

ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENS FROM SEAWEEDS PRESENT IN BIOBIO REGION

Valdebenito Alvaro¹, Troncoso Nicolás¹, Agurto Andres¹, Troncoso Marcos¹, Agurto Cristian¹.

¹Grupo Interdisciplinario de Biotecnología Marina, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción-Chile, alvarovaldebeni@udec.cl;

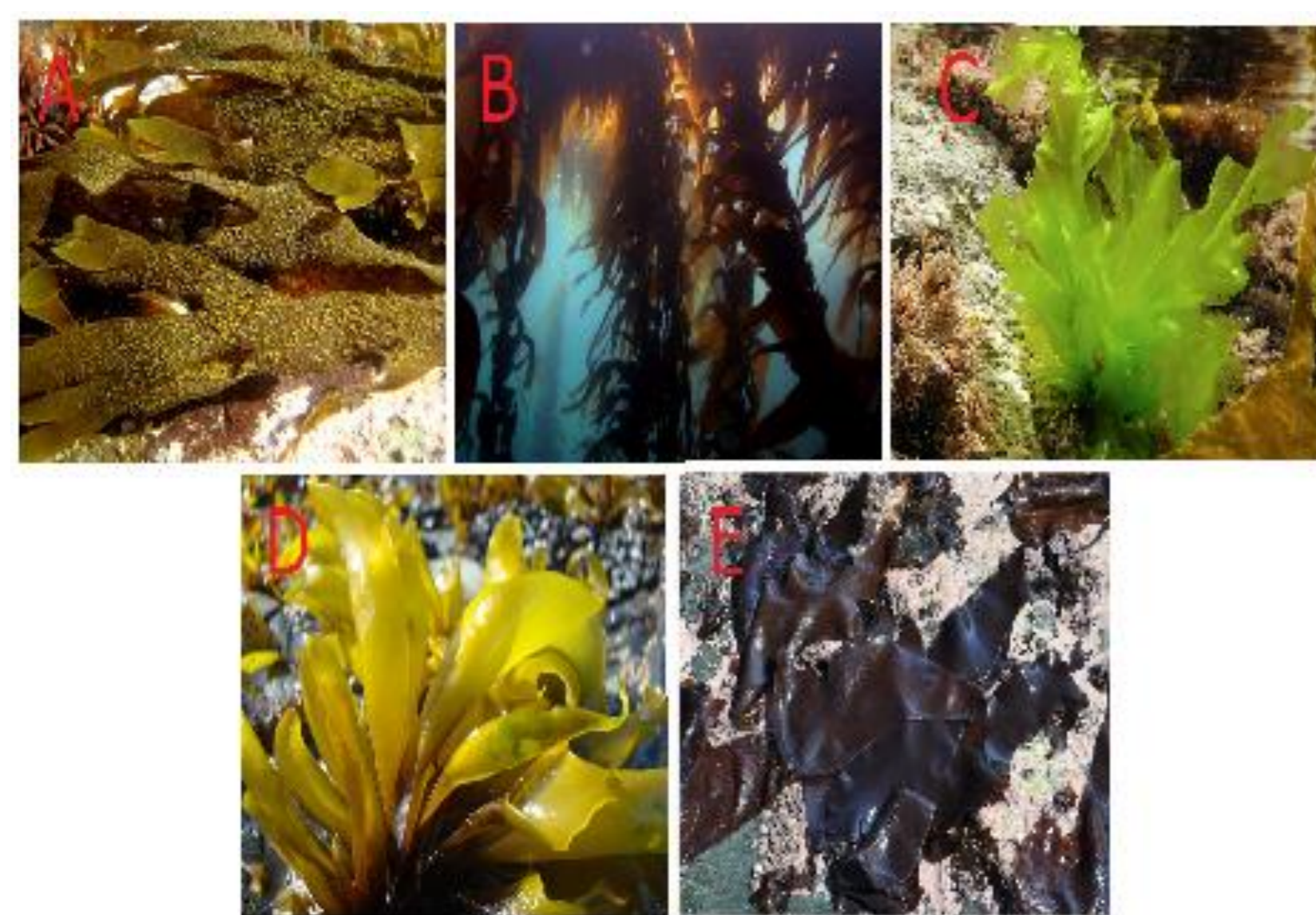


Fig. 1. Algas utilizadas para las actividades:
A: *Dicytiota kunthii* (Dku)
B: *Macrocystis pyrifera* (Mpy)
C: *Ulva* sp. (Uct y Uwt)
D: *Mazzaella laminarioides* (Mla)
E: *Sarcothalia crispata* (Scr) [4]

