



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Phytophthora citrophthora* EN PRESENCIA DE EXTRACTOS DE *Thevetia peruviana*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2018

Autor: José De Esteban García
Modalidad: Experimental
Tutor/es: Juana María Botía Aranda

Índice

Resumen	2
1. Antecedentes	3
1.1. Características de la Adelfa Amarilla (<i>Thevetia peruviana</i>)	3
1.2. Características del hongo <i>Phytophthora citrophthora</i>	6
1.3. Plaguicidas biorracionales con extractos vegetales	9
2. Objetivos	11
3. Material y métodos	12
4. Resultados y discusión	17
4.1. Ensayos “in vitro” con distintos extractantes	17
4.2. Ensayos “in vivo” en frutos de cítricos	24
5. Conclusiones	26
6. Bibliografía	28

Resumen

El presente estudio pretende ampliar el análisis sobre el uso de extractos de Adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) susceptibles de ser empleados como plaguicidas biorracionales para luchar frente a hongos fitopatógenos (como *Phytophthora citrophthora* en este caso) causantes de la podredumbre de diversos frutos. El ensayo se ha realizado empleando medio de cultivos "in vitro" a los que se les han añadido extractos de distintos órganos de la planta para analizar la capacidad fungicida que poseen sobre el hongo seleccionado. Los resultados han puesto de manifiesto que la mayor inhibición en el crecimiento del hongo es en presencia de extractos de planta completa en dimetil sulfóxido como agente extractante de *Thevetia peruviana*. El estudio también consta de una parte "in vivo", en la que se ha experimentado sobre la corteza de diversos cítricos aplicando extracto de planta completa según los resultados extraídos del ensayo "in vitro". Aunque los resultados son positivos es preciso que se realicen nuevos ensayos para tratar de identificar los posibles compuestos fungicidas y optimizar su método de obtención.

Abstract

The present study aims to broaden the analysis of the use of extracts of Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) susceptible of being used as biorational pesticides to fight against phytopathogenic fungi (such as *Phytophthora citrophthora* in this case) that cause the rotting of various fruits. The test was carried out using cultivation medium "in vitro" to which extracts of different organs of the plant have been added to analyze the fungicidal capacity they have on the selected fungus. The results have shown that the greatest inhibition in the growth of the fungus is in presence of extracts of complete plant in dimethyl sulfoxide as extractant agent of *Thevetia peruviana*. The study also consists of an "in vivo" part, which has been experimented on the bark of various citrus fruits by applying a complete plant extract according to the results extracted from the "in vitro" test. Although the results are positive, new tests must be carried out to try to identify the possible fungicide compounds and optimize their method of obtaining them.

1. Antecedentes

1.1. Características de la Adelfa Amarilla (*Thevetia peruviana*):

La Adelfa Amarilla (*Thevetia peruviana*) es una planta de la familia de las apocináceas originaria de México y América Tropical aunque se refiere también que su procedencia corresponde a la India Oeste y también es conocida como el Árbol de Ayoyote, Hueso o Codo de Fraile, India, Nuez de la India, Haba de San Ignacio o Amancay^{1,2}. Actualmente se encuentra distribuida en distintas regiones tropicales y subtropicales del mundo³. Otras sinonimias de esta planta son cascabel en España, retama en Venezuela, yellow oleander en Kenya-Africa y Florida, en México se le conoce como came en Michoacán, flor de San Pedro en San Luis Potosí y en Yucatán se le identifica con el nombre maya *Ah kits*^{4,5,6}.

Es un árbol o arbusto de 3 a 5 m de altura perennifolio, de corteza grisácea, con lenticelas, algo rugosa con los años, de hojas lineales, lanceoladas y amontonadas brillantes de un verde vivo, duras y apenas pecioladas. Posee flores tubulares amarillas, naranjas claro o blancas, ligeramente perfumadas y de 5 cm de diámetro que brotan sobre pedúnculos largos. Florece a intervalos durante buena parte del año en su hábitat nativo (climas tropicales y subtropicales), mientras que en climas más frescos, como en España (clima mediterráneo), florece en verano. Los frutos son drupas carnosas redondeadas con cierto parecido a las castañas y con costillas que al madurar cambian del verde al negro, pasando por el rojo, que contienen las venenosas semillas^{1,2}.

Produce frutos todo el año y la mayor producción se inicia en octubre y dura hasta marzo del siguiente año. Algunas especies de este género son venenosas, a pesar de esto existen en el mercado productos medicinales elaborados a base de esta planta: internacionalmente se comercializa con el nombre de Nuez de la India o Semilla de Brasil².

En medicina tradicional, se utiliza como antimalárica, antiparasitaria, reductora de peso, abortiva, para tratar dolor de muelas, hemorroides, enfermedades de la piel, sarna, úlceras, etc⁷. Aunque no tiene ninguna indicación terapéutica

aceptada en el tratamiento de enfermedades, ni margen de seguridad que justifique su uso.

Como curiosidad conviene destacar que hay una tendencia o moda de considerar que lo natural sea cual sea su origen, es saludable, lo que ha llevado a que actualmente estos productos se consuman más, incluso en cantidades elevadas, desconociendo cuál o cuáles son sus principios activos y peligros¹⁶. En este caso, las mismas semillas o infusiones de hierbas que se utilizan desde hace ya cientos de años en la medicina tradicional china con la finalidad de quemar grasa, reducir triglicéridos y colesterol, comúnmente conocidas como “almendras quema grasas” (aunque causen intoxicación, diarrea, pérdida de electrolitos, deshidratación y fallos vasculares), haciendo creer que la persona está bajando de peso, en otras regiones del mundo constituyen un método habitual de autointoxicación con fines suicidas y con un elevado porcentaje de mortalidad.

Esta especie también se ocupa para la reforestación de parques y avenidas de ciudades por su porte bajo, su sistema radical que no levanta el asfalto y sus llamativas y fragantes flores³. Así como por su resistencia a las principales plagas y enfermedades que atacan los árboles y arbustos de los jardines de las ciudades. La Adelfa Amarilla es una planta muy tóxica si se ingiere alguna de sus partes por lo que no se recomienda para jardines en los que jueguen niños¹⁷.

Por otra parte, se conoce que los extractos etanólicos obtenidos a partir de semillas de *T. peruviana* inhiben el crecimiento de patógenos bacterianos como: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Microtermes spp*^{8,9}.

Asimismo, algunos extractos acuosos de *Thevetia peruviana* se usan para inhibir la germinación de semillas de maleza donde los metabolitos secundarios responsables de esta propiedad son de naturaleza química triterpenoides, fenoles y flavonoides¹⁰.

Su consumo puede llevar a la muerte del individuo y puede producirse por inhalación, ingestión o contacto con la savia o extractos del vegetal, lo que la hace en su totalidad tóxica para el hombre.

Entre los cardenólidos, compuestos químicos que le proporcionan el carácter tóxico a la adelfa amarilla encontramos en orden decreciente de toxicidad: Peruvósidos, Rutósidos, Tevetina A, Nerifolina, Cerebrina, Thevetoxina y Tevetina B. Se encuentran distribuidos en toda la planta, aunque no de manera homogénea: semillas 4,8%, hojas 0,07%, frutos 0,045% y 0,036% en la savia¹⁶.

