

## EVALUACIÓN DE MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA Y FUNGICIDA EN SEMILLAS DE PLANTAS AUTÓCTONAS.

Maidana M.<sup>1</sup>, Murchio S.<sup>1</sup>, Vignale B.<sup>2</sup>, Zoppolo R.<sup>1</sup>, Leoni C.<sup>1</sup>, Dalla Rizza M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas. matiasmaidana@inia.uy

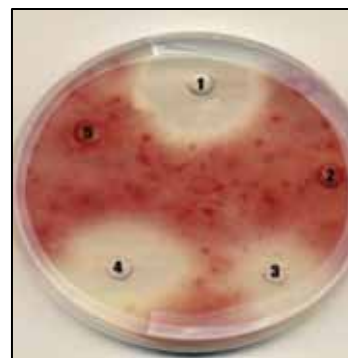
<sup>2</sup> Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto

### Introducción

En la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas se desarrolla un proyecto de investigación en péptidos con actividad antimicrobiana como una alternativa para el control de patógenos. El proyecto tiene tres componentes fundamentales: identificación y purificación de péptidos antimicrobianos, caracterización *in vitro/in vivo*, y escalado en la producción de péptidos antimicrobianos. El trabajo se centró en el diseño y planificación de una metodología simple y de bajo costo para la obtención de extractos proteicos de bajo peso molecular provenientes de semillas como aproximación a la identificación de péptidos. Este componente brinda la información primaria (MIC, MFC, caracterización molecular) para la búsqueda e identificación de péptidos con actividad antimicrobiana de posible aplicación tópica para el control de patógenos de post-cosecha.

### Materiales y Métodos

Las semillas evaluadas fueron: *Adesmia bicolor* (*Adesmia*), *Anethum graveolens* (*Eneldo*), *Coriandrum sativum* (*Coriando*), *Eugenia uniflora* (*Pitanga*), *Hexachlamis edulis* (*Ubajay*), *Ornithopus pinnatus* (*Ornitopus*), *Oryza sativa* (*Arroz negro*), *Paspalum notatum* (*Paspalum*), *Psidium cattleianum* (*Arazá*), *Trifolium resupinatum* (*Trébol*), *Trifolium vesiculosum* (*Trébol*). Los patógenos seleccionados por su relevancia agronómica fueron *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Pseudomonas syringae*. Las semillas fueron molidas en frío hasta obtener harina. Posteriormente se les agregó buffer de extracción ácido-salino en relación 1:3 (Pellegrini, 2006). Se clarificó el extracto por centrifugación, se filtró en papel wattman y se guardó una alícuota de 5ml (Extracto crudo). El resto se utilizó para la precipitación proteica con acetona en dos etapas, primero con un volumen de acetona donde se logra precipitar proteínas de alto peso molecular (un volumen) y luego con seis volúmenes de acetona donde se obtienen proteínas de bajo peso molecular y péptidos (seis volúmenes). Con las muestras de los extractos proteicos obtenidos se procedió a la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana utilizando la técnica difusión en PDA (Fig 1). Se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) utilizando las técnicas de microtitulación en placa de 96 pocillos (Díaz Dellavalle *et al* 2011;) (Fig 2). La Mínima Concentración Fungicida (MFC) de aquellas fracciones activas se determinó según la técnica descrita por Díaz Dellavalle y colaboradores (Fig 3).



**Figura 1:** Ensayo de inhibición extractos de Arazá a 1mg/mL en PDA con esporas de *F.oxysporum*. 1- Captan 0,2 mg/mL. 2- Extracto un volumen. 3- Extracto seis volúmenes. 4- Extracto crudo; 5- H<sub>2</sub>O mQ

## Resultados

En la Tabla 1 se resumen los resultados de MIC para cada extracto de semilla evaluada frente a los patógenos previamente mencionados. Los extractos de semillas que mostraron actividad inhibitoria mayor en el extracto seis volúmenes frente a *F.oxysporum* fueron Adesmia, Arazá y Arroz negro con un MIC de 125 µg/mL. De la misma manera Adesmia, Arazá, Ornithopus, Arroz negro y Ubajay presentaron un MIC en algunos casos sensiblemente menor de 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 125 µg/mL y 31,25 µg/mL respectivamente contra *P. digitatum* y *P. italicum*. Por otro lado los extractos seis volúmenes de Arroz negro, Ornithopus, Pitanga y Ubajay presentaron actividad inhibitoria contra *P. syringae* con un MIC de 125 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL y 125 µg/mL respectivamente.