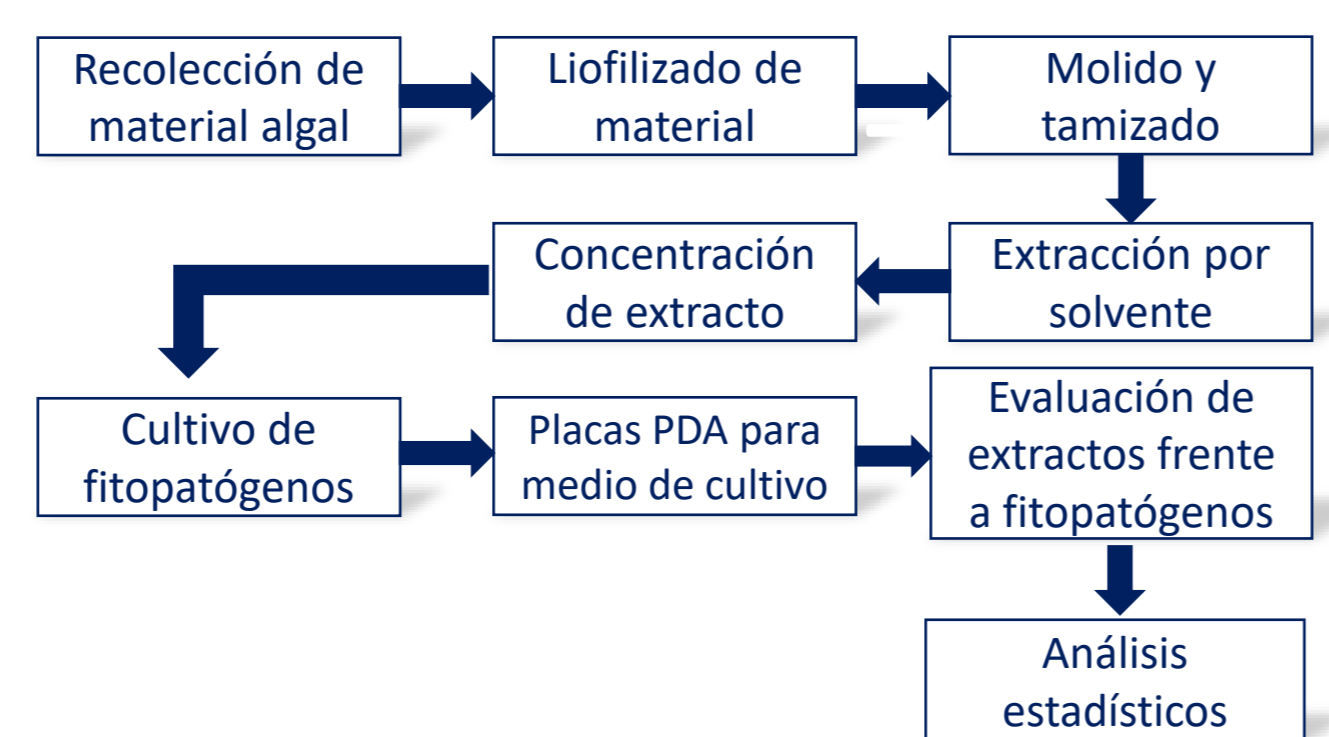


Fig. 2. Diagrama de la Metodología.