Las semillas son la parte más tóxica, (cuyo grado de toxicidad aumenta a medida que se produce la deshidratación del fruto) ya que en ellas podemos encontrar en mayor proporción glucósidos cardiotónicos y a su vez poseen pequeñas trazas de ácido cianhídrico, un compuesto inhibidor de la respiración celular extremadamente tóxico¹⁶. Es importante recalcar que este tipo de intoxicaciones se presenta en personas jóvenes sin enfermedades de base. El mecanismo de acción de los cardenólidos es la inhibición de la bomba Na/K ATPasa^{2,16}, fácilmente comparable con el mecanismo que encontramos en los compuestos digitálicos. Cada sección de la planta posee una proporción y composición distintas, lo cual tiene repercusión sobre la dosis letal, pero estos factores no son los únicos a tener en cuenta: adquieren gran relevancia la edad del individuo y la forma de administración. La dosis potencialmente letal varía entre 1-2 semillas para los niños y 8-10 semillas para los adultos y en cuanto a las hojas, se han calculado dosis de 4 g. Los síntomas que puede presentar son vómitos, náuseas, dolor abdominal, mareo, vértigo, diarrea, cambios electrocardiográficos, bradicardia, bloqueo auriculoventricular, así como depresión del segmento ST. Se pueden producir algunas complicaciones menos frecuentes entre las que se encuentran alteraciones electrolíticas, latidos ectópicos, palpitaciones e infrecuentes convulsiones y coma. Una de las alteraciones más severas es la hipopotasemia la cual puede desembocar en alteraciones cardiovasculares¹.

Asimismo, los ésteres que presenta esta planta que se obtienen de la corteza, hojas y semillas, tienen varias aplicaciones oleoquímicas entre las que encontramos lubricante en fibras textiles y aceite curtidor^{11,12,13}. Y de acuerdo a

investigaciones recientes, los ácidos grasos de semillas de *T. peruviana* son aptos para la producción de biodiesel^{14,15}, ejemplo de ello es el estado de Yucatán, que no cuenta con disponibilidad propia de combustibles fósiles, pero por su ubicación geográfica, puede ser un gran generador de energías alternativas, por lo que se han iniciado diversas acciones para la producción de biocombustibles y en particular para la producción de biodiesel a partir de aceite de semillas como *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* y en particular de *Thevetia peruviana*., considerando a esta especie una alternativa para la generación de energía renovable y una especie agrícola viable que puede ser explotada por agricultores y viveristas del estado².

1.2. Características del hongo *Phytophthora citrophthora*:

Las especies del hongo *Phytophthora* son principalmente patógenos de dicotiledóneas y relativamente específicos de las plantas que parasitan y muchas son patógenas de plantas de importancia económica: *Phytophthora infestans* por ejemplo ataca a la patata y causó la gran hambruna de Irlanda¹⁸. Hay que destacar que las enfermedades en las plantas causadas por este género son difíciles de controlar químicamente, por eso como estrategia contra ellas se está extendiendo el cultivo de variedades resistentes a estos patógenos.

Phytophthora es referido algunas veces como un organismo fúngico, pero está clasificado entre los Chromistas en el grupo denominado Oomicetes (hongos inferiores). Este es un buen ejemplo de la evolución convergente: *Phytophthora* es morfológicamente muy parecido a los hongos verdaderos (Fungi) aunque su evolución biológica es diferente. En contraste con los hongos verdaderos, los Oomicetes están más relacionados con las plantas que con los animales. Mientras las paredes celulares de los hongos están principalmente compuestas de quitina, las paredes celulares de los Oomicetes lo están de celulosa.

El nombre *Phytophthora* proviene del griego *Phyton* (planta) y *Phthora* (destructor), “destructor de plantas”. Además, este patógeno puede sobrevivir

durante varios años en el suelo, donde sobreviven en forma de micelio, clamidosporas y oosporas (esporas de resistencia formadas sexualmente), principalmente en las capas superficiales¹⁹. Las altas temperaturas y el exceso de agua en el suelo favorecen la germinación de esporas y el desarrollo del hongo^{19,21}.

Las especies de *Phytophthora* se pueden reproducir de manera asexual (formando clamidosporas y esporangios, que incluyen las zoosporas) y sexualmente (formando oosporas)¹⁹.

En el caso de la reproducción asexual, es común que todas las especies del género lo hagan mediante esporangios (contienen en su interior unos propágulos infectivos denominados zoosporas)²¹. La humedad, la luz, temperatura, el oxígeno y la nutrición influyen en su desarrollo, aunque en mayor o menor medida según la especie. Para la formación de zoosporas (que son las que infectan a las raíces) es indispensable la presencia de agua, por ello podemos decir que *Phytophthora* es un hongo patógeno del suelo, propagado a través del agua¹⁹.

En cuanto al ataque de *Phytophthora* en los cítricos encontramos que el hongo puede atacar tanto a la planta como a los frutos.

Atendiendo a la planta; la enfermedad más grave causada por *Phytophthora* en cítricos es la gomosis, también conocida como podredumbre del pie. La infección de la planta tiene lugar a nivel de la tierra, produciendo lesiones que se extienden hacia abajo o hacia arriba del tronco hasta las ramas importantes del árbol. La corteza interior y el cambium son dañados, pero la corteza exterior permanece firme con pequeñas grietas a través de las cuales exuda abundante goma, dicha exudación dependerá del estado del árbol y las condiciones ambientales²¹. La goma de los cítricos es soluble en agua y desaparece tras fuertes lluvias en climas subtropicales, pero es persistente en el tronco en condiciones secas. Las lesiones se extienden alrededor de la circunferencia del tronco, matando al cambium y anillando lentamente al árbol. Los árboles adultos pueden morir, pero por lo general, sólo resultan anillados parcialmente y los daños producen

un decaimiento de la copa, con defoliación, muerte de ramas jóvenes y escaso crecimiento de brotes²⁰.

Las infecciones en el tronco y las ramas principales vienen producidas generalmente por las salpicaduras de lluvia que diseminan los propágulos de *Phytophthora* desde el suelo.

La pudrición de la raíz por *Phytophthora* causa una disminución lenta de la vitalidad del árbol, las hojas se tornan de color verde claro o amarillo y pueden caer. Los primeros síntomas en tronco y ramas principales no son visibles externamente, ya que consisten en el oscurecimiento de los tejidos internos del floema y el cambium. La enfermedad destruye las raíces de conexión de los portainjertos sensibles y el patógeno infecta la corteza de la raíz, que se vuelve blanda. Si la destrucción de raíces de alimentación se produce más rápido que su regeneración, la absorción de agua y nutrientes será muy limitada y el árbol crecerá mal, se agotarán sus reservas de energía y la producción se reducirá, presentando falta de vigor y decaimiento generalizado^{20,21}.

De igual manera podemos observar el ataque en los frutos de los cítricos, en este caso denominado aguado o podredumbre marrón. En este caso la infección de los frutos se produce mediante esporangios que contienen las zoosporas de igual manera que la raíz y el tronco. Las salpicaduras provocadas por la lluvia diseminan las zoosporas del patógeno desde el suelo hasta los frutos y si se dan las condiciones adecuadas, infectan a los frutos. Por eso, los daños de la enfermedad afectan a los frutos situados en la mitad inferior de la copa del árbol, donde llegan más fácilmente las salpicaduras de lluvia con las zoosporas infectivas de *Phytophthora*. Dicha infección se hace patente a los 3-7 días desde la infección o posteriormente durante la conservación de los frutos en los almacenes.

