

Comunicación breve

Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de hojas de diferentes cultivares de *Fragaria ananassa* Duch. para la formulación de bioinsumos fitosanitarios**Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of leaves extracts of different cultivars of *Fragaria ananassa* Duch. for phytosanitary bioproducts formulation**

A. Cerviño¹; C.F. Grellet¹; P.A. Di Peto¹; L.C. Rodríguez²;
A.P. Castagnaro¹; M.P. Filippone^{2#}; A.I. Mamani de Marchese^{2#*}

¹ Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), EEAOC-CONICET.

² Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Néstor Kirchner 1900, (4000), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. *E-mail: al_mam@yahoo.com.ar

M.P. Filippone y A.I. Mamani de Marchese tuvieron igual contribución en este trabajo.

Resumen

En este trabajo se caracterizaron extractos metanólicos y acuosos de hojas de *Fragaria ananassa* Duch. de los genotipos “Camarosa”, “Camino Real”, “Merced”, “Benicia” y “San Andreas” (este último de dos procedencias: Tafi del Valle, Tucumán, y Patagonia), en base al contenido de compuestos fenólicos totales y a la capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos fitopatógenos. No se observaron diferencias significativas en el contenido de fenólicos a excepción del extracto metanólico (EM) del genotipo “Merced” que presentó el mayor valor y los extractos acuosos (EA) de los genotipos “San Andreas” de Tafi del Valle y “Camarosa”, que fueron los de menor contenido. Las bacterias mostraron mayor sensibilidad que los hongos a los EM, mientras que en el caso de los EA ambos tipos de microorganismos mostraron una sensibilidad similar. No se observó una relación directa entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antimicrobiana. Aunque algunos genotipos de frutilla mostraron actividad antimicrobiana específica, en general todos los genotipos evaluados presentaron un comportamiento similar. Se destacan los extractos acuosos para el desarrollo de un bioinsumo de bajo costo de producción, aprovechando los residuos de cosecha del cultivo de frutilla.

Palabras claves: Bioinsumos; *Fragaria ananassa*; Antimicrobianos naturales.

Abstract

In this work, methanolic and aqueous extracts from leaves of five genotypes of *Fragaria ananassa* Duch. were characterized based on their total phenolic compounds content and the ability to inhibit the growth of bacterial and fungal phytopathogens. Genotypes studied were: “Camarosa”, “Camino Real”, “Merced”, “Benicia” and “San Andreas” (this last one from two origins: Tafi del Valle, Tucumán and Patagonia). No significant differences were observed in the phenolic content except for the methanolic extract (ME) of the “Merced” genotype that presented the highest value and the aqueous extracts (AE) of the “San Andreas” genotypes from Tafi del Valle and “Camarosa”, which exhibited the lowest value. Bacteria showed greater sensitivity than fungi to ME, whereas in the case of AE both types of microorganisms showed a similar sensitivity. No direct correlation was observed between the content of total phenolic compounds and the antimicrobial activity. Although some strawberry genotypes showed specific antimicrobial activity, in general all evaluated genotypes showed a similar behavior and would be equally valid for the development of bioproducts. The aqueous extracts stand out for the development of bioproducts of low production cost, taking advantage of the crop residues of the strawberry crop.

Keywords: Bioproducts; *Fragaria ananassa*; Natural antimicrobials.

Los bioinsumos (biofertilizantes, bioestimuladores, bioplaguicidas, etc.) se han convertido en componentes vitales de los sistemas sustentables (Yakhin *et al.*, 2017), ya que constituyen una alternativa económica y ecológicamente aceptable para reducir los efectos negativos de los agroquí-

micos de síntesis, sin perjudicar la calidad de la producción agrícola. En general, un bioinsumo se formula a partir de componentes biológicos, compuestos o extractos vegetales o de microorganismos, o microorganismos vivos. El uso de microorganismos o de extractos vegetales para el manejo

Recibido: 15/06/2019; Aceptado 30/10/2019.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

de plagas y enfermedades agrícolas, es una práctica muy antigua que quedó relegada a la agricultura familiar como consecuencia del surgimiento de los agroquímicos sintéticos con la Revolución Verde a partir de la década del '40 (Vara-Sánchez y Cuéllar-Padilla, 2013). Sin embargo, en los últimos 30 años, volvió a valorizarse y actualmente muchas empresas multinacionales de agroquímicos de síntesis han incorporado a los bioinsumos dentro de su cartera de productos (Duke, 2018).

