



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

**“Inhibición del crecimiento de *Penicillium digitatum* por extractos de planta completa de *Erodium cicutarium* y *Nerium oleander* sobre manzanas y cítricos”**



CIENCIAS AMBIENTALES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

**Área Botánica**

**Departamento de Biología Aplicada**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

**Grado en Ciencias Ambientales**

**Autora: Laura Gómez Arias**

**Tutora: Juana M.<sup>a</sup> Botía Aranda**

**Curso: 2019/2020**

## Resumen

En este trabajo se evalúa la capacidad inhibitoria de dos especies vegetales, *Erodium cicutarium* y *Nerium oleander* frente al hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum* en la corteza de frutos maduros de manzanas y cítricos (limones y naranjas), a los que se aplican extractos de estas plantas completas. Se han realizado ensayos *in vitro* de dicho hongo en presencia de extractos de planta completa de las dos especies antes mencionadas. Los datos muestran que la Adelfa (*Nerium oleander*) es la que más inhibe el crecimiento *in vitro* de *Penicillium digitatum* (75,05%). En los ensayos *in vivo*, sobre la corteza de los frutos, en las manzanas (Granny Smith y Fuji), es *Erodium cicutarium* el que produce mayor inhibición, 9,6% y 88,42%, respectivamente. Y, con respecto a los cítricos, en los limones la mayor inhibición viene producida por *Erodium cicutarium* (8.38%) y en las naranjas ese mayor poder inhibitorio lo produce la Adelfa (52,01%).

This work describes the inhibitory capacity of two plant species *Erodium cicutarium* and *Nerium oleander* against the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum* on the bark of mature fruits of apples and citrus fruits (lemons and oranges), to which extracts of these complete plants are applied. *In vitro* tests of said fungus have been carried out in the presence of complete plant extracts of the two species mentioned above. The data show that Oleander (*Nerium oleander*) is the one that most inhibits the *in vitro* growth of *Penicillium digitatum* (75.05%). In the *in vivo* tests, on the fruit bark, in apples (Granny Smith and Fuji), it is *Erodium cicutarium* that produces the greatest inhibition, 9.6% and 88.42%, respectively. And, with regard to citrus fruits, in lemons the greatest inhibition is produced by *Erodium cicutarium* (8.38%) and in oranges this greater inhibitory power is produced by the Oleander (52.01%).

**Palabras clave:** *Penicillium digitatum*, *Erodium cicutarium*, *Nerium oleander*, inhibición, grados Brix y bioplaguicidas.

## Índice

1. Introducción .....	3
1.1. Nuevos plaguicidas biorracionales a partir de extractos vegetales .....	3
1.2. Plantas con posible actividad antifúngica .....	5
1.2.1. <i>Erodium cicutarium</i> .....	5
1.2.2. <i>Nerium oleander</i> .....	6
1.3. Enfermedades postcosecha: <i>Penicillium digitatum</i> .....	6
2. Antecedentes y objetivos .....	8
3. Material y métodos .....	11
3.1. Material vegetal .....	11
3.1.1. Extractos vegetales .....	11
3.1.2. Ensayos en frutos: manzanas y cítricos .....	12
3.2. Medios de cultivo .....	12
3.3. Ensayos “in vitro” .....	12
3.4. Medida del crecimiento fúngico .....	13
3.5. Ensayos “in vivo” en manzanas y cítricos .....	13
4. Resultados .....	15
4.1. Efecto de extracto de planta completa sobre el crecimiento “in vitro” de <i>Penicillium digitatum</i> .....	14
4.2. Efecto de extracto de planta completa sobre el crecimiento “in vivo” de <i>Penicillium digitatum</i> .....	19
4.2.1. Crecimiento “in vivo” en manzanas .....	19
4.2.2. Crecimiento “in vivo” en cítricos .....	22
5. Discusión .....	25
6. Conclusiones y proyección futura .....	26
7. Bibliografía .....	27

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Nuevos plaguicidas biorracionales a partir de extractos vegetales**

En los últimos años se ha producido un gran auge de la agricultura ecológica; debido a la concienciación, cada vez mayor, de la población sobre la conservación del medioambiente, así como el llevar una vida más saludable, sana y libre de plaguicidas e insecticidas químicos, que además de producir efectos negativos en el medio natural, también los producen en el organismo humano. Por esto, han aparecido diversos estudios sobre bioplaguicidas más respetuosos con el ambiente, son los llamados insecticidas de tercera generación o biorracionales. Estos bioplaguicidas aprovechan la gran cantidad de compuestos químicos que encontramos en la naturaleza, tanto en plantas como en animales.

La investigación de nuevas estrategias fitosanitarias se plantea como necesidad frente al intensivo desarrollo de los pesticidas orgánicos (Charles D., 2001). Entre dichas estrategias, se encuentran los estudios sobre la actividad biológica de las moléculas de defensa de las plantas que se podrían manifestar como el principio activo para los nuevos biopesticidas con un comportamiento fitosanitario mucho más respetuoso con el medioambiente (Smith, 1992).

Entre las ventajas de los insecticidas biorracionales podemos citar: 1) la rápida descomposición tras su aplicación, 2) el control efectivo que presentan y 3) la compatibilidad con sistemas de manejo integrado de plagas (Urbano, 2004). Estas ventajas son debidas a las moléculas de defensa de las plantas que presentan cuantiosos beneficios entre los que destaca su baja persistencia y su rápida biodegradabilidad a productos no tóxicos. Además, estas sustancias suelen ser activas contra un número limitado de especies diana específicas, con lo que es muy recomendable su uso como agentes de control de enfermedades (Sung-Eun y col., 2001). Por otro lado, la existencia de varias moléculas antifúngicas en una misma especie vegetal dificulta la aparición de resistencias en los patógenos (Carmona y col., 2001).

A pesar de la gran cantidad de ventajas que poseen los insecticidas biorracionales, también presentan algunas 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 para así asegurar que la aplicación se produce en el momento oportuno, y tienen un complicado proceso de registro como producto fitosanitario, lo que limita la posibilidad de protegerlos frente a una patente (Charles D., 2001).

En base a esta nueva corriente social y científica basada en la sostenibilidad del medioambiente se han realizado numerosos estudios que han puesto de manifiesto la actividad insecticida y/o antifúngica de diversas plantas como, por ejemplo: *Azadiractina indica* (Nimbo de la India), capaz de inhibir el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos (Amadioha, 2000; Govindachari y col., 1998); extractos de frutos de *Piper longum* L. (Pimienta larga) ejercen acción fungicida “in vivo” contra los hongos *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* y *Puccinia recóndita* en sus respectivas plantas huésped (arroz, pepino, tomate y trigo) (Sung-Eun y col. 2001); extractos de hojas de *Annona cherimola* (Chirimoyo), *Bromelia hemisphaerica* y *Carica papaya* (Papayo) inhiben la esporulación de *Rhizopus stolonifer* en ciruelas después de la cosecha (Bautista y col. 2000); *Euphorbia helioscopia* (Lechetrezna) produce inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos *Penicillium digitatum* y *Fusarium oxysporum* (Botía, 2014); *Ecballium elaterium* inhibe el crecimiento de los hongos *Phytophthora citrophthora* y *Rhizoctonia solani* (Botía y col., 2005; Agulló y Botía, 2007); extractos de plantas completas de *Diplotaxis eruroides* (Jaramago blanco) y *Conyza bonariensis* (Cola de caballo) inhiben el crecimiento de *Phytium ultimum* (Botía, 2007); los tratamientos con extractos vegetales de *Thevetia peruviana* (Adelfa amarilla) inhiben el crecimiento fúngico de *Phytophthora citrophthora* (Botía y col., 2018).

