi ampiamente dimostrati sull'ambiente e sulla gestione dell'agroecosistema. Il controllo dei patogeni fungini in agricoltura rimane quindi uno dei problemi più importanti a cui si cerca di dare soluzione alternativa. Vari sono i motivi che spingono gli operatori a rivolgersi verso tecniche sostitutive della lotta con fungicidi di sintesi, quali per esempio il biocontrollo. Inoltre il

legislatore, portavoce delle esigenze dell'opinione pubblica, sta orientando la difesa delle colture verso un tipo di approccio "integrato" (Direttiva 2009/128/CE) che prevede la riduzione degli input di prodotti di sintesi. La difesa integrata può essere anche considerata un'opportunità per incrementare lo sviluppo di mezzi di protezione di tipo biologico che può rispondere alle pressanti richieste della Grande Distribuzione Organizzata (GDO). La riduzione dell'impiego dei prodotti fitosanitari di sintesi in agricoltura è quindi un obiettivo condiviso tra i consumatori e i distributori. Anche se il profilo tossicologico ed ecotossicologico di molti nuovi prodotti di sintesi non desta preoccupazione, la popolazione in genere percepisce un forte legame tra l'uso di questi e l'inquinamento. Il problema di trovare un'alternativa ai prodotti di sintesi è particolarmente avvertito in quelle aree dove c'è una elevata e stretta convivenza tra popolazione e agricoltura. Secondo un recente rapporto dell'EFSA (Autorità Europea Per La Sicurezza Alimentare) sui residui degli agrofarmaci negli alimenti oltre il 97% dei campioni conteneva livelli di residui entro i limiti ammissibili. L'EFSA pertanto, valutando l'esposizione umana attraverso la dieta, ha sancito che i residui chimici presenti negli alimenti non costituiscono un rischio a lungo termine per la salute umana. Già precedentemente, nel caso specifico della difesa del vigneto, alcuni autori avevano dimostrato come il corretto utilizzo di antiparassitari (prodotti applicati a ridosso della raccolta o addirittura in post-raccolta) sortisca un risultato complessivamente positivo in termini di residui, dimostratisi ampiamente sotto i limiti di legge (Delaiti et al., 2008; Del Fabro et al., 2013). Tuttavia, diversi sono i progetti di difesa del vigneto che si prefiggono l'obiettivo "residuo zero". Un altro aspetto molto dibattuto in questo periodo è quello dell'impronta carbonica, specialmente in viticoltura e frutticoltura, dove l'utilizzo di fertilizzanti e agrofarmaci di sintesi contribuisce notevolmente all'emissioni di CO<sub>2</sub> eq. durante tutta la fase di produzione. (Untiedt et al., 2004; Lamastra et al., 2012). Tra i vari metodi offerti oggi per perseguire l'obiettivo di riduzione degli input di prodotti fitosanitari di sintesi si ricordano: nuovi metodi per la confusione sessuale dei fitofagi, mezzi meccanici innovativi per la distribuzione degli agro farmaci e infine riduzione dei prodotti di sintesi tramite l'utilizzo di biofungicidi. In Europa per biofungicida si intende un prodotto fitosanitario ad azione fungicida basato su un microorganismo o una sostanza naturale, tra questi quelli a base microbiologica rappresentano la maggioranza dei prodotti ad oggi registrati, mentre la comunità scientifica sta intensificando l'interesse verso la sperimentazione di sostanze naturali. Negli Stati Uniti si includono nella categoria dei biofungicidi anche i così detti *plant-incorporated protectants*, cioè sostanze

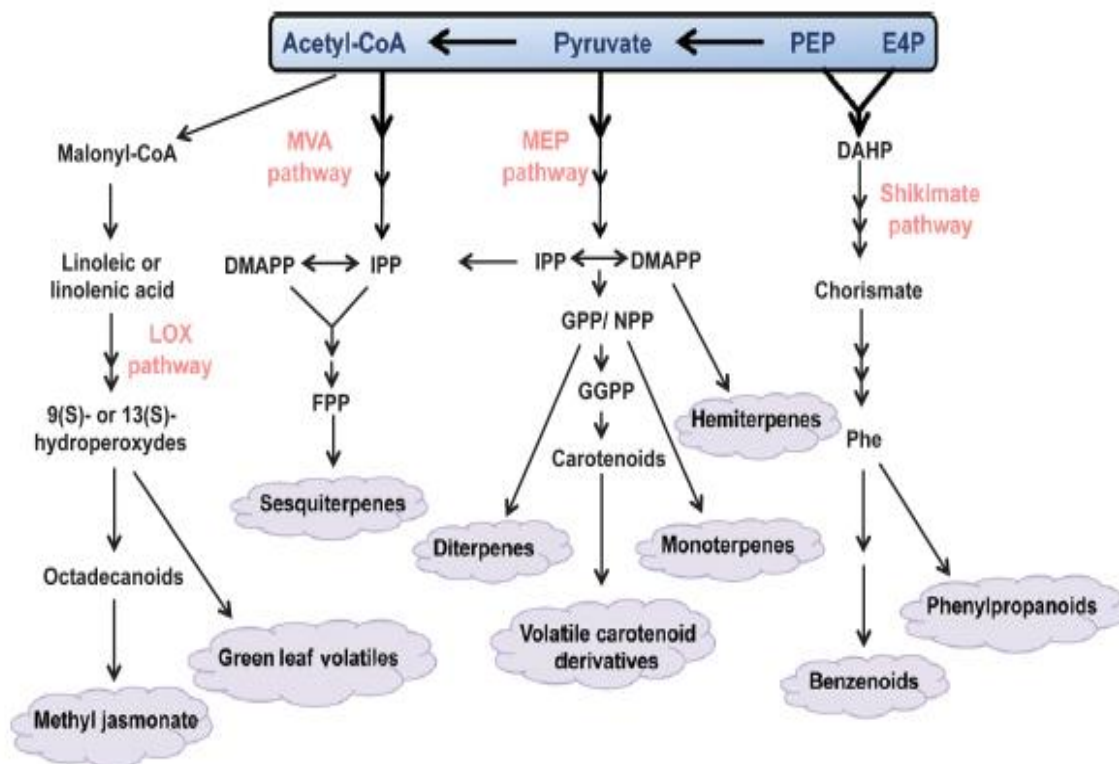
attive sintetizzate naturalmente dalle piante la cui produzione può essere aumentata in piante geneticamente modificate (Pertot et al., 2013). L'aumento dell'interesse verso le sostanze naturali è dovuto anche al recente progresso delle scienze “-omiche” che permettono e permetteranno l'isolamento di nuove molecole ad oggi parzialmente sconosciute, identificando con precisione anche i pathway di sintesi e la loro regolazione, finora completamente sconosciuti (Dudareva et al., 2012). Questi elementi sono di notevole interesse per l'industria biotecnologica, farmaceutica e agrofarmaceutica (Duke et al., 2000; Cragg et al., 2013; Ma et al., 2013).

## 1.1 Molecole naturali

Come già ricordato esiste l'esigenza comune di consegnare al consumatore un'immagine più “green&natural” della filiera di produzione, da spendere come esternalità positiva nel presente e futuro mercato. Una delle possibilità di coniugare entrambe le esigenze ricordate è quella del ricorso all'utilizzo di molecole naturali, estraibili da matrici vegetali, principalmente presenti negli oli essenziali. Gli oli essenziali sono oli liquidi, aromatici, ottenuti da diverse parti anatomiche di piante attraverso tecniche quali pigiatura, fermentazione, distillazione, *enfleurage* ed estrazioni con solventi organici. Le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali sono anticamente conosciute, i primi accertamenti scientifici di tali caratteristiche si hanno a partire degli anni 50 (Guenther et al., 1948; Boyle et al., 1955). L'aumento dell'interesse da parte del mercato ha portato negli ultimi anni ad incrementare gli sforzi della comunità scientifica nella ricerca riguardanti tali sostanze. Si sono individuate nel tempo caratteristiche importanti degli oli essenziali, addirittura dimostrando anche proprietà antivirali (Bishop et al., 2005; Xu et al., 2012) oltre che alle note attività antimicrobiche, antiossidanti e antiinfiammatorie (Tabella 4). Gli oli essenziali a temperatura ambiente si trovano in uno stato liquido, hanno bisogno di essere stoccati in ambienti adatti, in contenitori ermetici e al buio, per evitare cambiamenti composizionali causati da processi fotolitici e termolitici. Analisi gas cromatografiche e di spettrometria di massa hanno permesso di caratterizzare i maggiori componenti degli oli essenziali. Questi contengono sostanze volatili, definite *volatile organic compounds (VOCs)*, molecole caratterizzate da un'alta lipofilia e da un'alta pressione di vapore. Ogni olio essenziale tipicamente si caratterizza per uno o più componenti presenti maggiormente, altri sono rilevati in traccia. Non c'è dubbio che la maggior parte delle proprietà antimicrobiche siano fornite dai composti fenolici presenti

negli estratti (Cosentino et al., 1999), sebbene esistono anche altre molecole interessanti quali saponine, alcaloidi e sesquiterpeni. I VOCs derivano dal metabolismo secondario (Figura 1) delle piante, possono essere formate attraverso quattro diverse pathway di sintesi (Dudareva et al., 2012): la pathway del shikimato/fenilalanina (Benzenoidi, Fenilpropanoidi), la pathway dell'acido mevalonico (sesquiterpeni), la pathway del metileritritol fosfato (diterpeni, emiterpeni, monoterpeni e derivati volatili dei carotenoidi), la pathway della lipossigenasi (ossilipine).

Figura 1. Metabolismo secondario delle piante e pathway di produzione dei VOCs (da Dudareva et al., 2012)



Alcuni VOCs hanno anche un ruolo ormonale e regolativo che può suggerire un loro possibile utilizzo quali fattori capaci di interferire con i meccanismi di quorum-sensing di funghi e batteri. A titolo di esempio per questa ipotesi si ricorda il ruolo cruciale delle ossilipine nel determinare la produzione di aflatossine in *Aspergillus flavus* (Affeldt et al., 2012). Molti studi sono rivolti alla determinazione dell'attività biologica di tale molecole, saggiandole il più delle volte studiate come sostanze antibatteriche, tuttavia i loro targets e i meccanismi d'azione sono ancora poco conosciuti. Quest'ultimi sembrano essere

condivisi tra organismi filogeneticamente differenti. Un'importante caratteristica è l'idrofobicità di queste sostanze causata da un'elevata lipofilia che permette loro il legame con i lipidi delle membrane cellulare alterando fluidità e permeabilità di questa e l'attività delle proteine in essa contenute (Gill & Holley, 2006; Patil et al., 2013). Tuttavia molti studi hanno dimostrato che alcuni VOCs hanno anche altre attività inibitorie, a carico di enzimi vitali o indispensabili per la patogenesi (Tabella 4). Per esempio il 3-*Fenilprop-2-enal* inibisce l'attività amminoacida decarbossilasica di *Enterobacter aerogene* (Wendakoon & Sakaguchi, 1995). Ancora, si è dimostrato come alcune molecole naturali abbiano un effetto antimicrobico indiretto, come inibitori della produzione di tossine, sia batteriche (Ultee & Smid, 2001) che fungine (Paster et al., 1988). È ipotizzabile inoltre l'esistenza di molecole naturali che sarebbero in grado di inibire determinati fattori di virulenza dei patogeni. In questo caso andrebbero ricercate molecole in grado di ostacolare l'azione del microorganismo in vivo, e non necessariamente in vitro. Già è nota l'esistenza di proteine inibitrici di fattori di virulenza, per esempio inibitori di poligalatturonasi fungine (Favaron, et al., 1994; Favaron, et al., 1997). L'individuazione di tali proteine ha dato origine a interessanti manipolazioni genetiche: sovraesprimendo costitutivamente i geni codificanti per gli inibitori si è riusciti ad aumentare la resistenza di alcune piante a patogeni necrotrofi (Joubert et al., 2005; Janni et al., 2008). Ad alcune tra le molecole testate in questo lavoro di tesi è riconosciuta e accertata la capacità inibitoria nei confronti di lipasi di organismi diversi (Karu et al., 2007; Xu et al., 2005). Nonostante il grande interesse nello sviluppo di tali prodotti in ambito del "crop protection" non va dimenticato che tali molecole hanno anche un'alta fitotossicità (Isman et al., 2000) e alcune anche una tossicità acuta elevata nei confronti di organismi non target (Tabella 1). Queste ultime proprietà richiedono una seria attenzione nello sviluppo di prodotti a base di molecole naturali.

**Tabella 1. Tossicità acuta di alcune delle molecole testate nel presente lavoro(catalogo Sigma-Ardlich)**

NOME IUPAC	DL50*
<i>2 metossi-4-propenilfenolo</i>	328 mg·kg-1
<i>4 allil-2-metossifenolo</i>	1930 mg kg-1
<i>2 isopropil-5-metilfenolo</i>	980 mg Kg-1
<i>5 isopropil-2-metilfenolo</i>	810 mg Kg-1
<i>2 idrossi-3-metossibenzaldeide</i>	1590 mg Kg-1

\*mg di molecola per kg di peso vivo dell'animale (ratto).

## 1.2 *Botrytis cinerea* e difesa della vite

Il genere *Botrytis* è uno fra i primi descritti nella storia della micologia. Il botanico e micologo tedesco de Bary scoprì nel 1866 la connessione metagenetica tra *B. cinerea* e *Botryotinia funkliana* (De Bary) Whetzel che rappresenta lo stadio sessuato del fungo. *B. cinerea* appartiene al phylum degli *Ascomycota*, classe *Leotiomycetes*, Ordine *Helotiales*, Famiglia *Sclerotiniaceae*. *B. cinerea* è un parassita ubiquitario e polifago data la possibilità di alterare periodi di vita saprofitaria con altri di comportamento parassitario o emiparassitario. È caratterizzata da micelio robusto, ialino o leggermente grigio, ramificato, da cui si dipartono lunghi conidiofori scuri con cellula basale globosa, ramificato anch'esso nella regione terminale fino a dare cellule conidiogene rigonfiate in ampolle clavate producenti conidi lisci di dimensioni 11x11-15 µm. I conidi sono non-settati, ovoidali, inseriti lateralmente e apicalmente su fini denticolazioni. Il fungo può presentarsi anche sotto forma di sclerozio (di diametro da 1 a 5 mm), di colore nero e di forma irregolare. Lo sclerozio costituisce la forma più durevole di sopravvivenza del patogeno e di rado può differenziare gli apotecii con ascospore. Più comunemente dopo lo svernamento compaiono sulla superficie degli sclerozii conidiofori con conidi. *B. cinerea* è uno dei funghi maggiormente polifagi, capace di attaccare più di 200 ospiti (Agrios, 1964). Tra gli ospiti più soggetti alla malattia vi è sicuramente la vite. Su vite i sintomi possono verificarsi sulle foglie, sui giovani tralci e sul grappolo (Tabella 2), tutti questi organi, se le condizioni ambientali lo permettono, possono ricoprirsi di fruttificazioni (conidiofori) che danno origine alla classica muffa grigia.

**Tabella 2. Sintomi di attacco di *B.cinerea* su vite (modificato da Matta et al., 1996).**

<u>Parti colpite</u>	<u>Descrizione dei sintomi</u>	<u>Frequenza</u>
Foglie	Macchie dapprima cloritiche, poi bruno cuoio, generalmente isolate ma possono anche invadere l'intera lamina che seccando si ripiega verso terra.	++
Tralci	Attacchi apicali determinanti l'imbrunimento e un disseccamento delle foglioline e di buona parte del germoglio, nei tralci più vecchi presenza di tacche brune sui nodi e internodi.	+
Grappolo	Macchie brune su acini in cultivar di uva bianca, macchie livide su quelle a fiocine nera, più o meno profonde a seconda dell'andamento stagionale.	+++

L'infezione avviene soprattutto grazie ai conidi, i quali sono diffusi dal vento e, sebbene siano idrofobici, richiedono acqua libera per germinare. *B. cinerea* sverna nel suolo, come micelio o come sclerozio. Lo sviluppo del patogeno (e quindi della malattia) è possibile entro limiti termici molto ampi (5-31 °C). Questa caratteristica fa sì che *B. cinerea* non sia un problema solo in campo ma anche in fase di post-raccolta. L'optimum di crescita del fungo è compreso tra 21 e 25 °C. Una UR > 94 % è considerata ottimale per la sporulazione. Un metodo molto usato per individuare il periodo di inizio dello sviluppo del patogeno, si basa su una metodologia francese fondata sull'ipotesi che Botrite inizi ad infettare in campo solo quando si verificano condizioni climatiche che prevedono 15 ore di bagnatura e una temperatura media di 15°C (regola dei 15/15). Oltre che sul patogeno le condizioni climatiche influenzano anche la sensibilità della pianta. Tutti quei fenomeni che favoriscono il lussureggiamento aumentano il rischio di infezione. Più precisamente i fattori che favoriscono l'insediamento e lo sviluppo della malattia in campo sono: l'elevata umidità del terreno e dell'area di coltivazione (impianti in pianura e a fondo valle, eccesso di vegetazione), il minor spessore delle bucce (dovuto a eccessive concimazioni azotate, eccessive irrigazioni e dal prevalente impiego di antiperonosporici acupirici), presenza di ferite (causate da fattori abiotici e biotici). Oltre alle tecniche agronomiche adottabili come prevenzione contro gli attacchi di *B. cinerea* esistono ovviamente anche tecniche di lotta chimica. Normalmente i rischi maggiori d'infezione corrispondono alle fasi fenologiche di pre-chiusura grappolo, fase nella quale i residui floreali ancora presenti sui grappoli costituiscono il substrato ideale per la conservazione dell'inoculo. Altrettanto sensibile è la fase compresa fra l'invaiaitura e la vendemmia, in quanto gli acini in fase avanzata della maturazione sono particolarmente sensibili al patogeno, nonostante aumentino, a partire dall'invaiaitura, la sintesi di *PR-proteins* (Derckel et al., 1998). Queste due fasi fenologiche corrispondono ai momenti chiave per l'utilizzo di fungicidi antibotritici. Per varietà di vite molto sensibili alla muffa grigia, l'impiego dei fungicidi è spesso necessario. Tuttavia va considerato che non sempre i fungicidi testati sono in grado di contenere l'infezione, specialmente con un'alta pressione di malattia ed altri stress biotici e abiotici contemporanei. È necessario perciò ribadire che per garantire un'efficace controllo della botrite della vite non è possibile affidarsi esclusivamente alla lotta chimica, o ancor di più ad agenti di biocontrollo, ma risulta di estrema importanza l'applicazione dell'approccio integrato, garantendo nella generalità dei casi una buona qualità delle uve con un minimo impegno nella cernita durante la vendemmia, anche nelle stagioni più difficili. I danni di *B. cinerea* sono dovuti ai

maggiori costi per la monda degli acini colpiti, alla diminuzione di produzione, al deprezzamento delle uve da tavola per il danno estetico ma soprattutto agli effetti sulla qualità dei mosti e dei vini. Uno dei maggiori effetti negativi è rappresentato dal consumo degli zuccheri dell'uva, in particolare glucosio, dalla cui ossidazione si ottengono soprattutto glicerolo, in ambiente anossico (prime fasi di infezione) e acido gluconico in ambiente ossidativo (evasione del fungo). Dalla degradazione degli zuccheri si formano una serie di polioli di consistenza mucillaginosa con la formazione di microscopici filamenti che intorbidiscono il mosto. Uve “*botritizzate*” producono mosti con quantità elevate di acido galatturonico e meso-galattarico, derivanti da una accelerata degradazione delle sostanze pectiche contenute nella buccia. Questi complicano notevolmente i processi di chiarificazione. In mosti di uve “*botritizzate*” è accentuato il fenomeno dell'ossidazione polifenolica causata dalle polifenolossidasi (di cui la laccasi è l'enzima più noto) che determinano l'ossidazione dei polifenoli e di conseguenza l'intorbidamento del vino bianco o la perdita del patrimonio antocianico di quello rosso. Inoltre il metabolismo del fungo porta all'idrolisi dei glicosidi terpenici, all'ossidazione dei terpeni liberi e alla formazione di composti di sapore non gradito, come sotolone, vari alcoli superiori, metionina e lattoni. Un aspetto non ancora del tutto studiato riguarda il metabolismo secondario del fungo e la capacità di questo di produrre micotossine che potrebbero avere un effetto tossico nei confronti dell'uomo.

