

A. LAI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati

L. BACCHETTA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

O. MACCIONI, S. PROCACCI

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

S. MUSMECI, R. SASSO

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Sostenibilità, Qualità e Sicurezza
dei prodotti agroalimentari
Centro Ricerche Casaccia

P. CECCOBELLI

Unità Sanitaria Locale (ASL)/rm202
00157 Roma

**EFFETTO DELL' ESTRATTO DI *ASPHODELUS RAMOSUS* (L)
SPECIE MEDITERRANEA, SUL CONTROLLO DI
PATOGENI ED INSETTI DI INTERESSE AGRARIO**

RT/2023/22/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

A. LAI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati

L. BACCHETTA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

O. MACCIONI, S. PROCACCI

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi
Centro Ricerche Casaccia

S. MUSMECI, R. SASSO

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Laboratorio Sostenibilità, Qualità e Sicurezza
dei prodotti agroalimentari
Centro Ricerche Casaccia

P. CECCOBELLI

Unità Sanitaria Locale (ASL)/rm202
00157 Roma

EFFETTO DELL' ESTRATTO DI *ASPHODELUS RAMOSUS* (L) SPECIE MEDITERRANEA, SUL CONTROLLO DI PATOGENI ED INSETTI DI INTERESSE AGRARIO

RT/2023/22/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina www.enea.it

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

EFFETTO DELL'ESTRATTO DI *ASPHODELUS RAMOSUS* (L) SPECIE MEDITERRANEA, SUL CONTROLLO DI PATOGENI ED INSETTI DI INTERESSE AGRARIO

A. Lai, L. Bacchetta, S. Musmeci, R. Sasso, O. Maccioni, S. Procacci, P. Ceccobelli

Riassunto

L'Asfodelo è una pianta erbacea originaria del sud Europa, Africa, Medio Oriente e sub continente Indiano, ma esprime la sua maggiore diversità soprattutto nel bacino del Mediterraneo. Fin dall'antichità sono riconosciute le sue proprietà terapeutiche ed alimentari essendo ricca in flavonoidi, come luteolina, isovitexina, quercetina, e acidi fenolici (e.g. acido caffeico, gallico e clorogenico) acidi grassi e polisaccaridi ("inulina-type fructooligosaccharides").

Il documento del Green Deal Europeo, 'Farm to Fork', ha posto l'obiettivo, entro il 2030, di una riduzione del 50% dell'uso di sostanze chimiche fitosanitarie. In questo contesto l'uso dei fito-estratti naturali rappresenta una possibile alternativa all'uso dei composti chimici di sintesi da integrare ad altre soluzioni per una gestione sostenibile del sistema produttivo. A questo scopo si è voluto determinare l'effetto di estratti acquosi da radice di *A. ramosus* (L) a diverse concentrazioni sia sullo sviluppo in vitro di *Botrytis cinerea*, patogeno ubiquitario in grado di infettare molte specie vegetali, che sulla schiusa di uova, e sugli stadi giovanili della cimice asiatica, *Halimorpha halys* (Stål), specie invasiva polifaga su cui non sono ancora disponibili efficaci sistemi di controllo. I risultati ottenuti evidenziano un effetto inibitorio dell'estratto di asfodelo, in funzione della sua concentrazione ed un efficace effetto insetticida sulla cimice asiatica. L'estratto è stato analizzato anche per le sue caratteristiche fisico-chimiche.

Parole chiave: *Asphodelus ramosus* (L), Estratto da radici; *Botrytis cinerea* (Pers.), *Halyomorpha halys* (Stål).

Abstract

The Asphodelus genus, is an herbaceous plant originating in southern Europe, Africa, the Middle East and the Indian subcontinent, which exhibits a great genetic variability in the Mediterranean area. Its therapeutic properties have been recognised since the ancient times, as it is rich in flavonoids, such as luteolin, isovitexin, quercetin, and phenolic acids (e.g. caffeic, gallic and chlorogenic acids) fatty acids and polysaccharides ('inulin-type fructooligosaccharides').

*The European Green Deal, in particular the 'Farm to Fork', established the objective of 50% reduction of pesticides use by 2030. In that context, the use of natural phytoextracts represents a possible alternative to the application of synthetic chemical compounds, coupled with other solutions for a sustainable crop management system. The aim of this study was to determine the effect of aqueous extracts of *Asphodelus ramosus* roots at different concentrations on both, in vitro development of *Botrytis cinerea*, a ubiquitous pathogen able to infect many crops, and on eggs and juvenile stages of the Asian bedbug, *Halimorpha halys* (Stål), an invasive polyphagous insect, for which no efficient control systems are yet available. The results obtained show an inhibitory effect of the *A. ramosus* extract, according to the concentrations, and a significant insecticidal effect on the Asian bedbug. The extract was also analysed for its physic/chemical characteristics.*

Keywords: *Asphodelus ramosus* (L); *Botrytis cinerea* (Pers), Root-Tubers extract, *Halyomorpha halys* (Stål).

INDICE

INTRODUZIONE.....	7
MATERIALI E METODI.....	9
Estrazione dei principi attivi da radice di Asfodelo	9
Caratteristiche fisiche, contenuto in polifenoli totali ed attività antiossidante	10
Analisi della componente polisaccaridica	11
Test in vitro su <i>Botrytis cinerea</i>	11
Test su uova di <i>Halyomorpha halys</i>	13
RISULTATI E DISCUSSIONI	14
Caratterizzazione fisico chimica dell'estratto	14
Caratteristiche fisiche, polifenoli e attività antiossidante	14
Determinazione dei polisaccaridi	15
Test in vitro su <i>Botrytis cinerea</i>	16
Test su uova di <i>Halyomorpha halys</i> (cimice asiatica)	20
CONCLUSIONI.....	21
REFERENZE.....	22

EFFETTO DELL'ESTRATTO DI *ASPHODELUS RAMOSUS* (L) SPECIE MEDITERRANEA, SU PATOGENI ED INSETTI DI INTERESSE AGRARIO

INTRODUZIONE

Il genere Asfodelo (L), secondo la classificazione APG del 2016 (Chase et al 2016) appartiene alla famiglia delle *Liliaceae* o *Asfodelaceae*. È nativo del sud Europa, Africa, Medio Oriente e sub continente Indiano, dove è maggiormente diffuso (Malmir et al 2018). Il genere presenta la massima diversità soprattutto nel bacino del Mediterraneo e particolarmente nella penisola Iberica e nel nord Africa. Piante del genere *Asphodelus* sono conosciute fin dall'antichità sia a scopo terapeutico che per l'alimentazione. A questo scopo, vengono utilizzate tutte le parti della pianta: i tuberi, dopo essere pestati, vengono consumati fritti, così come gli steli, le giovani foglie e i semi (Peksel et al, 2013.). A scopo terapeutico l'Asfodelo è stato descritto per la cura di alopecia, reumatismi, eczema, ed eritema solare (Malmir et al 2018). Al-Qudah (2022) descrive l'effetto inibitorio di estratti acquosi e metanolici di *A. fistulosus* sia su batteri gram positivi che gram negativi. Inoltre, diversi studi hanno evidenziato l'effetto inibente di estratti di diverse specie di Asfodelo anche sullo sviluppo di patogeni vegetali. In particolare, estratti da radice di *A. microcarpus* hanno rilevato una potente attività antibatterica e antifungina contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Botrytis cinerea* (El-Seedi 2007) mentre Khaldi et al (2018) hanno dimostrato che estratti di *A. tenuifolius* esprimono un'efficace attività di contrasto alla formazione e germinazione delle spore di patogeni come *Alternaria spp* e *Cladosporium*.

