

20. Productos naturales bio-activos y sus aplicaciones.

Estudio de Compuestos Vegetales con potencial acción fungicida sobre patógenos de plantas de interés regional

Badaracco, Paula; Sortino, Maximiliano; Pioli, Rosanna.

Paula.badaracco@hotmail.com

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Rosario

Resumen

Dentro de los factores que pueden afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas se encuentran las enfermedades fúngicas, las cuales afectan el rendimiento y posibilidad de generar alimentos primarios y derivados. Actualmente se controlan mediante productos fitosanitarios pero el uso inapropiado supone un riesgo para la salud humana y el ambiente. Frente a esta realidad surge, como una opción sustentable, la utilización de los compuestos vegetales como potenciales productos antifúngicos o biofungicidas. El objetivo de este trabajo fue determinar la acción inhibitoria de metabolitos vegetales sobre el crecimiento in vitro de patógenos que afectan cultivos extensivos e intensivos hortícolas. Los compuestos evaluados fueron daidzeina, genisteina, dos chalconas (CH1 y CH2), vainillina, isovainillina y dos productos fungicidas comerciales como controles. Se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada compuesto químico, mediante el método de microdilución, frente a cinco géneros fúngicos *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Phomopsis* sp. (*P. longicolla*), *Fusarium* sp. (*F. graminearum*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* y *F. oxysporum*) y *Rhizopus stolonifer*, causantes de patologías de interés agronómico. Los resultados demostraron que sólo el vainillina resultó ser efectivo para inhibir todos los patógenos evaluados con concentraciones menores a 250 µg/ml, mientras que la chalcona CH2 presentó actividad frente *Alternaria* sp., *Phomopsis longicolla*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. Se concluye que ambos metabolitos vegetales, la chalcona CH2 y vainillina, registraron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de los fitopatógenos evaluados, constituyéndose como potenciales biofungicidas.

Palabras clave: Metabolitos Vegetales, Hongos Fitopatógenos, Acción Antifúngica.

Introducción

Las plantas, a lo largo del tiempo, han debido adaptarse a las condiciones ambientales en las cuales crecían. Dicha adaptación estaba condicionada por factores bióticos y abióticos; he aquí la importancia de que las mismas desarrollarán estrategias físicas, químicas y fisiológicas para poder hacer frente a todo aquello que tienda a modificar su normal desarrollo (Maestro-Duran et al. 1993). Dentro de los factores bióticos intervinientes se encuentran los hongos, organismos que pueden desarrollar relaciones simbióticas o bien ser patógenos de las mismas.

Los hongos tal lo plantean Grayer y Harbone (1994), para ser efectivos en su etapa patogénica requieren que sus esporas germinen y sean capaces de superar las barreras defensivas vegetales (cutícula) y, una vez atravesadas, poder infectar los tejidos de la planta. Estas barreras son físicas y/o químicas y, dentro de estas últimas, se encuentran los compuestos o metabolitos generados por las plantas que expresen capacidad antifúngica. Acorde al trabajo de Lygin et al (2014), estos metabolitos surgen como una primera línea de defensa ya sea inhibiendo al microorganismo o disminuyendo su colonización para que luego otras formas de defensa puedan eliminarlo.

La actividad antimicrobiana puede estar delegada a metabolitos secundarios

como son los compuestos fenólicos, saponinas, alcaloides, terpenoides, estibilenos y fenilpropanoides; entre otros. La respuesta vegetal a la infección del patógeno se expresa o manifiesta como un aumento en la producción de dichos metabolitos alcanzando una concentración inhibitoria del patógeno.

Tal lo expresa García (2004), estos metabolitos son eficaces desde la ecología, lo que los diferencia de los metabolitos primarios que son eficaces fisiológicamente. Si a su función ecológica sumamos, como lo plantea Rodríguez Maturino et al. (2015), la ventaja de ser rápidamente degradados en el suelo y que generalmente no presentan un efecto tóxico en mamíferos; los mismos pueden ser empleados en los sistemas de agricultura orgánica y sustentable.

Los primeros reportes sobre la presencia de metabolitos con acción antifúngica fueron descritos por Muller y Borger (1940). Los mismos mostraron fuertes evidencias de la resistencia de las plantas a enfermedades al observar la resistencia de la papa al hongo *Phytophthora infestans* causada por la producción de compuestos fungitóxicos por parte de la planta hospedante (García Mateos y Pérez Leal, 2003).