### **1.3 Fattori di patogenicità, fattori di tolleranza, fattori di resistenza**

La penetrazione del fungo *B.cinerea* nei tessuti dell'ospite può essere sia attiva che passiva, quest'ultima più rara. La penetrazione attiva è promossa dall'attività di cutinasi e lipasi. Questi sono enzimi importanti nei primi stadi di attacco, se inibiti la penetrazione attiva viene impedita (Commenil et al., 1997, Reis et al., 2005). Questi enzimi intervengono anche nella penetrazione dei tessuti dell'acino d'uva (Commenil et al., 1999). L'importanza come fattori di virulenza delle lipasi è stata accertata anche in altri patogeni necrotrofi come *F. graminearum* (Voigt et al., 2005). In questo fungo, come in *B.cinerea*, lipasi e cutinasi risultano ridondanti nel genoma. Lipasi e cutinasi risultano enzimi importanti anche in funghi biotrofi come le ruggini, nel genoma di questi organismi è avvenuta un'espansione di tali famiglie geniche nel corso dell'evoluzione e questi geni risultano tra quelli maggiormente espressi in pianta. L'espressione di una



cutinasi di *B. cinerea* (*cutB*) risulta strettamente associata alla presenza di lipidi vegetali (Leroch et al., 2013), dal resto cutina e cere vegetali rappresentano substrati con i quali il patogeno entra in contatto nelle fasi iniziali dell'infezione. Indispensabili per la virulenza di *B. cinerea* sono, inoltre, enzimi che codificano per la produzione e la degradazione dei ROS, per la sintesi di acido ossalico, per la degradazione della parete cellulare, in particolare per la componente ricca di pectina. Numerosi cluster di geni sono coinvolti nella sintesi di metaboliti secondari, incluso le micotossine. La regolazione della produzione di micotossine in *B. cinerea* è affidata a importanti geni regolatori anche di altre funzioni vitali come BcAtf1 (Temme et al., 2012) che codifica per un fattore di trascrizione b-ZIP, presente anche in altre specie di funghi patogeni. L'acquisizione di resistenza ai fungicidi si è spesso verificata in *B. cinerea*. Per questo motivo risulta importante la scelta di strategie di difesa che prevedano l'alternanza di sostanze attive a diverso meccanismo d'azione (Tabella 3). Vari ceppi isolati in campo sono stati caratterizzati come fenotipi resistenti a principi attivi quali pyrimethanil, fludioxonil, fenexamid, boscalid. L'approccio biologico (saggi di crescita) associato all'analisi delle variazioni di sequenza di geni che codificano per le proteine bersaglio ha permesso di chiarire i meccanismi con cui si sono presentati i casi di resistenza. Inoltre *B. cinerea* presenta spesso fenomeni di tolleranza a sostanze fungitossiche, sintetiche o naturali. La tolleranza è data da una serie di meccanismi messi in atto dal fungo per tollerare la presenza di una molecola tossica nel substrato di crescita, si manifesta con un'espressione anomala e differenziata di particolari classi di geni: geni di "detossificazione" (es. citocromo P450) e geni di codificanti trasportatori di membrana. I trasportatori di membrana sono proteine associate alle membrane cellulari presenti in tutti gli organismi. Il loro ruolo è quello di trasporto di molecole a basso peso molecolare, nei patogeni hanno il ruolo di secrezione di metaboliti secondari e di metaboliti tossici per il patogeno stesso. Si dividono in due grandi gruppi: "ATP Binding cassette transporters" (ABCtransporters) e "Major Facilitator Superfamily" (MSF). Gli ABC a differenza dei MSF vengono attivati dall'idrolisi dell'ATP. ABC e MSF sono ridondanti nel genoma di *B. cinerea*, questi trasportatori servono al fungo specialmente per detossificare un eventuale presenza nel citosol di molecole tossiche sia di origine naturale che sintetica (fungicidi). Infatti sia sostanze xenobiotiche naturali, per esempio resveratrolo, che sintetiche provocano una sovraespressione dei geni che codificano per questi trasportatori in *B. cinerea* (Schoonbeek et al., 2001 e 2003) e in altri funghi patogeni come *Septoria tritici* (Zwiers et al., 2000). Ceppi isolati in campo che si caratterizzano per una over-

espressione di trasportato di membrana presentano fenotipi più tolleranti a fungicidi con diverso meccanismo d'azione (Leroux et al., 2013).

**Tabella 3. Meccanismo d'azione delle sostanze attive antibotritiche attualmente registrate (fonte FRAC – Fungicide Resistance Action Committe)**

<u>Meccanismo d'azione</u>	<u>Codice e sito target</u>	<u>Gruppo chimico</u>	<u>Sostanza attiva</u>
Respirazione	Succinato deidrogenasi	Piridino-carbossamidi	Boscalid
Sintesi degli amminoacidi e delle proteine	Biosintesi della metionina	Anilino-pirimidine	Ciprodinil Mepanipirim pirimethanil
Traduzione del segnale	Trasduzione del segnale omolitico MAP/istidino-chinasi	fenilpirroli	fludioxonil
Biosintesi degli steroli nelle membrane	De metilazione C4 della 3-cheto-riduttasi	Idrossi-anilidi	fenexamid

## 2.0 Scopo

*B. cinerea* è un fungo necrotrofo che causa danni quantitativi e qualitativi attaccando nelle stagioni più difficili specialmente il grappolo di vite che manifesta una crescente sensibilità alla malattia fino alla vendemmia. Una possibile risorsa per la lotta biologica può essere data dall'utilizzo di molecole naturali, metaboliti secondari di piante e altri organismi, usate per la difesa chimica diretta delle colture. L'obbiettivo del presente lavoro di tesi è quello di individuare tra alcuni principi attivi, naturalmente sintetizzati da molti vegetali (Tabella 4), le molecole più efficaci nell'inibire lo sviluppo di *B. cinerea*. Gli screening e i saggi di crescita sono stati condotti sia su mezzo liquido che su mezzo solido, valutando le molecole con un effetto inibitorio più marcato sulla germinazione delle spore e sulla crescita dei tubetti germinativi di *B. cinerea*. Dopo aver studiato le funzione dose-risposta dei ceppi B05.10 e PM10 è stato studiato l'effetto di rallentamento dell'infezione su foglie e acini di vite. Le molecole più interessanti potranno essere utilizzate in una sperimentazione in campo.

**Tabella 4. Molecole naturali utilizzate nel presente lavoro e loro caratteristiche di attività biologica.**

Nome IUPAC	Nome comune	Specie	Attività	Target enzimatici (da pubCHEM database)	Attività antimicrobica	Reference
Acido 3,4-diidrossibenzoico	Acido Protocatecuico	<i>Boswellia dalzielii</i>	Antiossidante	Lipoxygenase DNA polymerase iota e beta Lysine demethylase Lysosomal glucosidase Phosphopantetheinyl transferase Carbonic anhydrase Anthrax lethal factor Matrix metalloproteinase	<i>M. tuberculosis</i>	J. Nat. Prod., (2005) 68:9:1318
					<i>B. subtilis</i>	Bioorg. Med. Chem., (2011) 19:17:5225
					<i>S. aureus</i>	
					<i>C. albicans</i>	
					<i>E. coli</i>	
<i>P. aeruginosa</i>						
2 idrossi-3-metossibenaldeide	Vanillina	<i>Vanilla planifolia</i>	Antiossidante	Catechol Omethyltransferase Aldehyde oxidase Xanthine dehydrogenase Aldehyde dehydrogenase DNA polymerase iota	<i>E. coli</i>	Fitzgerald D.J. et al., 2004)
					<i>L. plantarum</i>	
					<i>L. innocua</i>	
					<i>A.flavus.</i>	López-Malo et al., 2005
					<i>B. cinerea</i>	Rattanapitorn P., 2006
<i>F. verticillioides</i>	Dambolena J.S. et al., 2012					
Acido p-coumarico	-	More	Antiossidante	Carbonic anhydrase Tyrosinase	<i>A.flavus</i>	Pester N., et al., 2008
Acido caffeico	-	More	Antiossidante	Aldehyde dehydrogenase Lysine-specific demethylase Thioredoxin reductase Cytochrome P450 Lysosomal alpha-glucosidase hydroxyprostaglandin dehydrogenase lipase	<i>A. flavus</i>	Pester N., et al., 2008
Acido 3,4 dimetossibennoico	Acido Veratrico	<i>Schoenocaulon officinale</i> <i>Veratrum album</i>	Neurotossico	-	-	-
Acido 4-idrossibennoico	Acido salicilico	<i>Cocos nucifera</i> <i>Euterpe oleracea</i>	Antiinfiammatorio , elicitore	Aldehyde dehydrogenase hydroxyprostaglandin dehydrogenase Cytochrome P450	<i>Staphylococcus</i>	Jeong-Yong C. et al., 2005
					<i>Bacillus</i>	
					<i>S. mutans</i>	
					<i>P. syringe</i>	
					<i>E. carotovora</i>	
					<i>X. campestris</i>	
					<i>Agrobacterium</i>	
<i>C. albicans</i>						
4 allil-2-metossifenolo	Eugenolo	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Antiossidante	Aldehyde dehydrogenase Lipoxygenase Carbonic anhydrase Cytochrome P450 Cicloxygenase	<i>E. coli</i>	Patil S.D. et al., 2013
					<i>B. cinerea</i>	Wang C et. al, 2010
					<i>F. verticillioides</i>	Dambolena J.S. et al., 2012
2 metossi-4-propenilfenolo	Isoeugenolo	<i>Cananga odorata</i>	-	-	<i>C. albicans</i>	Kubo I. et al., 1993
					<i>S. cerevisiae</i>	
					<i>M. furfur</i>	
					<i>F. verticillioides</i>	Dambolena J.S. et al., 2012

5 isopropil-2-metilfenolo	Carvacolo	<i>Origanum vulgare</i>	Antiinfiammatorio	Cicloossigenase UDP-glucuronosyltransferase	<i>E. coli</i>	Patil S.D. et al., 2013
					<i>B. cereus</i>	Di Pasqua R. et al., 2007
					<i>P. aeruginosa</i>	
					<i>F. veticillioides</i>	Dambolena J.S. et al., 2012
					<i>B. cinerea</i>	Daferera D. et al., 2003
					<i>C. michiganensis</i>	
2 isopropil-5-metilfenolo	Timolo	<i>Thymus vulgaris</i>	Anaesthetico Antiossidante Antitumorale	Luciferin 4-monooxygenase Cicloossigenase UDP-glucuronosyltransferase	<i>Candida albicans</i>	Braga PC et al., 2007
					<i>L.monocytogenes</i>	Khalil et al., 2006
					<i>B. subtilis</i>	
					<i>F. veticillioides</i>	Dambolena J.S. et al., 2012
(2E)-3-fenilprop-2-enal	Cinnamaldehyde	<i>Cinnamomum verum</i>	Antimicrobico Antidiabetico Antimutageno	Tyrosinase Xanthine dehydrogenase	<i>L. betulina</i>	Tsair-Bor Y. Et al., 2006
					<i>L. sulphureus</i>	
2 metossifenolo	Guaicacolo	More	Espettore Anestetico	Tyrosinase UDPglucuronosyltransferase	-	-

## 3.0 Materiali e Metodi

### 3.1 Materiale Biologico

I ceppi PM10 e B05.10 di *B. cinerea* erano allevate in piastre contenenti 12 ml di PDA al buio a 25 °C fino al riempimento di tutta la superficie delle piastre. Con lo scopo di facilitare la conidiogenesi le piastre venivano quindi poste a 15°C con fotoperiodo naturale. Per gli inoculi di piastre, foglie e acini i tondelli di micelio in attiva crescita erano prelevati dal bordo esterno della colonia. Le spore per gli inoculi erano diluite in 4 ml di H<sub>2</sub>O sterile mediante lavaggio delle piastre. La concentrazione delle spore veniva determinata con la cella di Thoma e aliquote di spore venivano sospese in acqua sterile con 10% v/v di glicerolo, quindi conservate a -80 °C. Colture liquide di *B. cinerea* erano ottenute sul mezzo minerale Czapek Dox (Tabella 5) contenente glucosio al 2 % (w/v). Rispetto al protocollo classico è stato usato MgGlicerolfosfato e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> invece di MgSO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con lo scopo di ridurre la precipitazione dei sali. Il materiale vegetale utilizzato per i test in vivo è stato acquistato, uva cv. *Italia* o prelevato da colture in campo, come nel caso di foglie di vite cv. *Chardonnay* e grappoli di vite di cv. *Cabernet* e *Merlot*.

**Tabella 5** Composizione del substrato salino Czapek Dox modificato in cui sono state sospese le spore. (Basic Plant pathology Methods – Dhinagra, Sinclair 1995 n.38)

Elementi chimici	Cz 1X 1 litro	Cz 2X 100 ml
NaNO <sub>3</sub>	4g	0,4g
KCl	0,5g	0,1g
MgGlicerofosfato	0,5g	0,1g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,35g	0,07g
FeSO <sub>4</sub>	0,01g	0,002g
ZnSO <sub>4</sub> 1%	1ml	0,2ml
CuSO <sub>4</sub> 0,5%		
Glucosio	2g	0,4g

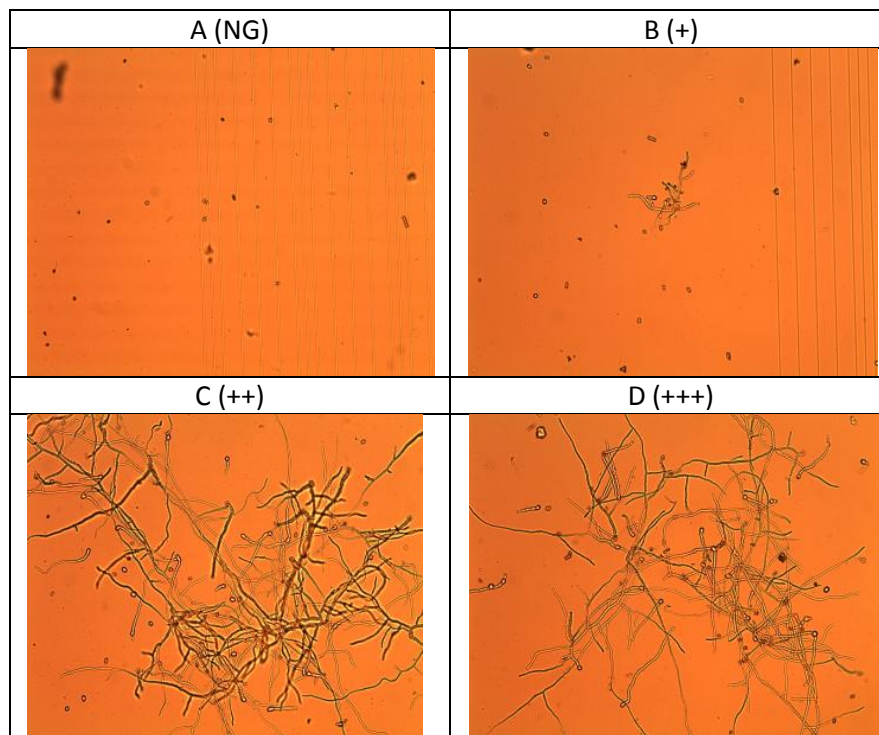
## 3.2 Materiale Chimico

Le molecole testate erano *3-4 Acido diidrossibenzoico* (Merck Schuchardt OHG), *2 idrossi-3-metossibenzaldeide* (Sigma-Aldrich), *Acido coumarico* (Sigma-Aldrich), *Acido caffeico* (Sigma-Aldrich), *Acido 3,4 dimetossibennoico* (Sigma-Aldrich), *Acido 4 idrossibennoico* (Sigma-Aldrich), *4 allil-2-metossifenolo* (Sigma-Aldrich), *2 metossi-4-propenilfenolo* (Sigma-Aldrich), *5 isopropil-2-Metilfenolo* (Sigma-Aldrich), *2 isopropol-5-metilfenol* (Sigma-Aldrich), *(2E)-3-fenilprop-2-enal* (Sigma-Aldrich), *2-metossifenolo* (Sigma-Aldrich).

## 3.3 Saggio biologico su germinabilità e sulla crescita dei tubetti germinativi

L'attività delle molecole naturali sulla germinazione di *B.cinerea* ceppo PM10 è stata saggiata in pozzetti di piastre E.L.I.S.A. contenenti 200 µl di mezzo salino Czapek Dox contenente glucosio al 2% w/v e  $10^6$  conidi/ml. Le molecole sono state somministrate a concentrazioni di 1,5, 1 e 0,5 mg/ml. Le piastre sono state mantenute ad una temperatura di 25 °C. Il controllo non trattato non conteneva alcuna molecola. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte. La determinazione della germinazione e della crescita dei tubetti germinativi è stata eseguita dopo 24 ore mediante microscopio LABORLUX 12 (Zeiss) osservando 10-12 diversi campi ottici a 250 ingrandimenti per un totale di 100-120 spore per ciascun trattamento. Alcune osservazioni sono state eseguite fino a 72 ore dopo l'inoculo. La germinabilità e la crescita dei tubetti germinativi delle spore trattate è stata confrontata con quella osservata nei controlli non trattati. Valutando con il simbolo “+++” una germinabilità e una crescita dei tubetti germinativi comparabile al controllo (Figura 2, D); con il simbolo “++” (Figura 2, C) una germinabilità comparabile al controllo ma una crescita e una ramificazione dei tubetti germinativi minore; con il simbolo “+” (Figura 2, B) una germinabilità e una crescita visibilmente inferiore rispetto al controllo.

**Figura 2** Foto A, spore di *B. cinerea* non germinate (NG;-), Foto B, spore con una germinabilità e una crescita visibilmente inferiore rispetto al controllo (+), Foto C, spore con germinabilità comparabile al controllo ma una crescita e ramificazione dei tubetti germinativi più bassa (++), Foto D, spore con germinabilità e crescita comparabile a quella del controllo (+++).