Asphodelus ramosus (figura 1) è la specie più abbondante nel Mediterraneo e le sue proprietà fitochimiche hanno rivelato la presenza di diversi costituenti in relazione alle diverse parti della pianta. Le radici contengono principalmente antrachinoni e polisaccaridi, recentemente caratterizzati come "inulina-type fruttoligosaccarides" attraverso cromatografia e analisi spettrofotometriche (Madia et al, 2021). La parte epigea è invece ricca di flavonoidi, come luteolina, isovitexina, quercetina, e acidi fenolici (come l'acido caffeico, acido gallico, acido clorogenico). Acidi grassi come il palmitico, oleico, linoleico sono stati trovati nei semi. Rimbau et al (1996) hanno dimostrato che estratti di radici di *A. ramosus* agiscono come agenti antinfiammatori in vivo confermando l'uso etnobotanico della pianta per la risoluzione di disordini infiammatori.



Figura 1 Fiore di Asfodelo macchia mediterranea (Fiumicino, RM)

Il recente Green Deal Europeo ha evidenziato, mediante il documento ‘Farm to Fork’, la necessità di una drastica riduzione dell’utilizzo di prodotti fitosanitari in agricoltura in quanto è evidente come l’uso di sostanze chimiche causi un notevole inquinamento di suolo, acqua, e aria. Entro il 2030 è stato fissato l’obiettivo di una riduzione del 50% dell’uso di sostanze chimiche fitosanitarie. Sempre nello stesso documento e sempre entro il 2030, si fa riferimento allo sviluppo dell’agricoltura biologica e alle misure da adottare affinché almeno il 25% del totale dei terreni agricoli venga trattato con questa tecnica produttiva. Dati questi obiettivi, in linea con l’obiettivo di sviluppo sostenibile n.3 delle Nazioni Unite “Assicurare la salute e il benessere per tutti e per tutte le età” risulta indispensabile trovare valide alternative ai composti chimici autorizzati in agricoltura (Regolamento di Esecuzione (UE) n° 1981; regolamento (CE) n. 1107/2009) in modo da limitare i rischi per la salute umana e per l’ambiente

I fito-estratti naturali rappresentano quindi un’opportunità, da integrare ad altre soluzioni, per una gestione sostenibile del sistema produttivo. In tale contesto si è voluto valutare l’effetto di estratti acquosi da radice di *A. ramosus* (Ceccobelli e Mirabella 2017) sullo sviluppo in vitro di *Botrytis cinerea*, patogeno ubiquitario che arreca danni a numerose colture e sulla schiusa di uova, e sugli stadi giovanili di *Halimorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae, cimice asiatica), specie invasiva polifaga su cui non sono ancora disponibili efficaci sistemi di controllo. *Botrytis cinerea* (Pers., 1794) è un fungo necrotico ubiquitario, che può vivere e sporulare come saprofita sui tessuti necrotici (comportamento necrotrofo) o produrre

strutture di sopravvivenza denominati sclerozi (Pertot, et al 2007). È in grado di infettare oltre 200 specie vegetali nel mondo e di causare ingenti danni e perdite economiche (Dean et al., 2012; Hua et al, 2018) alle coltivazioni sia in campo e sia, particolarmente, in post raccolta durante lo stoccaggio e il trasporto (Williamson et al 2007). Infatti, l'infezione può avvenire già prima della raccolta e rimanere silente fino a che le condizioni ambientali rendano favorevole lo sviluppo della malattia. Questa è la maggiore criticità per il controllo lungo la filiera, che attualmente viene **realizzato** attraverso l'utilizzo di prodotti chimici di sintesi, **con** conseguenze negative dovute sia al rilascio di residui tossici per l'ambiente e la salute umana, sia alla possibilità di selezionare ceppi del patogeno sempre più resistenti. Per quanto riguarda la cimice asiatica, insetto polifago alieno che sta creando notevoli danni soprattutto sui fruttiferi del nord Italia (nel 2020 la Coldiretti ha stimato perdite di circa 250 milioni di euro in Emilia Romagna e Veneto e recentemente i danni per l'agricoltura italiana sono calcolati in circa 600 milioni euro/anno) sarà interessante verificare la eventuale azione antimicrobica degli estratti di asfodelo sui batteri simbiotici presenti nell'intestino dell'insetto (Kenyon et al 2015) che, come in altri pentatomidi (Gonella et al, 2020), consentono una normale alimentazione e sviluppo nelle fasi giovanili precoci. Infatti, i batteri simbiotici possono svolgere ruoli fondamentali nella fisiologia, ecologia, nutrizione e riproduzione di molti insetti ospiti; queste strette relazioni possono condurre a elevati livelli di co-evoluzione tali da rendere la simbiosi obbligata.

In particolare, la cimice asiatica *H. halys* dipende per la propria sopravvivenza da simbiotici primari che risiedono nell'ultima regione dell'intestino medio, detta regione V4, e che forniscono all'ospite i nutrienti essenziali mancanti nella sua dieta. Tali simbiotici sono trasmessi alla progenie tramite secrezioni rilasciate dalla madre sulla superficie dell'uovo durante l'ovideposizione, di cui le neanidi neonate si nutrono nelle prime ore successive alla schiusa. Tale meccanismo di trasmissione, quindi, può essere vantaggiosamente inibito o impedito con l'uso di sostanze ad azione antibiotica al fine di controllare la popolazione del fitofago.

MATERIALI e METODI

Estrazione dei principi attivi da radice di Asfodelo

Radici di *A. ramosus* sono state raccolte in Valle Corsa (Lazio Italy). L'estratto è stato ottenuto seguendo il protocollo Ceccobelli e Mirabella (2017). In particolare, 10 g di radici di asfodelo vengono estratti in 1 L di acqua a 120° C per 20'. Dopo decantazione overnight la

soluzione viene filtrata. A questo preparato, per ogni 100 mL si aggiunge 1 μ L di estratto alcalino in acqua preparato con radici estratte in soda. L'estratto di radici così ottenuto viene conservato a 4°C per le successive analisi.

Caratteristiche fisiche, contenuto in polifenoli totali ed attività antiossidante

Il pH, la conducibilità (μ s/cm) e i solidi totali (ppm) sono stati misurati con misuratori portatili Water Quality Meter (VINKK Mod PH-02, A1), i gradi Brix con rifrattometro DBR35.