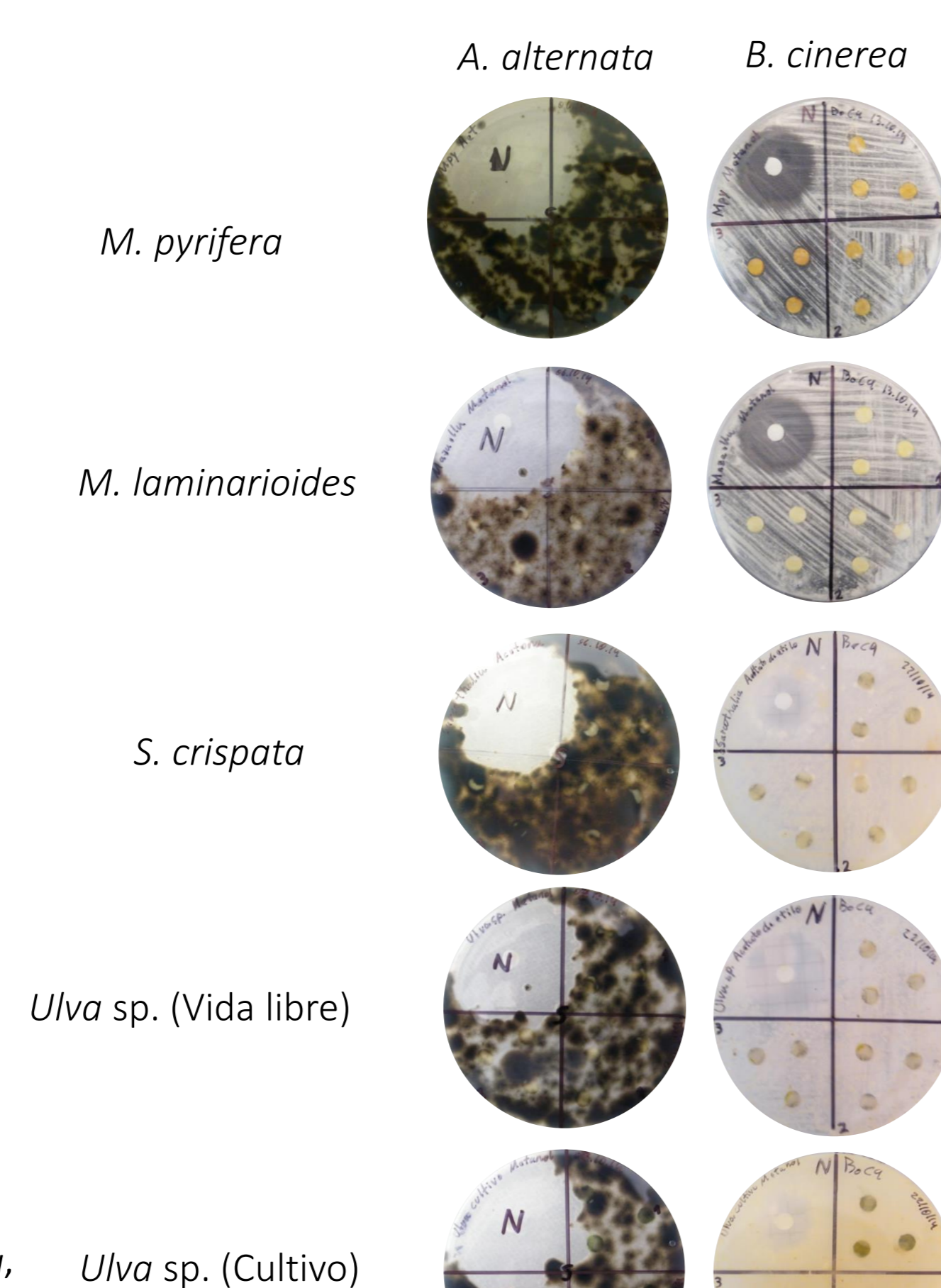


Fig. 4. Actividad antifúngica de diversas algas de la Región del Biobío frente a los hongos fitopatógenos *A. alternata* y *B. cinerea*.

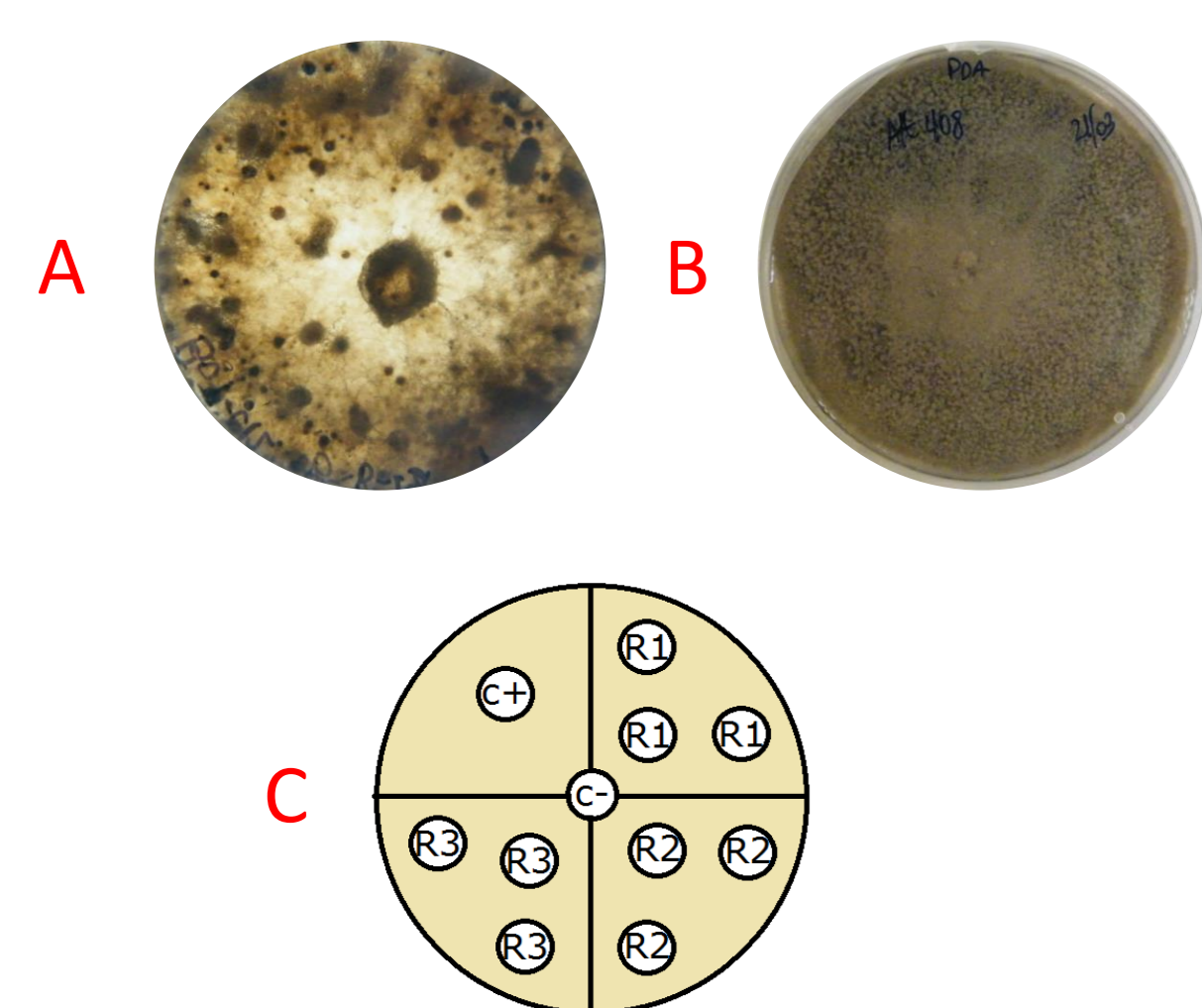


Fig. 3. A: Hongo *Botrytis cinerea*, B: Hongo *Alternaria alternata*, C: Distribución de discos en placa petri para evaluación antifúngica, R: replicas por solvente, R1, R2 y R3: subreplicas, C+: control positivo Nistatina, C-: control negativo solvente de extracción.

