## ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชของอนุพันธ์กรคเบนโซอิกและกรคซินนามิก

นายนวรัฐ เทศพิทักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2548 ISBN 974-53-1865-5 ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ANTI-PHYTOPATHOGENIC FUNGAL ACTIVITY OF BENZOIC ACID AND CINNAMIC ACID DERIVATIVES

Mr. Nawarat Thedpitak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-53-1865-5

	BENZOIC ACID AND CINNAMIC ACID DERIVATIVES
Ву	Mr. Nawarat Thedpitak
Field of study	Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.
Acc	epted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the I	Requirements for the Master 's Degree
_	Dean of the Faculty of Science
	(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)
THESIS COMMIT	TEE
	aldon le Lepis Chairman
	(Professor Udom Kokpol, Ph.D.)
	Wannhan Chawan Thesis Advisor
	(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)
	Vattaya Ngamagnawanich Member
	(Associate Professor Nattaya Ngamrojnavanich, Ph.D.)  Lipukius  Member  (Jittra Piapukiew, Ph.D.)
	(Situa i iapuniew, i ii.D.)

ANTI-PHYTOPATHOGENIC FUNGAL ACTIVITY OF

Thesis Title

นวรัฐ เทศพิทักษ์ : ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชของอนุพันธ์กรคเบนโซอิกและกรคชินนามิก. (ANTI-PHYTOPATHOGENIC FUNGAL ACTIVITY OF BENZOIC ACID AND CINNAMIC ACID DERIVATIVES) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.คร. วรินทร ชวศิริ 52 หน้า. ISBN 974-53-1865-5.

การศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อราก่อโรคพืชของอนุพันธ์กรคเบนโซอิกและสารที่เกี่ยวข้อง 40 ชนิดและ อนุพันธ์ของกรคชินนามิก 50 ชนิดเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของอนุพันธุ์กับฤทธิ์ด้านเชื้อ รา 4 ชนิด ได้แก่ Alternaria porri, Fusarium oxysporum, Pestalotiopsis sp. และ Phytophthora parasitica พบว่าการเติมหมู่ใชครอกชิลในวงเบนซีนของกรคเบนโซอิกทำให้ความสามารถในการยับยั้ง เชื้อราลคน้อยลง ในทางตรงกันข้ามเมื่อเดิมกลอรีนกับวงเบนซีนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในดำแหน่งที่สองหรือ สามของกรคเบนโซอิกพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราที่ดีขึ้น การศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อราของชินนามัลดีใชด์ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ A. porri. F. oxysporum และ P. parasitica ได้ 100% ที่ความเข้มข้น 2.5 mM นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการยับยั้งเชื้อรากับความยาวหมู่อัลคิลของ 4-ไฮครอกซีเบนโซ เอต พบว่า บิวทิล 4-ไฮครอกซีเบนโซเอตมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทคสอบทั้งหมดได้ดีที่สุด จาก การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา ทคสอบความเป็นพิษต่อพืชและการสลายตัวภายใต้ภาวะเร่งของ กรด 2,6-ไดไฮครอกซีซินนามิก พบว่ากรคคังกล่าวมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการเกษตร ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำไปใช้ยับยั้ง Pestalotiopsis sp. และ P. parasitica

สาขาวิชาเ	ทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิค	man	~ ~		
ปีการศึกษา	2548	ลายมือชื่ออาจารย์	์ ที่ปรึกษา	Mer	かが	

v

# # 4572337023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ANTIFUNGAL / BENZOIC ACID DERIVATIVES / BIOAUTOGRAPHIC NAWARAT THEOPITAK: ANTI-PHYTOPATHOGENIC FUNGAL ACTIVITY OF BENZOIC ACID AND CINNAMIC ACID DERIVATIVES. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. WARINTHORN CHAVASIRI, Ph.D. 52 pp. ISBN 974-53-1865-5.