I polifenoli totali sono stati quantificati con il reattivo Folin-Ciocalteu ed espressi in mg GAE/g (GAE="Gallic Acid Equivalents"). L'estratto di Asfodelo viene centrifugato a 12.000 rpm per 20 minuti e filtrato su filtri di cellulosa acetato. Si preparano due soluzioni reagenti: Folin-Ciocalteu 2 N, diluito 1:10 con acqua, e sodio carbonato 60 g/L. Per la reazione, 0,2 mL di **campione** vengono aggiunti a 5 mL del reattivo di Folin, quest'ultimo costituito da una miscela di acidi fosfotungstici e fosfomolibdici con i quali i composti fenolici, in ambiente alcalino, effettuano una reazione di ossido riduzione **dando** luogo allo sviluppo di una colorazione blu. L'intensità di tale colorazione è direttamente proporzionale al quantitativo di polifenoli presenti nel campione. Dopo 5 minuti di incubazione, si aggiungono 1,5 mL di sodio carbonato, che produce il pH alcalino favorevole allo sviluppo della reazione. Dopo un periodo di incubazione al buio di 30 min, durante il quale ha luogo la reazione, si effettua la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 725 nm. La retta di taratura viene elaborata riportando il valore dell'assorbanza, a 725 nm, in funzione della concentrazione di una serie di soluzioni a concentrazione nota (10, 20, 50, 100, 250, 500 μ g/mL) dello standard di riferimento (acido gallico). La concentrazione di polifenoli totali dell'estratto, espressa in μ gGAE/mL, viene determinata per interpolazione di questa retta dopo lettura dell'assorbanza relativa al campione. Un bianco, preparato con 0,2 mL del solo solvente in cui è disciolto l'estratto, viene letto prima dei campioni azzerando su di esso il valore dell'assorbanza.

L'attività antiossidante dei polifenoli è stata determinata utilizzando il radicale DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) come substrato ossidante. A tale scopo, si prepara una soluzione 60 μ M in etanolo del radicale DPPH. Tale soluzione, di colore blu, presenta un massimo di assorbimento a 515 nm. La neutralizzazione del radicale da parte di agenti riducenti, porta alla decolorazione della soluzione e, quindi, a una diminuzione dell'assorbanza proporzionale all'entità della reazione. Una sostanza a forte potere riducente, come il Trolox (analogo sintetico della vitamina E) viene utilizzato come standard di riferimento per la

misura dell'attività antiossidante. A tale scopo, dunque, si prepara una serie di soluzioni a concentrazione nota di Trolox (100, 250, 500, 750, 1000 μM) e 100 μL di ciascuna di esse vengono addizionati a 2,9 mL di DPPH 60 μM facendo, quindi, trascorrere un intervallo temporale di 60 minuti per il decorso della reazione al riparo dalla luce. Al termine della reazione si legge l'assorbanza della soluzione a 517 nm sullo spettrofotometro. In tal modo, si ottiene la retta di taratura dell'attività antiossidante, la quale definisce la percentuale di inibizione del DPPH in funzione della concentrazione del Trolox assunto come standard di riferimento. La percentuale di inibizione è stata calcolata con la seguente formula:

$$\% \text{ inib.} = (1 - A_c/A_0) \times 100$$

dove A_c è l'assorbanza del campione e A_0 quella del DPPH 60 μM .

La % inibizione si determina aggiungendo 100 μL del campione a 2,9 mL di DPPH 0,06 mM. Per interpolazione della retta si risale alla concentrazione μM equivalente di Trolox, esprimendo così l'attività antiossidante in μM TE (Trolox Equivalents).

Per la lettura dell'assorbanza, in triplicato, è stato utilizzato lo spettrofotometro Lambda 2 Perkin Elmer.

Analisi della componente polisaccaridica

L'analisi è stata effettuata nell'estratto acquoso (precedentemente filtrato a 0,2 μm) mediante eluizione con acqua ultrapura Classe A, su colonna REZEX-Pb⁺⁺ (30 x 0,78 cm; 9 μm), termostata a 80 °C, ad un flusso di 0,6 mL/min in isocratica (tempo di acquisizione: 30 min). L'identificazione e la quantificazione viene effettuata per confronto con uno standard esterno, costituito da inulina purificata, mediante rilevatore ELSD ("Evaporating Light Scattering Detector") impostato con i seguenti parametri: temperatura evaporatore 90° C, temperatura nebulizzatore 30° C, gas di trasporto: azoto x GC (flusso di alimentazione: 1,6 NL/min).

Test in vitro su Botrytis cinerea

Il fungo *Botrytis cinerea* è stato isolato da materiale naturalmente infetto (in particolare piante di basilico) e successivamente allevato in vitro per avere la quantità sufficiente per l'inoculo (figura 2). Il patogeno è un ospite non obbligato, ovvero una volta isolato può essere allevato in vitro su mezzi di coltura artificiali, e mantenuto in camere di crescita. È stato quindi allevato su mezzo di coltura sterile PDA (Potato Dextrose Agar) e mantenuto a 25° C in incubatore LABnet 211DS.

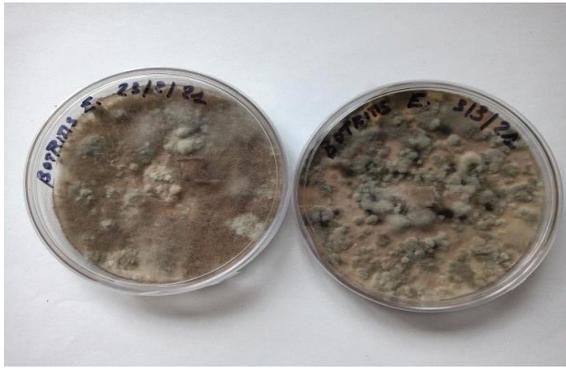


Figura 2 - Isolamento di *Botrytis cinerea* da piante di basilico precedentemente infettate (sinistra) e allevamento in vitro (destra)



Figura 3 - Preparazione dell'inoculo in tasselli di 3mm di diametro in condizioni di sterilità.

Le prove sono state effettuate inoculando con tasselli di micelio fungino di 3 mm di diametro (figure 3 e 4) nel terreno di coltura PDA contenente diverse concentrazioni di estratto di Asfodelo filtrato a 0,22 μm . Lo sviluppo del micelio è stato valutato visivamente nel tempo (sia dal punto di vista della crescita che delle caratteristiche morfologiche). Come controllo il fungo è stato fatto crescere sia su PDA 100% che su PDA a concentrazione di acqua correlate alla concentrazione percentuale di estratto di asfodelo utilizzato:



Figura 4 -Tasselli di fungo utilizzati per il test in vitro con *Botrytis cinerea*.

Sono stati elaborati due esperimenti:

Esperimento 1

L'estratto di Asfodelo è stato addizionato al terreno di coltura PDA nelle seguenti 3 concentrazioni: 10%, 25% e 50%. Lo sviluppo del micelio è stato valutato a 5 giorni dall'inoculo. Le Piastre Petri con aggiunta di estratto di Asfodelo sono state confrontate con i controlli PDA (100%) e PDA addizionato con acqua sterile al 10%, 25%, 50% in 4 repliche per tesi.

