

REZUMAT

CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA UNUI PRODUS BAZAT PE EXTRACTE BIOLOGIC ACTIVE EFICACE ÎN PROTECȚIA ANTIFUNGICĂ A PLANTELOR

Doctorand: Alina G. PAVEL (PERIȘOARĂ)

Conducător științific: Prof. univ.Dr. Stelica CRISTEA

CUVINTE CHEIE: *biofungicid, Tagetes erecta, substanțe biologice active, protecție plante, fitostimulator, agricultură ecologică*

INTRODUCERE

Plantele au proprietatea de a produce o varietate de metaboliți secundari cu rol de inactivare a organismelor dăunătoare. În funcție de metoda de obținere, pesticidele vegetale pot avea la bază extracte obținute din plante sau uleiuri esențiale volatile (Vidyasagar și Tabassum, 2013). Acestea se pot obține din diferite părți ale plantelor fie proaspete sau uscate, și anume, frunze, flori, rădăcini, semințe sau fructe. În general, se preferă părțile de plantă uscate, deoarece prin acest proces se reduce cantitatea de apă, obținându-se un randament mai ridicat în substanțe active (Abdulzahra și col., 2020; Chougule și Andoji, 2016). Conform datelor din literatură (Gakuubi și col., 2016), plantele cu un conținut bogat în compuși bioactivi cu activitate împotriva organismelor dăunătoare fac parte din familiile *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Myrtaceae* și *Solanaceae*. Compușii fitochimici, precum acizii, alcaloizii, polifenoli, flavonoidele, saponinele și substanțele terpenoide din extractele de plante reprezintă doar o parte dintre substanțele biologice active utilizate în formulările produselor destinate protecției plantelor (Sanchez Pino și col., 2013).

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Speciile de plante *Tagetes erecta* L (Crăiță) și *Trigonella foenum-graecum* L (Schinduf) ce fac parte din familiile *Asteraceae* și *Fabaceae* se regăsesc răspândite în mod spontan și cultivate la nivel global în diverse habitate geografice, dar și în microbiosfera de pe teritoriul României, având o însemnătate foarte mare pentru industria agricolă, horticolă, farmaceutică, alimentară și nutraceutică. Răspândirea vastă la nivel global le facilitează valorificarea. Conform literaturii de specialitate au fost realizate o serie de studii fitochimice pe extracte obținute din cele două specii plante, lucru evidențiat prin compoziția bogată în compuși fitochimici, în special flavonoide și polifenoli, saponine alcaloizi, uleiuri volatile, proteine și carbohidrați. Toți acești compuși sunt dovediți științific pentru proprietățile lor antioxidante și antimicrobiene. Însă analizele pe aceste două specii de plante sunt limitate pe teritoriul țării noastre, iar

rezultatele cercetării prezentei teze vin să completeze tabloul utilizării acestora în industria biopesticidelor ce au la bază substanțe biologic active vegetale, cu scopul susținerii și dezvoltării agriculturii ecologice, dar și limitarea utilizării pesticidelor chimice convenționale.

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

Obiective

Un prim obiectiv al prezentei teze a constat în obținerea unor extracte vegetale bogate în compuși fitochimici cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene, într-un mod economic, eficient și prietenos cu mediu, analiza profilului fenolic, antioxidant și a profilului germinativ.

Un al doilea obiectiv a constat în asocierea variantei de extract îmbogățit cu compuși fitochimici nutritivi și antimicrobieni cu rizobacterii cu proprietăți antifungice în vederea recomandării lor în dezvoltarea unui potențial produs ambivalent (antifungic și fitostimulator).

Teza de doctorat intitulată „**CERCETĂRI PRIVIND OBȚINEREA UNUI PRODUS BAZAT PE EXTRACTE BIOLOGIC ACTIVE EFICACE ÎN PROTECȚIA ANTIFUNGICĂ A PLANTELOR**” este constituită din două părți și structurată în șase capitole.

PARTEA I (Studiul Bibliografic) cuprinde trei capitole dedicate studiului de literatură (Capitolele I, II și III) unde este prezentat statusul actual în ceea ce privește biopesticidele, legislația de reglementare a acestor tipuri de produse la nivel european și plante bogate (*Tagetes erecta* și *Trigonella foenum-graecum*) în compuși fitochimici cu efect antioxidant și antimicrobian asupra organismelor dăunătoare.

PARTEA A II-A (Cercetări Proprii) este structurată în trei capitole și constituie contribuții proprii privind metodele de extracție, caracterizarea compușilor fitobiologici prezenți în cele șase variante de extracte obținute din cele două specii de plante cu scopul utilizării lor în industria protecției plantelor.