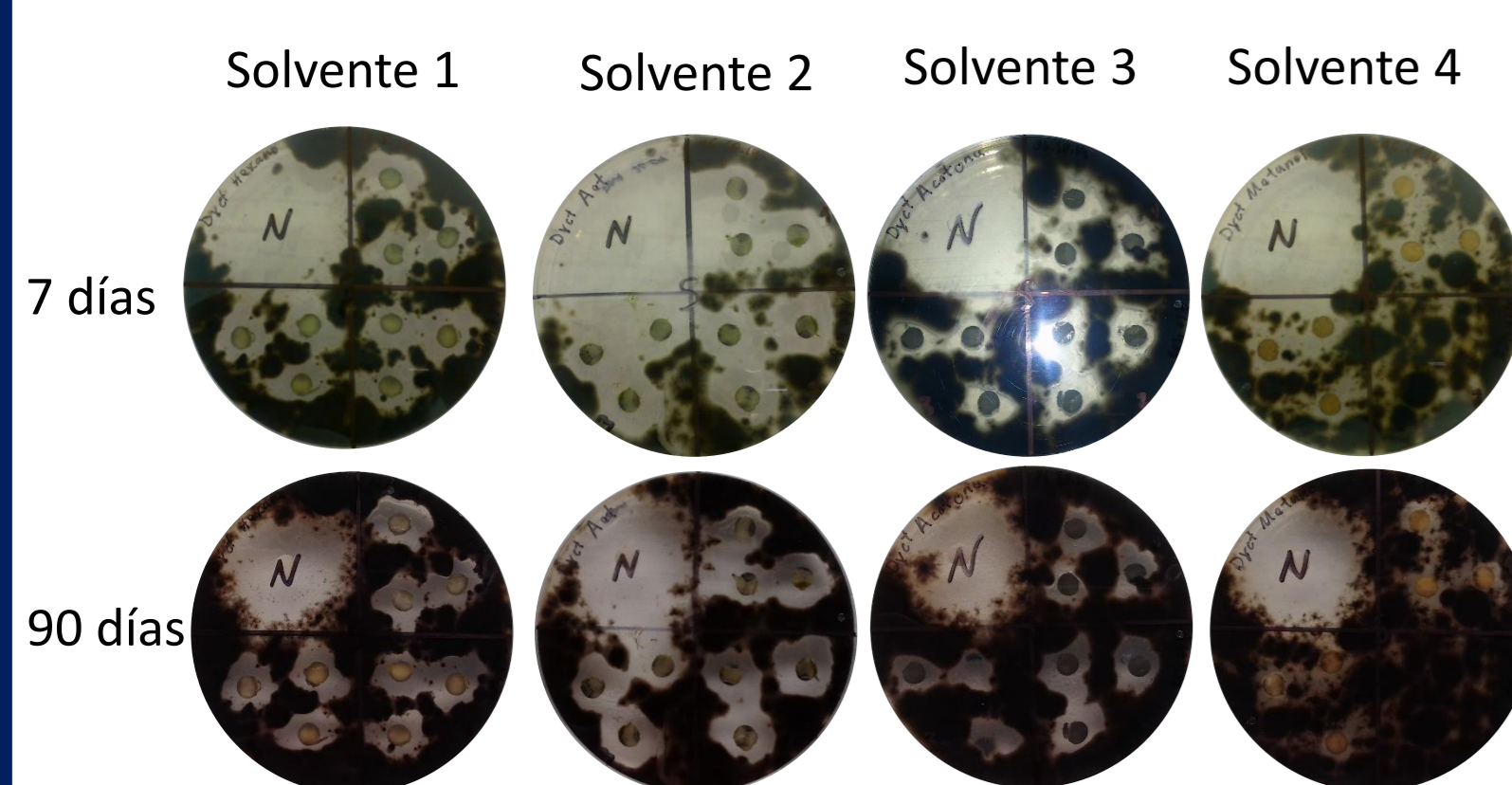


Fig. 5. Efecto de los extractos del alga *D. kunthii* en gradiente polaridad de solventes orgánicos a lo largo de 90 días frente al hongo fitopatógeno *A. alternata*.