A partir de hojas de las variedades "Chandler" y "Camarosa" de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.) se purificaron y caracterizaron compuestos bioactivos pertenecientes al grupo de los taninos hidrolizables (Filippone *et al.*, 1999; 2001; Mamani *et al.*, 2012). La aplicación externa tanto de estos compuestos puros como de los extractos que los contienen, disminuyeron la incidencia de enfermedades en diferentes especies vegetales tales como la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh y en cultivos como *F. ananassa*, *Citrus limon* (L.) Burm. y *Glycine max* (L.) Merr. (datos no publicados), por lo que serían potencialmente útiles para ser utilizados en la formulación de bioinsumos.

La tendencia actual indica que la utilización de este tipo de productos irá en crecimiento en la agricultura contemporánea y futura, por lo que la caracterización y desarrollo de bioinsumos se ha convertido prácticamente en una necesidad para el sector. En este marco, considerando los resultados previos del grupo y con el objetivo de desarrollar un bioinsumo, se optimizaron protocolos de obtención de extractos de frutilla factibles de ser implementados en una producción a mayor escala. Para la obtención de los extractos se aprovechan las hojas de las plantas al final del ciclo productivo del cultivo, lo cual no afectaría la producción de fruta. Considerando que la fuente potencial del material vegetal para la elaboración de un bioinsumo sería la producción local de Tucumán, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad biológica de los extractos de las variedades de frutilla más utilizadas en la provincia.

Se utilizaron cinco genotipos de *F. ananassa*: la variedad temprana "San Andreas", de dos procedencias distintas: Patagonia (SAP) y Tafi del Valle (SAT); las variedades intermedias "Benicia" (BE) y "Camarosa" (CA); y las variedades tardías "Camino Real" (CR) y "Merced" (ME). El material vegetal se cosechó al final del ciclo del cultivo, de una finca ubicada en la localidad de Lules, provin-

cia de Tucumán, Argentina (S 26° 55' 39.72" O 65° 20' 19.28"), el cual se secó a 50 °C con aire continuo hasta peso constante. Para preparar los extractos, tanto metanólicos (EM) como acuosos (EA), se mezclaron 10 g de hojas secas molidas con 100 ml de metanol 80 % (v/v), o con 100 ml de agua destilada acidificada a pH 3,5-4 con el agregado de jugo de limón al 5 % (v/v), respectivamente. En ambos casos se maceró durante 24 horas a temperatura ambiente y agitación. El homogenato alcohólico se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio al vacío a 50 °C, y el acuoso se filtró en embudo Büchner y se concentró en liofilizador a -20 °C, hasta una concentración final de 5 g de peso fresco de hojas por ml (g PF/ml) en ambos casos.

Considerando que los compuestos bioactivos previamente identificados pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, los extractos fueron caracterizados de acuerdo con el contenido de compuestos fenólicos totales y a la capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* de fitopatógenos.

Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu con las modificaciones según Seong Soo *et al.* (2010). El contenido total de compuestos fenólicos se calculó usando una curva de calibración establecida con una solución estándar de ácido gálico y se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de tejido fresco (mg GAE/g PF).

Se realizó un experimento factorial 2 x 6 completamente aleatorizado con dos repeticiones. Para el análisis estadístico se utilizó análisis de varianza y prueba de Tukey de comparación de medias. Se evaluó el efecto principal del extracto (acuoso o metanólico) y del genotipo, y la interacción entre ellos. El nivel de significación fue 0,05.

La interacción entre extracto y genotipo no fue significativa ($F = 0,68$, g.l. = 5,12, p-valor = 0,6465), pero hubo diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos entre los extractos ($F = 19,27$, g.l. = 1,12, p-valor = 0,0009) y entre genotipos ($F = 3,41$, g.l. = 5,12, p-valor = 0,0378). Estos resultados muestran que es mayor el efecto del extracto que el del genotipo.

En la Figura 1 se observa que, en general, el promedio del contenido de fenólicos totales de los EA ($20,12 \pm 3,67$ mg GAE/g PF) fue menor que el de los EM ($27,58 \pm 6,13$ mg GAE/g PF). La interacción no significativa indica que EM produjo valores más altos independientemente de la variedad.