Esperimento 2

Sulla base dei risultati dell'esperimento 1 è stata ripetuta la prova partendo dalla concentrazione del 50% di estratto di Asfodelo ed è stata valutata la percentuale superiore, pari al 75%. È stato seguito il protocollo descritto nell'esperimento 1 sia per il numero di repliche che di controlli e misurato il diametro della crescita miceliale ed osservato lo sviluppo morfologico a partire da 2 giorni dall'inoculo (in accordo con quanto riportato da Ait Barka et al 2004).

Test su uova di *Halymorpha halys* (cimice asiatica)

Ovature provenienti da un ceppo di *Halymorpha halys*, allevato in laboratorio, sono state trattate: 1) con una soluzione di estratto di asfodelo grezzo e 2) con una soluzione di estratto di asfodelo filtrato sterile (0,22 µm).

Le ovature (28 uova) sono state previamente coperte con uno strato di garza sterile, per favorire l'imbibizione e il contatto delle stesse con il fitoestratto che è stato somministrato con un dispensatore Eppendorf fino a raggiungere un volume di circa 400 µL; in tal modo

tutte le parti dell'ovatura sono state coperte con un film di soluzione. Le ovature trattate sono state quindi mantenute all'interno di capsule Petri overnight e lasciate asciugare per circa 2 ore. Dopo il trattamento, le ovature sono state separate e disposte ognuna in una piastra Petri contenente baccelli di fagiolini per l'eventuale nutrimento delle larve, insieme a del cotone idrofilo appena inumidito, per evitarne il disseccamento. I rilievi sono stati effettuati ogni 3 giorni dal trattamento e hanno riguardato: il numero di schiusa delle neanidi e successivamente il numero di neanidi morte e sopravvissute. Appena raggiunto il primo stadio di ninfa, gli individui sono stati trasferiti in contenitori cilindrici areati (9 cm L x 29 cm di h) provvisti all'interno di circa 5-6 baccelli di fagiolini. In questa fase sono stati monitorati il numero di ninfe morte e sopravvissute e l'età raggiunta dalle stesse. L'esperimento è stato condotto fino al raggiungimento della seconda età ninfale, dopo la quale l'effetto antibiotico dei composti ad azione antimicrobica diventa trascurabile. Ovature trattate allo stesso modo con acqua sono state utilizzate come controllo (6 repliche per ogni trattamento).

RISULTATI E DISCUSSIONI

Caratterizzazione fisico chimica dell'estratto

Caratteristiche fisiche, polifenoli e attività antiossidante

Per quanto riguarda le caratteristiche fisiche (Tabella 1) il pH rilevato nell'estratto risulta $4,57 \pm 0,1$ probabilmente influenzato dall'aggiunta di estratto alcalino in acqua preparato come riportato in Materiali e Metodi. La conducibilità, pari a $1.584 \pm 0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$, evidenzia la presenza di ioni associata ai solidi totali disciolti che nell'estratto risulta pari a $792 \pm 0,2 \text{ ppm}$. I gradi Brix, che sono un indice legato alla presenza di sostanze organiche rifrattometriche (principalmente carboidrati) sono pari al $10\% \pm 0,1$ in peso (p/p). L'estratto di radici di *A. ramosus* studiato, presenta una concentrazione di $342,92 \mu\text{g GAE}/\text{mL}$ che equivalgono a $34,29 \text{ mg GAEeq}/\text{g}$ di radice secca. L'attività antiossidante è risultata pari a $31,6 \mu\text{mol TE}/\text{mL}$ ossia $3,2 \mu\text{mol TE}/\text{g}$ di radice secca. Dai dati riportati in letteratura (Chimona et al 2014) le specie di Asfodelo contengono diversi metaboliti secondari di interesse come flavonoidi (i.e luteolina), antrachinoni, acidi fenolici (i.e acido caffeico, acido clorogenico), triterpeni e acidi grassi derivati del naftalene. Ghoneim et al (2013) hanno isolato in estratti etanolic, alcuni metaboliti tipici come acido 1,6-dimetossi-3-metil-2-naftoico, asfodelina, crisofanolo e derivati, mentre la ramnosina (biantrone C glicoside) è stata studiata

ampiamente come molecola caratteristica delle radici di *A. ramnosus* (Adinolfi et al 1989). Tra i dati più recenti Khalfaoui et al 2021, hanno studiato estratti di *A. tenuifolius* riportando una concentrazione di 40,99 mg GAE/g (residuo secco) utilizzando cloroformio come solvente di estrazione.

Analisi	Risultati Medie ±DS
pH	4,57 ± 0,1
Conducibilità (µS/cm)	1584 ± 0,1
Solidi totali (ppm)	792 ± 0,2
Gradi Brix	10% ± 0,1
Polifenoli totali (mg GAE/g)	34,29 ± 0,2
Attività antiossidante (µmol TE/g)	3,2 ± 0,01

Tabella 1-Valutazione di caratteristiche fisiche (pH, conducibilità, solidi totali, °Bx), polifenoli totali ed attività antiossidante nell'estratto di Asfodelo. Valori medi ± Deviazione Standard (DS)

Determinazione dei polisaccaridi

In riferimento ai carboidrati presenti nell'estratto di Asfodelo studiato, si rileva una concentrazione di fruttosio pari a $164,7 \pm 0.02$ g/L, una concentrazione di inulina e saccarosio al limite di rilevazione, mentre il glucosio è presente in concentrazione pari a $5,7 \pm 0.02$ g/L. Si può ipotizzare quindi, che l'inulina, tipico polisaccaride presente nelle radici di Asfodelo, abbia subito una idrolisi completa, probabilmente dovuta all'aggiunta dell'estratto alcalino delle radici a freddo. Sulla base di questi risultati si può supporre un grado di polimerizzazione (DP) medio pari a 30, molto simile a quello trovato nelle radici di *Cynara scolymus* (Lopez-Molina et al 2005). Le fibre di inulina a DP più elevato (10-65) favoriscono l'attività metabolica bifidogenica della flora batterica nel colon distale (Coudray et al 2003).

Test In vitro su Botrytis cinerea

Esperimento 1

Dopo 7 giorni dall'inoculo con estratto di Asfodelo alle concentrazioni studiate (10%, 25% e 50%) sebbene non si evidenzia un effetto fungicida, si rileva, tuttavia, alla concentrazione del 25%, una diversa morfologia di crescita del fungo rispetto al controllo. Tale differenza riguarda lo sviluppo vegetativo, con una maggiore presenza di ife bianche e l'assenza di massa grigia dovuta alla presenza di conidi, necessari nella fase di propagazione ed infezione (Pertot et al 2007) che appaiono inibite nel terreno con estratto di Asfodelo. In figura 5 è evidenziato l'effetto direttamente proporzionale alla concentrazione dell'estratto aggiunto nel mezzo di coltura. Infatti, alla concentrazione del 10% non si osservano differenze di accrescimento rispetto al controllo (figura 5 - sinistra), al 25% si osserva una maggiore inibizione dello sviluppo, con presenza di micelio bianco e quindi assenza di conidi (figura 5 - centro), mentre alla concentrazione più alta di estratto, ossia 50%, la differenza morfologica risulta maggiormente evidente (Figura 5- destra). In particolare, si osserva un marcato sviluppo di solo micelio bianco e non di ife grigie, in accordo con Xu et al (2007) che hanno osservato una diversa crescita miceliale e morfologica del fungo in vitro inoculato con estratti naturali di semi di pompelmo e chitosano. I controlli addizionati con la stessa percentuale di acqua, mostrano, invece, una crescita fungina con presenza di conidi come nel controllo PDA 100% (figure 5 e 6 rispettivamente).