Capitolul VI cuprinde metode de extracție, caracterizare din punct de vedere al compușilor fenolici, evaluare activitate antioxidantă și biotestul geminativ al celor șase tipuri de extracte pe semințe de castraveți și ridichi și concluziile parțiale. Materialul vegetal cercetat a fost constituit din flori uscate de *Tagetes erecta* obținute din cultură ecologică și semințe uscate de *Trigonella foenum-graecum*. Metodele de extracție abordate au fost prin macerare la temperatura camerei și prin asistare termică în faza de concentrare la temperaturi de 35-40°C. Tipul de solvenți selectați fac parte din categoria alcoolilor concentrați, propilenglicol (50%) și etanol (70%). Astfel, s-au obținut din fiecare specie de plante, extracte etanolice (etanol 40% și 70%), în raport de 1:10, 1:20 și extracte în propilenglicol (50%), în raport de 1:10. S-au determinat concentrațiile compușilor fenolici, s-a determinat activitatea antiradicalică prin metoda DPPH, s-a determinat conținutul de substanță uscată și a fost evaluat comportamentul celor șase variante de extracte comparativ cu martorul (apa distilată) și solvenții în care s-a realizat extracția (etanol 40%, etanol 70%, propilenglicol 50%) asupra semințelor de castraveți și ridichi, prin aplicarea biotestului germinativ (la concentrații de 0,10%, 0,50%, 1,00% și 1,50%).

Extractele obținute au prezentat o concentrație ridicată în polifenoli totali exprimați în echivalenți acid cafeic (CAE) mg/ml și compuși flavonoidici exprimați în echivalenți rutin (RE) mg/ml. Varianta de extract din flori de *Tagetes erecta* în etanol 40% a prezentat cea mai mare concentrație de compuși fitchimici (CAE mg/ml $6,723 \pm 0,511$ și RE mg/ml $- 9,102 \pm 0,430$), un răspuns oxido-reducător mai pronunțat (EC_{50} μ l/ml extract: 0.47 ± 0.007 ; RSD-1,130) și un efect pozitiv asupra semințelor, stimulând germinația și creșterea rădăcinilor în raport cu solventul și martorul, la toate dozele de probă cercetate (0,10% - Gi% - 288,24%; 0,50% - Gi% - 122,88%; 1,00% - Gi% - 196,41% și 1,50% - Gi% - 17,41%). Această variantă de extract a fost selectată pentru continuarea cercetărilor privind activitatea antimicrobiană (antifungic) asupra tulpinilor de *Monilinia laxa*, *Fusarium graminearum* și *Aspegilius niger* și determinarea activității antifungice sinergică asociat cu rizobacterii ce fac parte din specia *Bacillus*.

Capitolul V cuprinde determinările calitative și cantitative ale compușilor fenolici din extractul *Tagetes erecta* (etanol 40%), (selectat în urma rezultatelor înregistrate cadrul cercetărilor din Capitolul VI), determinările concentrației de monoglucide reducătoare, a conținutului de proteine solubile, determinările activității antiradicalice prin metodele CUPRAC, TEAC, DPPH și ABTS, continuarea cercetărilor privind testul biogeminativ pe semințe de grâu și determinarea activității antifungice, prebiotice, antibiolfim bacterian și de sinergism antipatogenic cu specii bacteriene de *Bacillus*.

Rezultatele capitolului V au constatat în evaluarea calitativă a compușilor polifenolici totali exprimați în echilavenți de acid galic (GAE) mg/ml și flavonoide, exprimate în echivalenți de quercintin (QE) mg/ml, dar și din punct de vedere cantitativ prin metoda HPLC-HESI, evaluarea conținutului de proteine solubile, conținutului de monoglucide reducătoare, evidențierea benzilor specifice compușilor fenolici din reziduul vegetal prin ATR-FTIR, evaluarea activității fitotoxice/biostimulatoare pe semințe de grâu comparativ cu solventul (etanol 40%), evaluarea activității antimicrobiene, precum și evaluarea activității antioxidante prin metodele DPPH, CUPRAC, FRAP și TEAC. Pentru intensificarea proprietăților antifungice s-au realizat cercetări de sinergie între efectul antifungic al rizobacteriilor stimulate cu extractul din flori de *Tagetes erecta*. Rezultatele au constatat într-o compoziție mai mare de TPC- $15,12 \pm 0,27$ GAE mg/ml, comparativ cu concentrația de flavonoide totale regăsită (TFC- $2,01 \pm 0,03$ QE mg/ml). În ceea ce privește conținutului calitativ de compuși fenolici al extratului de *Tagetes erecta* în etanol 40%, acesta a fost realizat cu ajutorul metodei HPLC-HESI și s-au identificat 3,36% (27 de compuși) din totalul compușilor polifenolici cuantificați și 20,15% din totalul flavonoidelor, dintre care cei mai reprezentativi sunt quercetina cu 383,74 mg/l, acidul siringic cu 30,71 mg/l, acidul elagic cu 26,80 mg/l, acidul 3,4-dihidroxibenzoic cu 20,50 mg/l, miricetina cu 13,64 mg/ml și acidul clorogenic cu 11,85 mg/l. Extractul prezintă o densitate de $1,0526 \pm 0,0016$ g/ml și un conținut de substanță uscată de 3,6%. În ceea ce privește florile uscate de *Tagetes erecta* (materialul vegetal), benzile din intervalul $650-4000\text{-m}^{-1}$ reflectă prezența unor componente biochimice primare și a unor macronutrienți, inclusiv lipide, proteine și