### 3.4 Saggio biologico sulla crescita della colonia

Le molecole che davano un effetto inibitorio più elevato (*2 idorssi-3-metossibenzaldeide*, *4 allil-2-metossifenolo*, *2 metossi-4-propenylfenolol*, *2 isoporopil-5-metilfenolo*, *(2E)-3-fenilprop-2-enal*, *2 idrossi-3-metossibenzaldeide*) nel test sulla germinabilità e sulla crescita (Paragrafo 4.1) sono state saggate valutando la crescita miceliare su substrato solido (PDA). Le piastre contenenti diverse concentrazioni delle molecole (10, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/ml) sono state inoculate con un tondello di micelio di diametro 0,5 cm. La prova è stata condotta sia con il ceppo B05.10 che PM10 di *B. cinerea*. Il volume finale di substrato era di 10 ml. Le misurazioni del diametro sono state condotte dopo 40 ore dall'inoculo. I dati ottenuti sono stati espressi come percentuale di crescita rispetto ai controlli non trattati. Durante l'esperimento le piastre sono state mantenute al buio a 25 °C. Le prove sono state ripetute 3 volte. I dati sulla crescita miceliare sono stati convertiti in *logit* per stimare l'EC50 e l'EC80. *Il logit* è una funzione, che si applica a valori compresi nell'intervallo 0 e 1, tipicamente valori rappresentanti probabilità. La funzione

*logit* si applica ad esempio nella regressione logistica e nella variabile casuale logistica. L'effetto di questa trasformazione viene applicata in particolare nello studio del dosaggio con risposte quantali.

Inoltre sono state provate combinazioni di molecole somministrate contemporaneamente nel tentativo di verificare un eventuale effetto antagonista, additivo o sinergico. Le combinazioni eseguite sono state: *4 allil-2-metossifenolo* con *(2E)-3-fenilprop-2-enal* e *4 allil-2-metossifenolo* con *2 isopropil-5-metilfenolo*. Il disegno sperimentale adottato era un fattoriale semplice con tre livelli di combinazioni delle molecole (0, 50 e 100 µg/ml) le osservazioni sono state eseguite a 48 e 72 ore. Anche queste prove sono state ripetute 3 volte. In un separato esperimento è stato valutato l'effetto del *4 allil-2-metossifenolo*, sul micelio di *B.cinerea* B05.10 di 3 giorni cresciuto in 50 ml di mezzo liquido PDB. La coltura era stata ottenuta inoculando 10<sup>5</sup> spore/ml in beute da 250 ml mantenute in agitazione a 300 rpm a temperatura ambiente con fotoperiodo naturale. Le concentrazioni saggiate per questa prova erano pari a 0, 100 e 250 µg/ml. Ogni trattamento è stato replicato 5 volte. Dopo 6 ore dal trattamento con *4 allil-2-metossifenolo* il micelio è stato prelevato e depositato con filtri da 100 µm, dopo 5 minuti di asciugatura il micelio è stato pesato.

### **3.5 Saggio di vitalità di *B.cinerea* con resazurina e pH con *4 allil-2-metossifenolo***

La resazurina è un colorante utilizzato principalmente come indicatore di ossidoriduzione in saggi di vitalità cellulare per batteri e cellule di mammifero. Tale metodo è stato per la prima e unica volta adottato per saggiare molecole antifungine nei confronti di *B.cinerea* nel 1998 (Pelloux-Prayer et al.). Interagendo con le cellule vitali viene trasformata dall'enzima diaforasi (metabolismo NAD<sup>+</sup>/NADH) in resorufina. La resazurina ha picco massimo di assorbanza a 575 nm, non è fluorescente ma se ridotta forma resorufina, che è fluorescente se stimolata a 530-590 nm e non ha il picco di assorbanza a 575 nm. A pH acido la resazurina viene ridotta a resorufina, diventando rosa. Il saggio colorimetrico con resazurina è stato eseguito su mezzo liquido Czapek Dox in pozzetti da 200 µl con 10<sup>6</sup> spore/ml di PM10 con pH finale 5,3. A tale pH la resazurina somministrata a concentrazione di 67,5 µg/ml rimane di colorazione blu. *4 allil-2-metossifenolo* è stato somministrato a 0, 10, 35 e 200 µg/ml, è stato eseguito un bianco con soli reagenti (Czapek, acqua e 200 µg/ml di *4 allil-2-metossifenolo*). I valori di assorbanza sono stati



letti dopo 48 ore. La prova è stata ripetuta 3 volte. Inoltre, è stato monitorato il pH del substrato in una prova analoga con un volume finale di 1,5 ml a 16, 24 e 48 hpi.

### **3.6 Saggio biologico su vite di trattamenti con alcune molecole naturali**

Olio essenziale di chiodi di garofano (*CloveOil*) contenente l'80% v/v di *4 allil-2-metossifenolo* è stato applicato ad una concentrazione di 0,2% v/v ad acini di uva bianca commerciale cv. *Italia*. Gli acini sono stati inoculati con un tondello di 0,5 cm di PDA colonizzato dal micelio di *B.cinerea* PM10. Il preparato conteneva 0,4ml/l di pinolene utilizzato come bagnante. Il pinolene non esercita alcun effetto antifungino in vitro (Cacciola et al. 2012). Il controllo non trattato è stato eseguito applicando agli acini uno stesso volume di acqua e bagnante. Le prove sono state eseguite 3 volte, inoculando 50 acini per trattamento. Si sono eseguite osservazioni a 1,2 3 e 4 giorni dopo l'inoculo valutando la percentuale di acini che presentavano lo sviluppo di segni e sintomi, si riportano i valori in percentuale. Con la stessa soluzione (0,2% *CloveOil* + Bagnante 0,4 ml/l) sono stati trattati grappoli di uva cv. *Cabernet* e *Merlot*. I grappoli sono stati inoculati dopo il trattamento con una sospensione conidiale di  $10^5$  spore/ml di *B.cinerea* ceppo PM10, valutando fino a 10 giorni dopo l'inoculo il proseguo dell'infezione. *4 allil-2-metossifenolo* è stato usato per trattare foglie di vite cv. *Chardonnay* utilizzando concentrazioni di 0,5, 1 e 2 mg/ml e pinolene alla concentrazione di 0,4 ml/l. Tali foglie sono state poi inoculate subito dopo il trattamento con tondelli di PDA con micelio di *B.cinerea*, ceppo PM10. Sono stati eseguiti controlli trattati solo con acqua e bagnante, monitorando l'andamento delle infezioni fino a 10 giorni dopo l'inoculo. Soluzioni di *4-allil-2-metossifenolo* e *(2E)-3-fenilprop-2-enal* (concentrazioni di 0,5 mg/ml rispettivamente) sono state utilizzate per trattare foglie di cv *Chardonnay*, successivamente inoculate con *B.cinerea* PM10 e monitorando la prova fino a 10 giorni dopo l'inoculo. Anche in questo caso è stato previsto l'utilizzo di pinolene. Gli esperimenti venivano condotti in vasche sterili chiuse con materiale plastico e contenenti carta bibula per mantenere l'umidità. Le vasche sono state tenute al buio a 15°C. Le osservazioni fotografiche sono state eseguite dopo 24, 48 e 100 ore. Le prove sono state ripetute tre volte.

### **3.8 Test di fitotossicità su foglia di vite di *4 allil-2-metossifenolo***

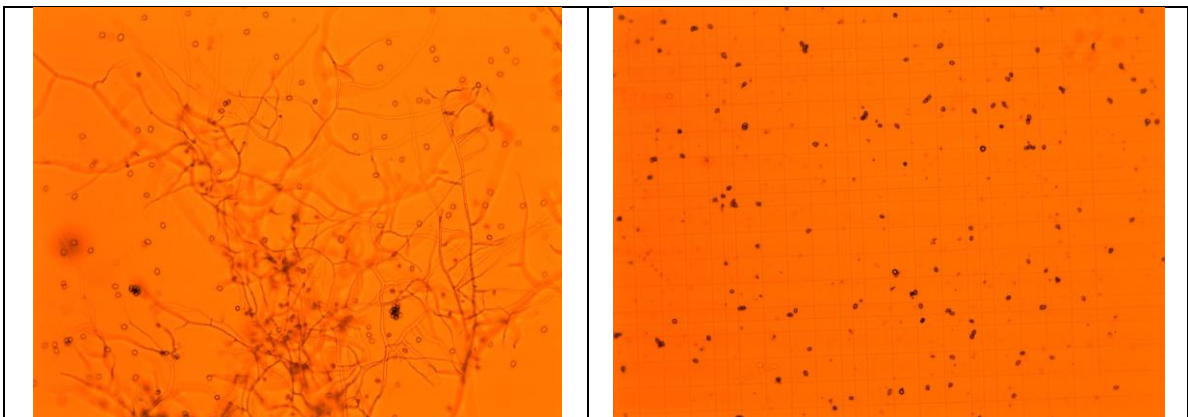
La pagina superiore di foglie di vite di varietà cv. *Chardonnay* sono state trattate in maniera uniforme con soluzioni acquose a concentrazioni di 200, 100, 10, 1 e 0,5 mg/ml di *4 allil-2-metossifenolo*. Le foglie sono state mantenute in ambiente buio, umido e a 15 °C, le osservazioni sono state eseguite dopo 24 ore dal trattamento. Si sono eseguite due repliche. Attraverso il software ImageJ<sup>®</sup> è stata misurata l'area fogliare che presentava aree necrotiche estese. Tale area sintomatica viene riportata in % rispetto al totale dell'area fogliare trattata.

## 4.0 Risultati

### 4.1 Effetto di molecole naturali su germinabilità e crescita dei tubetti germinativi di *B. cinerea*

In un primo esperimento è stato valutato l'effetto di alcune molecole naturali (Tabella 4) sulla germinabilità delle spore e la crescita dei tubetti germinativi di *B. cinerea* ceppo PM10. Le spore trattate con 2 *idrossi-3-metossibenzaldeide*, 4 *allil-2-metossifenolo*, 2 *metossi-4-propenilfenolo*, 2 *isopropil-5-metilfenolo*, 5 *isopropil-2-metilfenolo* e (2E)-3-*fenilprop-2-enal* non germinavano, ne alle 24 ore (Tabella 6) ne alle 72 ore. Inoltre le spore di questi trattamenti risultavano anche più scure e piccole rispetto alle spore dei controlli non trattati (Figura 3). Per determinare se l'assenza di germinazione era dovuta a morte cellulare anziché ad un effetto fungistatico temporaneo, le sospensioni contenenti le spore non germinate sono state diluite 1:100 e inoculate su substrato solido (PDA). Questi inoculi non mostravano alcun tipo di crescita. Le spore trattate con *Acido 3-4 didrossibenzoico*, *Aido coumarico* e 3,4 *Acido dimetossibenzoico* presentavano un lieve effetto di rallentamento della crescita dei tubetti germinativi, tuttavia alle 72 ore con questi trattamenti non si notavano differenze rispetto ai controlli non trattati.

**Figura 3.** Effetto del trattamento con 4 *allil-2-metossifenolo* sulla germinabilità delle spore di *B. cinerea*. A sinistra spore di controllo sospese in Czapek a 72 hpi; A destra spore sospese in Czapek e trattate con 500 µg/ml di 4 *allil-2-metossifenolo* a 72 hpi.



**Tabella 6. Effetto in vitro di molecole naturali sulla germinabilità delle spore di *B. cinerea* ceppo PM10 in mezzo Czapek a 24 ore dall'inoculo.**

Molecola	Concentrazione (mg/ml)	Effetto sulla germinabilità	
		Germinazione (G)/Non Germinazione (NG)	Grado di germinabilità e crescita*
<i>Acido 3,4-didrossibenzoico</i>	1,5	G	++
	1	G	++
	0,5	G	++
<i>2 idrossi-3-metossibenzaldeide</i>	1,5	NG	-
	1	NG	-
	0,5	NG	-
<i>Acido coumarico</i>	1,5	G	+
	1	G	++
	0,5	G	+++
<i>Acido caffeico</i>	1,5	G	+++
	1	G	+++
	0,5	G	+++
<i>Acido 3,4-dimetossibenzoico</i>	1,5	G	+
	1	G	++
	0,5	G	+++
<i>Acido 4-idrossibennoico</i>	1,5	G	+++
	1	G	+++
	0,5	G	+++
<i>4 allil-2-metossifenolo</i>	1,5	NG	-
	1	NG	-
	0,5	NG	-
<i>2 metossi-4-propenilfenolo</i>	1,5	NG	-
	1	NG	-
	0,5	NG	-
<i>5 isopropil-2-metilfenolo</i>	1,5	NG	-
	1	NG	-
	0,5	NG	-
<i>2 isopropil-5-metilfenolo</i>	1,5	NG	-
	1	NG	-
	0,5	NG	-
<i>2 metossifenolo</i>	1,5	G	+++
	1	G	+++
	0,5	G	+++
<i>(2E)-3-fenilprop-2-enal</i>	1,5	NG	-
	1	NG	-
	0,5	NG	-

\*Per (+++) si intende una germinabilità e una crescita dei tubetti germinativi comparabile al controllo; per (++) si intende una germinabilità comparabile al controllo ma una crescita e una ramificazione dei tubetti germinativi visibilmente più bassa; Per (+) si intende una germinabilità e una crescita visibilmente inferiore rispetto al controllo. NG si intendono spore non germinate.

## 4.2 Effetto di trattamenti di alcune molecole naturali sulla crescita della colonia di *B. cinerea*

Le molecole dimostrate più attive nell'esperimento precedente sono state utilizzate per determinare la relazione dose/attività contro i ceppi PM10 e B05.10 di *B. cinerea*. L'effetto sulla crescita miceliare su substrato solido PDA si è dimostrato significativo per tutte le molecole testate, con effetti diversi tra i due ceppi. L'EC50 dell' *4 allil-2-metossifenolo* calcolato tramite modello lineare *logit* risulta essere di 163 µg/ml per il ceppo B05.10, tale valore calcolato per il ceppo PM10 risulta essere più basso e pari a 76 µg/ml (Figura 5 e 6). L'EC80 per tale molecola risulta essere di circa 300 µg/ml, per entrambi i ceppi. *4 allil-2-metossifenolo* risulta essere una molecola fortemente inibitoria anche su substrato liquido PDB, Infatti, già a 6 ore dopo il trattamento si verificava il dimezzando del peso fresco del micelio in crescita ad una concentrazione di 100 µg/ml. Tuttavia il trattamento con 250 µg/ml di *4 allil-2-metossifenolo* non ha fornito differenze significative rispetto al trattamento con 100 µg/ml (Figura 24). *2 isopropil-5-metilfenolo* dimostra essere una molecola fortemente inibitoria, in base ai dati emersi il ceppo B0510 sarebbe il più sensibile, l'EC50 per questo ceppo è risultato di 100 µg/ml, l'EC80 di 273 µg/ml, entrambi i valori superiori a quelli del ceppo PM10 (164 e 344 µg/ml rispettivamente). Le altre molecole saggiate hanno mostrato un effetto meno marcato sulla crescita della colonia rispetto a queste due (figura 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20 e 21). *2 idrossi-3-metossibenzaldeide* ha presentato la minore attività inibitrice. Inoltre, il substrato dove cresceva il fungo arricchito con tale molecola virava di colore verso una tonalità rossastra, in maniera più accentuata con il ceppo PM10 (Figura 22). *(2E)-3-fenilprop-2-enal* a concentrazioni elevate (500 µg/ml) presenti nel substrato PDA inibiva completamente la crescita sia del ceppo PM10 che del ceppo B05.10. Tale effetto era evidente per tutta la durata dell'esperimento (10 giorni). L'EC50 e l'EC80 calcolati per il *(2E)-3-fenilprop-2-enal* risultavano avere valori molto vicini tra loro, per entrambi i ceppi (Figura 17 e 18). I trattamenti combinati di *4 allil-2-metossifenolo* con *2 isopropil-5-metilfenolo* e *4 allil-2-metossifenolo* con *(2E)-3-fenilprop-2-enal* eseguiti non ha fornito risultati che indicassero una sinergia o antagonismo, ma solo un effetto additivo.

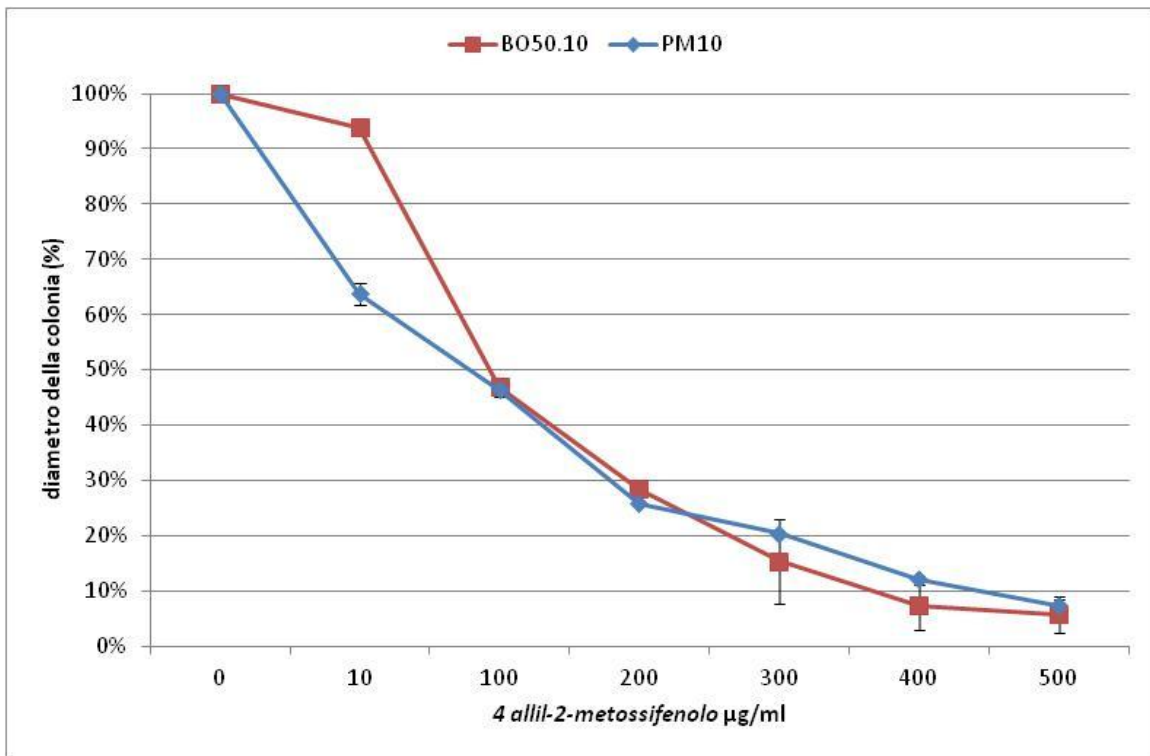


Figura 4. Curve di crescita di *B. cinerea* ceppo PM10 (blu) e B05.10 (rosso) con concentrazioni crescenti di 4 *allil-2-metossifenolo* nel substrato (PDA) a 40 ore hpi. I dati sono riportati in % di crescita del diametro della colonia rispetto al controllo non trattato.

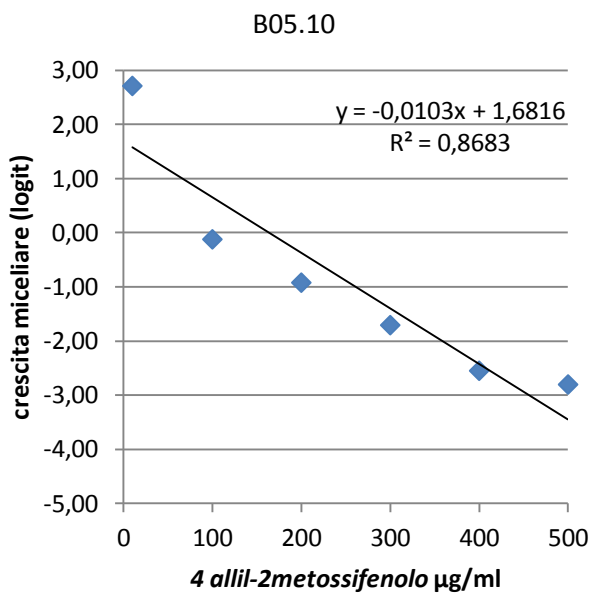


Figura 5. Conversione dei dati di crescita del ceppo B05.10 in logit.