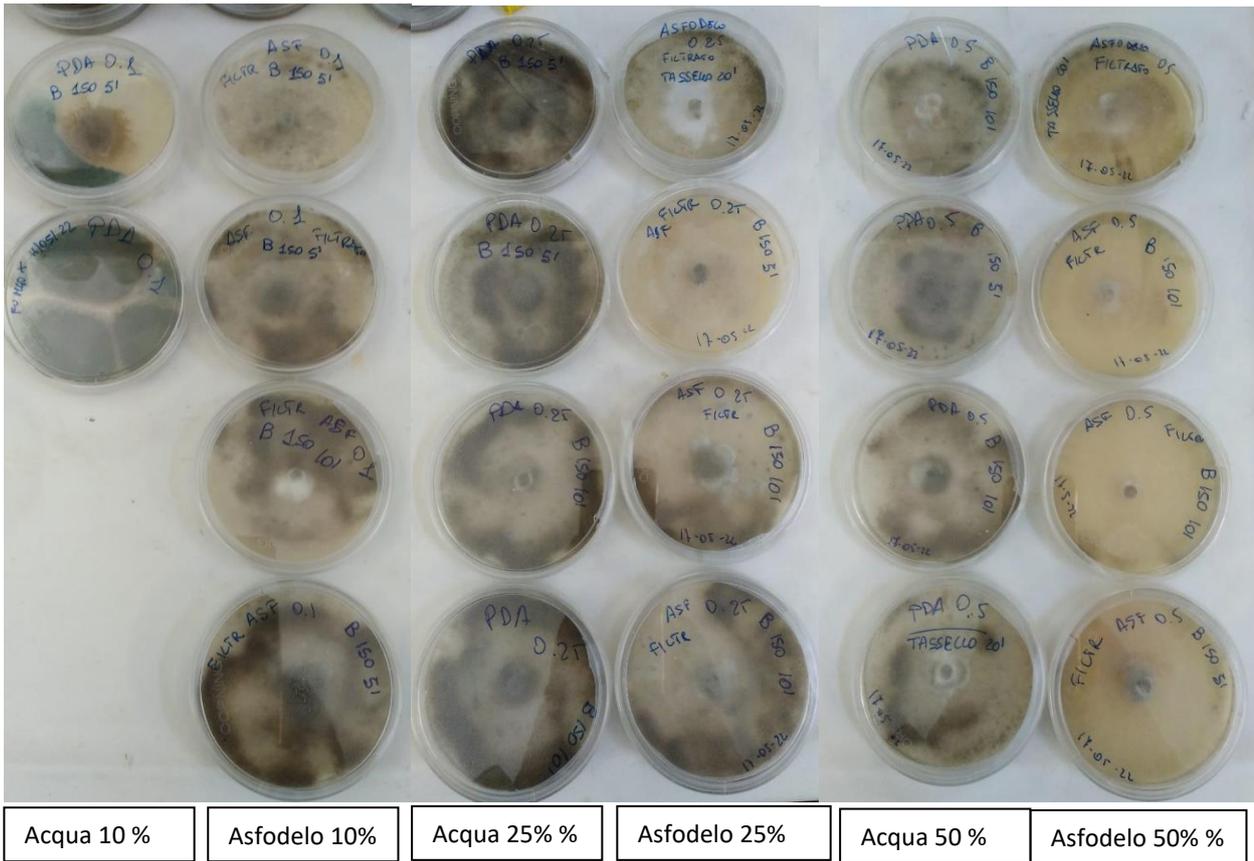


Figura 5 Campioni a dosi crescenti di estratto di asfodelo tal quale (da sinistra a destra 10%, 25%, 50%). Ogni tesi è stata confrontata con campioni a cui è stata aggiunta acqua nelle stesse proporzioni dell'estratto.

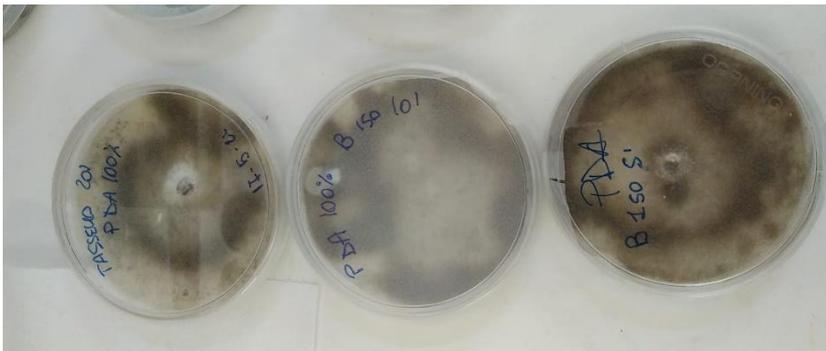


Figura 6 PDA, 100% (controllo 3 repliche)

Esperimento 2

Come riportato in figura 7 già dopo **2 giorni** (T1) dall'inoculo, sia nei terreni di controllo con PDA 100%, che in quelli con PDA in acqua 50% si osserva un inizio di crescita del micelio maggiore rispetto al fungo posto sul terreno con asfodelo 50%. La crescita del fungo è circa la metà rispetto alla crescita sui terreni di controllo ($0,23 \pm 0,1$ cm e $0,6 \pm 0,1$ cm

rispettivamente). Per l'accrescimento morfologico del fungo si osservi anche quanto riportato in Figura 8a (capsule a destra).

Il fungo inoculato sul terreno con estratto di asfodelo al 75%, invece, non mostra nessuna crescita al tempo T1 (Figura 8b capsule a destra). In entrambi i controlli si osserva un inizio di crescita del micelio (circa $0,6 \pm 0,1$ cm rispettivamente) (Figura 7).