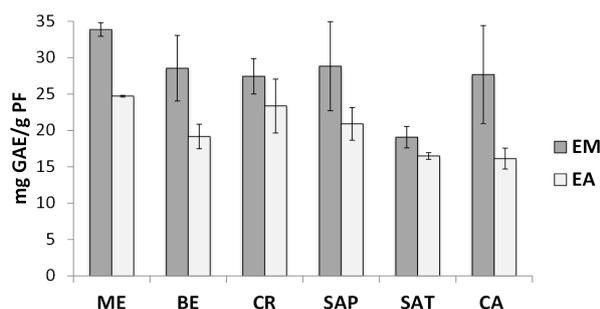


Figura 1. Contenido medio de compuestos fenólicos totales (mg GAE/g PF) de los extractos metanólicos (EM) y acuosos (EA) obtenidos a partir de hojas de los diferentes cultivares de *Fragaria ananassa* Duch.: “Camarosa” (CA), “Camino Real” (CR), “Merced” (ME), “Benicia” (BE) y “San Andreas” de Patagonia (SAP) y de Tafi del Valle (SAT). Las barras de error corresponden a los errores estándar.

La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* cepa C5 (*Cm*), bacteria Gram positiva y agente causal de la podredumbre anular de la papa, y de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), bacteria Gram negativa y agente causal de la canchrosia de los cítricos, y de los hongos *Penicillium digitatum*, causante de la podredumbre verde de los cítricos, y *Corynespora cassiicola*, agente responsable de la mancha anillada de la soja. Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) para *C. michiganensis*, y Cadmus para *Xcc*, a 28 °C durante 24 horas. Los hongos (*Penicillium digitatum* (Pd) y *Corynespora cassiicola* (Cc) se cultivaron 8 días en medio agar-papa-dextrosa (APD) a 25 °C y luz continua. Las esporas se colectaron de la superficie del micelio y se cuantificaron en cámara de Neubauer.

Para la determinación de la Concentración Efectiva 50 (CE50), concentración requerida para inhibir el 50 % del crecimiento microbiano, se realizaron curvas dosis-respuestas en medio líquido según se describe en Neubig *et al.* (2003) realizando diluciones seriadas al medio desde 200 mg PF/ml hasta 0,005 mg PF/ml. Como control negativo de inhibición se usó agua. Como control positivo se usó estreptomycin 0,5 mg/ml para las bacterias y el fungicida Imazalil a 200 ppm para los hongos. Cada valor de CE50 corresponde al promedio de tres réplicas experimentales. El análisis de la varianza se realizó en forma separada para cada patógeno y para cada extracto (acuoso o metanólico). Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En la Figura 2 se muestran los valores de CE50 para cada extracto, en donde se observa que en general las bacterias mostraron una sensibilidad

similar a ambos tipos de extractos (EA y EM), mientras que los hongos mostraron mayor sensibilidad a los EA. Los valores promedio de CE50 de los EA oscilaron entre 0,46-6,3 mg PF/ml y entre 1,6-11,8 mg PF/ml para bacterias y hongos, respectivamente; mientras que en los EM el rango fue 0,81-5,71 mg PF/ml para bacterias y de 10,2-31,4 mg PF/ml para los hongos. También se observó un comportamiento diferencial entre las dos bacterias evaluadas. *Xcc* (Gram negativa), mostró mayor sensibilidad general a los EA mientras que *Cm* (Gram positiva), fue más sensible a los EM de todos los genotipos de frutilla evaluados. Los extractos que presentaron la mayor actividad para ambas bacterias fueron el EA “Camarosa” (0,46 y 0,99 mg PF/ml para *Xcc* y *Cm*, respectivamente) y el EM de “Merced” (0,81 y 1,11 mg PF/ml para *Xcc* y *Cm*, respectivamente).

En el caso de los hongos, los valores promedio de las CE50 del EA de las variedades “Merced”, “Benicia” y “Camino Real” fueron muy similares para los dos hongos evaluados (valores comprendidos entre 7,45 y 4,03 mg PF/ml). Los EAs de las variedades “Camarosa” y las dos accesiones de “San Andreas” exhibieron mayor actividad para *P. digitatum* (2,52; 1,80 y 1,57 mg PF/ml respectivamente) mostrando un valor promedio de la CE50 de hasta un orden de magnitud inferior que para *C. cassiicola* (11,76; 8,06 y 7,01 mg PF/ml respectivamente). A diferencia de lo observado en bacterias, en el caso de los hongos no se puede definir un único extracto que presente la mayor actividad contra ambos hongos.