carbohidrați. Componente (carbohidrați), ce conform studiilor indică un rol important în plante ca nutrienți.

Cercetările activității antiradicalice prin metodele spectrofotometrice DPPH, CUPRAC, FRAP și TEAC evidențiază faptul că extractul a înregistrat o activitate antioxidantă mare pe tot parcursul celor 4 metode de analiză, însă prin metoda **CUPRAC** s-a înregistrat cea mai mare activitate antioxidantă ($65,81 \pm 1,51$ Trolox mM/ml), comparativ cu toate celelalte metode cercetate. Acest lucru a fost posibil datorită faptului că, prin aceasta metodă se pot analiza atât antioxidanții hidrofilii, cât și antioxidanții lipofili.

În cadrul cercetărilor biotestului germinativ privind evaluarea comportamentului variantei de extract din flori de *Tagetes erecta* în etanol 40% s-a dovedit că a îmbunătățit indicele de germinație (fitostimulant la concentrația de 0,50% - Gi% - 101,53%) și creșterea rădăcinilor semințelor de grâu germinate, comparativ cu martorul, dar și cu solventul la concentrația de 0,50% (RRG extract - 112,81%; RRG solvent - 73,41%).

În determinarea activității antifungice a extractului s-au utilizat următoarele specii de tulpini fitopatogene: *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum* și *Monilinia laxa*. Screening-ul calitativ antifungic a fost efectuat utilizând încorporarea extractului în mediu PDA lichefiat și răcit la 40-45°C. Extractul de *Tagetes erecta* fost înglobat în mediu de cultură la concentrații finale de 0,5%, 1,0% și 5,0%. Rezultatele obținute indică faptul că extractul a redus diametrul tulpinilor *Fusarium graminearum* și *Monilinia laxa*. Cel mai mare procent de inhibiție s-a observat la tulpina fungică *Fusarium graminearum*, la cea mai mare concentrație testată (5%), având un procent de inhibiție de $54,17 \pm 5,89\%$ (față de solvent, $p < 0,05$), iar în cazul tulpinei fungice *Monilinia laxa* s-a observat o inhibiție a diametrului coloniei cu $52,29 \pm 2,60\%$ la concentrația de 0,10% (comparativ cu solventul, $p < 0,05$). La tulpina fungică *Aspergillus niger* s-a observat o creștere semnificativă a miceliului în comparație cu solventul ($p < 0,05$).

Cercetările de **evaluare cantitativă a activității antifungice** a fost efectuat în mediu RPMI 1640 folosind metoda microdiluției în plăci cu 24 de godeuri. Concentrațiile testate ale extractului (0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5% și 3,0%) s-au realizat direct în mediul de cultură la un volum de 2 ml RPMI 1640 înșămânțat cu inocul fungic ajustat la standardul nefelometric 1 McFarland (10^6 CFU/ml). Astfel, s-a evaluat concentrația minimă inhibitorie (CMI). Pentru tulpina *Monilinia laxa* a fost observată o reducere nesemnificativă a viabilității celulare în raport cu solventul la toate concentrațiile testate, iar în raport cu martorul pozitiv a fost observată o reducere semnificativă a viabilității. Pentru tulpina *Fusarium graminearum*, viabilitatea celulară a fost scăzută pentru extract la concentrația de 3,0% ($6,67 \pm 2,31\%$), diferența semnificativă a fost făcută față de activitatea solventului. La tulpina *Aspergillus niger* s-a observat o creștere a proliferării celulare comparativ cu martorul (solventul), la concentrațiile de 1,5% ($93,24 \pm 1,91\%$) și 3% ($95,95 \pm 1,91\%$).