Según Grayer y Harbone (1994), existen distintas familias botánicas que producen compuestos antifúngicos los cuales pueden variar en su constitución

química dentro de cada familia o bien estar presente parcialmente dentro de las mismas. Para Graham (1991), son los metabolitos derivados de fenilpropanoides los que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y desempeñan distintas funciones. Es de allí la importancia de analizar este tipo de compuestos, donde su biosíntesis puede ser una respuesta a la presencia de un patógeno fúngico.

En las Fabaceas, según Lozovaya Vera et al. (2004), los fenilpropanoides son sintetizados y acumulados como respuesta al ataque de patógenos. Pero además dentro de esta familia botánica se presentan otros compuestos químicos con potenciales funciones antifúngicas.

Por otro lado, para Carpintella et al (2003), es necesario prestar atención a la familia Meliaceae debido a que ciertos metabolitos potencialmente activos son producidos por árboles de dicha familia y los cuales pueden ser utilizados como compuestos antifúngicos.

Más allá de un tipo particular de familia botánica, la presencia de compuestos secundarios ha permitido que los mismos ofrezcan resistencia infección y/o colonización de ciertos patógenos. Es por ello que su presencia dentro del Reino vegetal permite que actualmente sean considerados una alternativa, tal lo expresa Yanar et al (2011), para lograr productos de menor impacto ambiental y menor riesgo para los seres humanos.

Objetivos

Determinar la acción inhibitoria de metabolitos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de patógenos vegetales

Materiales y Métodos

Caracterización morfológica de las especies fúngicas evaluadas:

A partir de la micoteca de Fitopatología, disponible en el laboratorio de Biodiversidad vegetal y microbiana (BioVyM, IICAR, FCA.UNR), se seleccionaron cinco cepas o aislamientos de géneros y especies fúngicas causantes de enfermedades vegetales de interés agronómico, las cuales son reconocidas por su efecto detrimental sobre la producción y calidad de los alimentos y la salud humana y ambiental. A dicha selección se agregaron aislamientos patógenos del cultivo de *Cucurbita maxima* var. *maxima* (zapallito), con el fin de evaluar la posibilidad de su control mediante metabolitos vegetales, debido a que este tipo de producción agronómica cuenta con regulaciones para el uso de fungicidas comerciales y porque lo producido en el campo es ingerido sin procesamiento industrial por los consumidores.

Los patógenos fúngicos fueron reactivados mediante siembras en medio de cultivo de agar papa-glucosa 2% y acidulado con gotas de ácido láctico al 25%

(APGA), e incubados en condiciones en oscuridad a 26+/-1 °C durante 7 días.

Una vez obtenidas las colonias puras de cada patógeno bajo estudio, se realizó la caracterización morfológica en base en sus características macro-morfológicas como ser color de las colonias, presencia y forma del estroma, presencia y tipo de picnidios y peritecios; y micro-morfológicas como tamaño y forma de macro y micro-conidios, ascos y ascosporas (Leslie and Summerell, 2006; Hernández et al. 2015).

Preparación de Inóculos:

Los inóculos se prepararon de acuerdo con los lineamientos del documento M38-A2? recomendado por CLSI (2008) utilizando suspensiones de conidios. Los hongos fueron sembrados en medio Agar Papa Dextrosa, para estimular la conidiación, y se incubaron a 28°C por 10 días. Una vez obtenidas colonias maduras, las mismas fueron raspadas con agua estéril, lográndose las suspensiones. Se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y se realizó la dilución necesaria para obtener una concentración de 5×10^3 UFC/mL (Leslie & Summerell, 2006).

Compuestos a Evaluar:

Se trabajó con compuestos vegetales perteneciente a diferentes Familias Botánicas, como ser la Familia Meliaceae y la Familia Fabaceae. Además

se analizó la actividad antifúngica de compuestos sintéticos y compuestos comerciales. Los compuestos vegetales a evaluar fueron: Daidzeina (Lozovaya et al. 2004; Pioli et al., 2004), Genisteina (Lozovaya et al. 2004; Pioli et al., 2004), Vainillina (Carpinela et. al 2003), Isovanillina, Chalcona 1 y 2. Además se utilizaron como testigos dos fungicidas comerciales Azoxytrobina (estrobirulina) + ciproconazole (triazol) y Carbendazim 50, de baja toxicidad (grado 3 Banda azul o Banda verde) por ser catalogados los menos tóxicos para la salud humana y el ambiente. (INTA, 2008).