EC50= 163,26 µg/ml  
EC80= 297,95 µg/ml

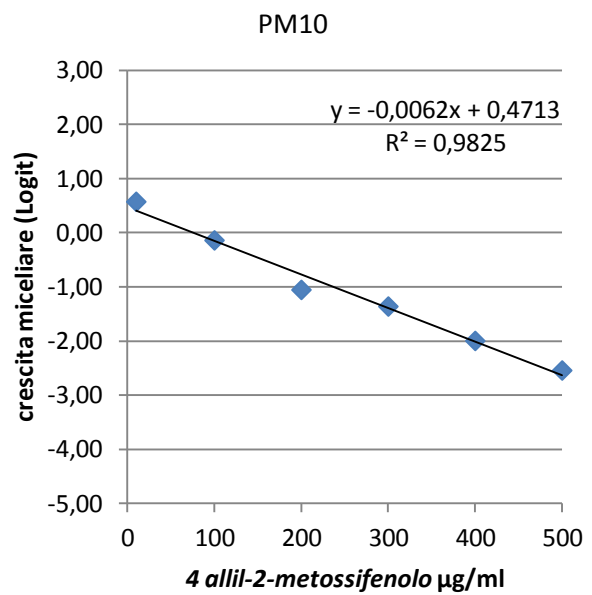


Figura 6. Conversione dei dati di crescita del ceppo PM10 in logit.

EC50= 76,02 µg/ml  
EC80= 299,61 µg/ml

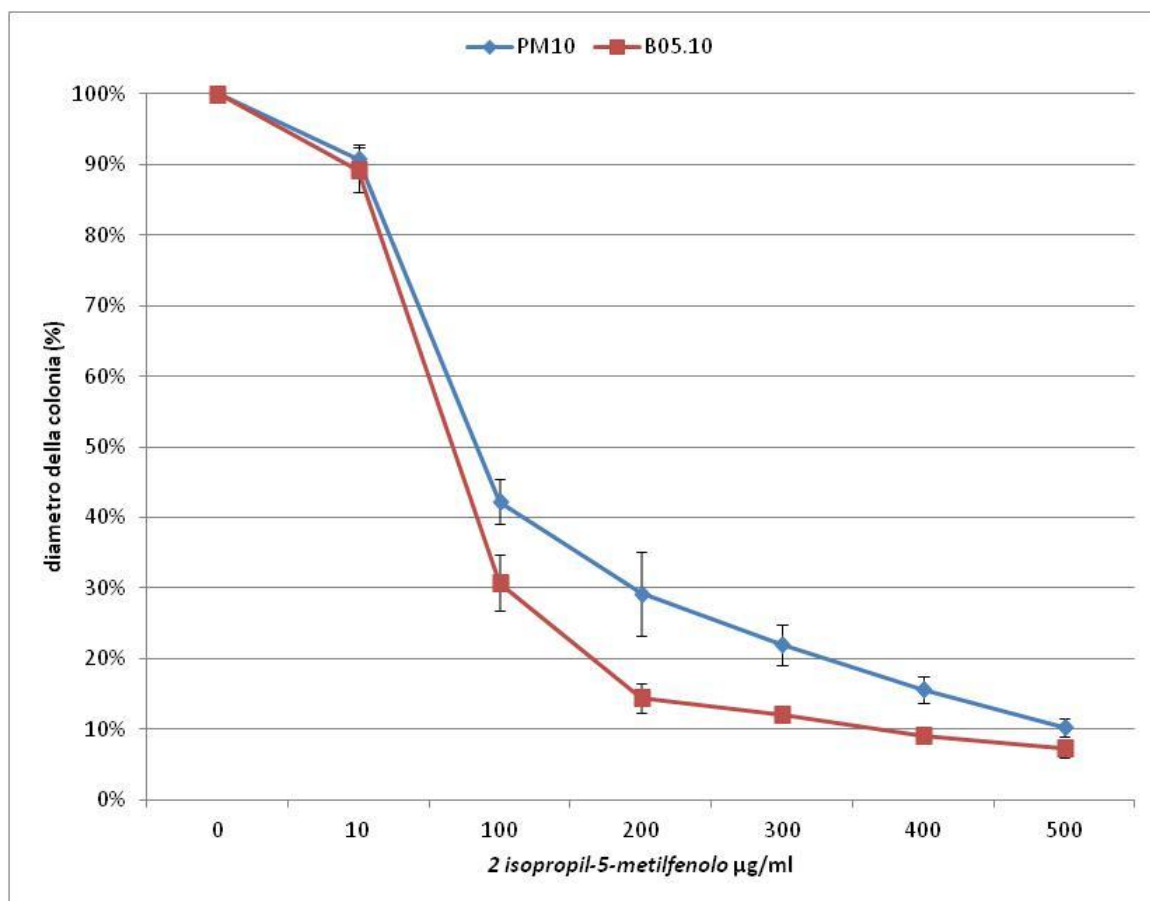


Figura 7. Curve di crescita di *B. cinerea* ceppo PM10 (blu) e B05.10 (rosso) con concentrazioni crescenti di 2-Isopropil-5-metilfenool nel substrato (PDA) a 40 ore hpi. I dati sono riportati in % di crescita del diametro della colonia rispetto al controllo non trattato.

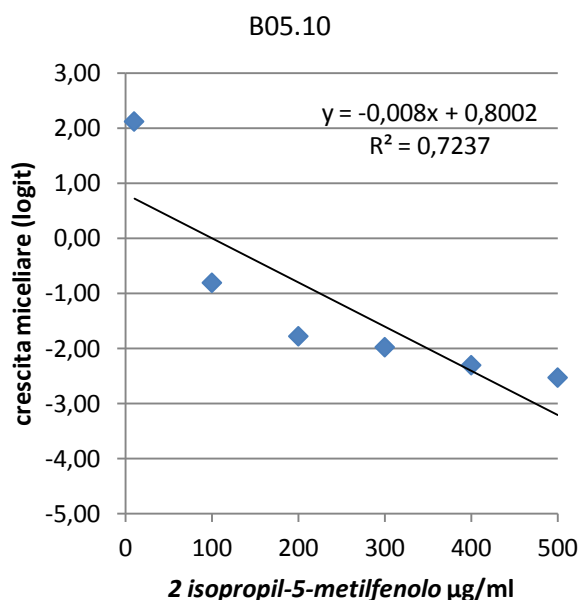


Figura 8. Conversione dei dati di crescita del ceppo B05.10 in logit.

EC50: 100,03 µg/ml  
EC80: 273,31 µg/ml

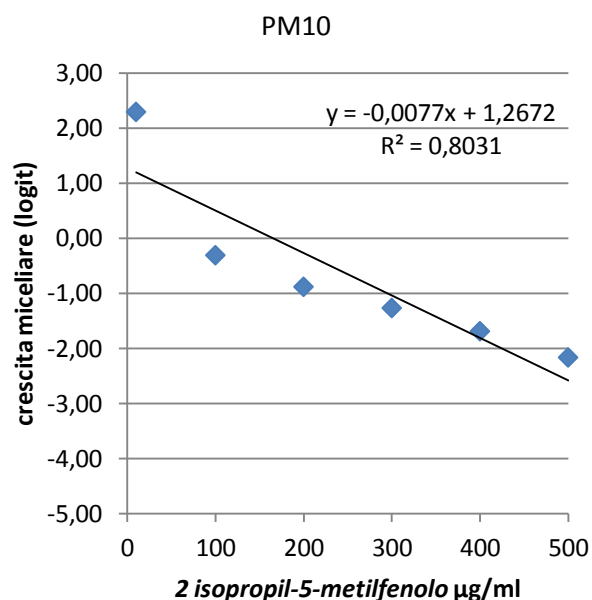


Figura 9. Conversione dei dati di crescita del ceppo PM10 in logit.

EC50: 164,57 µg/ml  
EC80: 344,61 µg/ml

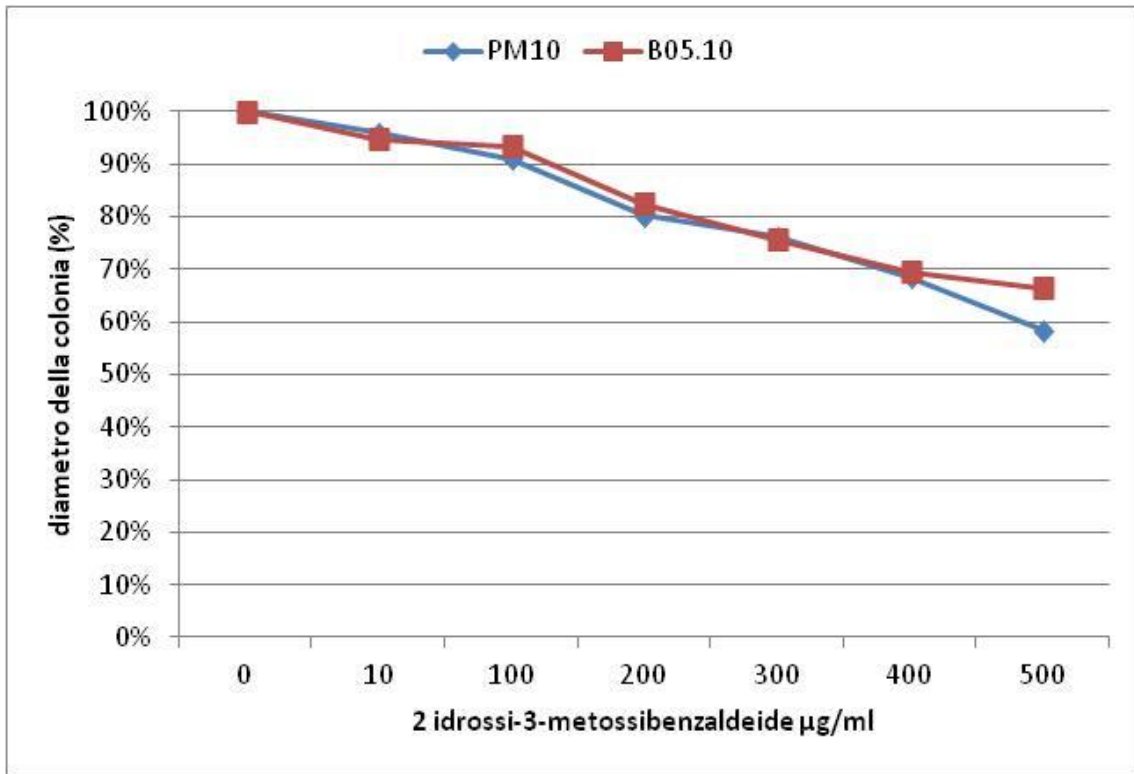


Figura 10. Curve di crescita di *B. cinerea* ceppo PM10 (blu) e B05.10 (rosso) con concentrazioni crescenti di 2 Idrossi-3-metossibenzaldeide nel substrato (PDA) a 40 ore hpi. I dati sono riportati in % di crescita del diametro della colonia rispetto al controllo non trattato.

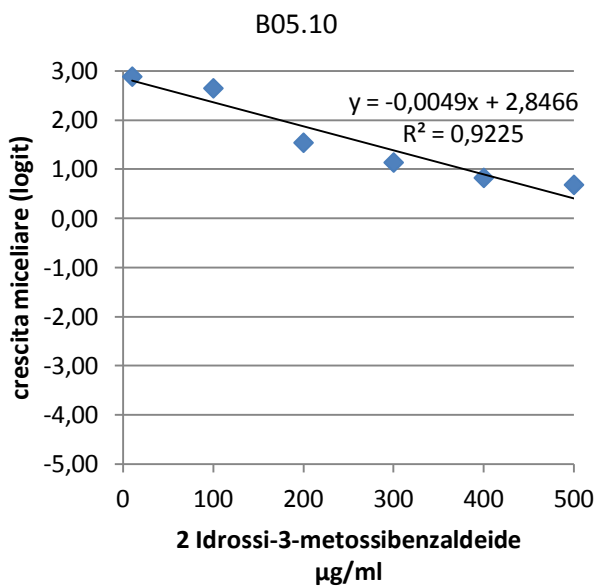


Figura 11. Conversione dei dati di crescita del ceppo B05.10 in logit.

EC50: 580,94 µg/ml  
EC80: 863,86 µg/ml

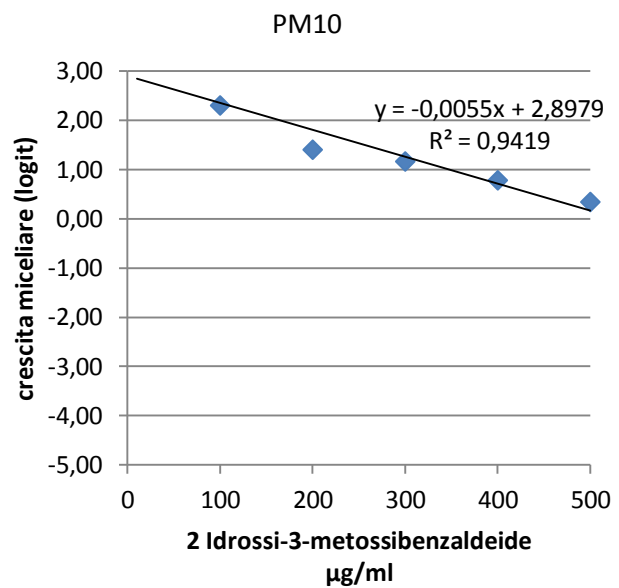


Figura 12 Conversione dei dati di crescita del ceppo PM10 in logit.

EC50: 526,89 µg/ml  
EC80: 778,94 µg/ml



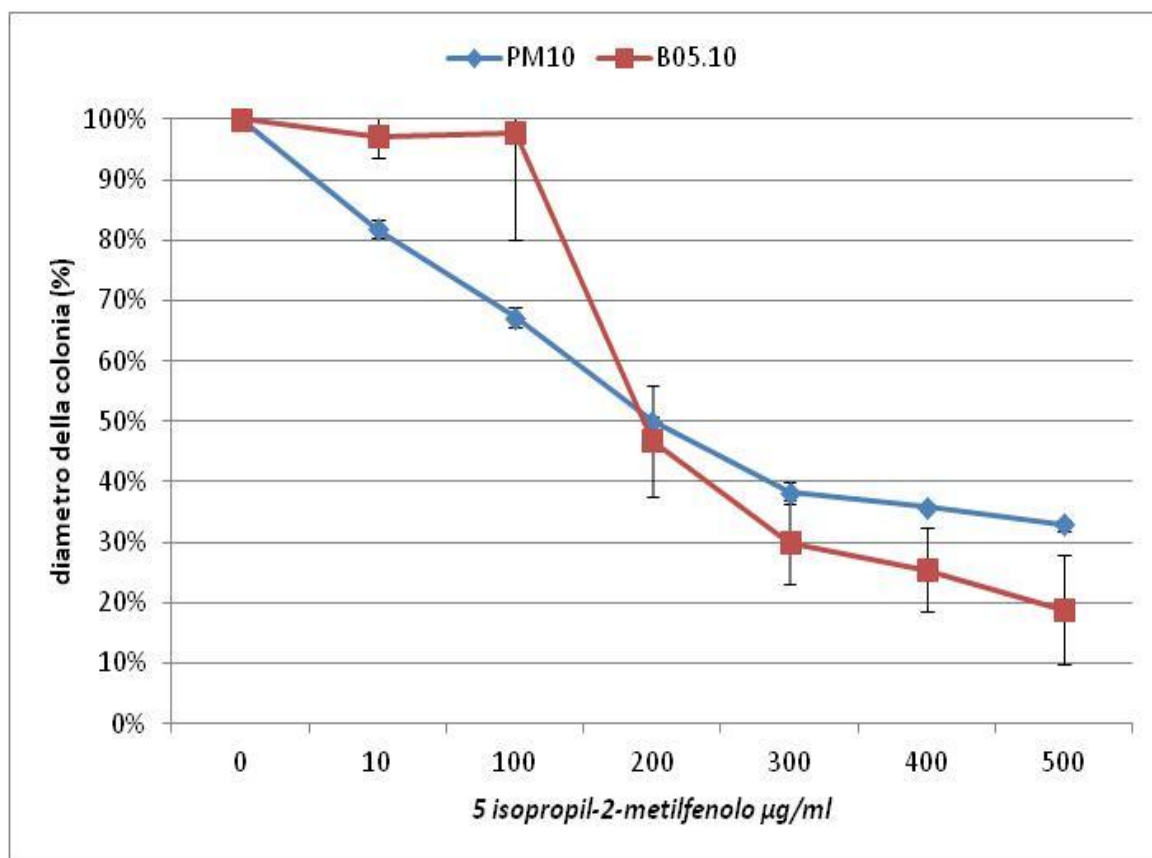


Figura 13. Curve di crescita di *B. cinerea* ceppo PM10 (blu) e B05.10 (rosso) con concentrazioni crescenti di 5-Isopropyl-2 methylphenol nel substrato (PDA) a 40 ore hpi. I dati sono riportati in % di crescita del diametro della colonia rispetto al controllo non trattato.

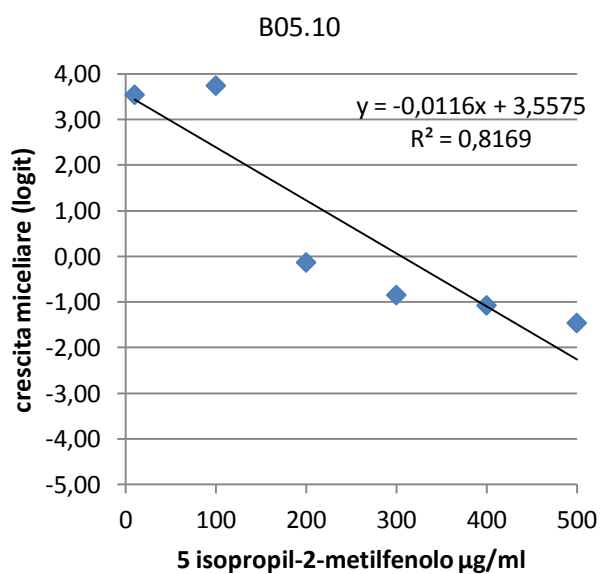


Figura 14 conversione dei dati di crescita del ceppo B05.10 in logit.

EC50: 306,68 µg/ml  
EC80: 426,19 µg/ml

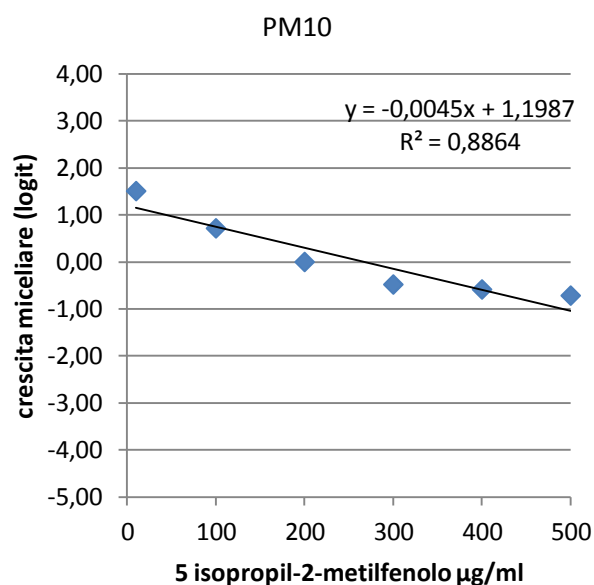


Figura 15 conversione dei dati di crescita del ceppo PM10 in logit.