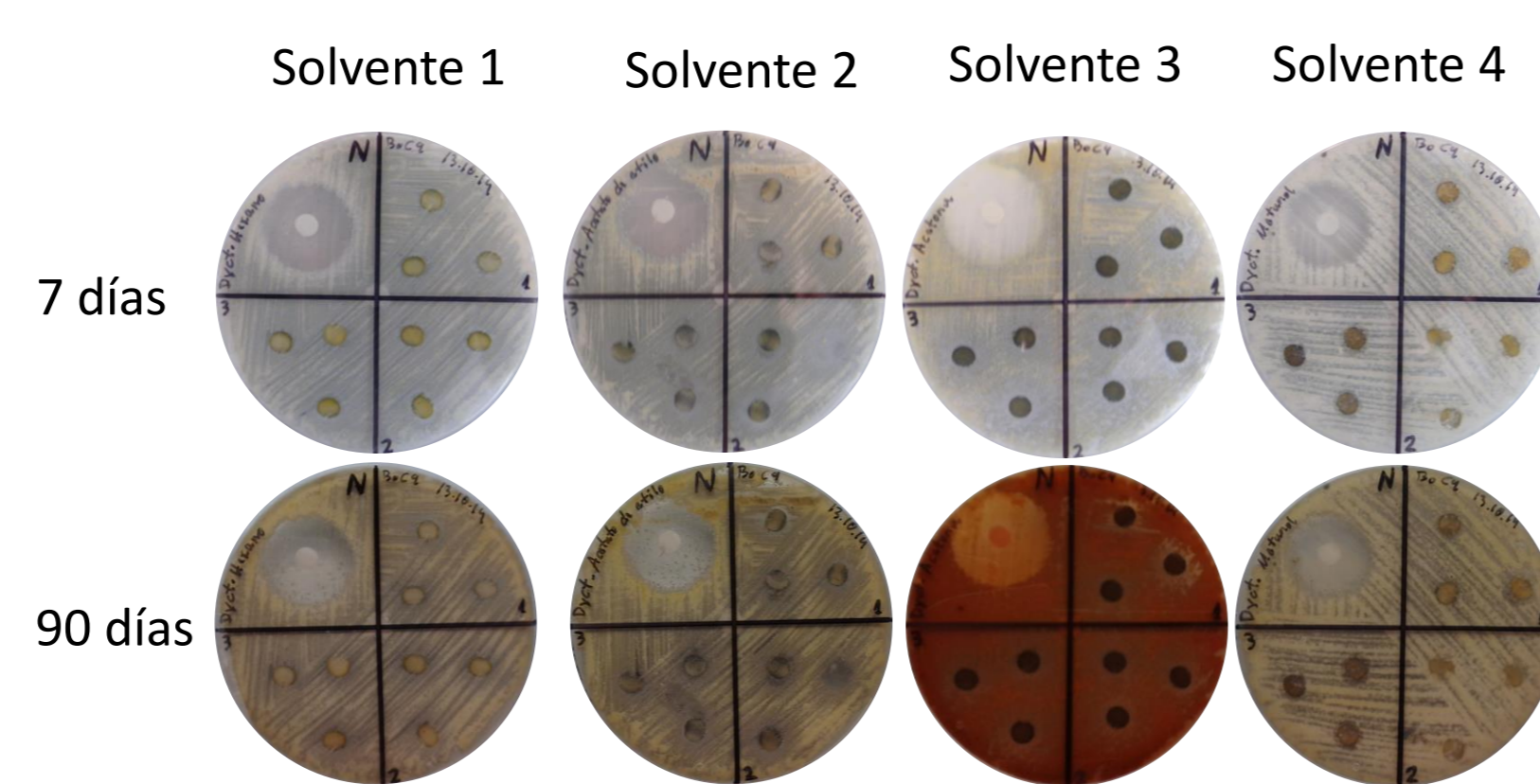


Fig. 6. Efecto de los extractos del alga *D. kunthii* en gradiente polaridad de solventes orgánicos a lo largo de 90 días frente al hongo fitopatógeno *B. cinerea*.