No se observó una asociación directa entre la actividad antimicrobiana de los extractos y el contenido de compuestos fenólicos. Por ejemplo, el EM de “Merced” que presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos totales, fue el de mayor actividad antimicrobiana sólo para las bacterias, pero no para los hongos evaluados. De igual manera, el menor contenido de compuestos fenólicos se observó en el EA de “Camarosa”. Sin embargo, resultó uno de los de mayor actividad inhibitoria del crecimiento de los fitopatógenos evaluados. En base a esto se podría inferir que la actividad antimicrobiana de los extractos estaría más asociada a la naturaleza química que a la concentración de los compuestos fenólicos presentes en los extractos.

De acuerdo con la actividad antimicrobiana se desprende que todos los genotipos de frutilla evaluados serían igualmente apropiados para el desar-

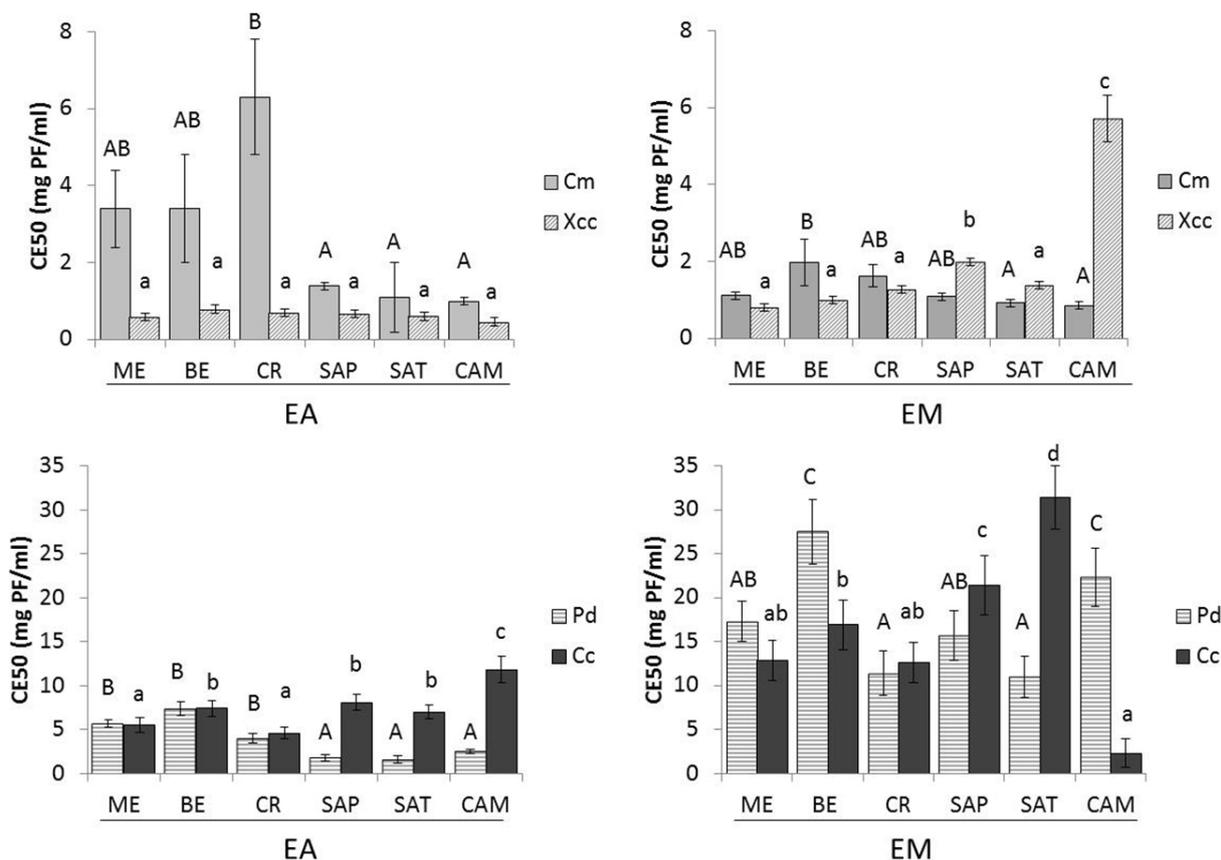


Figura 2. Actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes genotipos de *Fragaria ananassa* contra las bacterias *Clavibacter michiganensis* (Cm) y *Xanthomonas citri* (Xcc) y los hongos *Penicillium digitatum* (Pd) y *Corynespora cassicola* (Cc) expresadas como Concentración Efectiva 50 % (CE50) en mg de peso fresco de hoja por ml de extracto (mg PF/ml). EA: extracto acuoso. EM: extracto metanólico. Cultivares: "Merced" (ME), "Benicia" (BE), "Camino Real" (CR), "San Andreas" Patagonia (SAP), "San Andreas" Tañi del Valle (SAT) y "Camarosa" (CAM). Diferentes letras indican diferencias significativas entre las variedades según la prueba de Tukey ($p < 0,05$). El análisis de la varianza se realizó en forma separada para cada patógeno y para cada extracto. Las barras de error corresponden a los errores estándar.