Con respecto a la actividad insecticida se ha demostrado que extractos de hoja de *Ecballium elaterium* (Pepinillo del diablo) tienen un efecto inhibitorio en el coleóptero *Tribolium castaneum*, presentando un efecto repelente e inhibitorio del crecimiento en la fase de larva y toxicidad de contacto en la fase de pupa (Pascual-Villalobos y Robledo, 1999), también ha quedado demostrada la actividad insecticida de *Azadirachta indica* (Schmutterer, 1990); *Tetradenia riparia* (Jengibre arbustivo) (Dunkel y col., 1990), *Erodium cicutarium*

(Alfilillero) (Checa y Botía, 2005) y en general, las plantas aromáticas como el romero, el tomillo y el orégano, sobre coleópteros curculiónidos (Regnault-Roger y Hamraoui, 1994).

Por otro lado, también se han encontrado efectos bactericidas de *Thevetia peruviana* (Adelfa amarilla) en sus semillas, ya que inhiben el crecimiento de varios patógenos bacterianos como: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Microtermes* spp. (Kareru y col., 2010; Ravikumar y col., 2007).

## **1.2. Plantas con posible actividad antifúngica**

En nuestro estudio vamos a utilizar *Nerium oleander* (Adelfa rosa) y *Erodium cicutarium*. Hemos elegido estas plantas porque se encuentran de forma espontánea como especies de plantas adventicias presentes en los cultivos y en terrenos baldíos, por lo que sería muy interesante demostrar que tienen efecto bioplaguicida; además, en anteriores estudios se ha demostrado que estas especies producen efecto inhibitorio en hongos y también efecto insecticida (Botía y col., 2008; Botía y col., 2009; Botía y col., 2010).

### **1.2.1. *Erodium cicutarium***

*Erodium cicutarium* es una planta anual pelosa cuyo tamaño oscila de 4 a 60 cm. Sus hojas son pinnaticompuestas con numerosos foliolos, de tamaño similar, de dentados a pinnatipartidos. Sus flores están agrupadas en forma de una umbela largamente pedunculada, tienen 5 pétalos rosas con una mancha oscura en su base. Los frutos del *Erodium cicutarium* tienen mericarpos de 5 a 7 mm, con dos fosas anchas y un surco en su base, cuando se desprenden del fruto lo hacen de arriba hacia abajo, con el pico enrollado en forma de tirabuzón, a diferencia de las especies de *Geranium*.

El efecto inhibitorio de *Erodium cicutarium* es debido a la presencia de saponinas, que son unos compuestos secundarios presentes en muchos vegetales y que son importantes para la capacidad defensiva y antioxidante. Las saponinas pertenecen al grupo de los heterósidos glucósidos. Los contenidos de saponina varían de entre el 0.1% al 5% según la especie vegetal y son compuestos de defensa frente a sus patógenos.

En este sentido, *Erodium cicutarium* ha quedado demostrado que funciona como insecticida sobre ejemplares de cochinilla (Checa y Botía, 2005); también produce efecto inhibitorio del crecimiento en los hongos *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium oxysporum* (Botía y col., 2008) y extractos de flor y fruto inhiben el crecimiento del hongo *Pythium ultimum* (Botía y Roda, 2010).

### **1.2.2. *Nerium oleander***

La adelfa se encuentra extendida por toda la cuenca del Mediterráneo, es un arbusto de hojas perennes, de crecimiento rápido pudiendo llegar hasta los 6 metros de altura. Sus hojas son lanceoladas y enteras, muy coriáceas de color verde grisáceo y con un tamaño de 6 a 12 cm. Normalmente florece en primavera y continua su floración hasta el otoño, las flores tienen un diámetro de 3 a 4 cm y generalmente son rosas. Los frutos de esta planta son de color pardo-rojizo con un tamaño que varía entre 8 y 16 cm y con las semillas provistas de un penacho de pelos.

La toxicidad de *Nerium oleander* se debe a los compuestos terpénicos denominados heterósidos cardiotónicos de tipo cardenólido que posee y sus hojas tienen oleandrina, que se trata del L-oleandrósido de la oleandrigenina, cuya estructura mantiene una gran analogía con los heterósidos digitálicos.

Se ha demostrado que *Nerium oleander* presenta actividad inhibitoria frente a *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium oxysporum* (Botía y col., 2009); por otro lado, se ha comprobado un efecto insecticida contra la procesionaria del pino (Botía y col., 2009).

### **1.3. Enfermedades postcosecha producidas por *Penicillium digitatum***

Las enfermedades postcosecha son aquellas que afectan al fruto desde su recolección hasta que llegan al consumidor, provocando importantes pérdidas económicas en los sectores agrícolas. Distintos microorganismos, como hongos y bacterias, son capaces de afectar a las frutas y verduras durante la postcosecha, produciendo un menor rendimiento y una peor calidad. Los distintos microorganismos patógenos tienen efectos distintos en los frutos, pero los síntomas más habituales de las enfermedades postcosecha son: la degradación, la pérdida de sabor, los malos olores y la podredumbre. Cuanto más tiempo pasan los frutos

almacenados, mayor es la probabilidad de contraer algunos de estos síntomas, ya que, por otro lado, disminuye la capacidad de síntesis de las sustancias naturales de defensa que los protegen frente a estas enfermedades.

Una de estas enfermedades postcosecha, la podredumbre verde, es producida por el hongo *Penicillium digitatum*. Es un hongo necrotrófico, conocido comúnmente como podredumbre verde y es la principal enfermedad de postcosecha de los cítricos, causando hasta más del 90% del total de las pérdidas en postcosecha (Eckert y Eaks, 1989). Afecta a todas las variedades de cítricos, aunque las más vulnerables son las naranjas y las mandarinas, provocando pudriciones en los frutos. Cuando el fruto queda afectado, se genera un micelio blanco con gran cantidad de esporas que excretan una enzima que deshace la lignina de la corteza reblandeciendo los tejidos y finalmente lo recubre dejando una tonalidad verde, de ahí su nombre común. En los tejidos enfermos se crean manchas húmedas que después de un tiempo envuelven las vesículas de jugo.

Que este hongo afecte a los frutos depende de las condiciones climáticas y de la forma de manipulación de los frutos desde la recogida de la cosecha, ya que puede permanecer durante meses en la piel y desarrollarse después, cuando se producen heridas que liberan líquido que contacta con el hongo. La temperatura ideal para que se desarrolle es de 20°C y una humedad relativa alta, estas condiciones encajan con nuestro clima Mediterráneo, por lo que es una enfermedad muy importante en nuestra agricultura de rápido desarrollo y graves consecuencias económicas.

*Penicillium digitatum* sobrevive todo el año en forma asexual, formando conidios; por lo que su infección puede ocurrir durante todo el ciclo vital del fruto, desde su maduración hasta su comercialización.