Los síntomas del aguado se caracterizan por la aparición de pudriciones blandas de color gris oscuro que cambian a marrón de forma redondeada, para ir avanzando progresivamente hasta afectar a todo el fruto por completo. Mucha

de la fruta con síntomas de aguado en el campo, suele caer al suelo antes que el resto, poniéndose blandos y perdiendo el brillo^{22,23}.

Como medio para evitar dichas pudriciones derivadas del ataque de *Phytophthora* encontramos un abanico de lucha bastante amplio que va desde el control del patógeno mediante el uso de productos químicos como el Fosetilal, Oxicloruro de Cobre, Mancozeb o Zineb²³ pasando por los plaguicidas biorracionales que más tarde veremos o la plantación de *Oxalis sp.* en el suelo para evitar las salpicaduras de lluvia²².

1.3. Plaguicidas biorracionales con extractos vegetales:

La agricultura de hoy en día rechaza cada vez más el uso de plaguicidas tradicionales (principalmente organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) y en su lugar proponen un control integrado o global de las plagas y enfermedades. En general, se asume que los constituyentes activos de origen vegetal son biodegradables a productos no tóxicos y de baja persistencia. Las especies arbóreas y herbáceas sintetizan y acumulan en sus células gran variedad de sustancias fitoquímicas que incluyen compuestos fenólicos (como flavonoides) así como taninos y ligninas²⁴.

En estos últimos años han sido abundantes los estudios de las propiedades antifúngicas de numerosas plantas, impulsando el empleo de los insecticidas de tercera generación, frente a los plaguicidas sintéticos tradicionales. Estos nuevos plaguicidas también llamados biorracionales, al aplicarse tienen una rápida descomposición, presentan un control efectivo, son muy seguros para los operadores y son compatibles con sistemas de manejo integrado de plagas²⁵. A su vez suelen ser activas contra un número limitado de especies diana específicas, por lo que es muy recomendable su uso como agentes de control de enfermedades²⁶, y fruto de ello su uso masivo para el control de plagas es el reto del siglo XXI²⁷.

El termino biorracional representa cualquier producto o sustancia de origen natural (extractos de plantas, patógenos de insectos...) o sintéticas, similares o idénticas a otras que se encuentran en la naturaleza que poseen un modo de

acción único y que tiene un efecto negativo o letal sobre plagas objetivo-específicas. Las características que distinguen a los productos biorracionales de los convencionales son los bajos niveles de toxicidad para especies que no son objetivo, generalmente las dosis de uso son bajas y rápidas, los modos de acción son únicos, y reducen la dependencia de los plaguicidas convencionales²⁷.

Por otro lado, la existencia de varias moléculas antifúngicas en una misma especie vegetal dificulta la aparición de resistencias en los patógenos.

Aunque también presentan desventajas debido a su débil estabilidad en condiciones naturales; se precisa de un amplio conocimiento del ciclo biológico de la especie que se quiere combatir, a fin de asegurar la aplicación en el momento oportuno y presentan un complicado proceso de registro como producto fitosanitario, lo que limita la posibilidad de protegerlos frente a una patente²⁸.

De manera descriptiva el término biorracional debe utilizarse como un adjetivo que denota la compatibilidad con los sistemas vivos dentro de contextos específicos. Incluso un insecticida puede ser biorracional alternativamente en un sistema y decididamente en otro no puede serlo, así la compatibilidad del agente de control con el sistema en el que se utiliza parece ser el principio que rige lo biorracional²⁹.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la posible acción inhibitoria de la Adelfa Amarilla (*Thevetia peruviana*) sobre el crecimiento del hongo fitopatógeno *Phytophthora citrophthora*. De manera que así consigamos demostrar la existencia y eficacia de compuestos secundarios en *Thevetia peruviana* susceptibles de ser empleados como principio activo en plaguicidas biorracionales ante dicho hongo causante de la podredumbre de los frutos.

Nuestros objetivos se dividieron en dos partes:

- Análisis de la capacidad inhibitoria del crecimiento “in vitro”.
- Análisis de la capacidad inhibitoria “in vivo” en frutos preparados para su consumo y/o comercialización.



3. Material y métodos

Especie vegetal: Se seleccionó Adelfa Amarilla (*Thevetia peruviana*) como especie vegetal objeto de estudio. Entre toda la flora posible, se eligió a esta especie debido a que anteriormente existían ensayos realizados con la adelfa (*Nerium oleander*) que evidenciaban una notable capacidad fungicida¹³, de modo que de la Adelfa Amarilla al pertenecer a la misma familia de las apocináceas se esperaba un comportamiento similar y además no había sido objeto de estudio.

Se trata de una planta que fácilmente podemos encontrar en los parques y jardines de nuestro país, su recolección se hizo de los jardines de la Universidad Miguel Hernández de Elche durante el mes de diciembre de 2017 puesto que se encontraban todos los órganos que nos interesaban (sobre todo flores y frutos que no aparecen durante todo el año). A continuación, se separaron los distintos órganos de la planta (tallo, hojas, flor y fruto) (ver figura 1). Para realizar el secado del material vegetal, este se introdujo en una estufa Raypa con distribución de calor por convección natural, manteniéndose durante ocho días a unos 65°C (ver figura 1). De este modo se extrajo toda la humedad de la planta, lo que hace que sus enzimas queden inactivas, evitando la degradación de los compuestos³⁰. El material vegetal seco se molió con un molinillo modelo ágata y se prepararon los extractos vegetales empleando como agentes extractantes agua, dimetil sulfóxido (DMSO) y metanol. Hemos utilizado dichos extractantes debido a que habían mostrado evidencias de su efectividad en otros ensayos siendo el más eficaz el DMSO. Pero al trabajar en este caso con una especie distinta cabe la posibilidad de que se consiguieran unos resultados diferentes.



Figura 1. Separación de los distintos órganos de la planta (izquierda) y secado en estufa (derecha).

Extractos vegetales: Para la elaboración de los extractos se tomaron 0,1g de material seco procedentes de los distintos órganos de la planta (hojas, tallos, flores y frutos) y se disolvieron en un volumen de 10 mL de agua, de DMSO (disolvente orgánico polar) y de metanol como agentes extractantes siguiendo la metodología similar a la empleada en anteriores estudios de este tipo³¹. Dichos extractos vegetales se dejaron en un proceso de agitación, durante aproximadamente 24 horas y después se filtraron las muestras para así eliminar los materiales más gruesos y obtener un extracto homogéneo que llevase disueltos los metabolitos secundarios que nos interesan para este estudio. En el caso de la planta completa se adicionan las muestras en seco de todas las partes de la planta para posteriormente añadir los medios extractantes y dar paso a su agitación y filtración.

Medios de cultivo: Todos los medios de cultivo empleados en este ensayo se elaboraron utilizando PDA suministrado por Laboratorios Microkit. Para cada ensayo se prepararon los medios problema con extractos vegetales, y el medio control (solo con PDA). Los medios problema con distintos órganos se

prepararon mezclando 3,75g de PDA, 6 mL de extracto de los diferentes órganos y planta completa, y se completaron con agua destilada hasta los 120 mL. Los extractos se procedieron a esterilizar en el autoclave, en un programa de 20 minutos a 121°C. Una vez esterilizados los medios, se vertieron en placas Petri estériles marca Deltalab en una cabina de flujo laminar marca Teslar modelo Micro-H. Se completaron seis placas para el medio control y seis placas para cada órgano de la planta con los distintos agentes extractantes (DMSO, agua y metanol).