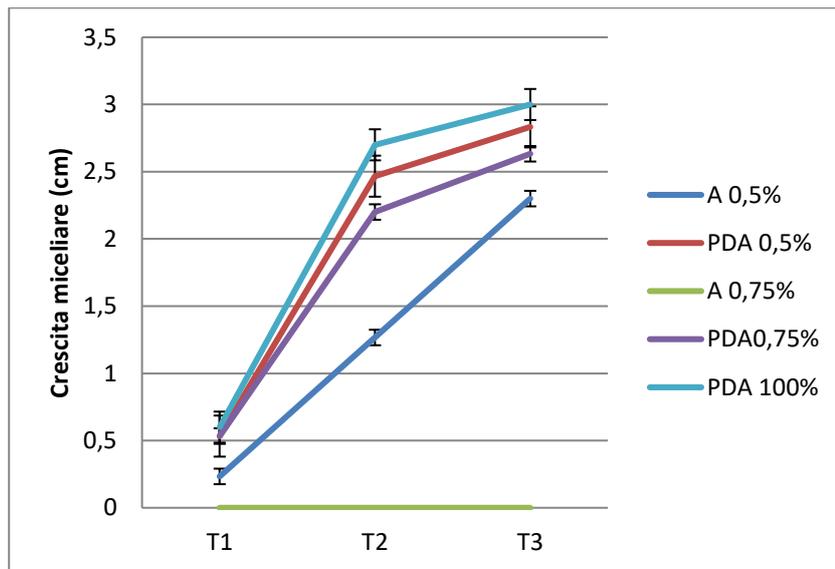


Figura 7 Andamento della crescita del micelio di *Botrytis cinerea* in vitro su terreno addizionato di estratto di asfodelo al 50% (linea blu) e 75% (linea verde) in confronto ai propri controlli PDA addizionato del 50%, 75% e 0% di acqua. La valutazione è stata effettuata su 3 repliche per ogni tesi dopo 2, 5 e 7 giorni dopo l'inoculo (T1, T2, T3 rispettivamente). Valori medi \pm Deviazione Standard

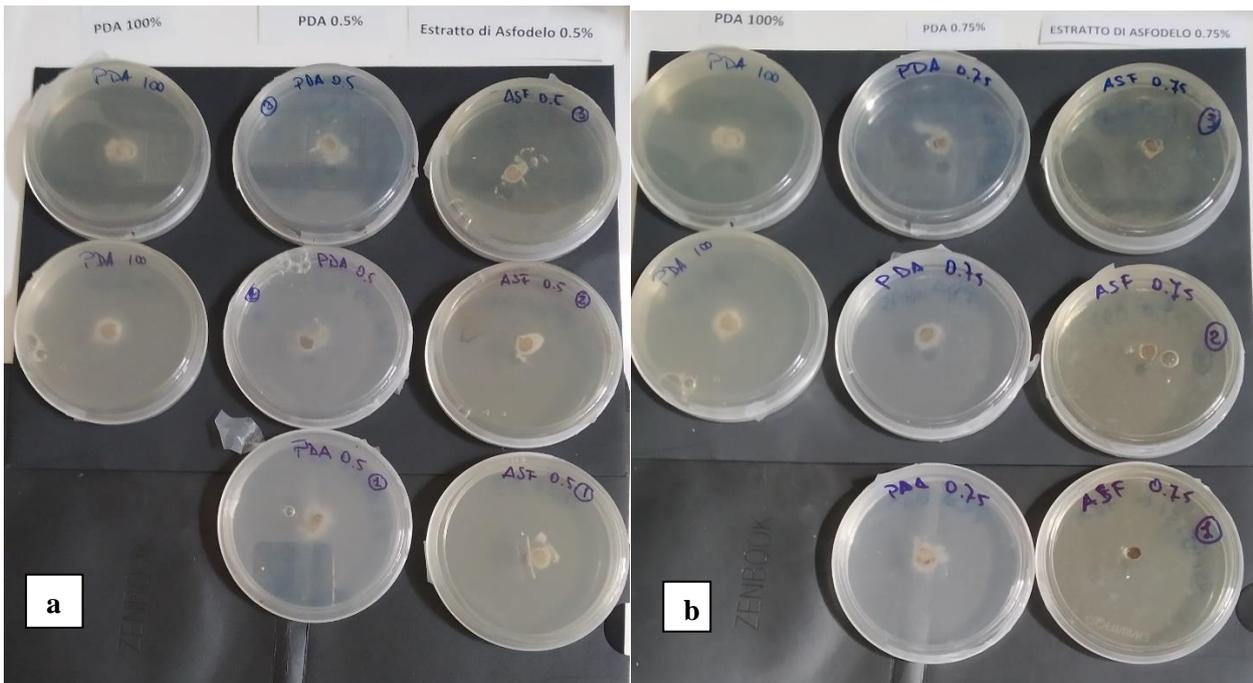


Figura 8 *Botrytis cinerea* su Asfodelo 50% (a) e Asfodelo 75% (b) dopo 2 gg dall'inoculo

Dopo **5 gg** (T2) la crescita del fungo sul terreno con asfodelo 50% si conferma ridotta di circa la metà rispetto ai terreni di controllo, mentre su terreno con asfodelo 75% non si osserva nessuno sviluppo. Nel PDA 100% e PDA 75% la crescita del micelio è confrontabile tra tutti i controlli (Figura 9a e 9b).

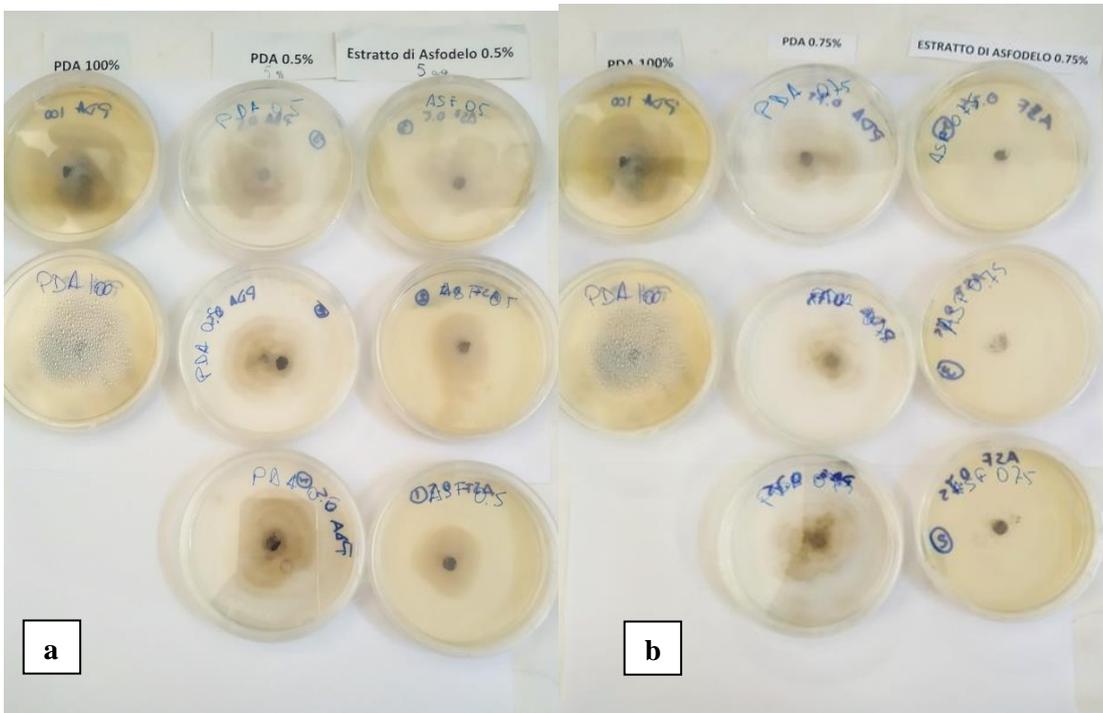


Figura 9 *Botrytis cinerea* su Asfodelo al 50% (a) e Asfodelo 75% (b) dopo 5 gg dall'inoculo

A **7 gg** (T3) si confermano i risultati precedentemente descritti. Si è voluta osservare la crescita del fungo anche dopo **30 giorni** dall'inoculo e, mentre nel terreno con asfodelo 75% una sola replica ha sviluppato un micelio di poco meno di 2 cm nel terreno, con l'asfodelo 50% si osservano sporangi come nei controlli PDA 100%, PDA 50% e PDA 75%. Questo dato conferma un effetto fungistatico dell'estratto al 50% ed un effetto inibitorio a lungo termine sullo sviluppo di *Botrytis cinerea* dell'estratto di asfodelo al 75%.