La podredumbre verde ha sido controlada con fungicidas sintéticos convencionales, como benomilo, imazalil o tiabendazol. Pero la utilización continuada de estos productos puede generar la aparición de cepas resistentes a estos fungicidas (Bus, 1992). Así en 2015 se incluyó



el benomilo en el listado de Plaguicidas prohibidos, cuya obligación a cumplir afectó desde el 1 de Julio de 2016. Además, el imazalil y tiabendazol son productos que, encontrados en la piel de mandarinas, naranjas, limones, pomelos, etc. Y usados como tratamientos preventivos ante el ataque de hongos no son inocuos para la salud. En el caso de imazalil se utiliza en la protección preventiva de podredumbres de almacén producidas por moho verde de la naranja (*Penicillium digitatum*) y moho azul de los frutos almacenados (*Penicillium expansum*) entre otras. Suele usarse en mezcla con ceras más imazalil y fosetil-Al. para los frutos cítricos. Sigue vigente su uso y en 2017 se renovó la aprobación como sustancia activa en la comercialización de productos fitosanitarios. Por este motivo es bueno estudiar otras posibles alternativas a los tratamientos químicos, mejor y más respetuosas con el medioambiente como los bioplaguicidas, para los fungicidas que son convencionales.

## **2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

En la actualidad, el uso masivo de plaguicidas e insecticidas sintéticos es el principal método para combatir los daños causados en las cosechas por los diversos patógenos que las atacan. Esta utilización masiva de los productos sintéticos se debe a que es el método más barato y eficaz, aunque, como ya se ha mencionado anteriormente, también provoca numerosos efectos negativos, tanto en el medioambiente como en la salud de las personas, además de ir perdiendo su efectividad en el transcurso del tiempo por la capacidad que tienen las especies patógenas de desarrollar una resistencia específica para cada producto utilizado.

Todos estos motivos, impulsan los diferentes estudios sobre diversos extractos de especies vegetales con potencial capacidad para inhibir el crecimiento y desarrollo de patógenos. En relación con los resultados obtenidos en anteriores estudios, parece posible la aplicación de este método alternativo en el control y manejo de plagas vegetales como una forma complementaria a los métodos ya existentes, que nos permitirá con el paso del tiempo ir dejando el uso de los insecticidas y plaguicidas más tóxicos y perjudiciales para el medioambiente por otros productos inocuos para el ser humano y el entorno.

Nuestro objetivo es estudiar el efecto que producen extractos vegetales obtenidos de *Erodium cicutarium* y *Nerium oleander* sobre el hongo *Penicillium digitatum* en dos variedades de manzanas: Fuji y Granny Smith, y en cítricos: naranjas y limones.

Como ya se ha comentado, el hongo *Penicillium digitatum*, ataca en la postcosecha, durante el transporte y en el almacenamiento de los frutos y hasta incluso en su comercialización aprovechando cualquier herida producida en la corteza del fruto. Los métodos que más se utilizan para la prevención de este hongo son tratamientos químicos (uso de fungicidas sintéticos) y tratamientos físicos (refrigeración).

La selección de las dos especies vegetales (*Erodium cicutarium* y *Nerium oleander*) se debe a los estudios anteriores que han demostrado la capacidad que poseen para inhibir el desarrollo y crecimiento de diversos hongos fitopatógenos. Además, el acceso a estas especies es fácil, ya que se suelen encontrar en los alrededores de los cultivos, aprovechando así, su cercanía.

Las variedades de manzanas fueron elegidas para nuestro estudio dada la importancia en el comercio y consumo en España: la manzana Fuji es una variedad obtenida en 1939 por la National Fruit Reseach Station de Morioka, Japón y es el resultado obtenido del cruzamiento entre la variedad Rall Janet y Delicious. El nombre es debido al monte sagrado del pueblo japonés y representa el 50% de la producción de manzanas de ese país. En España ocupa el tercer puesto en la comercialización de manzanas. Su peso suele estar entre los 200 y los 250 g, y normalmente miden entre 75 y 85 mm. En las primeras producciones es de forma irregular, con tendencia a dar frutos achatados y con surcos longitudinales, pero a partir de la segunda y tercera cosecha empieza a aumentar su homogeneidad. El pedúnculo es corto y firme, lo que dificulta su recolección lo que hace que a veces, parte del dardo quede adherido al fruto produciendo heridas a los otros frutos durante la manipulación.

La segunda variedad de manzana seleccionada es la Granny Smith es originaria de Nueva Gales del Sur, Australia, proveniente de una plantación de Thomas y Mary Ann Smith, hacia

mediados del siglo XIX. Es la tercera variedad más distribuida en el mundo. El fruto es tronco-cónico, regular y homogéneo, de 190 a 210 g de peso y 75 a 80 mm de tamaño, de pedúnculo mediano.

Al igual que las manzanas, los cítricos han sido escogidos por su importancia comercial en España. El limón Verna, es una variedad española de origen desconocido, pudiendo haberse obtenido en Murcia a partir de la variedad italiana *Monachello*. Es un fruto de buen tamaño (entre 65 y 70 mm de diámetro y con un peso de 130-170 g), con un mamelón grande en la zona apical y un cuello en la zona peduncular. Tiene pocas semillas, entre 2 y 6, pero a mayor temperatura en floración, presenta mayor número de semillas. Su forma es ovalada, la corteza es algo rugosa y gruesa (6-7 mm), y la pulpa tiene muy buen contenido en zumo (30-35%). En España, este limón se está cultivando cada vez más, y según explica Enrique Fuentes (2016), dos son los motivos: “La competencia con los orígenes de ultramar es cada vez menor, ya que las cadenas de distribución europeas demandan frutas con menos residuos de pesticidas y cada vez es más complicado para los exportadores del hemisferio sur, dado que requieren un mínimo de tratamientos al tratarse de tránsitos tan largos” y “otro factor influyente es el hecho de que con Verna, al cosecharse mayoritariamente entre abril y julio, apenas hay solapamientos con Turquía, Argentina, Chile o Sudáfrica”.

La naranja Navelate pertenece al grupo de naranjas navel y su característica esencial es que conserva sus calidades intactas una vez recolectada, aunque pase el tiempo y aunque su piel tenga un aspecto duro y feo. Surgió de forma espontánea en Vinaroz, por mutación natural de una rama en un campo de la variedad Navel de Juan Gil, hace ahora medio siglo. Fue una naranja muy comercializada, es de forma redondeada con textura y piel fina de color naranja pálido. Tiene un tamaño medio y una forma alargada. Su corteza es suave y lisa. Tiene la piel muy sensible, por lo que a menudo sufre rayaduras por culpa del viento ocasional que la zarandea o aparecen levísimos pinchazos, porque sus ramas tienen espinas. Una característica muy peculiar de esta naranja es que tiene un ligero desorden en la piel exterior conocido como colapso de la corteza o patita de rata rasgo característico sólo en este tipo de naranja, esta alteración sirve como cuño identificativo de la naranja Navelate con respecto al resto de naranjas del grupo navel. La pulpa es de color amarillo-naranja, muy jugosa y de

extraordinaria calidad con un elevado contenido en zumo. Otra característica de esta naranja es que jamás pierde su zumo, mantiene su calidad interna intacta, incluso varios meses después de su recolección, llegando a tener, tras pasar unos meses, un aspecto endurecido y feo de la piel manteniendo su calidad interna en perfecto estado. Todas estas características hacen que esté considerada la mejor naranja del mundo según los especialistas, consumidores, comerciantes y agricultores.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la posible utilización de extractos vegetales de *Erodium cicutarium* y *Nerium oleander* como nuevo tratamiento que evite el crecimiento de *Penicillium digitatum* en los frutos durante la postcosecha.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material Vegetal**

##### **3.1.1. Extractos vegetales**

Se seleccionaron para el estudio dos especies de plantas, *Nerium oleander* (Adelfa rosa) y *Erodium cicutarium*. Se utilizaron extractos de distintos órganos de la flor (tallo, hoja, raíz, flor y fruto) que habían sido utilizados en anteriores estudios. Estos extractos habían sido recolectados en los jardines de la Universidad Miguel Hernández de Elche. A continuación, se habían separado y secado. El material vegetal se introdujo en una estufa Raypa con distribución de calor por convección natural, manteniéndose durante ocho días a unos 65°C. Tras la molienda del material vegetal seco se prepararon los extractos vegetales empleando como agente extractante el DMSO.