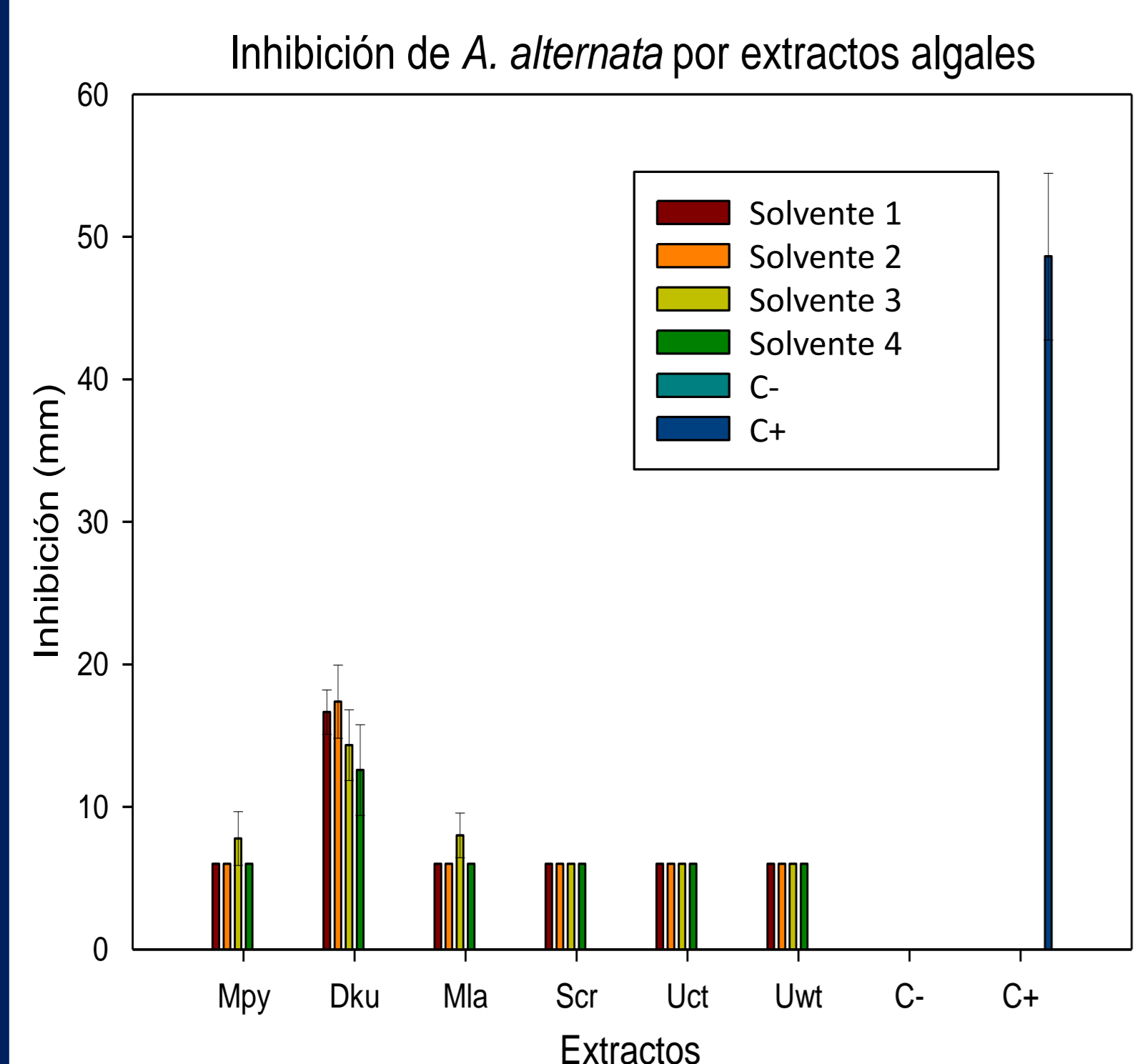


Fig. 7. Capacidad antifúngica de los distintos extractos crudos de algas de la Región del Biobío evaluados en mm del halo de inhibición frente al hongo fitopatógeno *A. alternata*. C- control negativo: solventes de extracción C+ control positivo: nistatina

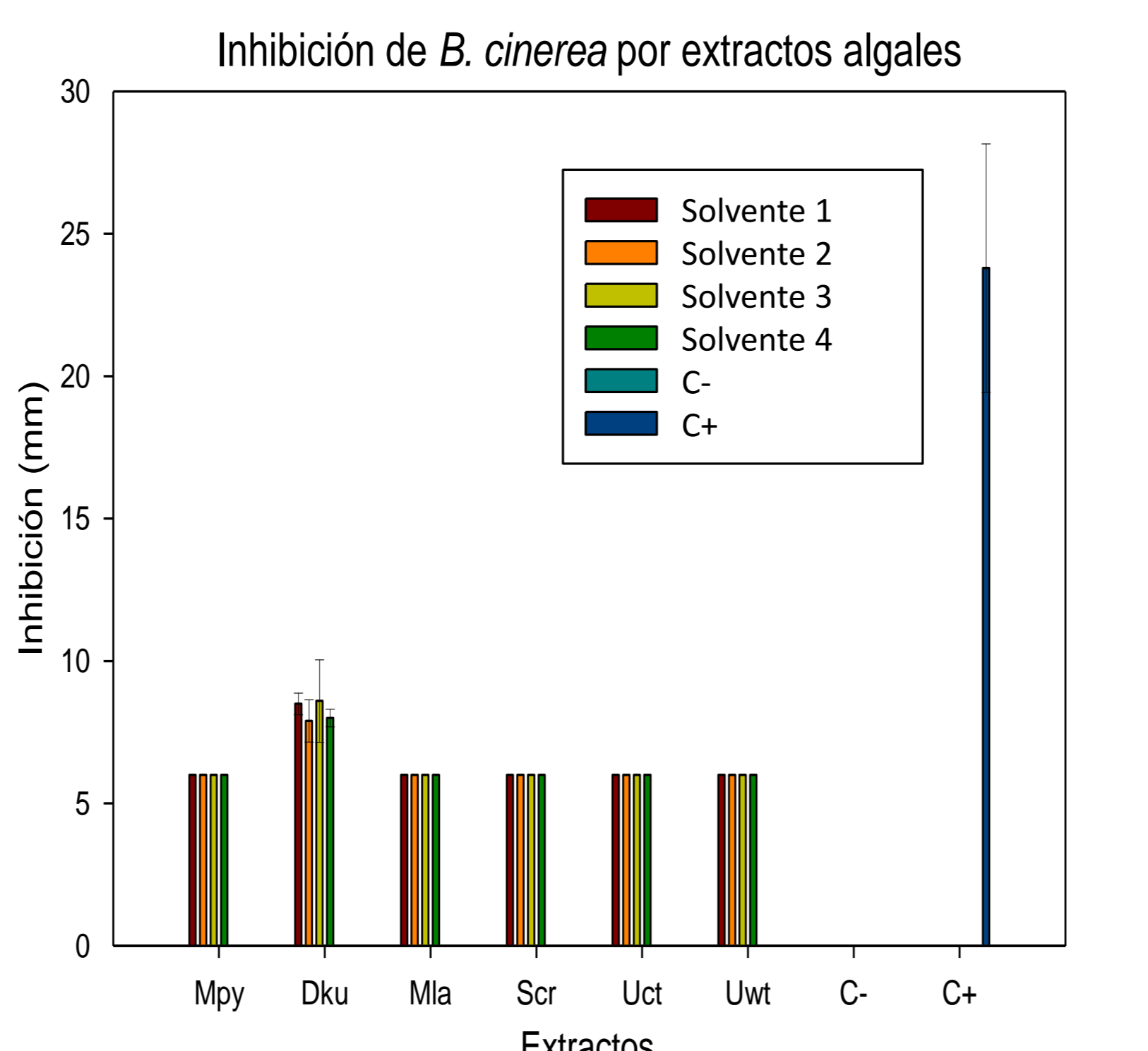


Fig. 8. Capacidad antifúngica de los distintos extractos crudos de algas de la Región del Biobío evaluados en mm del halo de inhibición frente al hongo fitopatógeno *B. cinerea*. C- control negativo: solventes de extracción C+ control positivo: nistatina