EC50:269,64 µg/ml  
EC80:558,45 µg/ml

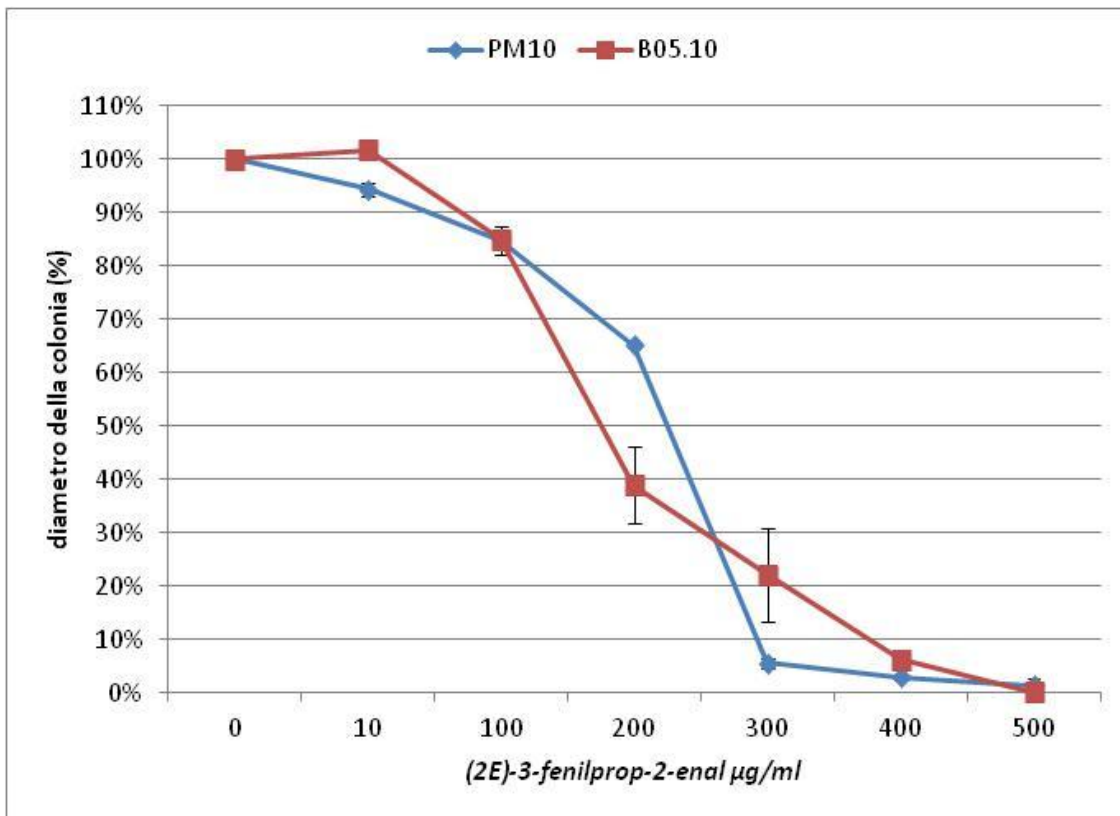


Figura 16 curve di crescita di *B. cinerea* ceppo PM10 (blu) e B05.10 (rosso) con concentrazioni crescenti di (2E)-3-Fenilprop-2-enal nel substrato (PDA) a 40 ore hpi. I dati sono riportati in % di crescita del diametro della colonia rispetto al controllo non trattato.

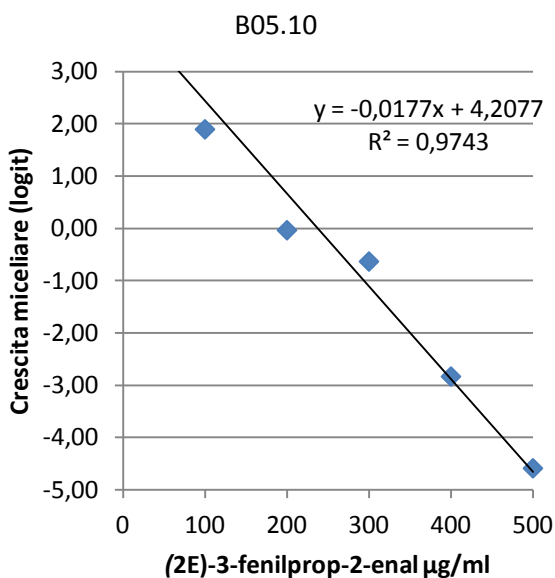


Figura 17. Conversione dei dati di crescita del ceppo B05.10 in logit.

EC50 :237,72 µg/ml  
EC80: 316,04 µg/ml

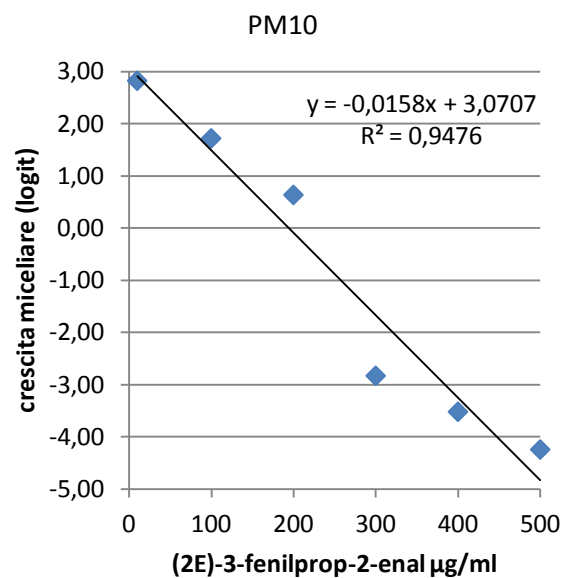


Figura 18. Conversione dei dati di crescita del ceppo PM10 in logit.

EC50 :194,35 µg/ml  
EC80: 282,09 µg/ml

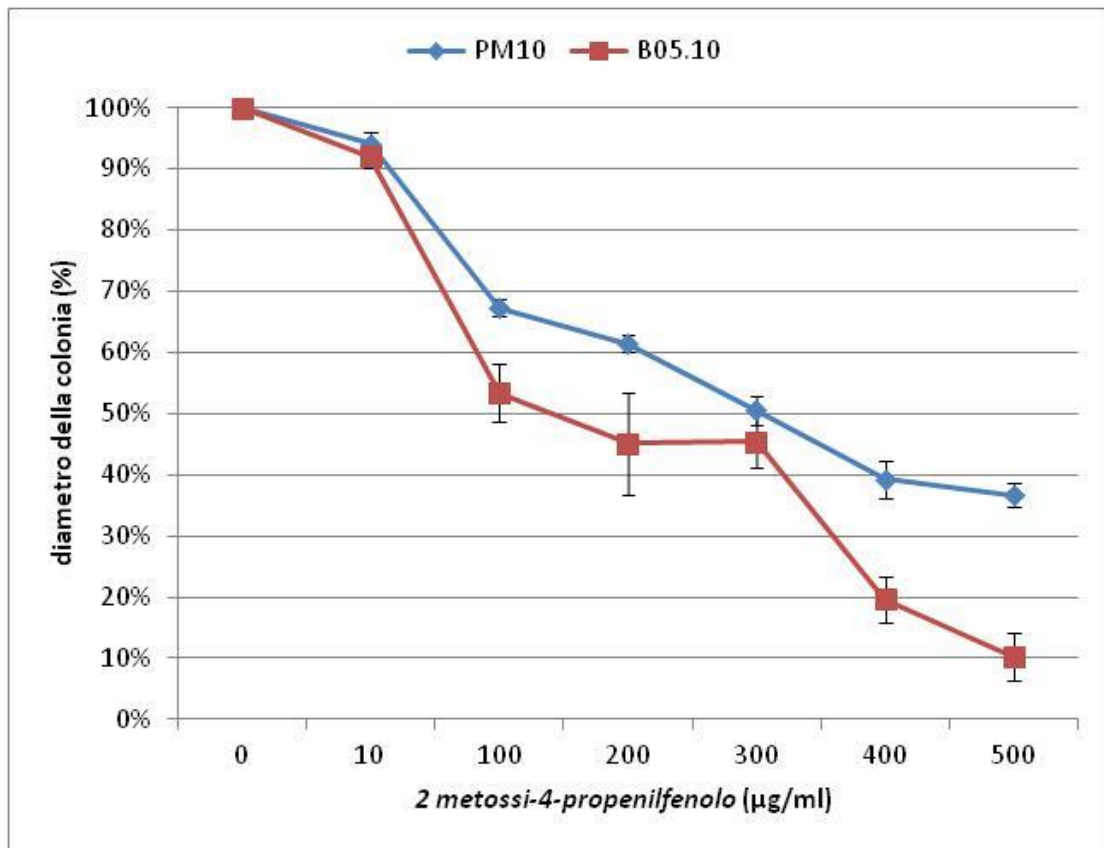


Figura 19. Curve di crescita di *B. cinerea* ceppo PM10 (blu) e B05.10 (rosso) con concentrazioni crescenti di 2-Metoossi-4-propenilfenool nel substrato (PDA) a 40 ore hpi. I dati sono riportati in % di crescita del diametro rispetto al controllo non trattato.

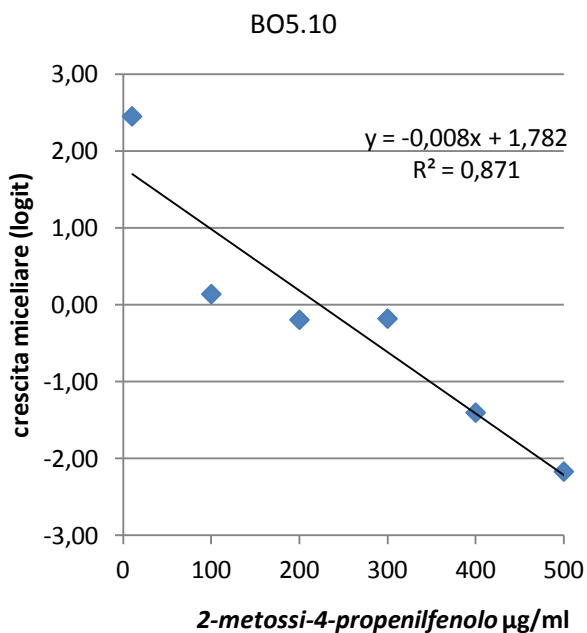


Figura 20. Conversione dei dati di crescita del ceppo B05.10 in logit.

EC50: 222,75 µg/ml  
EC80: 396,03 µg/ml

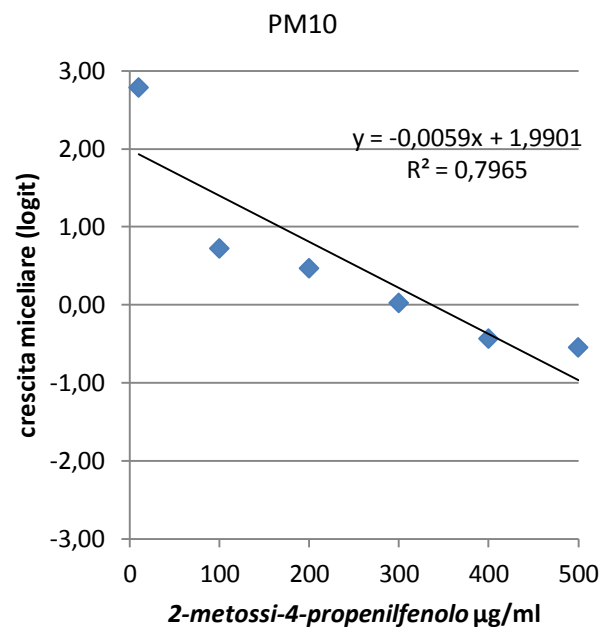


Figura 21. Conversione dei dati di crescita del ceppo PM10 in logit.

EC50: 337,30 µg/ml  
EC80: 572,27 µg/ml

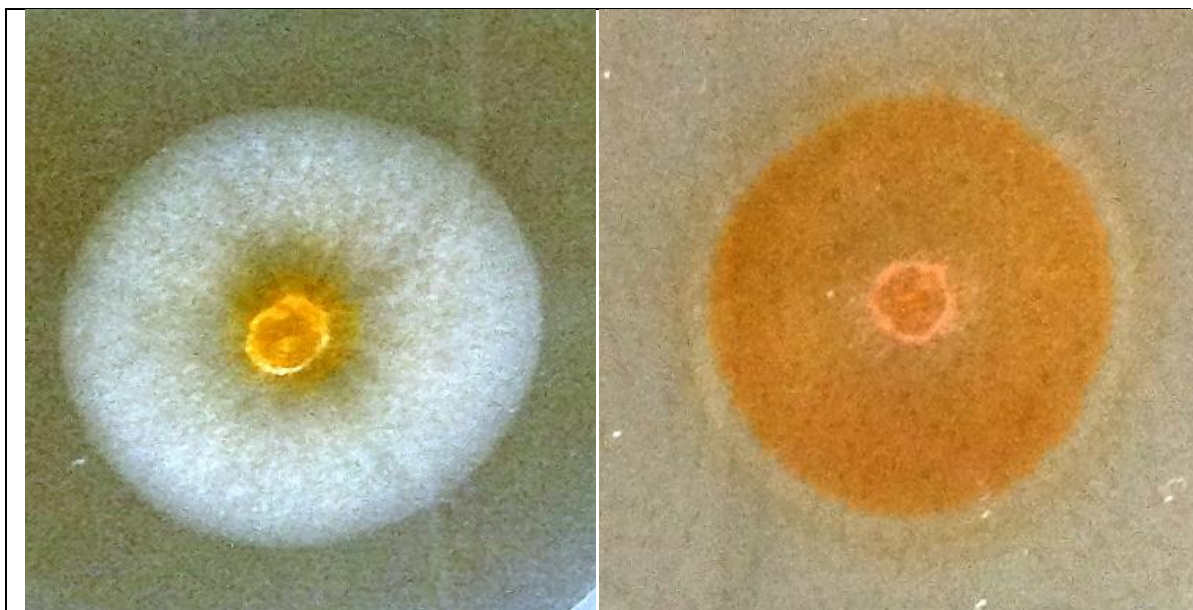


Figura 22. Caratteristiche della colonia del ceppo di *B. cinerea* B05.10 (a sinistra) e del ceppo PM10 (a destra) cresciuti su substrato solido PDA arricchito con una concentrazione di 300 µg/ml di 2 idrossi-3-metossibenzaldeide. Si noti la diversa risposta dei due ceppi alla molecola con evidente variazione di colore del substrato, fenomeno più accentuato nel ceppo PM10.

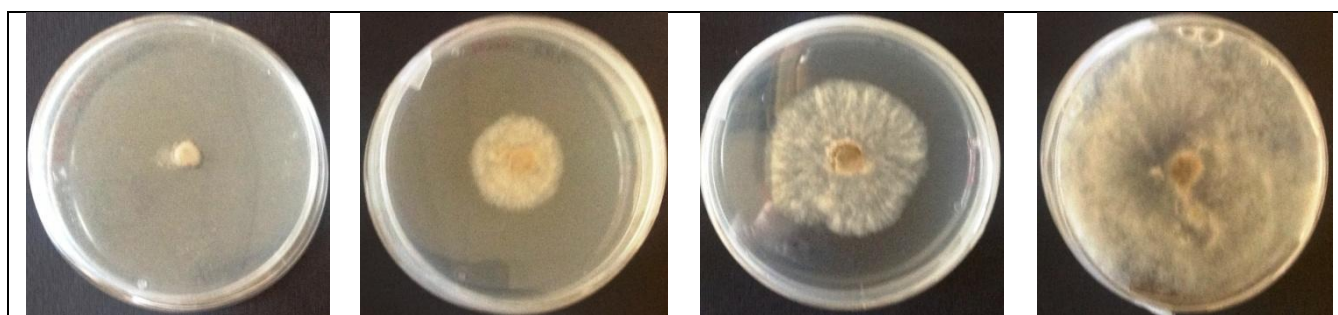
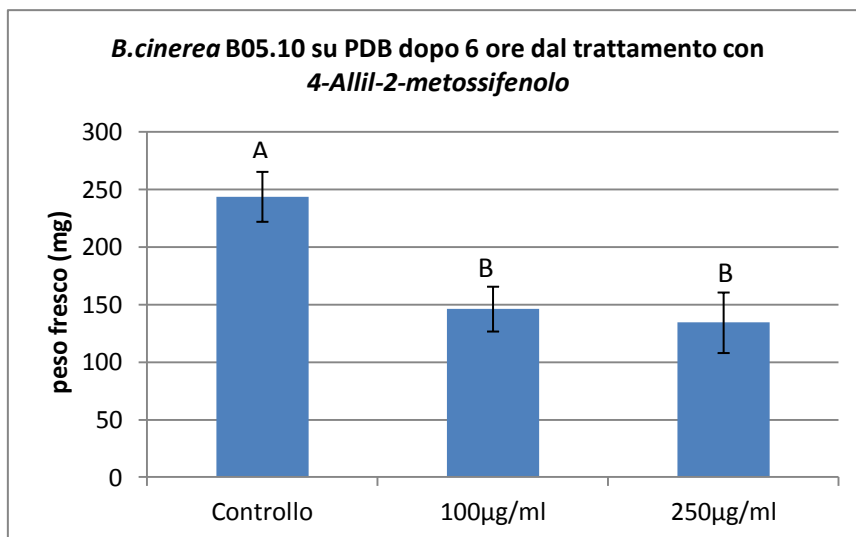


Figura 23. Effetto di 4 *allil-2metossifenolo* a concentrazioni decrescenti (500, 300, 100 e 0 µg/ml) nel substrato PDA inoculato con *B.cinerea* ceppo PM10 a 72 ore dopo l'inoculo.



**Figura 24.** Effetto sul peso fresco del micelio di *B.cinerea* ceppo B05.10 cresciuto su PDB per 48 ore e raccolto dopo 6 ore dal trattamento con 4 *allil-2-metossifenolo* a concentrazioni di 100 µg/ml e 250 µg/ml.