Actividad antifúngica:

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada compuesto químico se determinó usando el método de microdilución en caldo en microplacas de 96 pocillos con tapa y fondo plano (Greiner Bio One, Wemmel, Bélgica), con la modificación de que el medio utilizado fue Sabouraud-Glucosa (Sb-Glu). En cada una de las microplacas se realizaron las diluciones en forma seriada de las soluciones de trabajo para obtener, en cada pocillo 100 µl y concentraciones finales entre 250-0,24 µg/mL (Sortino et al., 2011).

Las placas se incubaron a 28-30°C utilizando cámara húmeda por un tiempo de 2 a 5 días dependiendo de la especie fúngica. Se determinó la concentración

mínima inhibitoria (CIM), como la menor concentración de los compuestos que inhibe totalmente el crecimiento de microorganismos y se consideró activos aquellos compuestos con CIM < 250 µg/mL. (Stevaz et al., 2004; Sortino et al., 2011).

Además se determinó la Concentración fungicida mínima (CFM) tomando alícuotas de 10 µL de los pocillos en los que no se observó desarrollo fúngico y se sembró en placas de Petri con Sb-Agar. Luego de la incubación por 2-5 días a 28°C, se observó el crecimiento y se determinó la CFM como la mínima concentración del compuesto o principio activo en la que no se haya observado crecimiento fúngico.

Resultados y Discusión

Los géneros evaluados y descriptos fueron *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp., *Rhizopus* sp. Algunas de las especies evaluadas fueron *Fusarium graminearum* (7-170 y 20), *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *Phomopsis longicolla* y *Rhizopus stolonifer*.

Posterior a la siembra e incubación de cada especie fúngica en microplacas de 96 pocillos, se observó cuál era la relación entre el patógeno y los distintos compuestos antifúngicos bajo estudio.

Para todas las cepas fúngicas bajo estudio, la daidzeina y genisteina no han

mostrado acción inhibitoria ni fungicida en ninguna de las concentraciones estudiadas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Pioli et. al (2004) sobre varias cepas del complejo *Diaporthe-Phomopsis* pero se diferenciaron del efecto antifúngico logrado sobre otros géneros fúngicos evaluados por Graham (1991) y Lozovaya et al (2004). Por lo tanto estos compuestos vegetales proveniente de la familia *Fabaceae* no han controlado la formación de colonias de los géneros y especies fúngicas evaluados y bajo estas condiciones experimentales.

Por otro lado, la vainillina ha inhibido los patógenos analizados en diferentes concentraciones. Las CIM para las especies *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp., *F. subglutinans*, *P. longicolla* y uno de los *F. graminearum* ha sido de 31,3 µg/ml. Con respecto a la otra cepa de *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *Alternaria* sp., la vainillina ha sido efectiva inhibiendo el crecimiento fúngico a concentraciones de 62,5 µg/ml. Sorprendentemente este compuesto antifúngico ha sido muy efectivo frente a *F. proliferatum*, obteniéndose una CIM de 15,6 µg/ml. Estos resultados acuerdan con lo expresado por Carpinella et al. (2003), demostrando la acción de dicho compuesto sobre distintos patógenos fúngicos. Pero además de inhibir la formación de colonias, este compuesto ha tenido acción antifúngica sobre los patógenos

estudiados, es por ello que las CFM han variado entre 62,5 y 31,3 µg/ml.

Además al evaluar la acción del compuesto sintético de semejante estructura química se determinó la importancia del compuesto natural sobre aquellos semejantes sintetizados artificialmente, ya que este último no presentó la misma forma de acción frente a los patógenos. La isovainillina, isómero sintético del vainillina, no ha presentado acción inhibitoria para las cepas fúngicas estudiadas excepto para *Alternaria* sp., la cual inhibió en una concentración de 250 µg/ml pero no ha sido capaz de evitar su crecimiento.