Para la elaboración de los extractos se pesaron 0.1 g de cada extracto de las plantas (flor, fruto, raíz, tallo y hoja), después de pesar cada extracto de las plantas lo mezclamos y volvimos a pesar 0.1 g de la mezcla, para así tener dos extractos de las plantas completas. Luego lo disolvimos en 10 mL de DMSO. Se dejaron agitando durante 48 horas y después se filtraron las muestras para eliminar los materiales gruesos y obtener unos extractos homogéneos.

### **3.1.2. Ensayos en frutos: manzanas y cítricos.**

Los frutos escogidos son dos variedades distintas de manzanas. Utilizamos 9 frutos de cada variedad (Fuji y Granny Smith) para el ensayo (3 para el medio control, 3 para los extractos de *Erodium cicutarium* y 3 para los extractos de *Nerium oleander*).

Los cítricos escogidos son limones Verna y naranjas Navelate, estas variedades de cítricos han sido seleccionadas por su importancia en el comercio de nuestra región. Por otro lado, su contenido en azúcar es muy distinto al de las manzanas, lo que nos permite hacer una comparación entre frutos con distintos grados Brix.

Utilizamos 9 frutos de cada cítrico (9 limones y 9 naranjas) para el ensayo: 3 frutos control, 3 para ensayo con los extractos de *Erodium cicutarium* y 3 para ensayo con los extractos de *Nerium oleander*.

### **3.2. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo se elaboraron utilizando PDA (patata-dextrosa-agar) suministrado por Laboratorios Microtik. Para cada ensayo se prepararon los medios problema con los extractos de las plantas completas y los medios control (solo con PDA).

Los medios problema contienen 3.75 g de PDA mezclados con 7.5 mL de extracto, y enrasando con agua destilada hasta los 100 mL. Los distintos extractos se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 121 °C y se vierten en las placas Petri estériles marca Deltalab en una cabina de flujo laminar marca Teslar modelo Micro-H. De cada tipo de medio se completan tres placas medio control y medio problema.

### **3.3. Ensayos “in vitro”**

Para la inoculación del hongo en los medios problema y control, se partió de material fúngico activado a partir de cepas puras de *Penicillium digitatum*. Para obtener el inóculo se empleó un tubo cilíndrico metálico estéril de 7 mm de diámetro con el que se perforaba el cultivo del hongo activado (Fig.1A). 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 los extractos de planta completa de las dos plantas estudiadas) y

medios control (solo con PDA) (Fig.1B). La inoculación se hizo en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar horizontal.

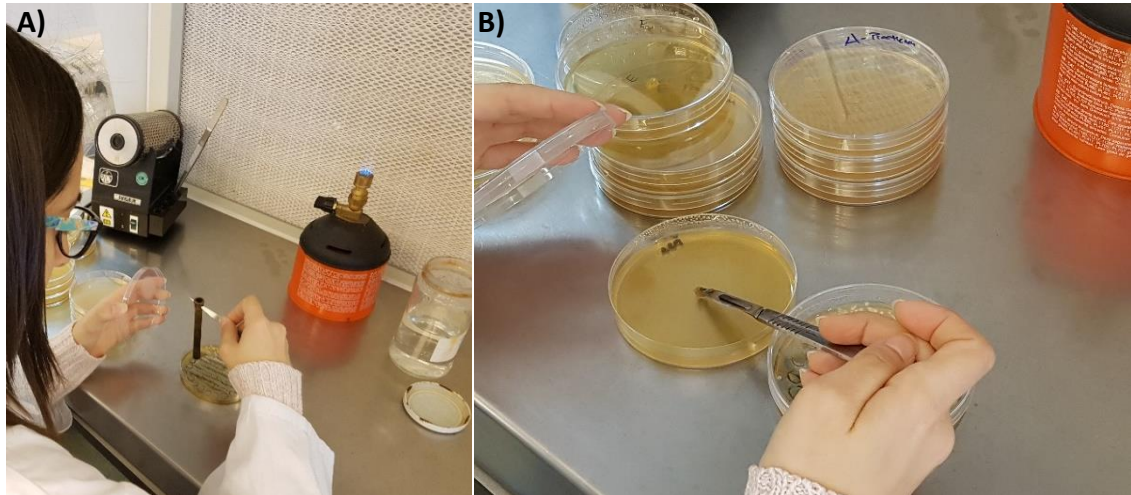


Fig.1: A) Perforación del hongo activado. B) Inoculación del hongo activado en los medios control y problema.

### 3.4. Medida del crecimiento fúngico

Los diferentes medios de cultivo se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente y la medida del diámetro de la colonia fúngica se realizó durante 20 días. Las medidas se tomaron con una regla graduada una vez al día y se efectuaban siempre dos medidas perpendiculares del diámetro de la colonia en cada placa. Las mediciones de crecimiento fúngico finalizaron cuando el hongo cubrió toda la placa del medio control.

### 3.5. Ensayos “in vivo” en manzanas y cítricos

Se recolectó una muestra homogénea de manzanas (9 de la variedad Fuji y 9 de Granny Smith); 9 limones Verna y 9 naranjas Navelate, con un estado de madurez muy similar y que fueran aptos para el consumo y la comercialización. En primer lugar, se lavan los frutos con agua y jabón para eliminar cualquier posible contaminación del exterior, una vez secos se aplicaron los extractos de planta completa de las dos plantas seleccionadas (*Nerium oleander* y *Erodium cicutarium*) sobre la corteza de los frutos mediante la inmersión de los frutos, dicha aplicación no se produjo en los controles (Fig.2).



Fig.2. Inmersión de los frutos en los extractos.

A los 30 minutos tras la aplicación del extracto, se produce la inoculación del hongo en los frutos. Para inocular el hongo en los frutos realizamos los siguientes pasos: A) una herida sobre la corteza del fruto con un cilindro metálico estéril de 7 mm de diámetro, B) retiramos con un bisturí la capa de corteza que formaba la herida y C) después se deposita el hongo a partir de los medios de cultivo activos de *Penicillium digitatum*. (Fig.3 para manzanas y Fig. 4 para cítricos).