### **4.3 Saggio di vitalità sulle spore di *B. cinerea* trattate con 4 *allil-2-metossifenolo* mediante resazurina**

Al fine di dimostrare che il 4 *allil-2-metossifenolo* riduce la vitalità delle cellule di *B. cinerea* è stato eseguito il saggio vitale con resazurina su mezzo salino Czapek Dox. La lettura dell'assorbanza a 72 ore hpi dimostra che i trattamenti con 10 µg/ml e 35 µg/ml di 4 *allil-2-metossifenolo* davano valori inferiori o uguali al controllo. Tali valori corrispondono, rispettivamente, a una crescita superiore o comparabile con il controllo non trattato. Per spiegare questa assenza di inibizione ottenuta con le dosi più bassi di 4 *allil-2-metossifenolo* è stato misurato il pH del substrato di crescita in seguito ai trattamenti. Infatti è noto che il pH del mezzo può influire sul livello di riduzione della resazurina. Quindi la differenza di assorbanza tra la tesi di controllo e la tesi con 10 µg/ml di 4 *allil-2-metossifenolo* è imputabile alla riduzione di pH del substrato verificatasi e non alla maggior crescita avvenuta nella tesi trattata con la molecola. Il trattamento con 200 µg/ml mostrava un arresto totale della crescita. La tesi trattata con 200 µg/ml dimostra valori di assorbanza non significativamente diverse dai soli reagenti (senza inoculo). Tale livello di concentrazione inibiva del 35% circa la crescita del micelio di *B.cinerea* PM10 su PDA avvelenato alle 40 hpi inoculo. I valori di pH in questo trattamento incrementano durante la prova fino a superare il valore di 5,6 sia alle 24 che alle 48 ore (Figura 28).

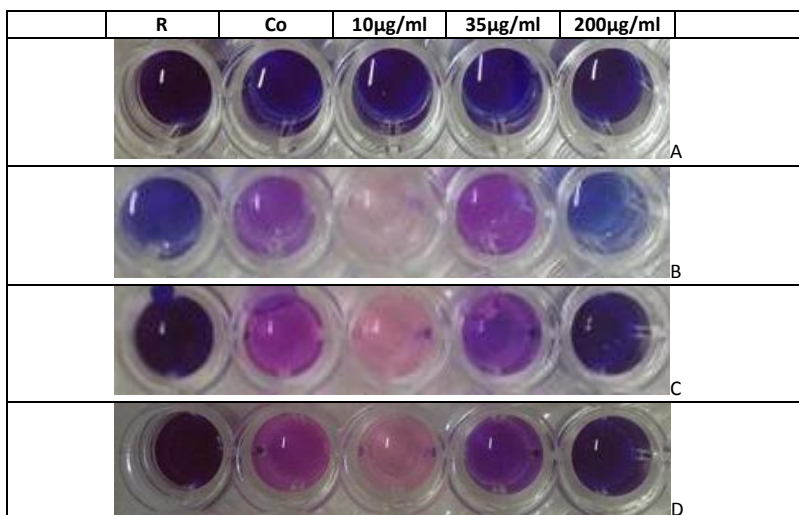


Figura 26. Saggio vitale con resazurina su *B. cinerea* ceppo PM10 trattato con 4 *allil-2-metossifenolo*. (A) 0 hpi, (B C e D) 48 hpi. R) sta per soli reagenti, Co) sta per controllo non trattato.

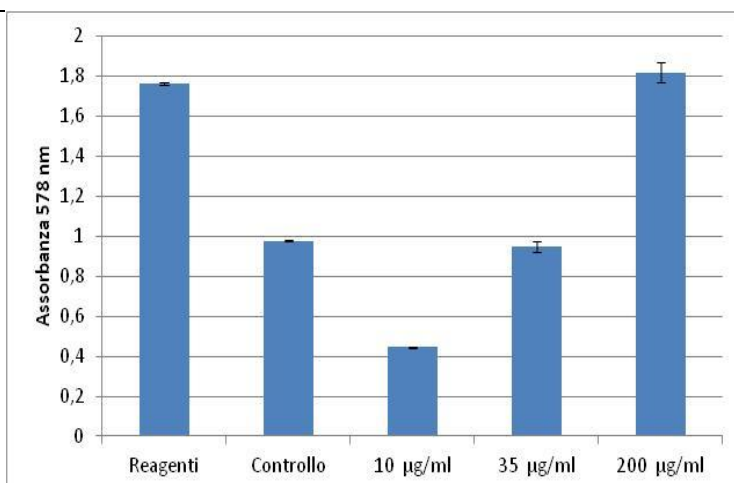


Figura 27. Assorbanza a 578 nm di pozzetti dei campioni trattati in Figura 26 dopo 48 hpi con *B. cinerea* PM10.

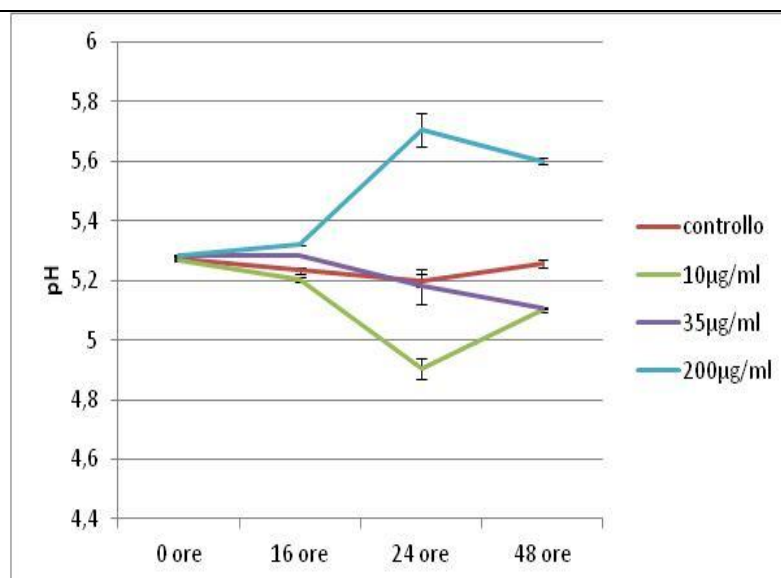


Figura 28. Andamento del pH del substrato a varie ore dall'inoculo con le stesse concentrazioni di 4 *allil-2-metossifenolo* usate per il saggio con la resazurina.

## 4.4 Effetto di trattamenti su vite con alcune molecole naturali

Per verificare se l'effetto inibitorio osservato in vitro contro *B. cinerea* si manifestava anche in vivo, acini e foglie di vite sono stati trattati con alcune molecole naturali e inoculando successivamente con il ceppo PM10. Si è valutato l'effetto sulla riduzione dei sintomi prodotti dal fungo nelle tesi trattate. Le molecole studiate per questi esperimenti erano *4 allil-2-metossifenolo* e *(2E)-3-fenilprop-2-enal*, i composti che avevano fornito un effetto inibitorio più forte e prolungato sulla crescita di *B. cinerea* in vitro. Alcuni trattamenti sono stati effettuati a base di *4-allil-2-metossifenolo* o alcuni estratti vegetali che la contenevano (*CloveOil*). Il trattamento con 2 mg/ml di tale molecola sulle foglie di cv *Chardonnay* e grappoli di varietà cv *Merlot* ha determinato protezione dell'infezione (Figura 31) fino al termine dell'esperimento (10 giorni). La protezione era totale nelle prove eseguite sui grappoli di cv. *Merlot* e circa nell'80% degli inoculi eseguiti sulle foglie. Tuttavia la concentrazione di 2 mg/ml di *4-allil-2-metossifenolo* su foglia risultava moderatamente fitotossica. Su grappoli di cv *Cabernet* invece si è assistito solo ad un rallentamento dell'infezione delle tesi trattate rispetto a quelle di controllo, e quindi la protezione è risultata meno intensa rispetto alla cv. *Merlot*. Dieci giorni dopo l'inoculo grappoli di cv *Cabernet* presentavano sintomi e segni paragonabili al controllo, non solo causati dal fungo *B.cinerea*, in tali grappoli si sono infatti sviluppate infezioni di *Aspergillus spp.*, successivamente isolato sia nelle tesi trattate sia nelle tesi di controllo. I trattamenti a 0,5 mg/ml e 1 mg/ml di *4 allil-2-metossifenolo* su foglie non hanno mostrato un effetto di rallentamento dell'infezione apprezzabile. L'effetto di rallentamento dell'infezione è stato accertato anche con il trattamento con *CloveOil* allo 0,2% (1,6 mg/ml *4 allil-2-metossifenolo* equivalenti) e con bagnante applicata ad acini di cv. *Italia*. Al quarto giorno solo il 30% circa di acini inoculati aveva sviluppato sintomi nella tesi trattata, meno di un terzo rispetto al controllo inoculato e non trattato (Figura 30). I trattamenti con somministrazione contemporanea di *4 allil-2-metossifenolo* (0,5 mg/ml) e *(2E)-3-fenilprop-2-enal* (0,5 mg/ml) si sono dimostrati in grado di inibire l'infezione degli inoculi eseguiti su foglie, in alcuni casi anche a 7 dpi. Inoltre si è osservato una significativa riduzione di necrosi negli inoculi trattati sia a 4 che a 7 dpi (Figura 34 e 35). Il trattamento a tali concentrazioni non ha dimostrato nessun tipo di sintomo di fitotossicità su foglia.

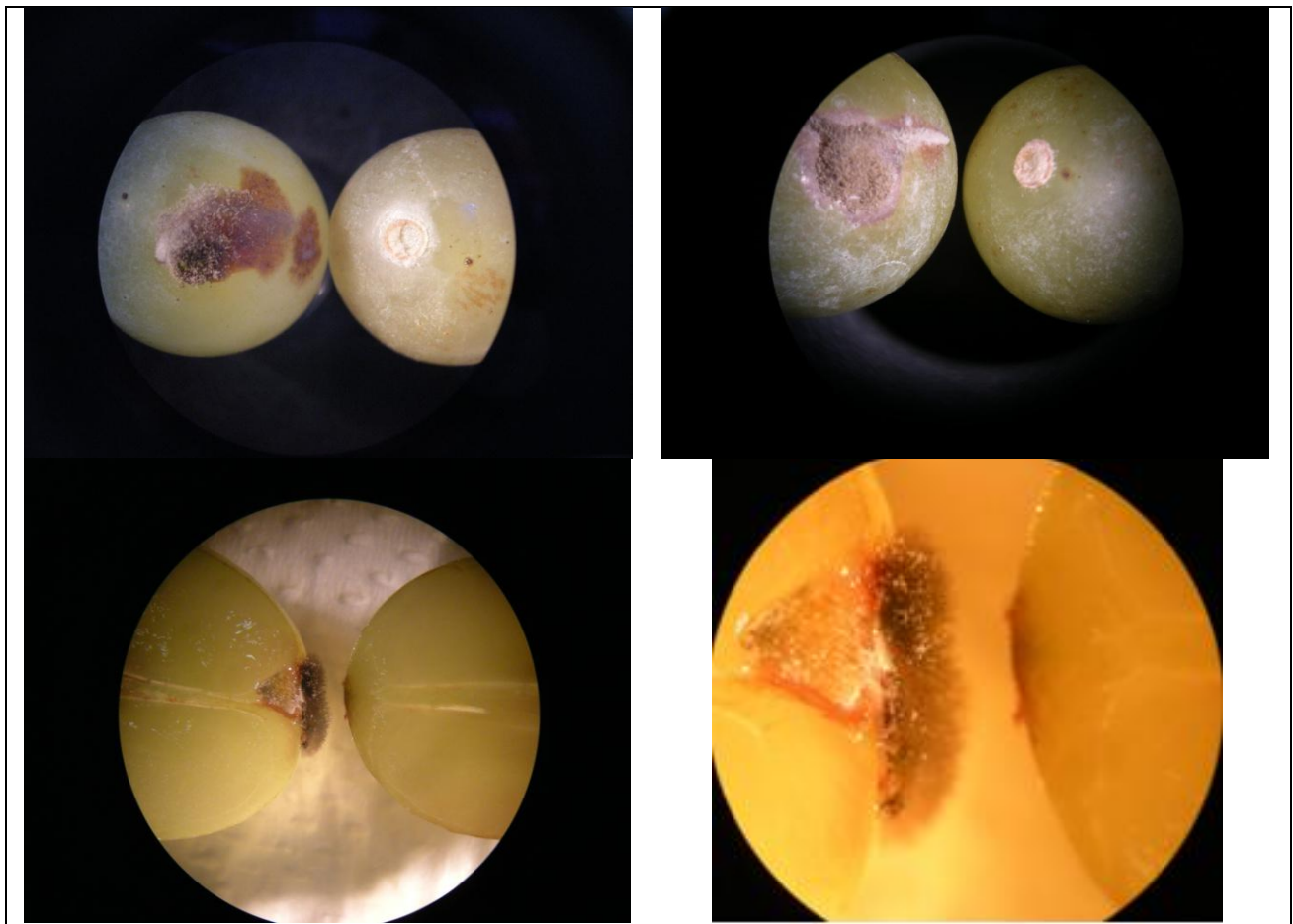


Figura 29. Effetto di trattamenti di *CloveOil* 0,2% + bagnante (0,5ml/l) su inoculo *B.cinerea* ceppo PM10. In ogni foto a sinistra si trovano acini di controllo non trattati, a destra acini trattati, foto a 72 ore dall'inoculo.

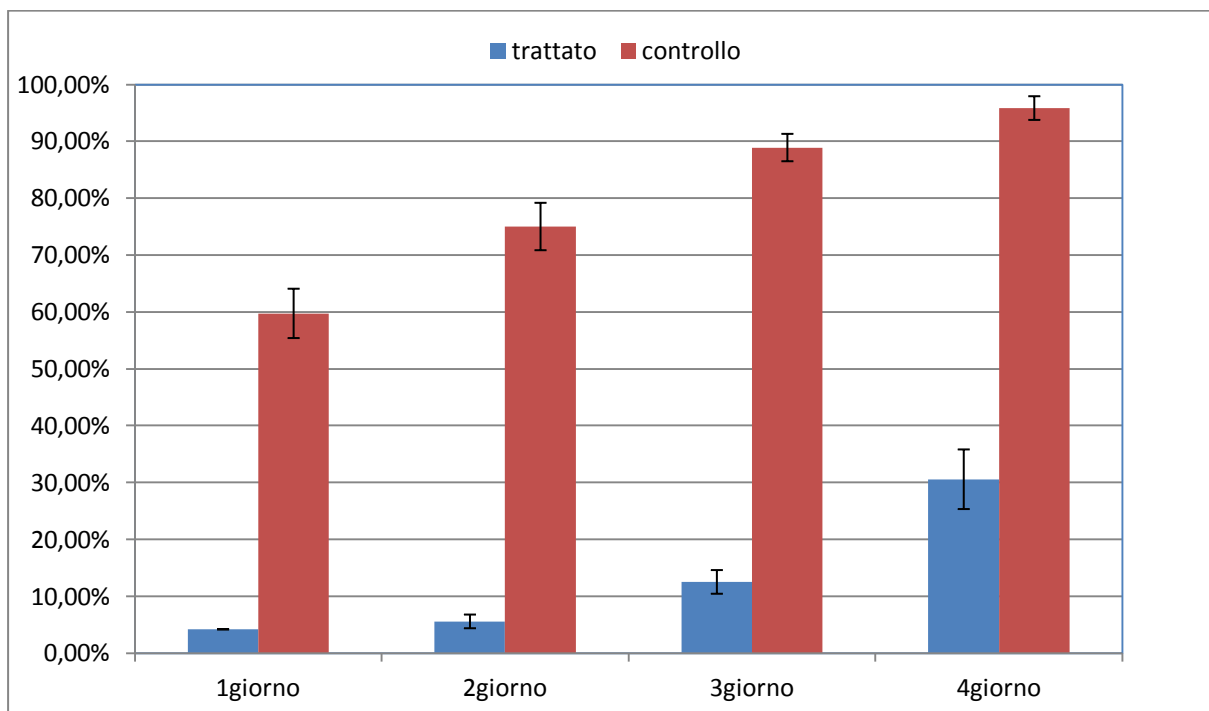


Figura 30. Inoculo con tondeelli di micelio di *B. cinerea* ceppo PM10 su acini cv. *Italia* trattata con *CloveOil* (0,2%) e bagnante (0,4 ml/l). Sulle ordinate % di acini sintomatici.



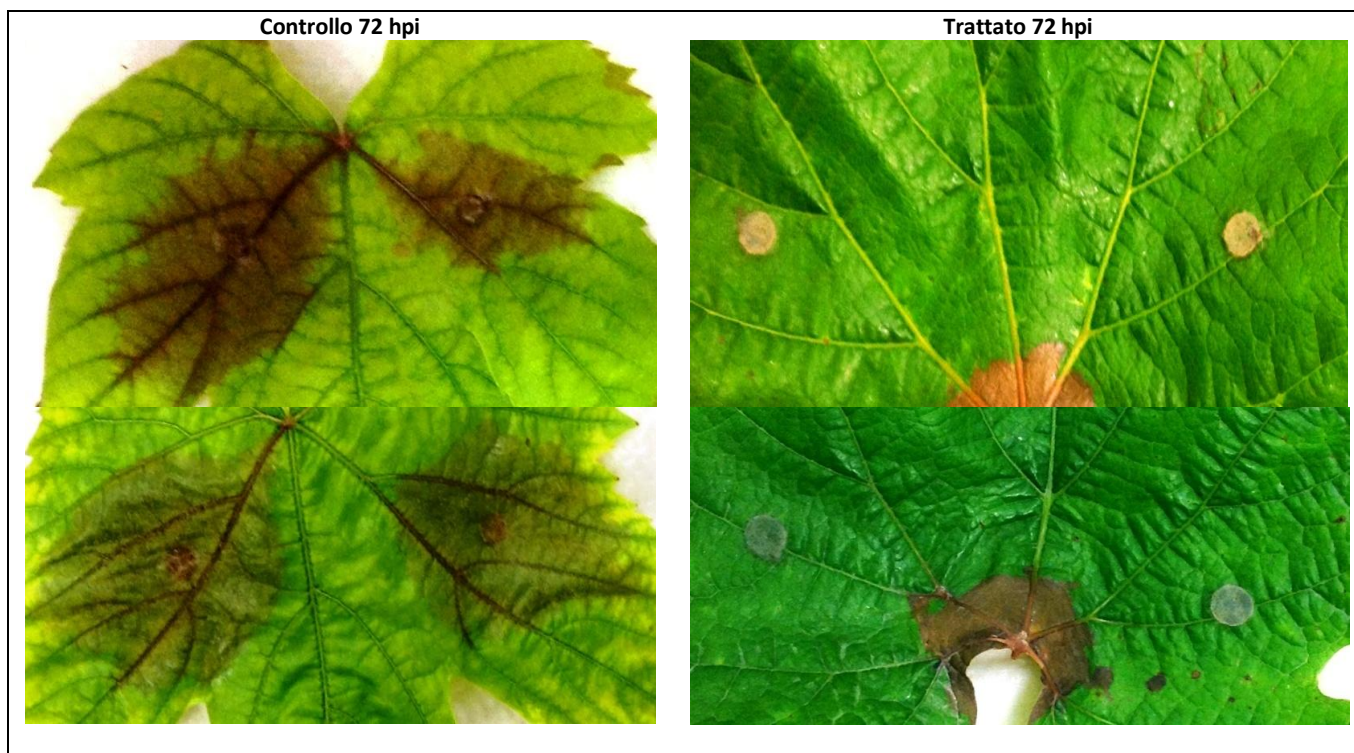


Figura 31. Effetto del trattamento con 4 *allil-2-metossifenolo* (2 mg/ml) su foglie di cv. *Chardonnay* inoculata con *B. cinerea* ceppo PM10.



Figura 32. Effetto del trattamento con *CloveOil* 0,2% su grappoli di cv. *Cabernet sauvignon* inoculata con spore di *B. cinerea* ceppo PM10.



Figura 33. Effetto del trattamento con *CloveOil* 0,2% su grappoli di cv. *Merlot* inoculata con spore di *B. cinerea* ceppo PM10.