Otros compuestos naturales encontrados en la naturaleza pero también de síntesis en el laboratorio, son las chalconas, las cuales en contraposición a lo planteado por Svetaz et al (2004), ellas presentaron comportamientos distintos. La Chalcona 1 no ha desarrollado actividad inhibitoria ni fungicida para los hongos analizados. Por su parte, la Chalcona 2 se caracterizó por inhibir en concentraciones de 250-62,5 µg/ml a *Alternaria* sp., *P. longicolla*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum*. Con respecto a la actividad fungicida de dicha chalcona, la misma ha demostrado acción en concentraciones 250-125 µg/ml sobre *Alternaria* sp. y *P. longicolla* pero no así para las dos especies de *Fusarium* sp.

Cuando se analizó la acción inhibitoria y/o antifúngica de los principios

activos de los distintos fungicidas comerciales, se encontró que los mismos varían en su capacidad para inhibir o matar patógenos fúngicos. El Carbendazim 50 ha tenido una acción muy variable a la hora de inhibir las distintas especies, encontrándose que inhibió totalmente el crecimiento de *P. longicolla* pero no ha sido capaz de controlar las especies de *F. graminearum*, *F. proliferatum* y *Rhizopus stolonifer*. Tal lo expresa Cavallo et al (2005), la eficiencia de control del Carbendazim frente a *Rhizopus stolonifer* es baja en comparación con otros productos comerciales. Además dicho principio activo no ha podido controlar cepas de *F. graminearum*, siendo su rendimiento menor al expresado en Svetaz et al. (2004).

De la misma manera, *F. oxysporum* no fue controlado por el compuesto activo de azoxistrobina, esto ha sido también demostrado por Araya Gonzales et al. (2013). Otra de las especies pertenecientes al género *Fusarium* como son los *F. graminearum* han sido disímiles en su actividad frente a este compuesto activo. Mientras que Azoxy pro ha controlado ambas cepas en valores diferentes, dichos valores son superiores a los presentados por Svetaz et al (2004). En algunos casos, como *Cladosporium* sp., solo la concentración de 250 µg/ml ha sido capaz de inhibir el crecimiento fúngico.

Conclusiones

Las plantas han sabido llevar adelante respuestas fisiológicas con el fin de protegerse de los patógenos. Como parte de estas respuestas surgen los metabolitos secundarios con la capacidad de evitar la colonización de sus tejidos de por parte de las hifas fúngicas. He aquí la importancia de este estudio para utilizar estos compuestos con fines agronómicos, los cuales son naturales, biodegradables y no afectarían la salud del ser humano y del ambiente.

En base a los resultados obtenidos, la vainillina sería un compuesto óptimo para utilizarse en el control de enfermedades. El mismo ha sido capaz de controlar y hasta inhibir el crecimiento de todos los patógenos bajo estudio, esto demuestra que su espectro de acción es amplio. Además tal lo plantea Carpinella et al (2003), su presencia en los alimentos como saborizante demuestra su baja toxicidad para los mamíferos, lo cual le brinda mayores beneficios al uso de dicho compuesto en la producción agrícola.

Algunos de los compuestos estudiados no han presentado acción dentro de lo ensayado por este trabajo, no obstante su acción dentro del metabolismo vegetal no deja de ser importante. El accionar de algunas isoflavonas tal vez no reside únicamente en su posibilidad de inhibir los patógenos, sino que las mismas

podrían servir para comunicar sobre la infección y activar una respuesta inmunitaria de las plantas.

Por otro lado, la capacidad inhibitoria de otros compuestos depende de su origen, pudiendo ser naturales o artificiales. Pero además de ser naturales, uno debe considerar dentro de qué o cuál familia o género botánico se encuentran ya que el accionar de ciertos metabolitos secundarios parece estar condicionado por la información genética que cada especie vegetal contenga.

Tal lo expresa Yanar et al (2011), la explotación de dichos compuestos será un método racional y ecológico para el manejo integrado de enfermedades. El interés es tal que, según García y Pérez (2003), el reconocimiento de estos compuestos químicos permitiría producirlos a gran escala y obtener un producto comercial o bien seguir estudiándolo para evaluar genéticamente su maquinaria de producción dentro de la planta.