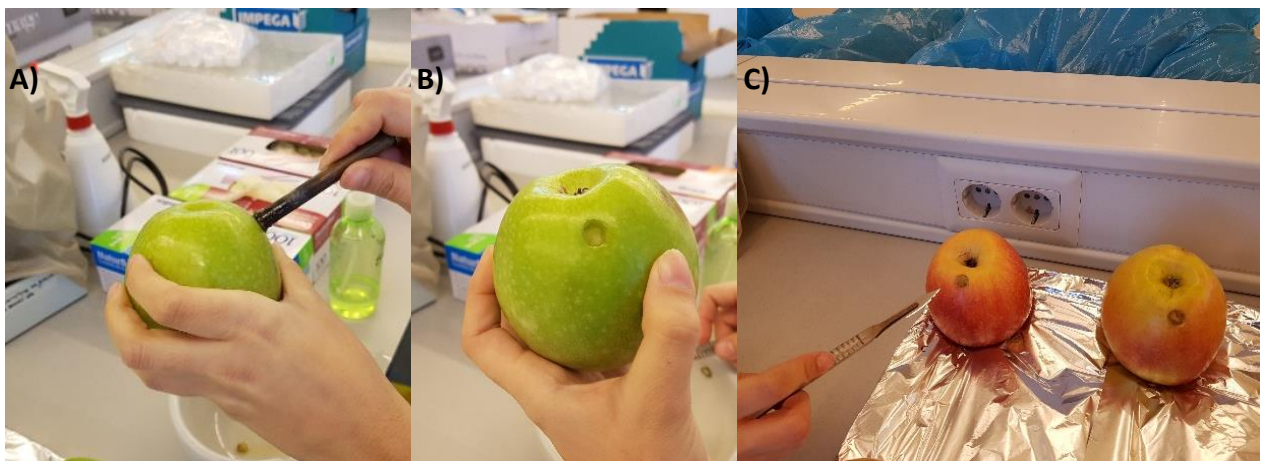


Fig.3: A) Realización de la herida en la corteza cada manzana. B) Retirada de la capa de corteza de la herida. C) Inoculación del hongo en la herida.

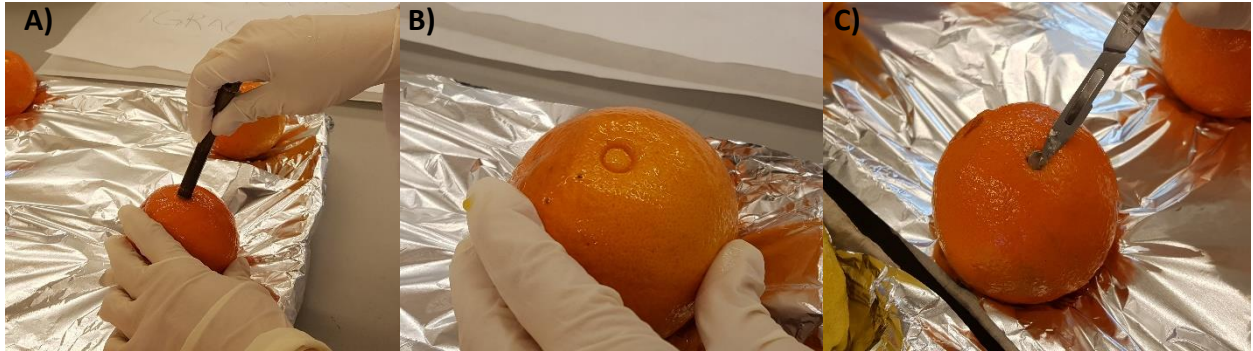


Fig. 4 A) Realización de la herida en la corteza de cada cítrico. B) Retirada de la capa de corteza de la herida. C) Inoculación del hongo en la herida.

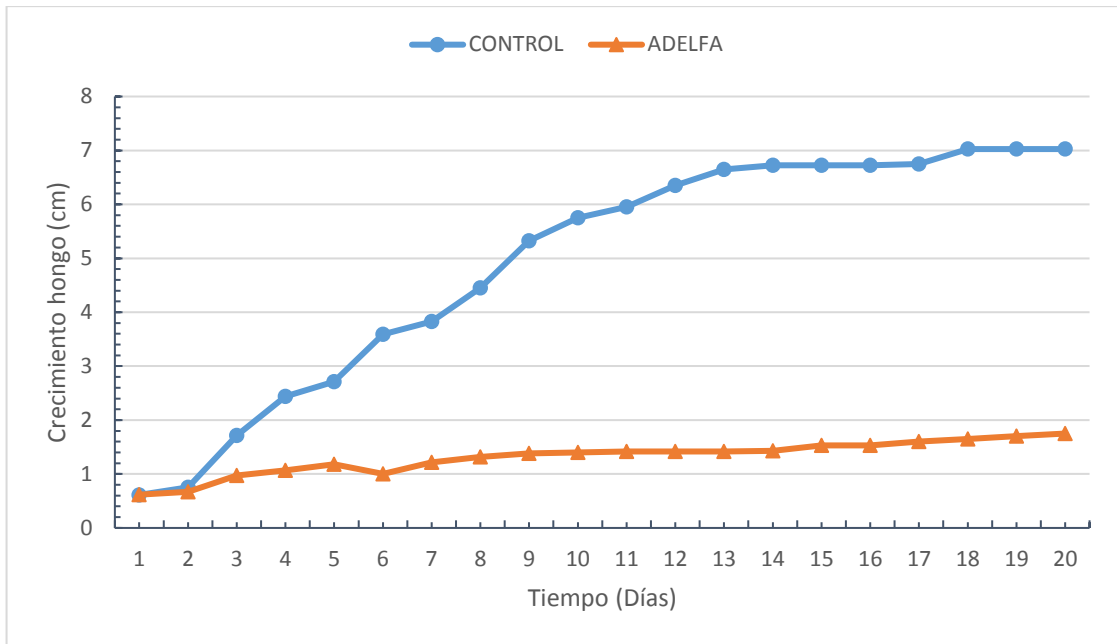
Tras la inoculación del hongo en los frutos, se procedió a la medición del crecimiento de los hongos cada 24 horas durante 9 días en el caso de las manzanas y durante 12 y 8 días en el caso de los cítricos (limones y naranjas respectivamente).

## 4. RESULTADOS

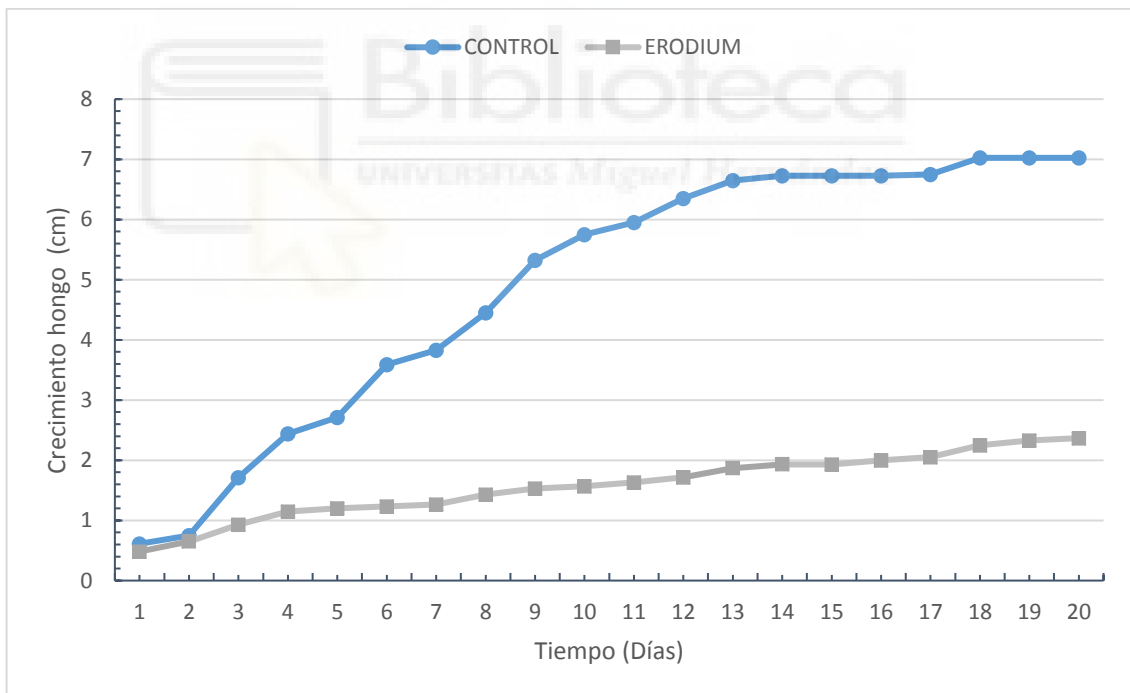
### 4.1. Efecto de extracto de planta completa sobre el crecimiento *in vitro* de *Penicillium digitatum*