În ceea ce privește **evaluarea efectului antifungic** au fost inoculați 10 μ L de probă pe mediul PDA, folosind concentrații de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5% și 3,0%. Astfel, s-a observat că tulpina fungică *Monilinia laxa* a fost complet inhibată, iar pentru tulpina

Fusarium graminearum inhibarea a fost aproape completă cu diferențe semnificative în raport cu solventul la concentrațiile de 0,1%, 0,5% extract. La tulpina *Aspergillus niger*, cea mai mare inhibiție a fost observată la concentrația de 0,1%, atât la extract, cât și la solvent.

În cadrul **evaluării capacității de aderență microbiană** la substratul inert al extractului de *Tagetes erecta* și a solventului (etanol 40%) asupra tulpinilor de fungi patogene cercetate s-a observat faptul că aderența microbiană a fost inhibată semnificativ pentru tulpina *Fusarium graminearum* (la concentrațiile de 1,5% și 3%) și pentru tulpina *Aspergillus niger* (1%, 3% și 1,5%). La *Monilinia laxa* s-a observat o inhibare a aderenței pentru martorul pozitiv (tulpina netratată), dar cu o creștere semnificativă în prezența extractului. Acest fenomen poate fi datorat prezenței monoglucidelor reducătoare și a polifenolilor cu proprietăți antioxidante din compoziție.

Cercetările de evaluare a **activității prebiotice și antibiofilm** bacterian a extractului (concentrații 1,56-50%) asupra tulpinilor PGPR (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* și *Bacillus amyloliquefaciens*) au evidențiat faptul că atât extractul, cât și solventul au manifestat activitate antibacteriană. Valoarea CMI a fost de 12,5% pentru toate cele trei tulpini bacteriene cercetate. La tulpina bacteriană *Bacillus licheniformis* s-a observat o creștere semnificativă a viabilității celulelor în ceea ce privește solventul, dar și controlul pozitiv la concentrația de 1,56% ($114,59 \pm 1,26\%$). În schimb pentru tulpina *Bacillus amyloliquefaciens* s-a observat că proba de extract a inhibat semnificativ viabilitatea microbiană față de solvent și martorul pozitiv. Totodată, s-a evidențiat un efect de sinergie privind stimularea aderenței celulelor microbiene la substratul abiotic între extractul de *Tagetes erecta* și tulpina *Bacillus licheniformis*. La tulpina *Bacillus amyloliquefaciens* nu au fost observate diferențe semnificative față de martorul pozitiv, însă la tulpina bacteriană *Bacillus licheniformis*, toate variantele au crescut semnificativ aderența microbiană. Conform studiilor de specialitate, tulpina bacteriană *Bacillus subtilis* prin prezența adenozinului monofosfat ciclic (di-AMP cyclic) are capacitatea de a acționa ca un semnal de tip extracelular influențând formarea biofilmului și atașarea celulelor microbiene la suprafața biotică.

În cadrul determinării **activității antifungice sinergice** a extractului din flori de *Tagetes erecta* și rizobacterii s-au selectat variantele de tulpini din specia *Bacillus spp* și concentrațiile de extract în funcție de rezultatele obținute în cadrul experimentelor de evaluare a concentrației minime inhibitorie (CMI) astfel încât, extractul să conducă la creșterea proliferării celulare. Au fost utilizate concentrațiile de 1,5% atât pentru extract, cât și pentru solvent în prezența tulpinii *Bacillus licheniformis* și 1,5% și 3% extract/solvent în prezența tulpinii *Bacillus subtilis* împotriva tulpinilor fungice, *Fusarium graminearum*, *Monilinia laxa* și *Aspergillus niger*. Astfel, rezultatele relevă faptul că, variantele selectate au manifestat o bună inhibare a creșterii miceliului cu $28,33 \pm 2,08$ mm și $26,67 \pm 1,53$ mm în cazul tulpinii *Bacillus subtilis* îmbogățită cu concentrațiile de 1,5% și 3% *Tagetes erecta* pe tulpina *Fusarium graminearum*, în timp ce pe *Monilinia laxa* s-a înregistrat un efect inhibitoriu total, atât pentru amestecul constituit din suspensia microbiană de *Bacillus spp* cu extract, cât și pentru amestecul

de tulpini *Bacillus spp* cu solvent. Însă efectul sinergic între extract și suspensia microbiană de *Bacillus subtilis* a fost mai scăzut pentru tulpina fungică *Aspergillus niger*. Un efect antagonist a fost observat în cazul tulpinii *Bacillus licheniformis* la tulpina *Fusarium graminearum*.