Cultivo “in Vitro”: Para la inoculación en los medios problema y control, se partió de material fúngico activado a partir de cepas puras de *Phytophthora citrophthora* procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia) (ver figura 2).

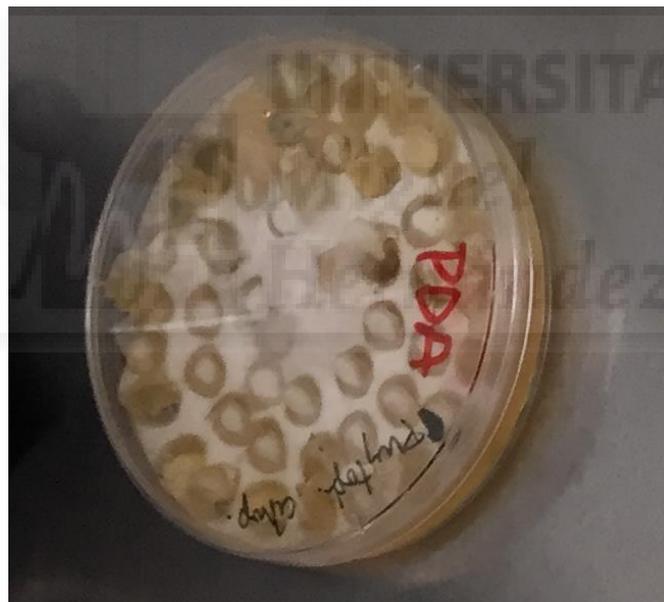


Figura 2. Inóculos del cultivo de *Phytophthora citrophthora*.

Se empleó un tubo cilíndrico metálico de 7 mm de diámetro con el que se perforaba el cultivo del hongo activado, dado que así se encuentra en fase de crecimiento exponencial y reducimos la duración de la fase de latencia o adaptación que se produce al inocular el hongo en nuevos medios de cultivo. Con ayuda de una lanceta los inóculos de medio con micelio fúngico se colocaron en el centro de las placas que contenían los distintos medios: medios problema

(con extractos vegetales) y medios control (solo PDA). La inoculación se hizo en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar horizontal (ver figura 3).



Figura 3. Inoculación del hongo en los medios de ensayo.

Medida del crecimiento fúngico: Se comenzó el ensayo el 19 de febrero con la inoculación en diferentes medios y se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente (20°C). La medida del diámetro de la colonia fúngica se realizó dos veces al día al inicio del ensayo para más tarde pasar a una sola medición diaria debido a que el crecimiento del hongo no variaba tanto y su ritmo de crecimiento se ralentizó. Las medidas se tomaron con una regla graduada y se efectuaban siempre dos medidas perpendiculares del diámetro de la colonia en cada placa (ver figura 4). Las mediciones de crecimiento se expresaron en centímetros y finalizaron cuando el hongo cubrió toda la placa del medio control a los 10 días de haber iniciado el ensayo.

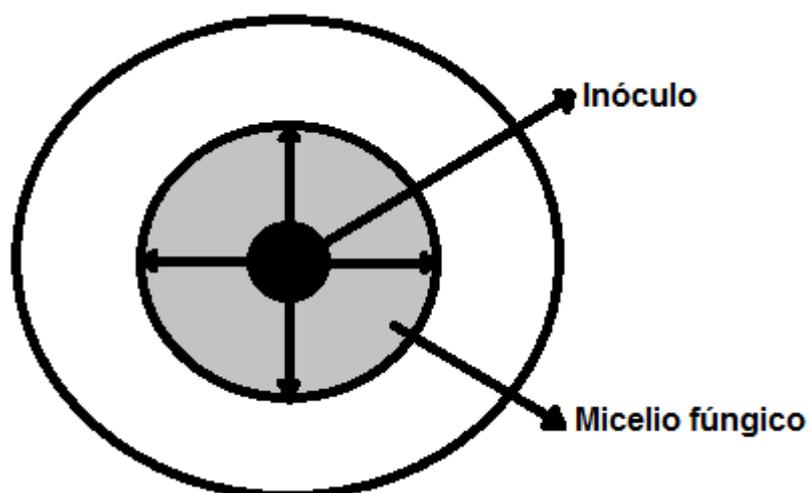


Figura 4. Medidas de crecimiento fúngico en los ensayos realizados “in vitro”.

Estudio “in vivo” sobre frutos de naranja y limón: Se procedió a la recolección de una muestra homogénea de cítricos en estado de madurez y se recogieron naranjas y limones que fueran aptos para el consumo y/o la comercialización. En primer lugar, se lavaron los frutos con agua y jabón para eliminar cualquier rastro posible de contaminación exterior, una vez secos se aplicó el extracto de planta completa sobre la corteza de los frutos, dicha aplicación no se produjo en los controles. Los frutos se mantuvieron 30 minutos tras la aplicación del extracto y a continuación se produjo la inoculación del hongo en los frutos. Para inocular el hongo se procedió a realizar una herida sobre la corteza del fruto y con un bisturí se retiró la corteza del fruto para después depositar el inóculo del hongo a partir de medios de cultivo activos de *Phytophthora citrophthora*. Tras la inoculación de los frutos, se procedió a la medición del crecimiento de los hongos cada dos días aproximadamente hasta un total de 33 días (ver figura 5).



Figura 5. Crecimiento del hongo en naranjas (izquierda fruto control, derecha fruto tratado).

4. Resultados y discusión

4.1. Ensayos “in vitro” con distintos extractantes:

Se llevo a cabo el estudio de crecimiento con el hongo fitopatógeno en los diferentes medios de cultivo con (o sin) extractos de diferentes órganos y los datos obtenidos de las diferentes medidas se pasaron a analizar a través de una comparativa de gráficas para comprobar si existen diferencias significativas entre las distintas partes de la planta y extractantes sobre la inhibición del crecimiento del hongo.

Extractos vegetales en agua como medio extractante: Se comenzó analizando el crecimiento del hongo en presencia de extractos de todos los órganos seleccionados y de la planta completa en agua como agente extractante (ver figura 6). Como se puede observar en la gráfica, ninguno de los órganos ensayados consigue inhibir el crecimiento del hongo ni tampoco se aprecia inhibición en el extracto de planta completa.

La falta de inhibición del crecimiento puede ser debida a la falta de disolución de los compuestos de la planta en el agua, impidiendo que estos compuestos lleguen a actuar. Se podría incluso sugerir que potencian el crecimiento del hongo al compararlo con el crecimiento en el medio control. Para determinar

realmente si los metabolitos secundarios que se encuentran en esta planta son o no inhibidores del crecimiento de *Phytophthora citrophthora*, deberemos observar el comportamiento del hongo ante los demás extractos en presencia de los otros agentes extractantes (metanol y DMSO).