Tabla 1. Datos de MIC para cada semilla evaluada frente a hongos fitopatógenos

	Nombre común	<i>F.oxysporum</i>			<i>P. digitatum</i>			<i>P. italicum</i>			<i>P. syringae</i>		
		Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)	Ec (µg/ml)	1v (µg/ml)	6v (µg/ml)
1	Adesmia	31,25	1000	125	> 31,25	1000	62,5	31,25	-----	> 62,5	-----	-----	-----
2	Arazá	31,25	-----	125	62,5	-----	125	62,5	-----	< 125	-----	-----	-----
3	Arroz negro	16,25	-----	> 125	31,25	-----	125	15,65	-----	62,5	250	500	125
4	Coriando	500	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	Eneldo	-----	-----	-----	31,25	-----	-----	31,25	-----	-----	125	-----	-----
6	Ornithopus	1000	-----	1000	15,65	1000	31,25	15,65	1000	31,25	250	-----	125
7	Paspalum	1000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	Pitanga	>31,25	-----	-----	62,5	-----	-----	< 62,5	-----	-----	125	-----	62,5
9	Trebol blanco	1001	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	Trebol rojo	500	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	Ubajay	16,25	-----	250	15,65	1000	31,25	>15,65	1000	>31,25	250	1000	125

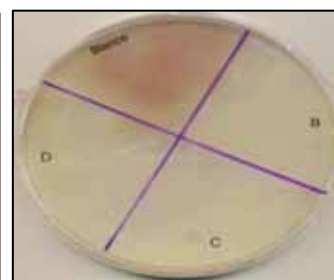
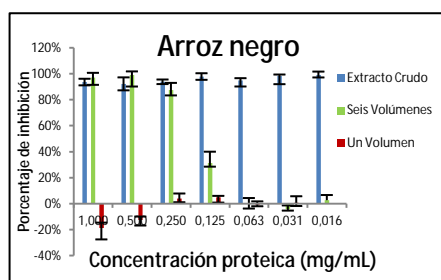
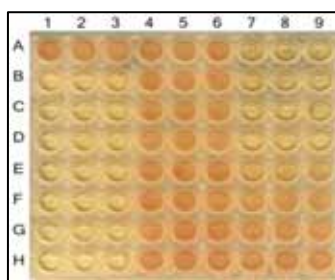


Figura 2. Izquierda: bioensayo para la determinación del MIC empleando extractos de Arroz negro y *F.oxysporum*. En pocillos A1-A6 control de crecimiento en agua.; A7-A9 Captan 0,2mg/mL; B1-B3 Extracto crudo 1mg/mL; B4-B6 Extracto un volumen 1mg/mL. B7-B9 Extracto seis volumen 1mg/mL. Pocillos de C a la H diluciones seriadas al medio. Derecha, Gráfico de dosis respuesta a tiempo final 48 hs. Extractos de Arroz negro contra *F.oxysporum*

Figura 3. Ensayo de MFC para extractos de Arroz negro empleando *F.oxysporum*. A: control de crecimiento; B 20µL de pocillo B-8; C 20µL de pocillo C-8; D 20µL de pocillo D 8.

## Conclusiones

De los resultados obtenidos se concluye que de 11 especies evaluadas hay cinco que presentaron una marcada actividad antimicrobiana frente a más de un patógeno evaluado. Los valores de MIC para la cinco especies activas están comprendidos entre 0,0312 mg/mL (Ubajay contra *P. digitatum*) y 1mg/mL (Ornithopus contra *F.oxysporum*), resultando alguno de estos muy promisorios para un trabajo posterior de identificación del factor tóxico. Se resalta además que en el extracto de arroz negro se encontró actividad fungicida del crecimiento miceliano.

## Referencias

Díaz Dellavalle P, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, Dalla Rizza M (2011) Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus Alternaria spp. Chilean Journal of Agricultural Research 71: 231-239

Pelegri PB, Noronha EF, Muniz MAR, Vasconcelos IM, Chiarello MD, Oliveira JTA, Franco OL (2006) An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Proteins and Proteomics* 1764: 1141-1146