Screening of antifungal activity of forty benzoic acid derivatives and related compound and fifty cinnamic acid derivatives were evaluated on four phytopathogenic fungi; Alternaria porri, Fusarium oxysporum, Pestalotiopsis sp. and Phytophthora parasitica, in order to define a possible structure-activity relationship. The addition of a supplementary hydroxyl group in various positions on the benzene ring of benzoic acid suppressed the antifungal activity on all tested fungi. On the contrary, the addition of a chlorine in the 2 or 3 position and conversion of carboxylic acid function group to an aldehyde increased the mycelial growth inhibition. Further evaluation of antifungal activity of cinnamaldehyde found that it completely suppressed A. porri, F. oxysporum and P. parasitica at 2.5 mM and nearly completely suppressed Pestalotiopsis sp. Methyl, ethyl, propyl, butyl, hexyl, octyl and dodecyl 4-hydroxybenzoates were tested against A. porri, Pestalotiopsis sp. and P. parasitica, in order to investigate the structure-activity relationship on the length of alkyl chain. The results showed that butyl 4-hydroxybenzoate showed generally good activity against all tested fungi. Further evaluation of antifungal activity, phytotoxicity and stability of 2,6-dichlorocinnamic acid were determined. It was found that compared to the conventional chemical fungicide captan and iprodione, 2,6-dichlorocinnamic acid is much more efficient and therefore can be an antifungal agent, particularly to control Pestalotiopsis sp. and P. parasitica.

Field of study	Biotechnology	Student's signature	men -	···
•	•••	Advisor's signature	//	

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

I deeply appreciate and would like to express sincere thanks, my advisor, Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri for his encouraging guidance, supervision, helpful suggest throughout this research and giving me an opportunity to work in his lively and friendly research group, the most stimulating working environment.

I would also like to extend my gratitude to Professor Dr.Udom Kokpol, Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojnavanich and Dr. Jittra Piapukheaw for their kindness and helpful suggesting for the complements of this thesis and serving as thesis committee.

Special thanks go to Miss Sujittra Deesamer, Miss Wanida Munbunjong, Mr. Wanchai Pluempanupat, Miss Nongnoot Khruasanit, Miss Wanchan Noppanit, Miss Salinthip Prathuangsuksri and Miss Pratoomrat Tongkate for their kind technical support.

I would like to thank my friends for their supports and encouragement made me strong to get through this work.

Lastly, I thank mum and dad for their loves.

### **CONTENTS**

	Page
Abstract in Thai	iv
Abstract in English	v
Acknowledgements	vi
Contents	vii
Lists of Figures	x
Lists of Tables	xii
Lists of Abbreviations	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
1.1 Plant diseases cause by fungi	I
1.1.1 Plant diseases caused by Alternaria porri	2
1.1.2 Plant diseases caused by Fusarium oxysporum	3
1.1.3 Plant diseases caused by <i>Pestalotiopsis</i> sp	5
1.1.4 Plant diseases caused by <i>Phytophthora parasitica</i>	6
1.2 Literature search on the anmicrobial activity of benzoic acid	
derivatives	7
1.3 Objectives of this research	9
II MATERIALS AND METHODS	10
2.1 Chemicals	10
2.2 Equipments	10
2.3 Synthesis of hexyl, octyl and dodecyl 4-hydroxybenzoates	10
2.4 Fungal strains	11
2.5 Antifungal assay	12
2.6 Spore germination assays	12
2.7 Phytotoxicity bioassays	13
2.8 Stability test	14
2.9 Statistical analysis	14

	Page
CHAPTER	
III RESULTS AND DISCUSSION	15
3.1 Fungal growth inhibition by benzoic acid derivatives and	
related compounds	15
3.2 Chemical structure-antifungal activity relationship of benzoic	
acid derivatives and related compounds	20
3.2.1 Effects of the substituent on the benzene ring	20
3.2.2 Effects of modifications on the aliphatic chain	21
3.3 Further study on antifungal activity of cinnamaldehyde	21
3.4 Further study on antifungal activity of esters of 4-	
hydroxybenzoic acid	23
3.5 Fungal growth inhibition by cinnamic acid derivatives	24
3.6 Chemical structure-antifungal activity relationship of cinnamic	
acid derivatives	28
3.6.1 Effects of the substituent on the benzene ring	29
3.6.2 Effects of other functional groups	30
3.7 Further study on biological activity and stability of 2,6-	
dichlorocinnamic acid	30
3.7.1 Effect of 2,6-dichlorocinnamic acid on the mycelial growth	
of A. porri, Pestalotiopsis sp. and P. parasitica	30
3.7.2 Effect of 2,6-dichlorocinnamic acid on the mycelial	
growth Pythium sp. and Colletotrichum gloeosporioides	32
3.7.3 Effect of 2,6-dichlorocinnamic acid on spore germination	
of Pestalotiopsis sp	34
3.7.4 Phytotoxicity of 2,6-dichlorocinnamic acid	35
3.7.5 Stability of 2,6-dichlorocinnamic acid	36
IV CONCLUSION	38
Proposal for future work	39
REFERENCES	40
APPENDIX	42
Appendix A	43
Appendix B	44