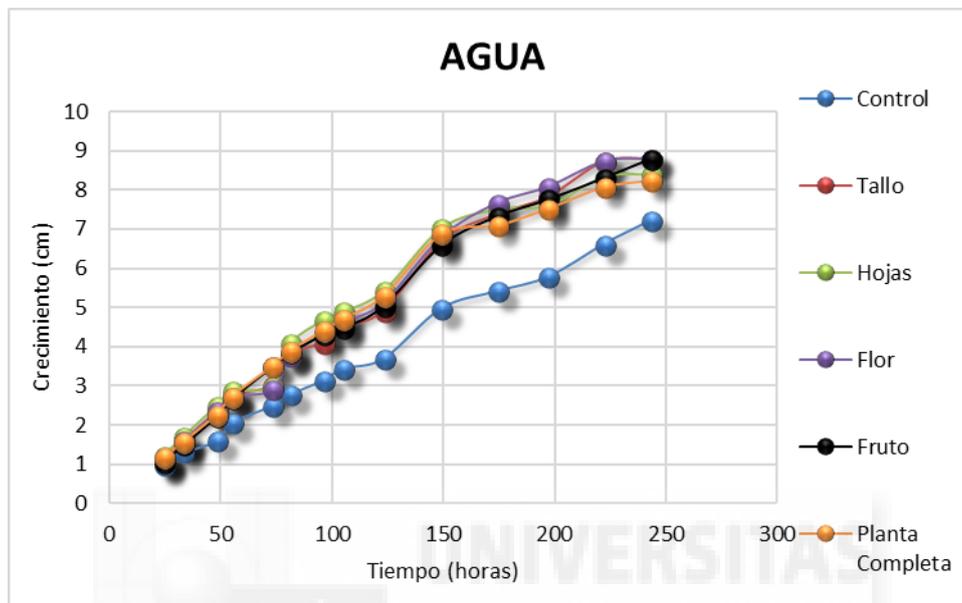


Figura 6. Crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en presencia de extractos de los distintos órganos y de la planta completa en agua como agente extractante.

En anteriores ensayos realizados en Adelfa (*Nerium oleander*) y empleando agua como agente extractante se obtuvieron resultados diferentes, aunque la planta sea de la misma especie de las apocináceas. En el caso de la adelfa se ha comprobado inhibición ante el hongo *Phytophthora citrophthora* en presencia de extracto con el mismo extractante que en este caso³¹. Por ello, es evidente la diferencia en la capacidad inhibitoria entre dos plantas de la misma familia, la cual se basa principalmente en diferencias entre los metabolitos secundarios que las componen.

Extractos vegetales en metanol como agente extractante: A continuación, se estudia el crecimiento del hongo en presencia de los mismos extractos anteriores, pero usando metanol como agente extractante (ver figura 7). Los

resultados muestran un efecto inhibitorio en prácticamente todos los extractos, especialmente en los extractos de flor, tallo y hojas, en los que el crecimiento del hongo al final del ensayo era de 4,45 cm aproximadamente, mientras que en el control el crecimiento fue de 7,2 cm lo cual se traduce en un porcentaje inhibitorio del 38,2%. El resto de los extractos procedentes de fruto y planta completa son los que presentan un menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo. Se evidencia que la planta completa, aunque combine extractos de todos los órganos no tiene mayor efecto inhibitorio que los producidos por cada órgano por separado. Por otro lado, el extracto de fruto apenas tiene efecto sobre el crecimiento del hongo ya que presenta un crecimiento muy similar al control y por ello no refleja apenas inhibición en la gráfica.

Estos resultados ponen de manifiesto como en anteriores publicaciones³², que los efectos inhibitorios de los diferentes órganos de la planta no son “sumatorios” y no actúan de forma sinérgica ya que como bien se puede observar en la figura 7 los extractos de los órganos por separado son mucho más efectivos, (salvo el extracto de fruto) que juntos en la planta completa.

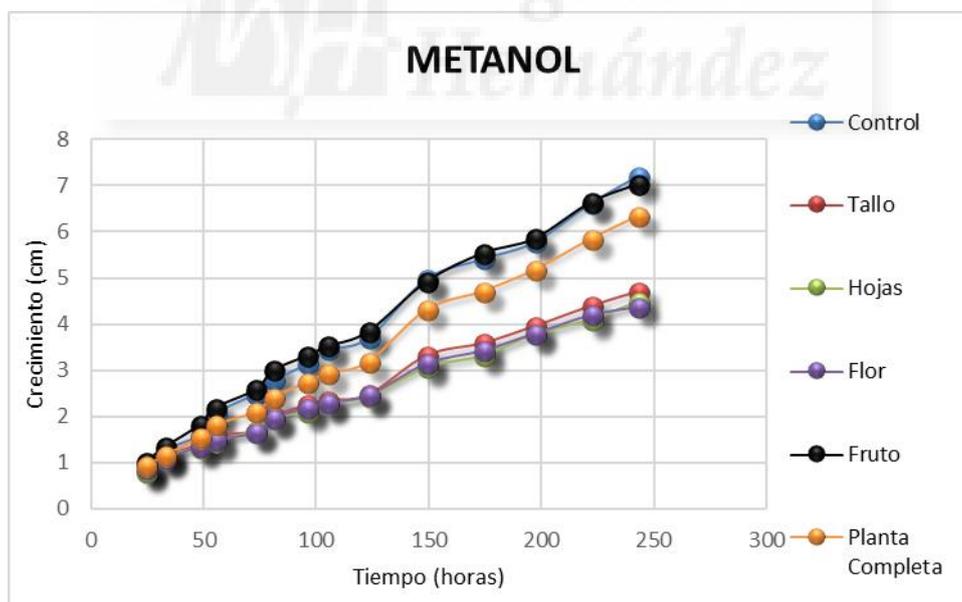


Figura 7. Crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en presencia de extractos de los distintos órganos de la planta y la planta completa en metanol.

Al final del ensayo (243 horas) se detecta la mayor inhibición en los extractos de tallo, flor y hojas. Dichos valores muestran que el metanol es mejor agente extractante que el agua (cuyos porcentajes inhibitorios eran incluso negativos). Podemos sugerir que los componentes de *Thevetia peruviana* en tallo hojas y flor, sí que poseen propiedades antifúngicas ante *Phytophthora citrophthora* (no así con los extractos de frutos).

Extractos vegetales en dimetil sulfóxido (DMSO) como agente extractante:

Como se aprecia en la imagen (ver figura 8), el hongo crece mucho más en el medio control que en los medios con extracto de órganos, siendo el más efectivo de todos ellos el de la flor.



Figura 8. Crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en medio control (arriba) y medio problema con DMSO (debajo). De izquierda a derecha: extracto de hoja, de tallo, de flor y de fruto.

Como se puede observar en la gráfica siguiente (ver figura 9), tanto la planta completa como el extracto vegetal de los distintos órganos de *Thevetia peruviana* son efectivos como agente antifúngico frente a *Phytophthora citrophthora* destacando que el extracto más eficaz en DMSO es la planta completa seguido de la flor. En este caso ocurre lo contrario que en los extractos con metanol, ya

que la suma de todos los órganos, es decir la planta completa, es el extracto más inhibitorio y que los órganos por separado son menos eficaces. Así ocurre también en la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por extractos de planta completa de Lechetezna (*Euphorbia helioscopia*)³³.

De los resultados obtenidos se ha puesto en evidencia la necesidad de analizar tanto los extractos de los órganos por separado como juntos en la planta completa debido a que los metabolitos presentes en cada órgano pueden interactuar entre sí de modo sinérgico (o como antagonistas). En este ensayo se puede apreciar en la gráfica que la interacción entre los distintos órganos se ha producido de modo sinérgico (no así en el metanol).