ABSTRACT: The agricultural industry in Chile represents one of the highest levels of national exportation, being the fruit sector the one that generates the greatest assets. The fruit industry experiments significant annual losses that vary from 4-5%. These losses are caused by the influence of phytopathogenic microorganisms such as *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium*, which damage fruits through oxidation effects. Lessening methods, synthetic chemical washing and thermal methods are used for fighting this problem, but most of them do not accomplish the total extermination of pathogens, damaging the fruit. In order to generate antifungal activity capable of eliminating phytopathogens, different seaweed species present in the region of Bio-Bío were used because of their bioactive compound contents that confer antimicrobial capacity. Extractions of bioactive compounds were performed through organic solvents through batch type agitation. Raw extracts obtained from seaweeds were evaluated in exposure to *B. cinerea* and *A. alternata* by using the Kirby-Bauer method. The results showed the seaweeds species *Sarcothalia crispata* and *Ulva lactuca* did not present high antifungal activity against the pathogens used. On the other side, *Macrocystis pyrifera* and *Mazzaella laminarioides* successfully presented antifungal activity against *A. alternata*. However, the brown seaweed *Dicytiota kunthii* stood out due to its ability to inhibit the three fungi used, being this the species with the highest antifungal activity. The data obtained from the extracts of *D. kunthii* with antifungal activity can be used for the production of sleeve-type foam mesh for the protection of fruits, reducing economic losses in the exporting sector. The research is in the context of the project Innovachile 13IDL2-18275 - Development of Biodegradable Antifungal Foam Mesh (Sleevits) for the Protection of Apple and Pear Exports.

INTRODUCCION:

La industria agrícola en Chile posee una de las exportaciones con mayor recaudación para el país [13], teniendo a la manzana y la pera como dos de las más importantes frutas a nivel nacional [12], por culpa del ataque de fitopatógenos como *A. alternata* y *B. cinerea* se pierde un alto porcentaje de la exportación, es por este motivo que se pretende implementar mallas termoplásticas espumadas, sleeveits, con capacidad antifúngica que provenga de las algas para la protección de las frutas, esto dado ya que en las últimas décadas el estudio de las algas ha aumentado por la importancia de los compuestos bioactivos que estas poseen [14 y 15], estos compuestos ofrecen protección contra los patógenos que coexisten con las algas [3], además se han descrito un sinnúmero de otras capacidades en estos metabolitos secundarios como antitumoral, antiviral, antifúngica, insecticida, citotóxica, fitotóxicos y acciones antiproliferativas, entre otras [11]. Para las algas pardas los compuestos bioactivos antifúngicos que se presentan en mayor cantidad son los derivados de los terpenos como lo son los dictyol C y H y los xenicane, dolabellane entre otros [1, 3, 14, 16, 17, 18 y 19], en las algas rojas los compuestos bioactivos más comunes son polisacáridos sulfatados, compuestos halogenados, terpenos, carbohidratos, ácidos grasos y distintos pigmentos [9, 10 y 11] y por ultimo las en las algas verdes encontramos polisacáridos sulfatados, terpenos y compuestos polifenólicos [20 y 21].

METODOLOGIA:

Se obtuvieron macroalgas pardas, rojas y verdes de la Región del Biobío (Fig. 1). Las muestras fueron preparadas para una extracción del tipo batch con distintos solventes orgánicos. Los extractos se concentraron en un evaporador paralelo hasta un volumen de 4 mL [6]. Para la actividad antifúngica se utilizaron placas PDA las cuales se inocularon con el método de dispersión por tórua con los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* (Bo C9) y *Alternaria alternata* (Alt 408) (Fig. 3). Utilizando el método de Kirby Bauer [5] se inocularon discos de difusión con 30 µL de los extractos de algas, además un control positivo, nistatina y como control negativo el resultado de la extracción (Fig. 3), las placas se mantuvieron durante 7 días a 20±5°C para observar el crecimiento del hongo. Los resultados se obtuvieron a través de medición con pie de metro. Los datos se visualizaron a través de Análisis de Varianzas (ANOVA) de dos vías y por el test de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) para visualizar diferencias significativas existentes en la inhibición del crecimiento del hongo por las distintas algas utilizadas y el solvente de extracción.

RESULTADOS:

- ❖ Todas las algas evaluadas contra *A. alternata* mostraron actividad antifúngica y una alta diferencia significativa entre especies y solvente (Fig. 4, 5 y 7, ANOVA $p < 0,001$, F: 7,749), destacándose *M. laminarioides* y *M. pyrifera* (Fig. 7, TUKEY HSD $p < 0,01$), pero el alga que obtuvo un mayor rendimiento fue *D. kunthii* la cual inhibió el crecimiento del hongo en todas sus extracciones teniendo una diferencia altamente significativa con los demás extractos (Fig. 7, TUKEY HSD $p < 0,001$).
- ❖ Al igual que el control positivo (Nistatina), la inhibición de *D. kunthii* frente a *A. alternata* se sostuvo durante 90 días que fue el tiempo que se mantuvo montada la experiencia (Fig. 4 y Fig. 5).
- ❖ Contra el hongo *A. alternata* la mejor actividad antifúngica la mostro la extracción de *D. kunthii* (TUKEY HSD, 17,39±2,57 mm).
- ❖ Todas las algas evaluadas contra *B. cinerea* mostraron diferencia ligeramente significativa en su actividad antifúngica entre especie y solvente (Fig. 4, 6 y 8 ANOVA $p < 0,5$, F: 1,40), destacándose *D. kunthii* la cual inhibió el crecimiento del hongo en todas sus extracciones con una diferencia altamente significativa (Fig. 8, TUKEY HSD $p < 0,001$).
- ❖ A lo largo de los 90 días que duró la experiencia las extracciones de *D. kunthii* con los distintos solventes orgánicos se mantuvieron al igual que el control positivo, obteniendo en algunos casos mayor rendimiento que la inhibición provocada por la nistatina (C+) (Fig. 5 y Fig. 6).
- ❖ Contra el hongo *B. cinerea* la mejor actividad antifúngica la mostro la extracción de *D. kunthii* (TUKEY HSD, 8,57±1,45 mm).