rollo de un bioinsumo, ya que mostraron actividades similares. Además, se pudieron identificar algunos extractos que mostraron una destacada actividad antimicrobiana contra un patógeno en particular, por lo que podrían utilizarse para el diseño de bioinsumos específicos.

La actividad antimicrobiana de los extractos muestra el potencial de estos para ser utilizados en el manejo fitosanitario de cultivos agrícolas en un esquema de producción orgánica y de bajo impacto ambiental. Los resultados obtenidos permiten concluir que cualquiera de los genotipos de frutilla evaluados resultaría válido para el desarrollo de un bioinsumo.

La posibilidad de utilizar los residuos de cosecha otorgaría un valor agregado al cultivo de la frutilla (Roveretti *et al.*, 2013), lo que sumado a la actividad antimicrobiana *in vitro* que presentaron los extractos obtenidos con agua (EA), permitiría la obtención de un bioinsumo de bajo costo e inocuo para la salud humana y el medio ambiente.

El hecho de que las diferentes variedades de frutilla evaluadas presentaron características bioactivas muy similares, hace que el material vegetal para la elaboración de un potencial bioinsumo no esté restringido a un genotipo de frutilla específico. Esto es muy importante ya que particularmente en este cultivo existe una constante generación de nuevos genotipos, lo que resulta que una variedad en uso comercial sea rápidamente reemplazada por nuevas variedades (Krischbaum *et al.*, 2017).

Agradecimientos

Agradecemos al ITANO (CONICET-EEAOC), a la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la UNT (SCAIT), a la Cátedra de Bioquímica Agrícola de la Facultad de Agronomía y Zootecnia, UNT, al Ing. Roberto Mamana de Finca La Loma (Lules, Tucumán), por la provisión del material vegetal y al Comité Editor RANAR por su valiosa colaboración en Bioestadística.

Referencias bibliográficas

- Duke S. (2018). Pest Management Science in 2017. *Pest Management Science* 74 (1): 7-8.
- Filippone M.P., Ricci J.D., Mamani de Marchese A.M., Farías R.N., Castagnaro A. (1999). Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS letters* 459 (1): 115-118.
- Filippone M.P., Díaz Ricci J.C., Castagnaro A.P., Farías R.N. (2001). Effect of fragarin on the cytoplasmic membrane of the phytopathogen *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (7): 925-928.
- Kirschbaum D., Sordo M., Adlercreutz E., Delmazo P., Pacheco R., Misrendino E. (2017). Panorama del cultivo de Frutilla en junio de 2017. *Boletín de Frutas y Hortalizas del Convenio INTA-CMCBA* N° 61. En: https://www.researchgate.net/publication/318528141_Panorama_del_cultivo_de_Frutilla_en_junio_de_2017, consulta: abril 2019.
- Mamani A., Filippone M.P., Grellet C., Welin B., Castagnaro A.P., Díaz Ricci J.C. (2012). Pathogen-induced accumulation of an ellagitannin elicits plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25 (11): 1430-1439.
- Neubig R.R., Spedding M., Kenakin T., Christopoulos A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Reviews* 55 (4): 597-606.
- Roveretti M.J., Atucha A.J., Lacaze M.V. (2013). Producto Bruto Hortícola del Partido de General Pueyrredon: Reglas institucionales, relaciones insumo-producto y composición del valor agregado. En: <http://nulan.mdp.edu.ar/2198/1/roveretti.etal.2013.pdf>, consulta: abril 2019.
- Seong Soo J., Yun-Bae K., Do Ik L. (2010). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Secondary Metabolites from White Rose Flower. *Plant Pathology Journal* 26 (1): 57-62.
- Vara-Sánchez I., Cuéllar-Padilla M. (2013). Biodiversidad cultivada: una cuestión de coevolución y transdisciplinariedad. *Ecosistemas* 22 (1): 5-9.
- Yakhin O., Lubyantsev A., Yakhin I., Brown P. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science* 7: 2049.