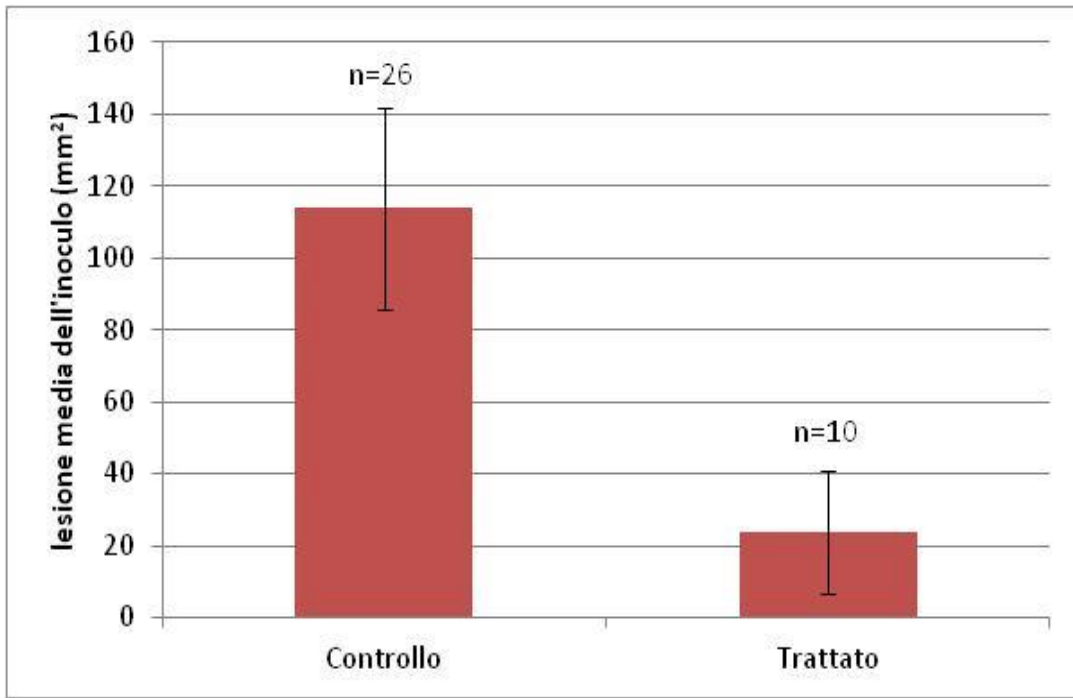


Figura 34. Area necrotica prodotta da *B. cinerea* PM10 a 96 hpi su foglie di vite trattate (con 4 *allil-2-metossifenolo* e *(2E)-3-fenilprop-2-enal*) e foglie del controllo non trattato.

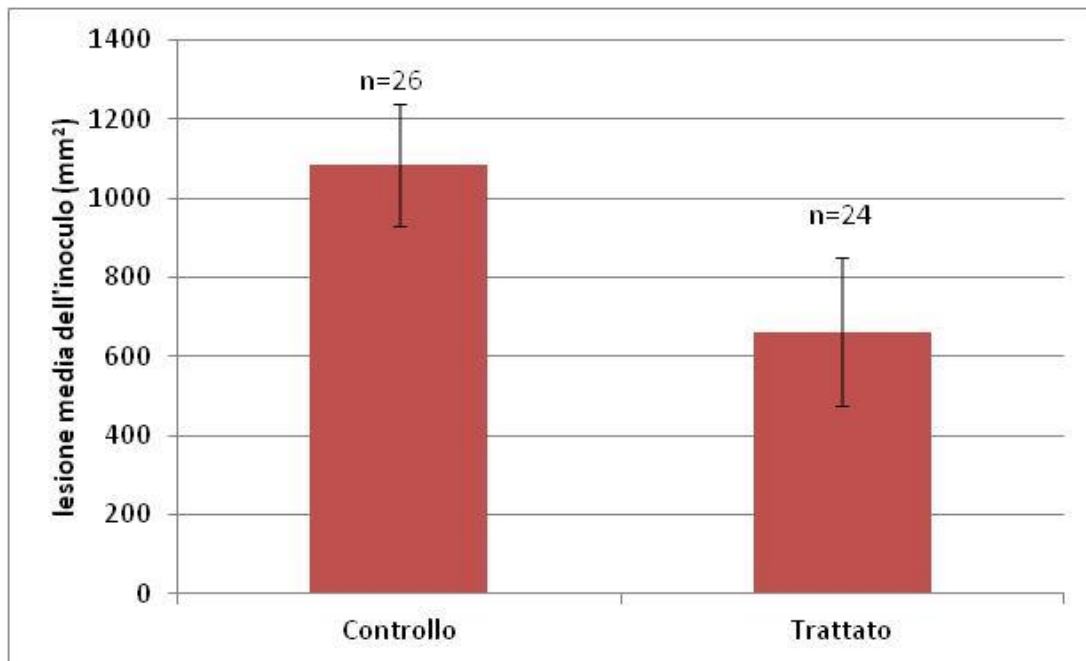


Figura 35. Area necrotica prodotta da *B. cinerea* PM10 a 170 hpi su foglie di vite trattate con 4 *allil-2-metossifenolo* e *(2E)-3-fenilprop-2-enal* e foglie del controllo non trattato.



Figura 36. Area necrotica prodotta da *B. cinerea* PM10 a 96 hpi su foglie di vite trattate con 4 *allil-2-metossifenolo* e (2E)-3-fenilprop-2-enal (a destra) e su foglie di controllo non trattato (a sinistra).

## 4.5 Test di fitotossicità

I trattamenti con 4 *allil-2-metossifenolo* avevano causato anche sintomi di fitotossicità su foglia. Per caratterizzare tale fenomeno si sono eseguiti trattamenti a base di questa molecola applicata a concentrazioni di 200, 100, 10, 1 e 0,5 mg/ml. I sintomi di fitotossicità provocati dalla soluzioni di 4 *allil-2-metossifenolo*, quando presenti, hanno la caratteristica di manifestarsi velocemente, già a 3 ore dopo il trattamento (Figura 38). In queste prove solo ad alte dosi di 4 *allil-2-metossifenolo* si sono registrati sintomi imputabili alla fitotossicità del trattamento. Alla concentrazione di 200 mg/ml le foglie sono risultate completamente sintomatiche. I trattamenti a 500 µg/ml non hanno causato sintomi di fitotossicità nelle foglie, mentre i trattamenti a 1 e 2 mg/ml hanno presentato sintomi fitotossici estesi al meno dell'8% delle foglie trattate (figura 37), il trattamento a 2 mg/ml inibiva completamente l'infezione di *B.cinerea* anche fino a 10 dpi.

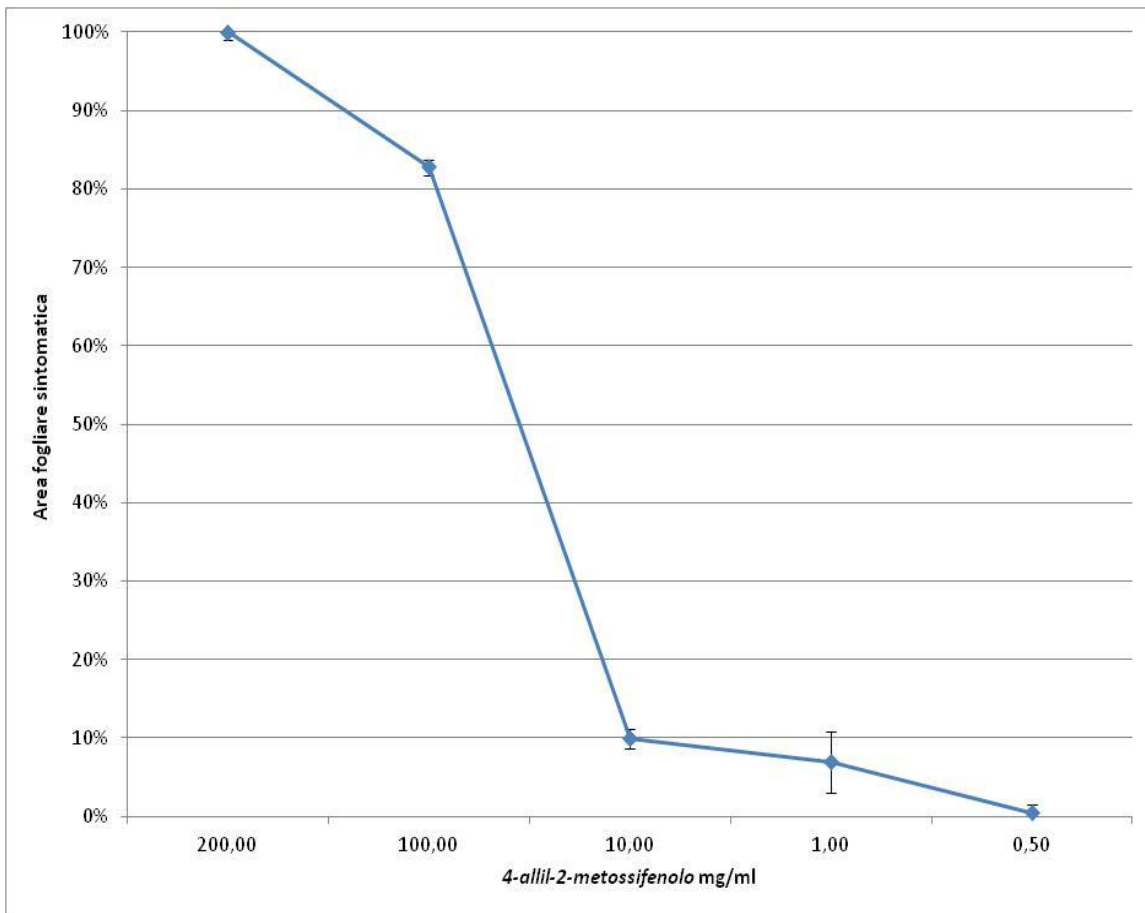


Figura 37 Curva di fitotossicità di 4 *allil-2-metossifenolo* a varie concentrazioni provate.



Figura 38. Sintomi di fitotossicità di 4 *allil-2-metossifenolo* somministrato a 100 mg/ml su foglie di vite cv. *Chardonnay*.

## 5.0 Analisi struttura-attività

Con lo scopo di individuare le caratteristiche strutturali comuni alle molecole che hanno dimostrato un effetto inibitorio nei vari saggi è stata eseguita un'analisi struttura-attività mettendo in relazione alcuni parametri chimico-fisici con l'EC80 calcolato. A molecole che non avevano fornito effetti inibitori nel primo screening è stato assegnato un valore convenzionale di EC80 pari a 3000 µg/ml mentre a molecole che avevano fornito un debole effetto è stato assegnato un valore convenzionale di EC80 pari a 2500 µg/ml (Tabella 7). Da questa analisi è stato escluso il 2 *metossifenolo* (l'assenza di attività inibitoria è imputabile alla sua fotolabilità). Tutte le molecole provate si caratterizzano per un'alta lipofilia, espressa dal parametro logP. L'importanza di questo coefficiente consiste nell'indicazione del livello di idrofilia o idrofobia, in termini pratici questo coefficiente viene indicato su scala logaritmica in base 10. I valori sono positivi in caso di molecole dal forte carattere idrofobo, e correlati in maniera positiva con questa caratteristica. Le molecole testate hanno valori di logP relativamente alti, variano infatti da 0,98 a 3,27. Tale parametro è positivamente correlato con la capacità di interazione con i fosfolipidi (Dambolena et. al., 2011). Le molecole con attività antifungina maggiore tra quelle saggate presentano valori di logP più elevati e quindi sono potenzialmente più portate all'interazione con i fosfolipidi di membrana. La correlazione negativa e più elevata ( $R^2=0,858$ ) tra parametro chimico e capacità antifungina è risultata essere quella in relazione ai valori della *polar surface area* (PSA) messa in evidenza nella figura 43. Molecole con un'elevata PSA riescono a permeare le cellule, penetrando e superando il plasmalemma. Le molecole più attive in termini di inibizione della crescita in vitro di *B. cinerea* si caratterizzano per una PSA bassa, con valore compreso tra 30 e 17 Å<sup>2</sup>. Tale parametro è indice della tendenza a non superare il plasmalemma di una molecola. Un altro elemento che accomuna tutte le molecole con forte attività inibitoria è il numero di donatori di ponti idrogeno (HBD, hydrogen bond donor), tale parametro corrisponde al valore di 1 per 4 *allil-2-metossifenolo*, 2 *metoossi-4-propenilfenolo*, 2 *idrossi-3-metossibenzaldeide*, (2*E*)-3-*fenilprop-2-enal*, 5 *isopropil-2-metilfenolo* e 2 *isopropil-5-metilfenolo*. Queste molecole hanno valori di HBA (hydrogen bond acceptor) diversi, tale parametro è comunque inferiore a 2 nelle molecole con attività antifungina più marcata. Troppi ponti idrogeno rendono la molecola eccessivamente polare, impedendone la diffusione nelle parti lipofile (Lipinski et al. 2001). Come proposto da altri autori esistono

altri parametri ritenuti importanti e fortemente correlati con l'attività inibitoria che possono essere presi in considerazione, quali *refrattarietà molare* e l'*area di saturazione* delle molecole (Dambolena et al., 2012). Un'elaborazione di un modello matematico che tenga in considerazione tutti questi parametri (quasi tutti facilmente recuperabili da database chimici disponibili come *pubCHEM* e *chEMBL*) può fornire un buon strumento per predire il comportamento di molecole naturali e non nei confronti di *B. cinerea* e altri patogeni. Queste indicazioni bypassando la prima fase di ricerca in laboratorio, accorciando notevolmente i tempi di sviluppo, i cui limiti sono approfonditi nella discussione del presente lavoro.

**Tabella 7** EC80 medio tra i due ceppi calcolato mediante modellizzazione *logit* o convenzionalmente assegnato e alcune caratteristiche chimico fisiche delle stesse correlate alla capacità inibitoria.

Nome IUPAC	EC80* (µg/ml)	logP	PSA	HBD	HBA
<i>4 allil-2-metossifenolo</i>	298	2,58	29,46	1	1
<i>2 isopropil-5-metilfenolo</i>	308	3,27	20,23	1	2
<i>(2E)-3-fenilprop-2-enal</i>	400	1,71	17,07	1	0
<i>2 metossi-4-propenilfenolo</i>	484	2,53	29,46	1	1
<i>5 isopropil-2-metilfenolo</i>	492	3,27	20,23	1	2
<i>2 idrossi-3-metossibenzaldeide</i>	820	1,33	46,53	1	3
<i>Acido 3,4-diidrossibenzoico</i>	2500	0,98	76,76	4	3
<i>Acido cumarico</i>	2500	1,69	57,53	2	3
<i>Acido caffeico</i>	3000	1,44	77,76	3	4
<i>Acido 4-idrossibennoico</i>	3000	1,23	63,6	2	3
<i>Acido 3,4-dimetossibennoico</i>	2500	1,43	55,76	1	4

\*medio tra i due ceppi (PM10 e B05.10)



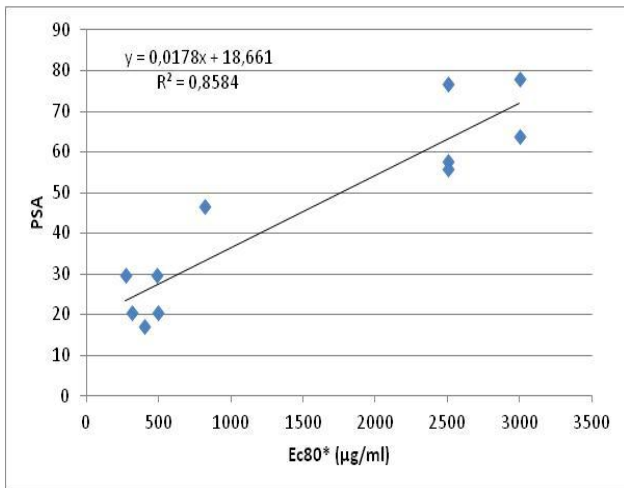


Figura 43. Correlazione tra PSA ed EC80 medio.

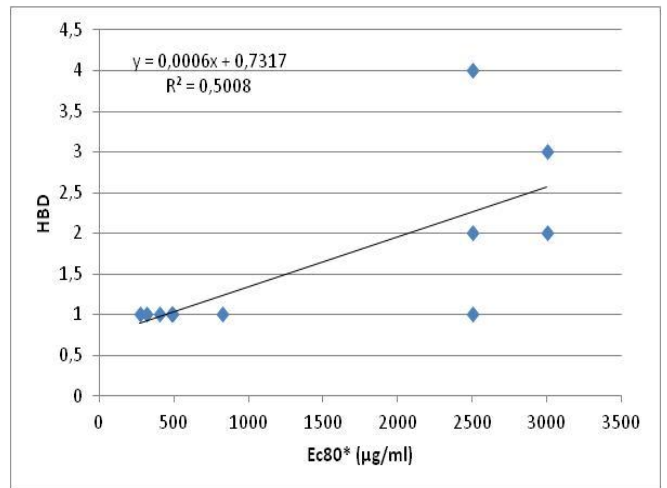


Figura 44. Correlazione tra il valore di HBD ed EC80 medio.

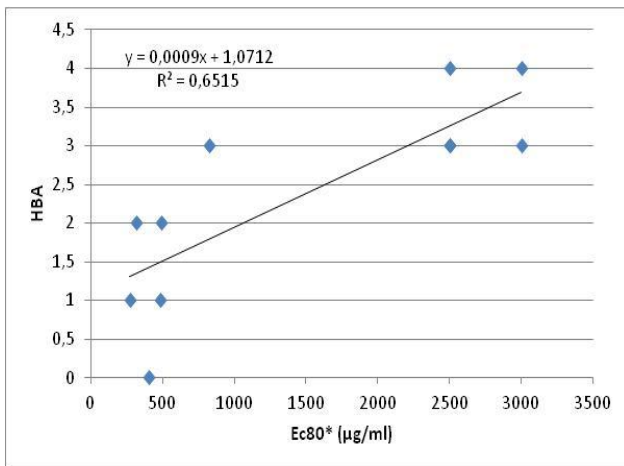


Figura 45 Correlazione tra il valore di HBA ed EC80 medio.

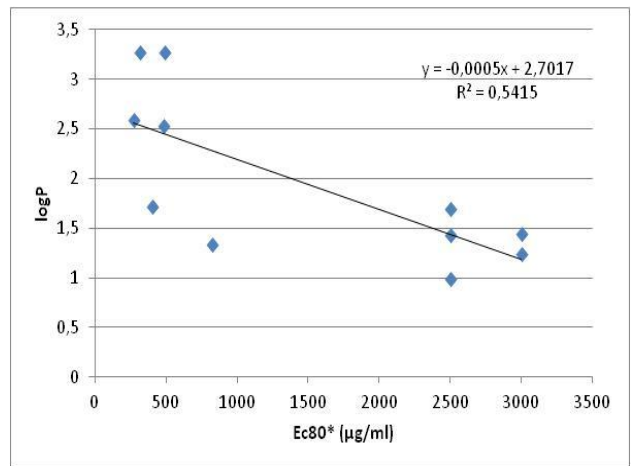


Figura 46. Correlazione tra logP ed EC80 medio.