El crecimiento del hongo en las placas varía según la especie de extracto vegetal utilizado. En la gráfica 1 se puede observar el crecimiento del hongo en el medio control y en el medio problema con extracto de planta completa de *Nerium oleander* (Adelfa rosa). En la gráfica 2 se observa el crecimiento de *P. digitatum* en el medio control y en el medio problema con extracto de planta completa de *Erodium cicutarium*.





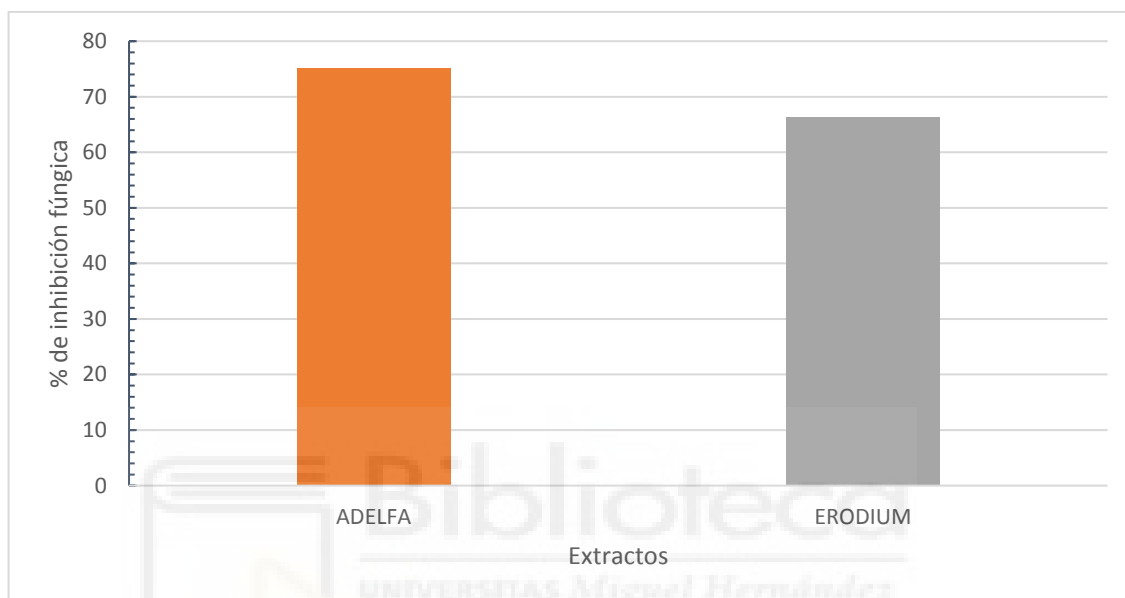
Gráfica 1. Crecimiento “in vitro” de *P. digitatum* en los medios control y problema con extracto de Adelfa.



Gráfica 2. Crecimiento de *P. digitatum* en los medios control y problema con extracto de *Erodium cicutarium*.

Las gráficas muestran el mayor potencial inhibitorio frente al hongo de *Nerium oleander* que *Erodium cicutarium*, a los 20 días tras finalizar el ensayo. Para ver con mayor

evidencia esta diferencia en la inhibición se ha realizado la gráfica 3, que muestra el porcentaje inhibitorio de cada extracto de planta completa en ambas especies. El hongo en presencia de adelfa crece sólo un 24,91% frente al crecimiento del medio control, lo que supone una inhibición de 75,05% y en presencia de *Erodium cicutarium*, el hongo crece un poco más (un 33,69%) lo que se traduce en una menor inhibición sobre el hongo (66,31%).



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de *P. digitatum* en presencia de extractos de planta completa de Adelfa y *Erodium*.

La evolución en el crecimiento del hongo en las placas se muestra, a continuación. En las figuras se muestra el medio control en la parte superior y los medios problema en la parte inferior (Fig.5), se ha seleccionado los 7 y 20 días para hacer más evidente el crecimiento del hongo al inicio del ensayo y al final del ensayo. Así, podemos observar que el crecimiento de *P. digitatum* en la placa problema que contiene *Nerium oleander* es casi imperceptible, mientras que en la placa con *Erodium cicutarium*, aunque el crecimiento también es pequeño, es mayor que en presencia de Adelfa.