	Page
VITA	52

### LIST OF FIGURES

Figu	re	Page
1.1	Disease cycle of Alternaria sp	3
1.2	Disease cycle of Fusarium oxysporum	4
1.3	Spores of <i>Pestalotiopsis</i> sp	5
1.4	Disease cycle of <i>Phytophthora</i> sp	6
2.1	The colony characteristics of the four phytopathogenic fungi on PDA	
	used in this research: (A) Alternaria porri; (B) Fusarium oxysporum;	
	(C) Pestalotiopsis sp.; (D) Phytophthora parasitica	11
2.2	Microscopic field of haemocytometer slide with spores of Pestalotiopsis	
	sp.; bar = 50 μm	13
3.1	Structure-antifungal activity of benzoic acid derivatives and related	
	compounds assayed at 5 mM final concentration on the mycelial growth	
	of A. porri, F. oxysporum, Pestalotiopsis sp. and P. parasitica	18
3.2	Effects of esters of 4-hydroxybenzoic acid assayed at 1 mM final	
	concentration on the mycelial growth of phytopathogenic fungi on	
	a solid culture medium	23
3.3	Structure-antifungal activity of cinnamic acid derivatives assayed at	
	I mM final concentration on the mycelial growth of A. porri,	
	F. oxysporum, Pestalotiopsis sp. and P. parasitica	27
3.4	The mycelial growth inhibition of 2,6-Dichlorocinnamic acid (I),	
	Captan (II), Iprodione (III) at 1 mM	31
3.5	The mycelial growth inhibition of 2,6-dichlorocinnamic acid on	
	Pythium sp. and C. gloeosporioides	33
3.6	Effect of 2,6-dichlorocinnamic acid at different concentrations on spore	
	germination of Pestalotiopsis sp	35
3.7	Relative root growth for Chinese mustard. Different letters (a, b) are	
	significantly different at the level of $P < 0.05$ according to the Scheffe	
	test	35

Figure		Page
3.8	Effect of oven conditions at 80° C, daylight and 256 wavelength UV light	
	on the stability of 2,6-Dichlorocinnamic acid	36
1	H-NMR spectrum of hexyl 4-hydroxybenzoate	50
2	<sup>1</sup> H-NMR spectrum of octyl 4-hydroxybenzoate	50
3	H-NMR spectrum of dodecyl 4-hydroxybenzoate	51

#### LIST OF TABLES

Table		Page
3.1	Benzoic acid derivatives and related compounds used in this study	16
3.2	Effects of cinnamaldehyde as a function of concentration on the	
	mycelial growth of phytopathogenic fungi on a solid culture medium	22
3.3	Cinnamic acid derivatives used in this study methanol extracts of $A$ .	
	calamus at 10,000 ppm	24
3.4	Effects of 2,6-dichlorocinnamic acid and two standard fungicides as a	
	function of concentration on the mycelial growth of A. porri,	
	Pestalotiopsis sp. and P. parasitica on a solid culture medium	32
3.5	Effects of 2,6-dichlorocinnamic acid as a function of concentration on	
	the mycelial growth of <i>Pythium</i> sp. and <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
	on a solid culture medium	33
3.6	Effect of 2,6-dichlorocinnamic acid on spore germination	
	of Pestalotiopsis sp	34
1	Antifungal activity of benzoic acid derivatives on the mycelial growth	
	of A. porri and F. oxysporum	44
2	Antifungal activity of cinnamic acid derivatives on the mycelial growth	
	of A. porri and F. oxysporum	45
3	Antifungal activity of benzoic acid derivatives on the mycelial growth	
	of Pestalotiopsis sp. and P. parasitica	47
4	Antifungal activity of cinnamic acid derivatives on the mycelial growth	
	of Pestalotiopsis sp. and P. parasitica	48

#### LIST OF ABBREVIATIONS

°C degree celsius

cm centrimeter

DMSO dimethylsulfoxide

g gram

mg milligram
ml milliliter
No. number

PDA potato dextrose agar

ppm part per million

sp. species

w/w weight by weight

 $\begin{array}{ll} \mu I & \text{microliter} \\ UV & \text{ultraviolet} \end{array}$