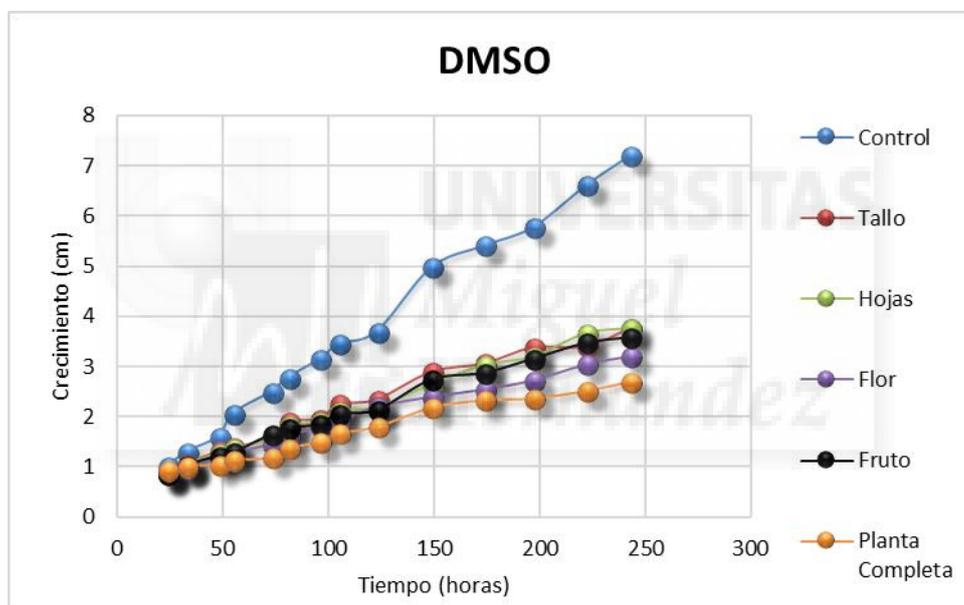


Figura 9. Crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en presencia de extractos de los distintos órganos de la planta y la planta completa en DMSO.

Si realizamos la comparativa de los valores de inhibición alcanzados por los distintos tipos de extractos sobre el hongo patógeno durante los días 1, 7 y 10 del ensayo (ver figura 10) comprobaremos que la planta completa es el extracto que más inhibe el crecimiento con un máximo de más del 60% seguido de cerca por la flor con un porcentaje menor. Es importante destacar que, al inicio de los ensayos, los porcentajes de inhibición de los extractos son todos bastante similares entre sí hasta el sexto/séptimo día en que comienza a observarse

inhibición de los extractos, sobre todo de planta completa y flor que son los que más van a inhibir el crecimiento de *Phytophthora citrophthora*.

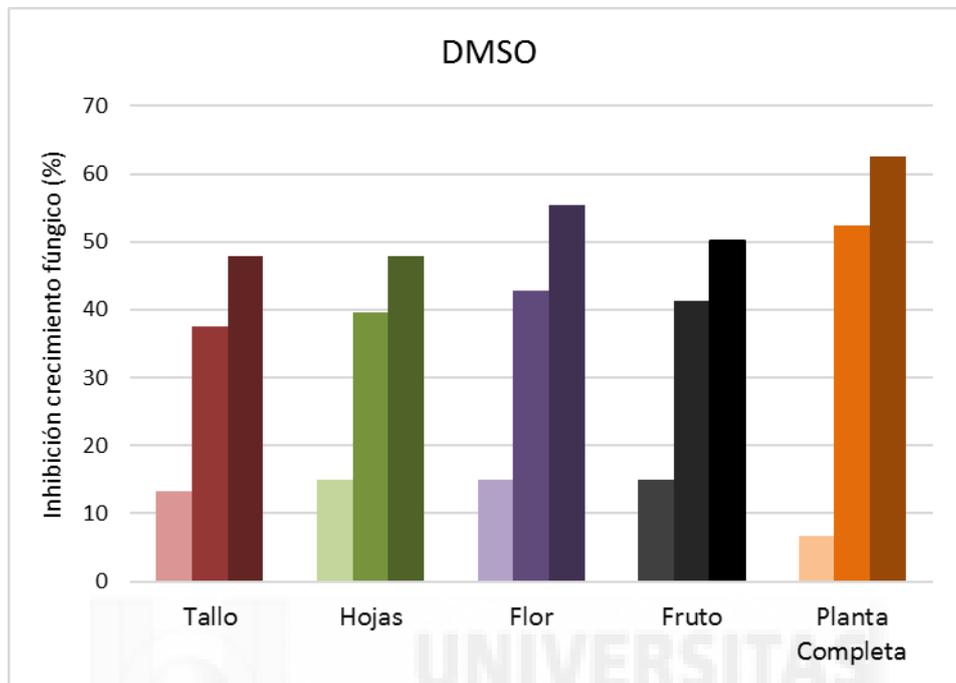


Figura 10. Porcentajes inhibitorios del crecimiento del hongo en medios con los distintos órganos de la planta en presencia de DMSO en los días 1,7 y 10 (escala creciente de color).

A la vista de los resultados obtenidos con los extractos de *Thevetia peruviana* se puede afirmar que los extractos de todos los órganos ensayados y de planta completa en DMSO son efectivos para las concentraciones ensayadas en la inhibición del crecimiento fúngico, aunque la inhibición no sea la misma en todos ellos.

Como conclusión para el ensayo “in vitro” podemos ver la siguiente gráfica (ver figura 11) que a modo de resumen de todo el ensayo “in vitro” refleja los crecimientos del hongo en presencia de extractos de plantas completas en los distintos agentes extractantes. De modo que para realizar el ensayo “in vivo” el extracto elegido para tratar los cítricos es el de planta completa en DMSO por ser el extracto que más inhibe el crecimiento del hongo de todos los ensayados.

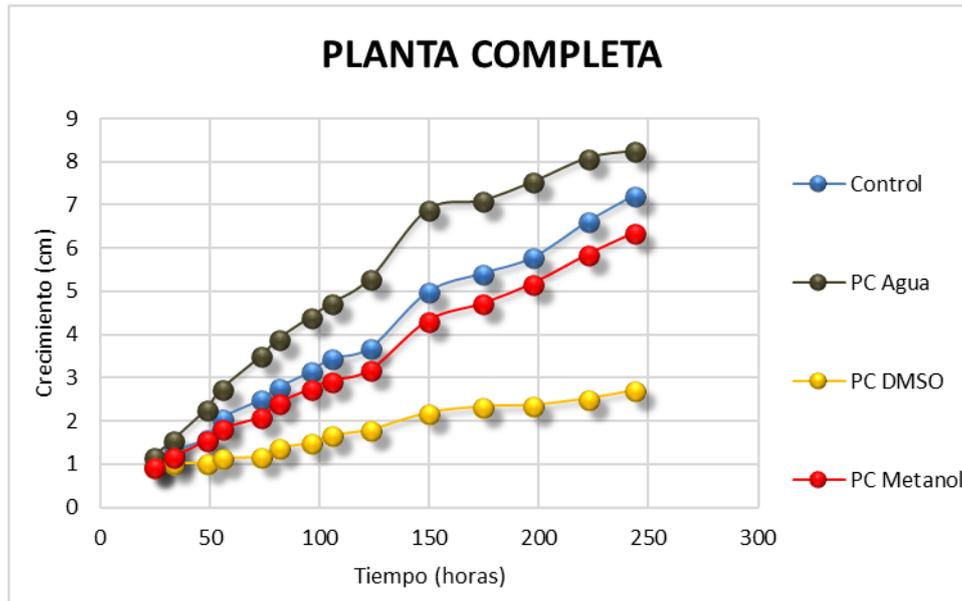


Figura 11. Crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en presencia de extractos de la planta completa en cada uno de los agentes extractantes ensayados.