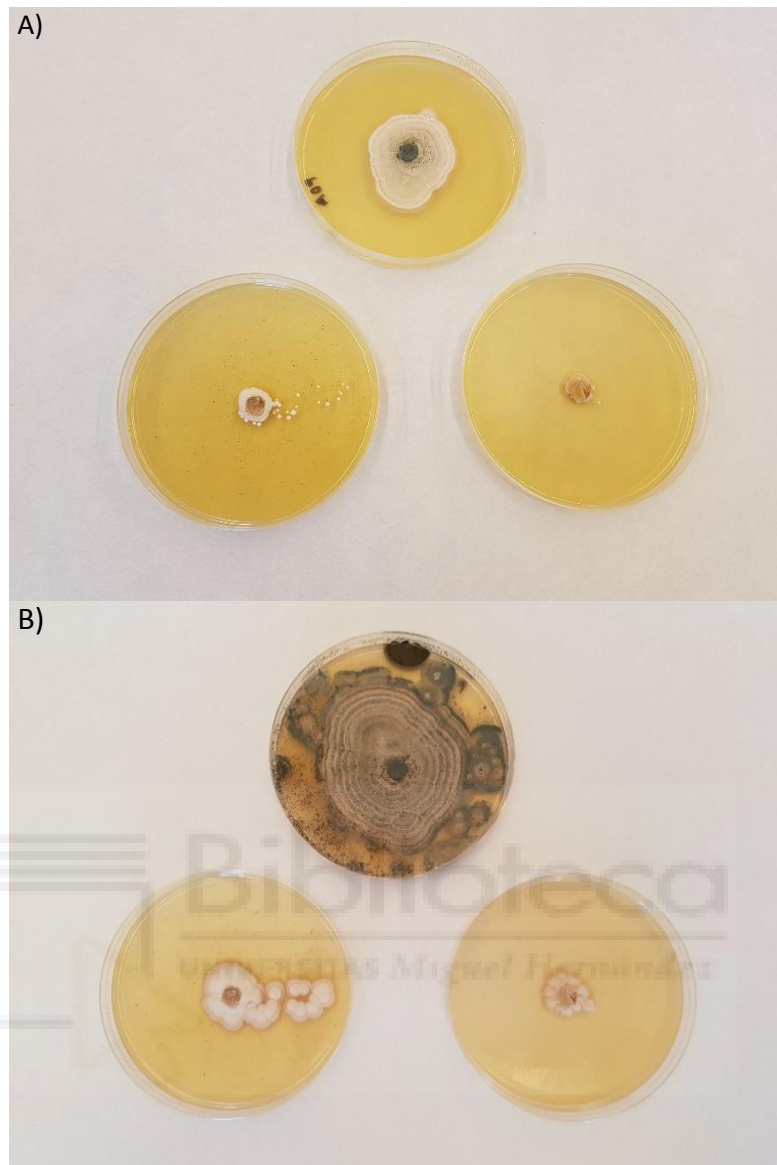


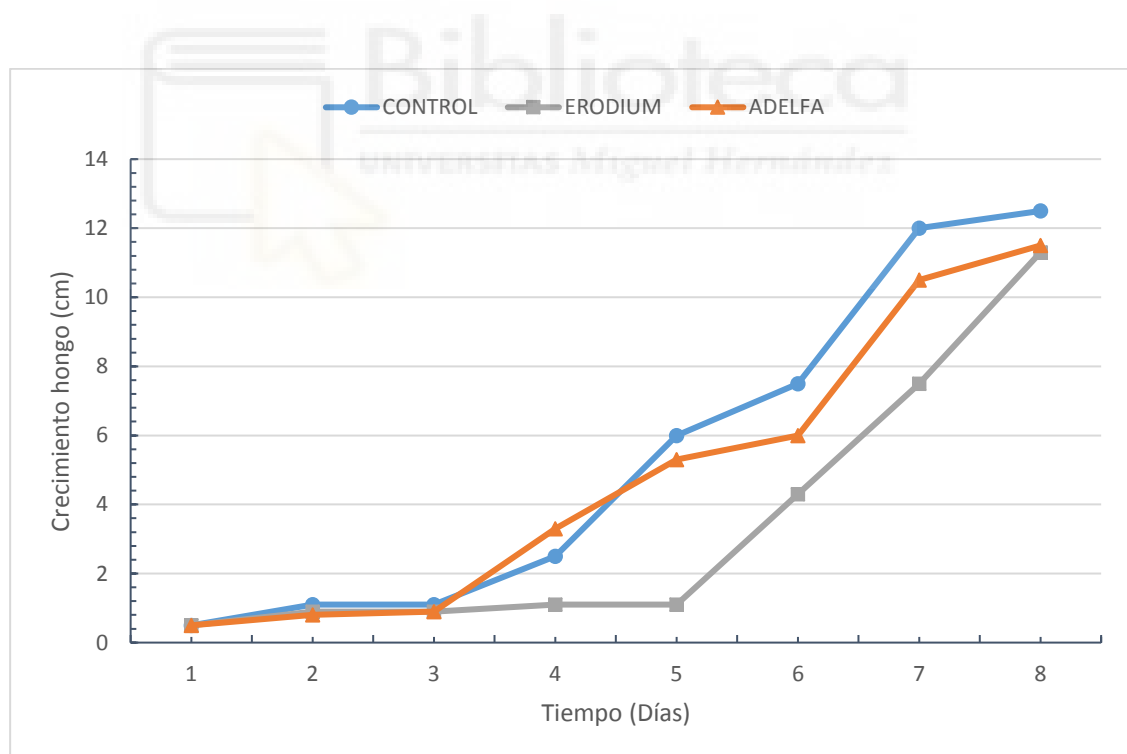
Figura 5. Crecimiento de *P. digitatum* a los 7 días (A) y 20 días (B). Arriba: placa control, abajo izquierda: placa con extracto de *Erodium cicutarium* y abajo derecha: placa con extracto de *Nerium oleander*.

Como puede comprobarse de los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*, se plantea el estudio del posible efecto fungicida sobre *Penicillium digitatum* que puedan tener los extractos de las dos plantas completas sobre los frutos seleccionados (manzanas y cítricos).

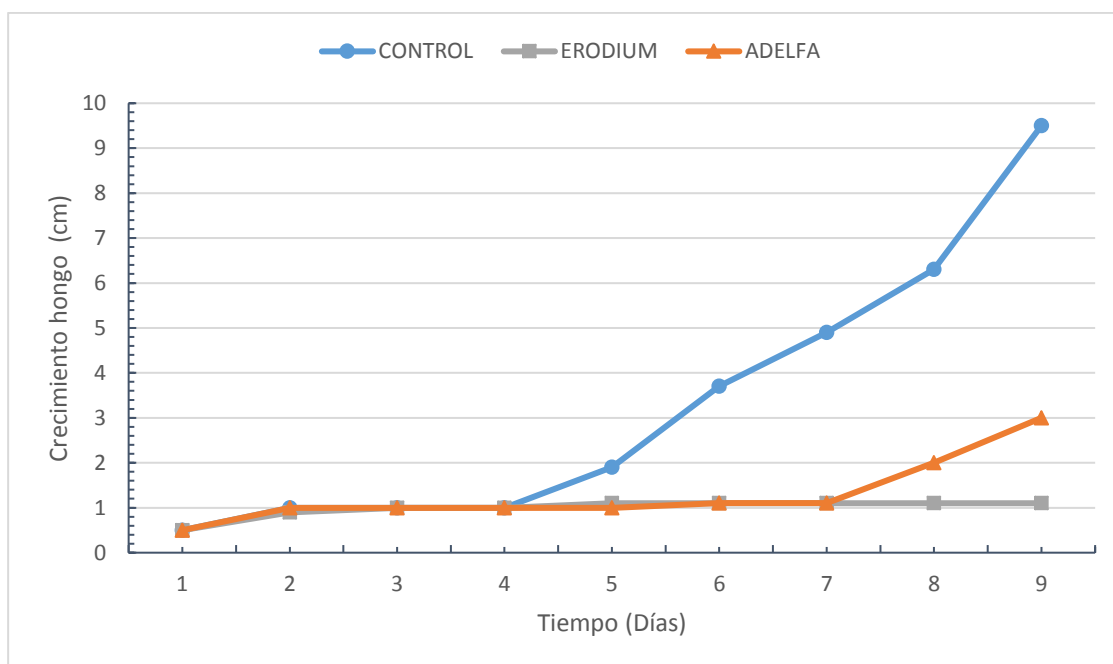
## 4.2. Efecto de extracto de planta completa sobre el crecimiento *in vivo* de *Penicillium digitatum*

### 4.2.1. Crecimiento *in vivo* en manzanas

Se ha estudiado el crecimiento del hongo *P. digitatum* sobre dos variedades de manzanas (Fuji y Granny Smith) seleccionadas según su contenido en azúcar, así, la manzana Fuji es la más dulce con 16'5°Brix, y la Granny Smith es la más ácida con 13'0°Brix. Los grados Brix son una unidad de cantidad y sirven para determinar el cociente total de materia seca, generalmente azúcares, disuelta en un líquido. Separamos las manzanas en 3 grupos de 3 manzanas cada uno: grupo control (1), grupo tratadas con *Erodium* (2) y grupo tratadas con Adelfa (3). El ensayo duró 9 días, durante los cuales se fue midiendo cada 24h el diámetro que alcanzaba el hongo sobre la corteza de los frutos. En las gráficas 4 y 5, se representa el crecimiento del hongo sobre las variedades Granny Smith y Fuji, en los frutos control y los frutos tratados con los extractos de plantas.