Test su uova di *Halyomorpha halys* (cimice asiatica)

Dall'analisi dei risultati si evince un potenziale effetto insetticida sulle uova trattate con gli estratti di Asfodelo (tabella 2). In particolare, il trattamento con l'estratto filtrato ha dato i migliori risultati con nessun uovo schiuso e quindi con una mortalità del 100%. Una situazione intermedia è stata rilevata con l'estratto grezzo, con il quale è stata rilevata una mortalità del 78,6% alla seconda età ninfale rispetto al 46,4% rilevato sul controllo trattato con acqua. La mortalità più alta è stata osservata allo stadio di neanide, come atteso in base agli effetti antimicrobici studiati su questo insetto o su insetti analoghi con simbiosi batterica obbligatoria.

Trattamento	Ninfe sopravvissute	±e.s.	Ninfe morte	±e.s.	Mortalità (%)
Acqua	15,0	3,3	13,0	3,3	46,4
Estratto grezzo	6,0	3,0	22,0	3,0	78,6
Estratto filtrato	0,0	0,0	28,0	0,0	100,0

Tabella 2 - Ninfe di 2^a età sopravvissute e morte per ovatura al 5° rilievo sperimentale. Valori medi e Errore Standard (±es)

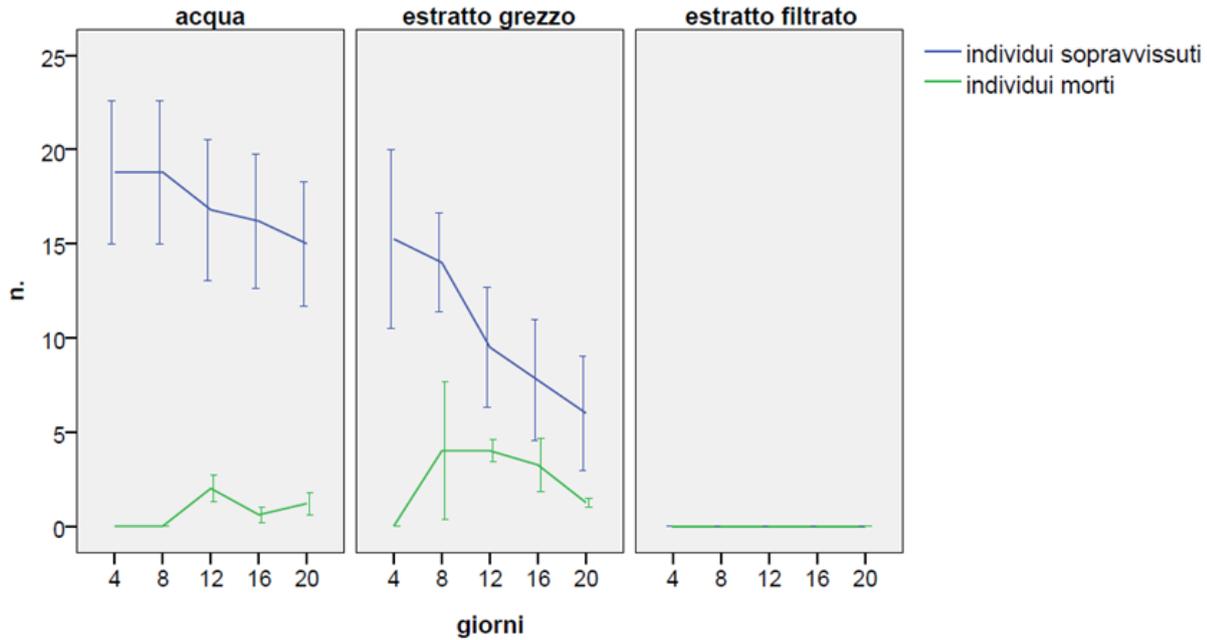


Figura 10 Numero complessivo di individui di *H. halys* sopravvissuti, per ovatura e numero di individui morti per ovatura ad ogni rilievo. Nell'estratto filtrato non sono state mai rilevate uova schiuse. Valori medi \pm Errore Standard (SE)

CONCLUSIONI

L'estratto filtrato esaminato per le caratteristiche fisico/chimiche evidenzia la presenza di biomolecole idrosolubili, data l'estrazione con acqua ("green solvent"). Un estratto etanolic o cloroformico porterebbe in soluzione molte più biomolecole ad azione antiossidante; tuttavia, l'estratto acquoso si è dimostrato interessante per l'azione di contenimento dello sviluppo fungino *in vitro* e sulla schiusa delle uova di cimice Asiatica.

L'estratto di asfodelo alla concentrazione del 75% ha dimostrato un totale effetto inibitorio della crescita vegetativa e riproduttiva *in vitro* di *B. cinerea* che si è confermato anche dopo 30 gg dall'inoculo.

Alla concentrazione del 50% di estratto di Asfodelo, dopo 7 giorni si comincia ad osservare, anche se in misura minore e con presenza di sole ife vegetative, la crescita del micelio: ciò è dovuto probabilmente ad un effetto *fungistatico* piuttosto che *fungicida* nelle fasi iniziali di crescita *in vitro*. Comunque, visto che anche a questa concentrazione si osserva una diversa morfologia di crescita fungina (inibizione della formazione di conidi), si può ipotizzare l'uso dell'estratto anche a concentrazioni minori.

In base ai risultati ottenuti su uova di *Halyomorpha halys* si evince un notevole effetto insetticida dell'estratto filtrato di asfodelo. La mancanza totale di uova schiuse, fa ipotizzare un meccanismo diverso da quello osservato per altri composti ad azione antimicrobica, che hanno un effetto generalmente meno immediato e che interessano invece le fasi di neanide della cimice. Un'azione più blanda e più simile a quella riscontrata in bibliografia (Gonella et al., 2020) a causa di effetti sugli endosimbionti batterici, è stata osservata invece sull'estratto grezzo. Resta dunque da verificare a cosa sia dovuta questa palese differenza, che nel non filtrato potrebbe riguardare, ad esempio, fenomeni di degradazione di sostanze ad azione tossica attive durante la fase di sviluppo embrionale di *H. halys*, oppure semplicemente una diversa concentrazione dei principi attivi nei 2 estratti fin qui saggiati. Va in ogni caso considerato che in questa prima fase dell'esperimento si è adottata una condizione ottimale sia per la durata del contatto che per la distribuzione uniforme dell'estratto su tutta la superficie dell'ovatura. Sarà dunque importante valutare gli effetti degli estratti di asfodelo a concentrazioni via via più basse e in condizioni non ottimali, simili a quelle che normalmente si verificano con gli eventuali trattamenti in campo. Ulteriori esperimenti saranno necessari per valutare l'effetto dell'estratto, tal quale o diluito, su piante in vivo al fine di evitare eventuali alterazioni fisiologiche e/o morfologiche a carico dei diversi organi vegetali (es riduzione dello sviluppo, deformazioni fogliari, ustioni, rugginosità, ecc.).