De los ensayos realizados “in vitro” con planta completa se puede concluir que el mejor extractante de los seleccionados es el DMSO (ver figura 12). Se descarta el agua como agente extractante y se comprueba que DMSO es el mejor agente para extraer y diluir los compuestos secundarios.



Figura 12. Crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en medio control (izquierda) y medio problema con extracto de planta completa en DMSO (derecha).

4.2. Ensayos “in vivo” en frutos de cítricos:

Una vez realizados los ensayos “in vitro” pasamos a los ensayos “in vivo” para comprobar la efectividad de los extractos en frutos de cítricos. Este último ensayo se llevó a cabo sobre frutos maduros de naranjas y limones divididos en dos grupos: frutos control y los frutos tratados con extracto de planta completa en DMSO. Los frutos control se dejaron sin tratar.

Los resultados del crecimiento del hongo sobre las **naranjas** se muestran en la siguiente gráfica (ver figura 13), donde se pone de manifiesto que los frutos tratados con el extracto presentan inhibición del crecimiento fúngico. En los frutos control a los 33 días, *Phytophthora citrophthora* cubre los frutos en su totalidad mientras que los frutos inoculados con *Phytophthora citrophthora* en presencia de extractos de planta completa muestran una herida menor, de unos 2 cm (ver figura 5).

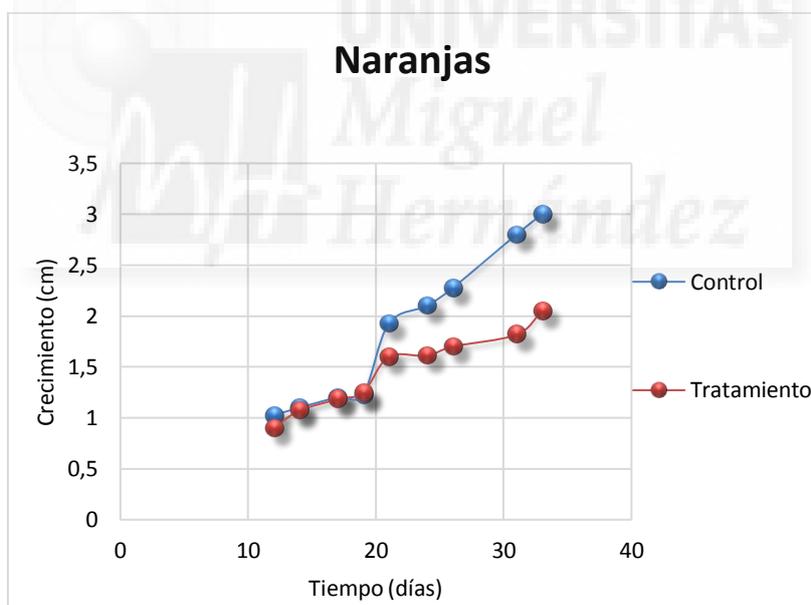


Figura 13. Crecimiento de *Phytophthora citrophthora* en naranjas.

En cambio, en el ensayo con frutos de **limón** los resultados no han sido los esperados. En los limones control los hongos no han conseguido crecer, mientras que en los frutos tratados el crecimiento ha sido muy rápido (ver figura 14). Dicha incongruencia puede haberse producido por varias causas; bien porque no se encontraban activos, bien debido a una mala manipulación, o por

los diferentes estadios de madurez entre los frutos control y los frutos tratados, los cuales presentaban un mayor grado de madurez y susceptibilidad ante el patógeno.



Figura 14. Crecimiento del hongo *Phytophthora citrophthora* en fruto control (izquierda) y fruto tratado (derecha).

Por lo tanto, dicho ensayo en limones habría que repetirlo con el mismo extracto, ya que tenemos evidencias de resultados positivos como en el ensayo realizado con extractos de lechetrezna sobre corteza de frutos de limón³³. Para comprobar dichas capacidades inhibitorias podemos probar con otros órganos de la planta u otros agentes extractantes, aunque cabe esperar que el extracto de planta completa en DMSO sea el que otorgue la mayor inhibición.

Conclusiones

El siguiente estudio pone en evidencia la existencia de metabolitos secundarios con actividad fungicida en *Thevetia peruviana* (adelfa amarilla), siendo la extracción con DMSO más efectiva que la extracción con agua o metanol ya que dichos extractos consiguen mayor porcentaje inhibitorio. Y dentro de los órganos ensayados, la planta completa en DMSO ha sido la que mayor porcentaje inhibitorio ha conseguido frente al crecimiento de *Phytophthora citrophthora* siendo la flor en DMSO el órgano más efectivo. Con respecto al extractante metanol es la flor el órgano que mayor inhibición produce.

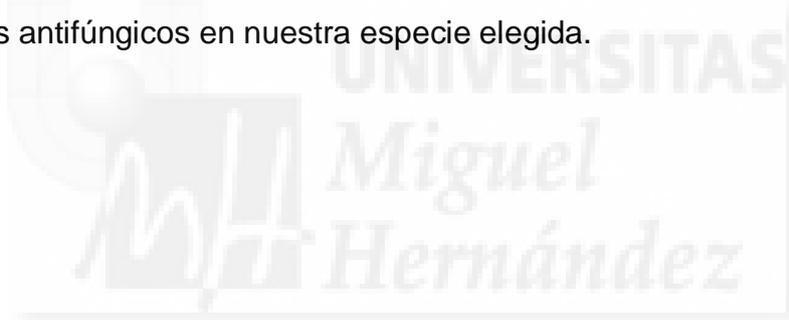
En el caso del ensayo “in vitro” los resultados han sido favorables y hemos podido extraer diversas conclusiones positivas, mientras que en los ensayos “in vivo” no hemos podido sacar conclusiones, por lo que cabría realizar una segunda parte de nuevos ensayos con frutos de similar grado de madurez y con inóculo activo de *Phytophthora citrophthora*.

Se ha podido comprobar como el mismo órgano, en este caso la flor, en unos casos causaba inhibición y en otros no, o cuando se encontraba agrupado junto a otros órganos era capaz de inhibir o pasaba lo contrario. Esto es indicativo de que la actividad antifúngica de un extracto vegetal se debe al efecto combinado de diversos factores, como puede ser la presencia o no de otro tipo de metabolitos secundarios que pueden cambiar entre especies de la misma familia como ocurre entre la Adelfa y la Adelfa Amarilla, el estado de desarrollo de la planta, la concentración a la cual se encuentren cada uno de ellos y/o la sinergia que pueda darse entre ellos.

Supondría un gran avance en este campo de investigación, el conseguir aislar los componentes antifúngicos presentes en *Thevetia peruviana* y comprobar su acción de forma individual y separada de los demás compuestos de la planta para así conocer con seguridad los componentes responsables de la actividad inhibitoria. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el tipo y cantidad de los compuestos secundarios presentes en los distintos órganos de las plantas, también dependen de la especie, la época del año y la fase de desarrollo en la

que se encuentre la especie. Incluso poder relacionar la síntesis y/o acumulación de dichos compuestos con los distintos estudios de crecimiento de la planta para optimizar la recogida de material vegetal.