DISCUSIÓN:

- ❖ La actividad antifúngica medida contra *A. alternata* y *B. cinerea* proveniente del alga parda *D. kunthii* puede estar dada por los diversos terpenos provenientes del alga los cuales se han descrito para otras especies de *Dicytiota* como los xenicane, dolabellane dictyol C y H [1, 2 y 3].
- ❖ La gran actividad que presenta *D. kunthii* se ve reflejada en el periodo que duran los extractos manteniendo la capacidad antifúngica en los distintos solventes, el experimento sobrepasa el periodo de pruebas de 90 días que fue donde se dio término a la experiencia. Estos hallazgos son distintos y novedosos y no tienen punto de comparación, ya que, los estudios realizados por otros autores no se enfocan en el tiempo que duran los compuestos bioactivos entregando su capacidad antifúngica.
- ❖ En comparación a *D. kunthii*, la actividad de *M. pyrifera* fue menor esto pudo darse ya que los floratinos y los compuestos fenólicos son los que dan actividad antimicrobiana a esta alga según Dean [7] y estos se extraen principalmente desde fronda reproductiva como lo muestra Agurto [8], y para este caso se utilizó principalmente fronda vegetativa.
- ❖ La actividad de *M. laminarioides* puede estar dada por los distintos metabolitos secundarios tales como polisacáridos sulfatados, compuestos halogenados, terpenos, carbohidratos, ácidos grasos y distintos pigmentos que poseen las algas rojas descritos por algunos autores para estas especies de algas [9,10,11].

CONCLUSIÓN:

- ❖ Las experiencias con los extractos del alga parda *Dicytiota kunthii* muestran que esta alga es capaz de producir inhibición frente a los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *A. alternata*, independiente del solvente utilizado para la extracción.
- ❖ Las algas pardas de la Región del Biobío son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, dependiendo del solvente con el cual se realicen las extracciones en el caso de *M. pyrifera*, pero en otros casos como *D. kunthii* todas las extracciones presentan la capacidad antifúngica.
- ❖ Las algas rojas de la Región del Biobío son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos.
- ❖ Las algas verdes de la Región del Biobío son capaces de inhibir en baja proporción el crecimiento de hongos fitopatógenos.
- ❖ La mejor alga con capacidad antifúngica de la Región del Biobío fue *Dicytiota kunthii*.
- ❖ La inhibición de los hongos no está dada por los solventes de extracción, ya que los controles negativos lo demuestran, al permitir el crecimiento del fitopatógeno.
- ❖ Los datos obtenidos son fundamentales para continuar con la investigación del proyecto 13IDL2-18275, ya que se tiene claridad sobre la actividad antifúngica presentada por las algas de la Región del Biobío.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS: (1) Manzo et al., 2009. Phytochemistry Letters Volume 2, Issue 4, Pages 211–215. (2) Macaya et al., 2005. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Volume 325, Issue 2, 29 November 2005, Pages 214–227. (3) Blunt et al., 2006. Natural Product Reports 23(1): 26–78. (4) Macaya. 2013. Proyecto Fondecyt 11110437. (5) Bhatta et al., 2015. Medical Journal Armed Forces India Available online 29 March 2015. (6) Troncoso et al., 2015. Revista de Biología Marina y Oceanografía Vol. 50, 51: 199-204 (7) Dean et al., 1984. Marine Biology, 78:301-313. (8) Agurto et al., 2014. IX Congreso Nacional de Micro y Macro Algas, 7 al 10 de abril, Viña del Mar, Chile. (9) Felicio et al., 2010. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 52, Número 5, Pages 763-769. (10) Ki-Bong et al., 2008. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. Volumen 18, Número 1, enero 1 de 2008, páginas 104-108. (11) Machado et al., 2011. Planta Med. 77 (7): 733-735. (12) Banco Central de Chile, 2013. Indicadores de Comercio Exterior, Cuarto Trimestre 2012. (13) Oficina de Estudio y Políticas Agrarias (ODEPA). 2011. (14) Schmitt et al., 2004. Chemoeology, pp 125-131 (15) Aruoma et al., 2003. Mutation Research, 544:203-215. (16) Senthil et al., 2013. Molecular Diagnosis and Drug Discovery Laboratory, Department of Biotechnology, School of Life Sciences, Karpagam University, Coimbatore-640 021, Tamilnadu, India. (17) Cronin et al., 1995. Marine Ecology Progress Series 119, pp 265-273. (18) El Gamal A., 2010. Saudi Pharmaceutical Journal 18, 1–25 (19) Eom et al., 2011. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14, 192–197. (20) Puglisi et al., W.2004, 60 (2004), pp. 7035–7039 (21) Chakraborty et al., 2012. Food Chemistry. Volume 119, Issue 4, 15 April 2010, Pages 1399–1408.