REFERENZE

- Adinolfi M., Corsaro M. M., Lanzetta R., Parrilli M., Scopa A., 1989. A bianthrone c-glycoside from *Asphodelus ramosus* tubers. *Phytochemistry*. Vol. 28. No 1. pp. 284-288 [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)85063-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)85063-0)
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C. et al., 2004. **Chitosan** improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep* 22, 608–614. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0733-3>.
- Al-Qudah, M. M. A., 2022. **Antibacterial** effect of *Asphodelus fistulosus* aqueous and ethanolic crude extracts on gram positive and gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e260029. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.260029>
- Ceccobelli, P.; Mirabella, C. WO-Composition of *Asphodelus* root extracts. PCT International Patent Application 2017/137887, 17 August 2017.

- Chase M. W., Christenhusz M. J. M., Fay M. F., Byng J. W., Judd W. S., Soltis D. E., Mabberley D. J., Sennikov A. N., Soltis P. S., Stevens P. F. (The Angiosperm Phylogeny Group), 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV, *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 181, Issue 1, 1–20, <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Chimona C., Karioti A., Skaltsa H. & Rhizopoulou S., 2014. Occurrence of secondary metabolites in tepals of *Asphodelus ramosus* L., *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 148:1, 31-34. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.790851>
- Coudray, C., Tressol, J., Gueux, E. et al., 2003. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr* 42, 91–98. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0390-x>
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. and Foster G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- El-Seedi Hesham R. 2007. Antimicrobial Arylcoumarins from *Asphodelus microcarpus* L. *J. Nat. Prod.*, 70, 1, 118–120. <https://doi.org/10.1021/np060444u>
- Gonella E., Orrù B., Marasco R., Daffonchio D., Alma A. 2020. Disruption of Host-Symbiont Associations for the Symbiotic Control and Management of Pentatomid Agricultural Pests. A Review *Frontiers in Microbiology*. 11, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.547031>
- Ghoneim, M.M.; Ma, G.; El-Hela, A.A.; Mohammad, A.-E.I.; Kottob, S.; El-Ghaly, S.; Cutler, S.J.; Ross, S.A., 2013. Biologically Active Secondary Metabolites from *Asphodelus Microcarpus*. *Nat Prod Commun*. Aug;8(8):1117-9. PMID: 24079182.
- Hua L., Yong C., Zhanquan Z., Boqiang L., Guozheng Q., Shiping T., 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables, *Food Quality and Safety*, Volume 2, Issue 3, 111–119, <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Lopez-Molina D., Navarro-Martínez M. D., Rojas-Melgarejo F., Hiner N.P., Chazarra S., Rodríguez-López J.N., 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L. *Phytochemistry* 66 : 1476–1484 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.003>
- Khaldi, A., Meddah B., Abdallah M., Houcine B., Gouri S., 2012. Phytochemical screening and in vitro antifungal effect of some plants extracts of *asphodelus tenuifolius* cavan and

zygophyllum album L. on fungi development. European Journal of Scientific Research Volume 80, Issue 3, 311 – 321

- Khalfaoui, A.; Noumi, E.; Belaabed, S.; Aouadi, K.; Lamjed, B.; Adnan, M.; Defant, A.; Kadri, A.; Snoussi, M.; Khan, M.A.; et al., 2021. LC-ESI/MS-Phytochemical Profiling with Antioxidant, Antibacterial, Antifungal, Antiviral and In Silico Pharmacological Properties of Algerian *Asphodelus tenuifolius* (Cav.) Organic Extracts. *Antioxidants* 10, 628. <https://doi.org/10.3390/antiox10040628>
- Kenyon L.J., Meulia T., and Sabree Z.L. 2015. Habitat Visualization and Genomic Analysis of “Candidatus *Pantoea carbekii*,” the Primary Symbiont of the Brown Marmorated Stink Bug.. *Genome Biol. Evol.* 7: 620–635. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv006>.
- Madia, V.N.; De Vita, D.; Messori, A.; Toniolo, C.; Tudino, V.; De Leo, A.; Pindinello, I.; Ialongo, D.; Saccoliti, F.; D’Ursi, A.M.; Grimaldi M.; Ceccobelli P.; et al. 2021. Analytical Characterization of an Inulin-Type Fructooligosaccharide from Root-Tubers of *Asphodelus ramosus* L. *Pharmaceuticals*, 14, 278. <https://doi.org/10.3390/ph14030278>
- Malmir, M.; Serrano, R.; Caniça, M.; Silva-Lima, B.; Silva, O., 2018. A Comprehensive Review on the Medicinal Plants from the Genus *Asphodelus*. *Plants*, 7, 20. <https://doi.org/10.3390/plants7010020>
- Peksel A., Imamoglu S., Kiyimaz N. A., Orhan N., 2013. Antioxidant and radical scavenging activities of *Asphodelus aestivus* Brot. extracts, *International Journal of Food Properties*, 16:6, 1339- <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.587622>
- Pertot I., Elad Y., Tassin M., 2007. *La muffa grigia della vite. San Michele all’Adige (TN): Istituto Agrario di San Michele all’Adige– 66 p. ISBN 978-88-7843-020-4*
- Rimbau, V., Risco, E., Canigueral, S. and Iglesias, J., 1996. Antiinflammatory Activity of Some Extracts from Plants used in the Traditional Medicine of North-African Countries. *Phytother. Res.*, 10: 421-423. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199608\)10:5<421::AID-PTR851>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199608)10:5<421::AID-PTR851>3.0.CO;2-U)
- Tesi di laurea 2012-2013 Sara Marcon Effetto di estratti vegetali sulla crescita di *Botrytis cinerea* in vitro e su acini d’uva. <https://hdl.handle.net/20.500.12608/15989>
- Vio-Michaelis, S., Apablaza-Hidalgo, G., Gómez, M., Peña-Vera, R., & Montenegro, G., 2012. Antifungal activity of three Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. *Botanical Sciences*, 90(2), 179-183. <https://doi.org/10.17129/botsci.482>
- Xu W.T., Huang K.L., Guo F., Qu W., Yang J.J., Liang Z., Luo Y.B., 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*, *Postharvest Biology and Technology* 46: 86–94

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019>

- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JA, 2007. Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. Mol Plant Pathol. 2007 Sep;8(5):561-80.

<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>

ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
www.enea.it

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati
novembre 2023