## 6.0 Discussione

Nel presente lavoro di tesi è stata accertata la capacità di alcune molecole naturali di inibire lo sviluppo in vitro di *B. cinerea* sia nei confronti della crescita miceliare sia sulla germinabilità delle spore, con un effetto su queste definibile abbattente. Inoltre si è accertata la capacità di alcune di esse di rallentare e in alcuni casi inibire l'infezione di *B. cinerea* in vari tessuti di vite. La molecola ritenuta più interessante è risultata il 4 *allil-2-metossifenolo* che ha mostrato un effetto medio un' inibizione sulla crescita miceliare maggiore rispetto ad altre molecole. (2*E*)-3-*fenilprop-2-enal* invece alle più alte concentrazione testate (500 µg/ml) in vitro si è dimostrata in grado di inibire completamente la crescita di *B. cinerea* con un effetto protratto nel tempo. L'attività inibitoria delle molecole testate nei confronti di *B. cinerea* (ceppo PM10 e B05.10) segue questo ordine decrescente: 4 *allil-2-metossifenolo*, 2 *isopropil-5-metilfenolo*, (2*E*)-3-*Fenilprop-2-enal*, 2 *metossi-4-propenilfenolo*, 5 *isopropyl-2-metilfenolo*, 2 *idrossi-3-metossibenzaldeide*. *Acido Coumarico*, *Acido 3,4-diidrossibenzoico*, *Acido 3,4-dimetossibenzoico* invece hanno mostrato un effetto inibitorio molto blando e transitorio, altre non hanno dimostrato alcun effetto in vitro. Tale scala di inibizione risulta in parte diversa da quella determinata da altri autori con le stesse molecole nei confronti di *F.verticillioides* (Dambolena et al., 2012). È probabile che i due funghi abbiano sviluppato meccanismi di adattamento e detossificazione divergenti ad oggi sconosciuti. L' EC50 e l'EC80 ottenute dopo trasformazione *logit* sono risultate diverse nei confronti dei due ceppi di *B. cinerea*. La diversa risposta potrebbe essere dovuta ad una diversa espressione di geni regolatori (per esempio i *VELVET*) che determinerebbero, non solo una diversa virulenza dei ceppi (Schumacher et. al., 2012), ma anche un diverso adattamento a molecole antifungine. Sono emerse inoltre delle differenze con i valori di EC50 ed EC80 determinati da altri autori per alcune delle molecole testate nei confronti di *B. cinerea* ceppo B05.10, dal resto è noto che saggi di inibizione anche solo parzialmente differenti forniscono dati dissimili. È stato dimostrato infatti che una notevole influenza viene esercitata dal tipo di substrato utilizzato, ad esempio se liquido o solido, (Cotoras et al., 2013), o dal metodo di saggio; per esempio esistono metodi che prevedono lo studio delle fasi gassose (*microatmosphere method*) delle molecole (Afra et al., 2005). Il substrato e il metodo di saggio utilizzato influenzano quindi l'attività della molecola testata, tale interazione dipende dalle caratteristiche chimico fisiche di questa (per esempio struttura, pressione di vapore, idrosolubilità). Si avverte quindi la necessità

di trovare un protocollo condiviso e standardizzato per confrontare l'attività antifungine di molecole naturali. Il metodo applicato in questo lavoro di tesi con la resazurina sembrerebbe un buon candidato a soddisfare tale caratteristiche, tuttavia tale metodo è influenzato dal pH del mezzo di crescita. Al fine di determinare quali caratteristiche chimico-fisiche fossero più correlati con l'attività inibitoria delle molecole è stata condotta un'analisi struttura-attività. Tale studio ha permesso di chiarire che tutte le molecole con un effetto inibitorio elevato sono caratterizzate da un elevato logP (indice di ripartizione ottanolo/acqua), e un basso PSA (*polar surface area*), tali parametri indicano che queste molecole hanno un'alta affinità per il comparto fosfolipidico e sono propense a permanere a livello del plasmalemma e presumibilmente della parete (Brennana et al. 2013). Ipoteticamente disturbano la membrana cellulare limitando la funzionalità delle proteine associate e comportano un immediato aumento di permeabilità della membrana, con conseguente perdita immediata di liquidi (Wang et al. 2010). Tale alterazione di attività è noto e ampiamente dimostrato nei confronti delle pompe protoniche di batteri gram-positivi che, a contatto con queste molecole, diminuiscono la loro attività (Brut et al., 2004; Deepak et al., 2013). Il significativo innalzamento del pH del substrato salino inoculato con *B.cinerea* verificatosi a concentrazione di 200 µg/ml di *4 allil-2-metossifenolo* potrebbe essere dovuto all'alterazione dell'attività di proteine di membrana *H+ATPase*. L'abbassamento transitorio del pH a 10 µg/ml di *4 allil-2-metossifenolo* è alle conoscenze attuali non facilmente spiegabile. Molti autori hanno proposto un ruolo centrale nel meccanismo di detossificazione attuato dai trasportatori di membrana. I geni in questione, in presenza di *4 allil-2-metossifenolo* nel substrato, subiscono una sovraespressione, specialmente il gene *BcatrB* di *B. cinerea* (Schoonbeek et al., 2003). Tale fenomeno si manifesta anche in *Septoria tritici* (Zwiers et al., 2000). Come già ricordato uno dei ruoli dei trasportatori di membrana è quello di espellere prodotti tossici dal citosol della cellula, ma il *4 allil-2-metossifenolo* ha come bersaglio le membrane cellulari ed è caratterizzata da una bassa PSA. È probabile quindi che l'*up-regulation* dei trasportatori sia dovuta a un declino dell'attività degli stessi che si verifica in presenza di un disturbo alle membrane. Tale declino minerebbe la normale omeostasi della cellula fungina e indurrebbe l'espressione di geni codificanti trasportatori di membrana. Lo sviluppo e l'ampliamento dell'analisi struttura-attività può permettere la creazione di modelli matematici in grado di predire l'efficacia di molecole simili a quelle usate, accelerando il processo di sviluppo di nuovi fungicidi. Tuttavia tali modelli possono dare

risposte attendibili solo su molecole che hanno analoghe caratteristiche strutturali e funzionali. Trattamenti a base di *4 allil-2-metossifenolo* si sono dimostrati in grado di inibire l'infezione di *B. cinerea* in foglie e acini. Tuttavia è emerso un diverso grado di protezione tra le cv *Merlot* e *Cabernet*. È possibile che eventuali caratteristiche diverse dei tessuti delle due cultivar interagiscono con la molecola modificando il livello di efficacia del trattamento. La fitotossicità di *4 allil-2-metossifenolo* osservata con trattamenti ad alte concentrazioni può essere dovuta al fatto che questa molecola è un potente inibitore di lipossigenasi vegetale (Naidu 1995), tuttavia possibile bersaglio anche del fungo. Va ricordato inoltre che i livelli di EC50 e EC80 calcolati nel presente lavoro risultano alti se paragonati ai normali fungicidi di sintesi, per ovviare a tale problematica risulta opportuna la ricerca di sinergie con altre molecole naturali, come proposto da altri autori (Burt, 2004), oltre allo sviluppo di adeguate coformulazioni e coformulati. Tuttavia le prove di somministrazione contemporanea in vitro tra *4 allil-2-metossifenolo* con *2 isopropil-5-metilfenolo* e *(2E)-3-fenilprop-2-enal* non hanno dimostrato effetti sinergici, dal resto sono molecole con caratteristiche e meccanismi simili se non del tutto uguali. I trattamenti con somministrazione contemporanea di *4 allil-2-metossifenolo* e *(2E)-3-fenilprop-2-enal* (entrambe usate a concentrazioni di 0,5 mg/ml) hanno garantito un soddisfacente grado di protezione dei tessuti di vite dall'infezione di *B. cinerea*, senza manifestare alcun sintomo di fitotossicità.

## 7.0 Conclusioni e prospettive future

I meccanismi d'azione ma soprattutto l'adattamento del fungo a queste molecole devono essere ancora spiegati, tale chiarimenti possono essere forniti da un approccio trascrittomico nello studio dell'interazione molecola-organismo, tale metodologia è stata intrapresa di recentemente a seguito dei dati emersi da questo lavoro ed è in fase di studio. *4-allil-2-metossifenolo* oltre ad essere la molecola che esplica un'attività inibitoria in vitro più elevata nei confronti di *B.cinerea* ha anche una tossicità relativamente bassa. *4-allil-2-metossifenolo* è un composto fenolico presente in grandi quantità nell'olio essenziale di garofano e di molte altri oli essenziali di basilico, noce moscata e cannella, quindi facilmente recuperabile di cui si conosce l'intera pathway di sintesi (Gang et al., 2002) replicabile anche per via sintetica (Sadeghion et al., 2008). Dimostrandosi in grado di inibire l'infezione di *B.cinerea* può essere usata come fungicida, o presa come

ispirazione per la sintesi di nuovi fungicidi (Ma et al., 2013). Tuttavia la sua alta fitotossicità nei confronti delle foglie implica una corretta formulazione e utilizzo, usando tecniche e modalità di applicazione da definire e sviluppare, sia con sperimentazione in campo che in laboratorio. Da questo punto di vista sembra interessante la possibilità di modificare l'attività di questa molecola attraverso *glicoconiugazioni* proposte di recente, che migliorerebbero le caratteristiche della molecola agevolando di molto il suo utilizzo (Zhang et al., 2013). Per concludere, a seguito dei risultati emersi da questo lavoro, è stata iniziata e attualmente è in corso una prova sperimentale in campo che prevede l'utilizzo di una coformulazione tra *4-allil-2-metossifenolo* e *(2E)-3-fenilprop-2-enal* come applicazione antibotritica, applicata ad un vigneto di cv. *Chardonnay* e uno di cv. *Glera*. La prova sperimentale è stata disegnata su modello dei *blocchi randomizzati*, sarà analizzata l'eventuale capacità del trattamento proposto di abbattere la carica d'inoculo di *B.cinerea* presente nei tessuti di fiori e grappoli.

## 8.0 Bibliografia

- Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical Structure. *Letters in Applied Microbiology*. 43:149–154
- Bishop C.D. 1995. Antivital activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* cheel against tobacco mosaic virus. *Jurnal of essential oil research*. 7:641-644.
- Boyle W., 1955. Spices and essential oil as preservatives. *The American perfumer and essential oil Review* 66:25-28.
- Braga PC, Alfieri M, Culici M, Dal Sasso M. 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses*. 50:502-6.
- Brennan T.C.R., Krömerb J.O. and Nielsen L.K. 2013. Physiological and Transcriptional Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to d-Limonene Show Changes to the Cell Wall but Not to the Plasma Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3590-3600 . *Mycoses*. 50:502-6.
- Burt S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. 2004. *International Journal of Food Microbiology* 94:223– 253.
- Cacciola S.O., Faedda R., Sinatra F., Agosteo G.E., Schena L., Frisullo S., Magnano G., 2012. Olive Anthracnose. *Journal of Plant Pathology*. 94:29-44.
- Cho J.J., Moon J.H., Seong K.Y., Park K.H. 2005. Vol. Antimicrobial Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid and trans 4-Hydroxycinnamic Acid Isolated and Identified from Rice Hull. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62:2273-2276.
- Commènil P., Belingheri L. 1998. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *B.cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52:1-14.
- Commènil P., Belingheri L., Baue G., Dehorter B. 1999. Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:37-43.

- Cragg G.M., Newman D.J. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 3670–3695.
- Cosentino S, Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29:130–135.
- Cotoras M., Castro P., Vivanco H., Melo R., Mendoza L. 2013. *Mycologia*. 105:28-33. Farnesol induces apoptosis-like phenotype in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*.
- Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou G.M. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection*. 22:139–44.
- Dambolena J.S., Zygadlo J.A., Rubinstein H.R. 2011. Antifumonisin activity of natural phenolic compounds. A structure–property–activity relationship study. *International Journal of Food Microbiology*. 145:140–146.
- Delaiti M., Brida M., Angeli G., Oliviero S. 2008. Residui sull’uva di trattamenti antibotritici. *L’Informatore Agrario*. 45:4.
- Del Fabro A. 2013. Coniugare reddito e ambiente è questione di tecnologia. *Vigne e Vini*. 4: 51- 54
- Delaiti M., Sandri O., Brida B., Angeli G. I residui sull’uva di trattamenti antibotritici. 2008. *Supplemento Difesa Vigneto e Frutteto-L’Informatore Agrario*. 45.
- Di Capasso F., Borrelli, F Capasso R., Longo R. *Farmacognosia applicata: Controllo di qualità delle droghe vegetali*. 2007. Rizzoli.
- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem*. 55:4863–70.
- Dudareva N, Klempien A, Muhlemann J.K., Kaplan I. 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic.. *New Phytologist*. 198:16–32.

- Duke O.S., Romagni J.G., Dayan F.E. 2000. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection* 19:583-589.
- Favaron F., D'Ovidio R., Porceddu E., Alghisi P. 1994. Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. *Plant Pathology* 195:80-87.
- Favaron F., Castiglioni C., D'Ovidio R., Alghisi P. 1997. Polygalacturonase inhibiting proteins from *Allium porrum* L. and their role in plant tissue against fungal endo-polygalacturonases. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 50:403–417.
- Fitzgerald D.J., Stratford M.J., Gasson M.J., Ueckert J., Bos A., Narbad A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. 2004 *Journal of Applied Microbiology*. 97: 104–113.
- Gill A.O., Holley R.A. 2006. Inhibition of membrane bound ATPase of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant essential oil aromatics. *International journal of food microbiology* 111: 170-174.
- Guenther E. 1948. *The essential oils*. D. Van Nostrand. New York.
- Isman B.M. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603.608.
- Janni M, Sella L, Favaron F, Blechl A.E, De Lorenzo G., D'Ovidio R. 2008. The Expression of a Bean PGIP in Transgenic Wheat Confers Increased Resistance to the Fungal Pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Pathology* 21:171-177
- Karu N., Reifen R., Kerem Z., J. 2007. Weight Gain Reduction in Mice Fed Panax ginseng Saponin, a Pancreatic Lipase. Inhibitor Agric. Food Chem. 55:2824-2828.
- Khalil; El Yamani, Jamal; Rossi-Hassani, Badr-Din. 2006. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *Food Microbiology* 183:191–195.
- Klnt .J., Holley R.A. 2010. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *J Food Microbiol*. 140:164-8.



- Kubo I., Muroi H., Himejima M. J. 1993. Combination Effects of Antifungal Nagilactones Against *Candida albicans* and Two Other Fungi with Phenylpropanoids. *J Nat. Prod.* 56:220–226.
- Lamastra L., Capri E. 2012. Calcolo dell'impronta carbonica in viticoltura. *Informatore Agrario*.30: 43-46.
- Leroch M, Kleber A, Silva E, Coenen T, Koppenhöfer D, Shmaryahu A, Valenzuela PD, Hahn M.2013. Transcriptome Profiling of *Botrytis cinerea* Conidial Germination Reveals Upregulation of Infection-Related Genes during the Prepenetration Stage. *Eukaryot Cell.* 12:614-26.
- Leroux P, Walker A.P. 2013. Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. *European Journal of Plant Pathology.* 135:683-693.
- Li W., Zhang M., Wang Z., Wang Y.P., Zheng Y., Zhang.J. 2011. Simultaneous RP-HPLC Determination of Six Platycosides: Application to an Enzymatic Preparation Study. *Chromatographia.* 74:777–782
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 46:3–26.
- López-Maloa A., Maris Alzamora S., Palou E. 2005 *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology.* 99:119–128.
- Ma Y.T., Fan H.F., Gao Y.Q, Li H., Zhang A., Ming Gao J. 2013. Natural Products as Sources of New Fungicides (I): Synthesis and Antifungal Activity of Acetophenone Derivatives Against Phytopathogenic Fungi. *Chem Biol Drug Des.* 81: 545–552.
- Paster N., Juven B.J., Harshemesh H. 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *Journal of Applied Microbiology* 64:293–297.
- Patil S.D, Sharma R., Srivastava S., Navani N.K., Pathania R. 2013. Downregulation of *yidC* in *Escherichia coli* by Antisense RNA Expression Results in

Sensitization to Antibacterial Essential Oils Eugenol and Carvacrol. PLoS ONE 8(3): e57370. doi:10.1371/journal.pone.0057370.

- Pelloux-Prayer A.L., Primer B., Joseleau J.P. 1998. Kinetic evaluation of conidial germination of *Botrytis cinerea* by a spectrophotometric method. *Mycol. Res.* 102:320-322.
- Pertot I., Prodorutti D., Angeli D., Puopolo G., Giovannini O., A.pellegrini A., Oliveira Longa C.M., Perazzoli M. 2013. Difesa sostenibile con i biofungicidi microbiologici. *L'informatore agrario-Vigneto e frutteto.* 7:9.
- Rattanapitigorna P., Arakawab M., Tsubob M. 2006. Vanillin enhances the antifungal effect of plant essential oils against *Botrytis cinerea*. *International Journal of Aromatherapy.* 16:193–198.
- Reis H, Pfiffi S., Hahn M. 2005. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology.* 6:257–267.
- Russell, P. Morton V., Staub T., E. 2005. A century of fungicide evolution. *A Short History of Fungicides.* *Journal of Agricultural Science.* 143:11-25.
- Schoonbeek H., Del Sorbo G., De Waard M.A. The ABC Transporter BcatrB Affects the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to the Phytoalexin Resveratrol and the Fungicide Fenpiclonil. 2001. *MPMI.* 14:562–571.
- Schoonbeek H., van Nistelrooy J., de Waard M.A. 2003. Functional Analysis of ABC Transporter Genes From *Botrytis cinerea* Identifies BcatrB as a Transporter of Eugenol. *European Journal of Plant Pathology.* 109:1003-1011.
- Temme N., Oeser B., Massaroli M., Heller J., Adeline S., Collado I.G. 2012. BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 13:704–718.
- Untiedt R., Blanke M.M. 2004. Effects of fungicide and insecticide mixtures on apple tree canopy photosynthesis, dark respiration and carbon economy. *Crop Protection.* 23:1001–1006.

- Voigt C.A., Schafer W., Salomon S. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals *The Plant Journal*. 42:364–375.
- Wendakoon, Chitra N.; Sakaguchi, Morihiko. 1995. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. *Journal of Food Protection*. 58:280-283.
- Xu B.J., Han L.K., Zheng Y.N., Jeong Hyun Lee J.H., Sung C.K. 2005. In Vitro Inhibitory Effect of Triterpenoidal Saponins from *Platycodi Radix* on Pancreatic Lipase. *Arch Pharm Res*. 28:180-185.
- Xu J., Song X., Yin Z.Q., Cheng A.C., Jia R.Y, Deng X.Y., Ye K.C., C. F. Shi, C. Lv. Zhang W. 2012. Antiviral activity and mode of action of extracts from neem seed kernel against duck plague virus in vitro. *Poult Sci*. 91:2802-2807.
- Yen T.B., Chang S.T.. 2006. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi.\*\*\*\*\*
- Zhang P., Zhang E., Xiao M., Chen C., Xu W. 2013. Enhanced chemical and biological activities of a newly biosynthesized eugenol glyconjugate, eugenol  $\alpha$ -D-glucopyranoside. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:1043:1050.
- Zwiers L.H., De Waard M.A. 2000. Characterization of the ABC transporter genes *MgAtr1* and *MgAtr2* from the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol*. 30:115–125.

Siti

[www.punchem.com](http://www.punchem.com)

[www.chemlab.com](http://www.chemlab.com)