Cele două tulpini de *Bacillus spp*. au evidențiat o activitate antagonistă variabilă asupra agenților fitopatogeni, prezentând activitate în mod special asupra tulpinii *Fusarium graminearum*.

Capitolul VI cuprinde concluziile generale asupra rezultatelor, iar lucrarea se încheie cu referințele bibliografice.

În urma cercetărilor privind obținerea unui produs din sursă naturală ce ar putea reprezenta o soluție viabilă privind protecția plantelor s-au obținut șase variante de extract din semințe de *Trigonella foenum graecum* și flori de *Tagetes erecta*. Astfel, au fost utilizați doi solvenți de extracție ce fac parte din categoria alcoolilor concentrați, etanol 70% și propilenglicol 50%, iar procesul de extracție s-a realizat prin macerare la temperatura ambientală și prin o ușoară asistare termică în faza de concentrare. Principiul ce a stat la baza utilizării acestor tipuri de solvenți și a metodelor de extracție, a fost acela de a extrage în cantitate cât mai ridicată compuși cu potențial efect fitostimulant și antimicrobian (fungicid) și totodată, de a nu deterioara potențialii compuși fitochimici extractibili.

Conform rezultatelor obținute pe ambele specii de plante, cea mai eficientă metodă de extracție a compușilor fitochimici a fost cea asistată termic. Acest aspect a fost evidențiat de concentrațiile crescute în polifenoli și flavonoide, dar și a activității oxido-reducătoare mai pronunțată, comparativ cu variantele de extract obținute în etanol 70% și propilenglicol 50% (fără asistare termică).

În urma biotestului geminativ s-a evidențiat faptul că extractul din flori de *Tagetes erecta* în etanol 40% a manifestat un puternic efect fitostimulant asupra semințelor de ridichi, iar pe semințele de castraveți fiind observat, un ușor efect fitostimulant în urma tratării acestora cu extract din *Trigonella foenum-graecum* în etanol 40% la concentrații scăzute (0,10%).

În urma cercetărilor realizate pe parcursul lucrării s-a evidențiat faptul că extractul *Tagetes erecta* în etanol 40% posedă proprietăți antioxidante, citoprotectoare și antimicrobiene puternice datorită compușilor regăsiți în compoziție. Extractul din flori de *Tagetes erecta* s-a dovedit a avea un efect ușor fitostimulator și asupra semințelor de grâu. Activitatea antifungică a fost determinată atât calitativ, cât și cantitativ pe mediu solid și lichid, observându-se faptul că extractul cercetat a atenuat dezvoltarea creșterii miceliului, în mod special pentru tulpinile *Fusarium graminearum* și *Monilinia laxa*. Patogenitatea tulpinilor de fungi este datorată în general de capacitatea lor de a forma biofilme la suprafața țesuturilor plantelor, iar aplicarea extractului din flori de *Tagetes erecta* ar putea preveni aderarea agenților fitopatogeni, dar și potențarea rizobacteriilor privind activitatea antifungică, proprietate pe care o dețin în mod natural. Așa cum reiese din cercetările noastre, extractul din flori de *Tagetes erecta* condiționat în etanol 40% în combinație cu tulpinile de rizobacterii prezintă o măsură

de biocontrol viabilă, datorită activității lor antagoniste împotriva agenților fitopatogeni, în special împotriva tulpinii *Fusarium graminearum*.

Cercetările din prezenta teză conferă noutate și originalitate furnizând informații ce ar putea fi aplicate în industria biotehnologică agricolă cu scopul dezvoltării de bacterii antifungice îmbogățite cu extract de *Tagetes erecta* ce ar putea sta la baza unui biopesticid puternic cu eficacitate asupra agenților fitopatogeni ai plantelor și totodată, cu efect stimulator privind creșterea și dezvoltare răsadurile de legume și a plantelor cerealiere. În același timp, lucrarea oferă informații valoroase și originale privind obținerea într-un mod eficient, sigur, economic și prietenos cu mediu a unor extracte vegetale bogate în compuși fitochimici cu potențial de utilizare în industria protecției și fitostimulării plantelor.

În cele 150 de pagini ale prezentei teze se regăsesc 33 de tabele, dintre care 30 sunt originale, 39 de figuri, dintre care 36 sunt originale și 233 de referințe bibliografice. Rezultatele obținute pe parcursul activității de cercetare desfășurată în cadrul studiilor de doctorat au fost diseminate în 3 articole, dintre care 2 articole publicate în reviste cotate ISI (WOS) și 1 articol acceptat spre publicare în revistă cotate ISI (WOS).