En conclusión, en este estudio se pone de manifiesto que los tratamientos con los extractos vegetales de *Thevetia peruviana* inhiben el crecimiento fúngico de *Phytophthora citrophthora*. Estos resultados sugieren que la Adelfa Amarilla pueda ser empleada como una especie con actividad antifúngica. Aunque los resultados son positivos, es preciso que se realicen nuevos ensayos para tratar de identificar los posibles compuestos con actividad fungicida y sobre todo tratar de optimizar el método de obtención de los extractos para conseguir así una mayor eficacia en el control de *Phytophthora citrophthora*. En este campo podrían realizarse estudios para averiguar incluso el mejor y más adecuado momento fisiológico de la planta para obtener la mayor cantidad de compuestos secundarios antifúngicos en nuestra especie elegida.



Bibliografía

1. Plantas y flores. *Thevetia Peruviana* [sede Web]. [Consultado 16 de abril de 2018]. Disponible online en:
<http://plantayflor.blogspot.com/2013/11/thevetia-peruviana.html>
2. Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Reyes-Chávez E, Barahona-Pérez L. Producción y manejo de Ah kits (*Thevetia peruviana*) especie potencial para la producción de biodiesel. México: 2013.
3. Yépez F, Arboleda M. Promoción de la emergencia en uruape (*Bauhinia monandra* Kurz) y retama (*Thevetia peruviana*), especies potenciales para la arboricultura urbana. Bioagro. 2009;21(1):15-22.
4. Rajapakse S. Management of yellow oleander poisoning. Clin Toxicol (Phila.). 2009;47(3):206-212.
5. Morales JF. Estudios en las Apocynaceae neotropicales XIX: la familia Apocynaceae (Apocynoideae, Rauvolfioideae) en Costa Rica. Darwiniana. 2005;43(1-4):90-191.
6. Tun DF, González J. Vegetación y flora del rancho "El zapotal", municipio de Tizimín, Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán: 2004.
7. Arellano JA, Flores GJ, Tun GJ, Cruz B. Nomenclatura, forma de vida, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. Etnoflora yucatanense. Universidad Autónoma de Yucatán. Pp. 35-40.
8. Kareru, PG, Keriko JM, Kenji GM, Gachanja AN. Anti-termite and antimicrobial properties of paint made from *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. oil extract. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2010;4(2):087-089.
9. Ravikumar HS, Makari HK, Gurumurthy H. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol extract of *Thevetia peruviana*. Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2007;6(9):1579-4377.
10. Alfonso MR, Villasana Y, Lorenzo M, Álvarez DP, Uranga H. Análisis fitoquímico de cinco plantas con actividad alelopática. ALAM. 2005. Varadero, Matanzas, Cuba. Pp. 592-595.

11. Fukuda H, Kondo A, Noda H. Review. biodiesel fuel by transesterification of oils. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2001;92(5):405-416.
12. Calle J, Coello J, Castro P. Opciones para la producción de biodiesel en el Perú. 2005;2(2):69-77.
13. Pacheco LD, Toborda MME, De la Rosa TC. Estudio preliminar y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas, corteza y semillas de *Thevetia peruviana* (Persoon) Schum. 2006;3(5):12.
14. Demirbas A. Biodiesel en: Biodiesel A realistic fuel alternative for diesel engines Biodiesel. Springer London; 2008.
15. Kannan TK, Marappan R. Study of performance and emission characteristics of a diesel engine using *Thevetia peruviana* biodiesel with diethyl ether blends. *Rev. European Journal of Scientific Research*. 2010;43(4):563-570.
16. Torres, N. Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*. Facultad de Ciencias Médicas UNR. [Consultado 16 de abril de 2018]. Disponible online en:
http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19001.pdf
17. Consulta Plantas: *Thevetia peruviana* [sede Web]. Plantas por nombre. [Consultado 16 de abril de 2018]. Disponible online en:
<http://www.consultaplantas.com/index.php/plantas-por-nombre/plantas-de-la-s-a-la-z/770-cuidados-de-la-planta-thevetia-peruviana-adelfa-amarilla-o-tevetia>
18. Monografías.com. Un fitopatógeno cambia el destino de dos naciones [sede Web]. [Consultado 23 de abril de 2018].
Disponible online en:
<http://www.monografias.com/trabajos57/enfermedad-papa/enfermedad-papa.shtml#xeltizon>
19. Seminis. ¿Cómo ataca la Phytophthora? [sede Web]. [Consultado 23 de abril de 2018]. Disponible online en:
<http://www.seminis.mx/blog-como-ataca-la-phytophthora/>
20. Tecnicoagricola. Phytophthora en cítricos [sede Web]. [Consultado 23 de abril de 2018]. Disponible online en:
<http://www.tecnicoagricola.es/fitoftora-en-citricos/>

21. Gestión integrada de Plagas y Enfermedades en Cítricos. Identificación, biología y daños de *Phytophthora* [sede Web]. [Consultado 23 de abril de 2018]. Disponible online en:
<http://gipcitricos.ivia.es/identificacion-biologia-y-danos-23.html>
22. Gestión Integrada de Plagas y Enfermedades en Cítricos. Podredumbre marrón o aguado [sede Web]. [Consultado 23 de abril de 2018]. Disponible online en:
<http://gipcitricos.ivia.es/area/plagas-principales/enfermedades/aguado-o-podredumbre-marron>
23. Agrotterra. Aguado y gomosis, como combatir la *Phytophthora* en cítricos [sede Web]. [Consultado 23 de abril de 2018]. Disponible online en:
<https://www.agrotterra.com/blog/descubrir/aguado-y-gomosis-como-combatir-la-phytophthora-sp-en-los-citricos/79177/>
24. Close DC, Arthur C. Rethinking the role of many plant phenolics: protection from photodamage. 2002;99:166-172.
25. Urbano-Terrón P. "Biopesticidas de origen vegetal". Ediciones Mundi-Prensa; 2004.
26. Sung-Eun L, Byeoung-Soo P, Moo-Key K, Won-Sik C. Fungal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L, against phytopathogenic fungi. *Crop*. 2001;20:523-528.
27. Agrovergel. Biorracional [sede Web]. [Consultado 29 de abril de 2018]. Disponible online en:
<http://www.agrovergel.com/Biorracional.html>
28. Charles D. Lords of the harvest: biotech, big money, and the future of food. Perseus Publishing. Cambridge: MA; 2001.
29. Intagri. ¿Qué significa en realidad control biorracional de plagas? [sede Web]. [Consultado 29 de abril de 2018]. Disponible online en:
<https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/Significado-real-control-biorracional-plagas>
30. Harbone JB, Mabry TJ, Mabry H. "The Flavonoids". Londres:1975.
31. Botía-Aranda JM, Berenguer-Ferrández A, Aliaga-González G, Roda-García JJ. Inhibición del crecimiento de *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium*

- oxysporum* en presencia de extractos de adelfa (*Nerium oleander*). Cuadernos de fitopatología. 2009;101:7-12.
32. Botía-Aranda JM, Roda-García JJ. Efecto sobre el crecimiento de *Phythium ultimum* en presencia de extractos de *Erodium cicutarium*, *Diplotaxis erucooides*, *Eruca vesicaria* y *Nerium oleander*. Cuadernos de fitopatología. 2010;104:5-10.
33. Botía-Aranda JM, Honorato García AI. Inhibición de hongos fitopatógenos por extractos de Lechetrezna (*Euphorbia helioscopia*). Ensayos “in vitro” y sobre corteza de frutos de limón. Levante agrícola. 2013;186.