La inocuidad para los seres humanos es importante pero además, los compuestos antifúngicos son productos naturales y por lo tanto son rápidamente degradados en el suelo (Rodríguez Maturino 2015). Por lo tanto la implementación de estos metabolitos como potenciales fungicidas permitirá beneficios a las propias plantas, a la población humana y al ambiente, convirtiendo al

recurso natural vegetal como una fuente de productos útiles para la producción de alimentos.

Bibliografía

Araya González P., Sandoval Briones C., Núñez Abarca F. 2013.

Eficiencia de distintos fungicidas sobre el control in vitro de *Fusarium oxysporum* aislado de frutos kiwi. Editorial: Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía.

Carpinella M, Giorda L, Ferrayoli C, Palacios S. 2003. Antifungal Effects of Different Organic Extracts from *Melia azedarach* L. on Phytopathogenic Fungi and Their Isolate Active Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2506-2511.

CLSI. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved. Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.

García, D.E. "Los metabolitos secundarios de las especies vegetales." *Pastos y Forrajes*, vol. 27, no. 1, 2004, p. 1+. AcademicOneFile, Accessed 3 May 2018.

García-Mateos R, Pérez-Leal R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. *RevistaChapingo* 9: 5-10.

Graham Terrence L. 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Rev. Plant Physiol.* 95:594-603.

Grayer, R., Harborne, J. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Journal Phytochemistry*, vol 37: 19-42.

Hernández, Facundo E., Pioli, Rosanna N., Peruzzo, Alejandra M., Formento, Ángela N., Pratta, Guillermo R.. (2015). Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* (teleomorfo desconocido: Diaporthales) de la región templada y subtropical de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 63(3), 871-884.

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2008. Aplicación eficiente de fitosanitarios. Capítulo 2: plaguicidas químicos, composición y formulaciones, etiquetado, clasificación toxicológica, residuos y métodos de aplicación. Ediciones INTA.

Leslie J., Summerell B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Iowa, Estados Unidos. Blackwell Publishing.

Lygin, A. V., Hill, C. B., Pawlowski, M., Zernova, O. V., Widholm, J. M., Hartman, G. L., and Lozovaya, V. V. 2014. Inhibitory effects of stilbenes on the growth

of three soybean pathogens in culture. *Phytopathology* 104:843-850.

Lozoya V, Anatoliy L, Zernova O, Shuxian L, Hartman G, Widholm J. 2004. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 671–679.

Maestro-Durán R, León R, Ruiz-Gutiérrez V. 1993. Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Revista de Consejo Superior de Investigaciones Científicas Licencia: Grasas y Aceites*. Vol. 44 Fasc. 6 365-369.

Muller K. Borger H. 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanst. Land Forstwirtschaft*. 23:1 89-231

Pioli R, Hernández R, Dietrich M. L., Catalán C, Morandi E. 2004. Isoflavonoids role in defense mechanisms associated with *Glycine max* - *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* interaction. VII^o World Soybean Forum: Congreso Mundial de Soja. III^o Congreso Brasileiro de Soja. PO31, Pág. 73. 28 Feb-04 Marzo 2004, Brasil.

Rodríguez-Maturino A, Troncoso-Rojas R, Sánchez-Estrada A, González-Mendoza D, Ruiz-Sánchez E, Zamora-Bustillos R, Cecena-Duran C, Grimaldo-Juarez O, Aviles-Marin M. 2015. Efecto

antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chilpetin (*Caspicum anium* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología* 47: 72-77.

Sortino, M., Derita, M., Zacchino, S. 2011. Diferentes estrategias para la búsqueda de compuestos antifúngicos. Editorial Académica Española, LAP LAMBERT Academic Publishing Gmb H, Saarbrücker, Alemania. ISBN 978-3-8443-4580-3, 231 páginas.

Stevaz L, Tapia A, Lopez S, Furlan R, Petenatti E, Pioli R, Schemeda-Hirschmann G, Zacchino S. 2004. Antifungal Chalcones and New Caffeic Acid Esters from *Zuccagnia punctata* Acting against Soybean Infecting Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3297-3300.

Yanar Y., Kadioğlu I., Gökçe A., Demirtaş I., Gören N, Çam H., Whalon M. 2011. In vitro antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(14), pp. 2625-2629.