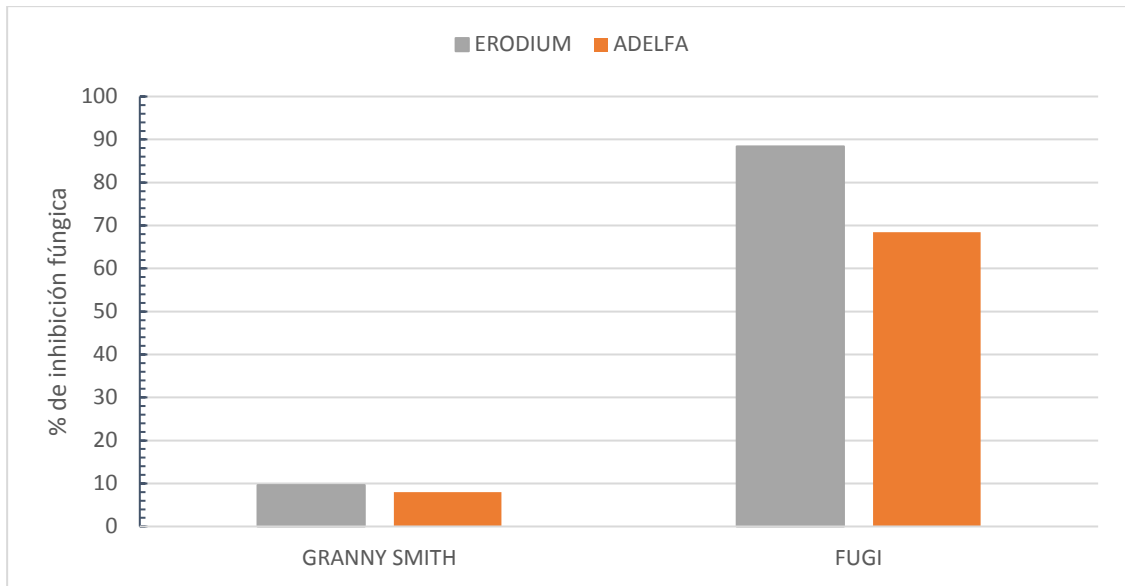
Gráfica 4. Crecimiento de *P. digitatum* sobre Granny Smith en los frutos control y frutos tratados con extractos.



Gráfica 5. Crecimiento de *P. digitatum* sobre Fuji en los frutos control y frutos tratados con extractos.



De este ensayo se observó que, tanto en la variedad Granny Smith como en la Fuji, el extracto *Erodium* produce más inhibición sobre el crecimiento de *Penicillium digitatum* que *Nerium oleander*. También se dedujo, que la inhibición es mayor en las manzanas de variedad Fuji que en las de Granny Smith, alcanzando casi un 90% y un 70% para *Erodium* y adelfa, respectivamente. En la gráfica 6, se muestran los porcentajes de inhibición de las dos especies vegetales en las distintas variedades.



Gráfica 6. Porcentaje de inhibición de *Erodium* y Adelfa en las 2 variedades de manzanas.

Como puede observarse en la variedad Granny Smith la inhibición de *P. digitatum* por extracto de Erodium y Adelfa apenas llega al 10%.

A continuación, se muestran las imágenes del avance del hongo en las distintas variedades de manzanas, pudiendo observar como en la variedad Granny Smith, *P. digitatum*, crece mucho más que en la variedad Fuji. Además, se observa como *Erodium cicutarium* presenta mayor poder de inhibición que *Nerium oleander* (Adelfa) (Fig.6).

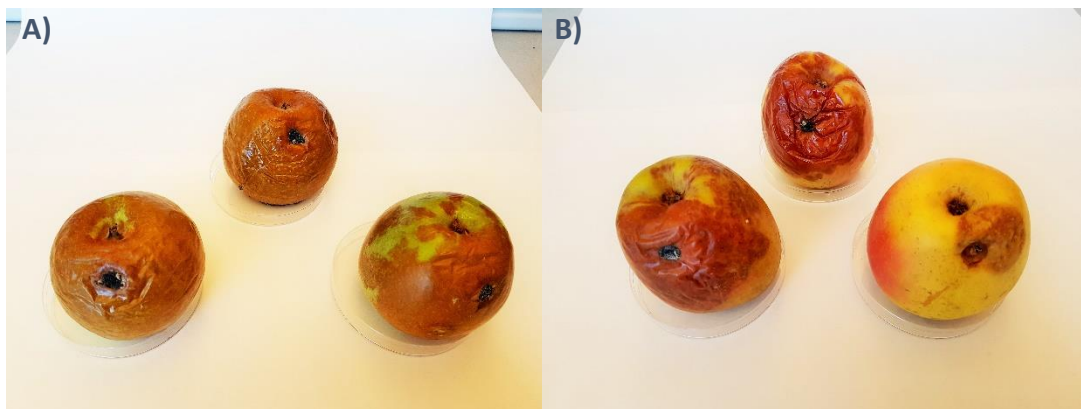
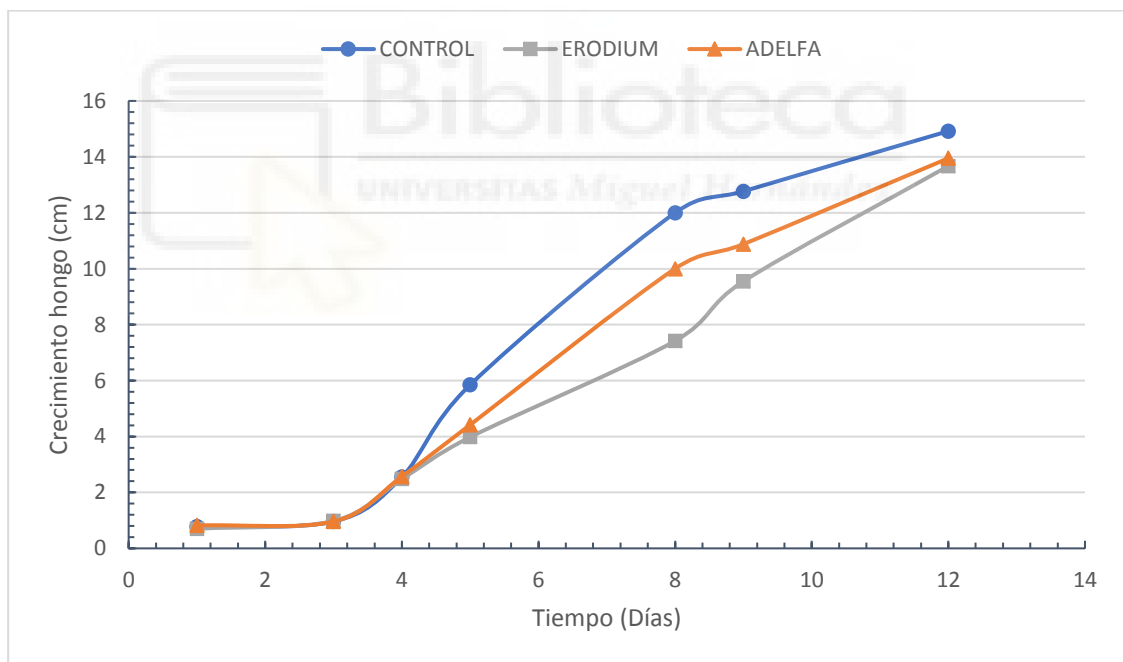


Figura 6. Ensayo con la variedad Granny Smith (A) y Fuji (B) Arriba: fruto control, abajo izquierda: fruto problema con *N. oleander* y abajo derecha: fruto problema con *E. cicutarium*.

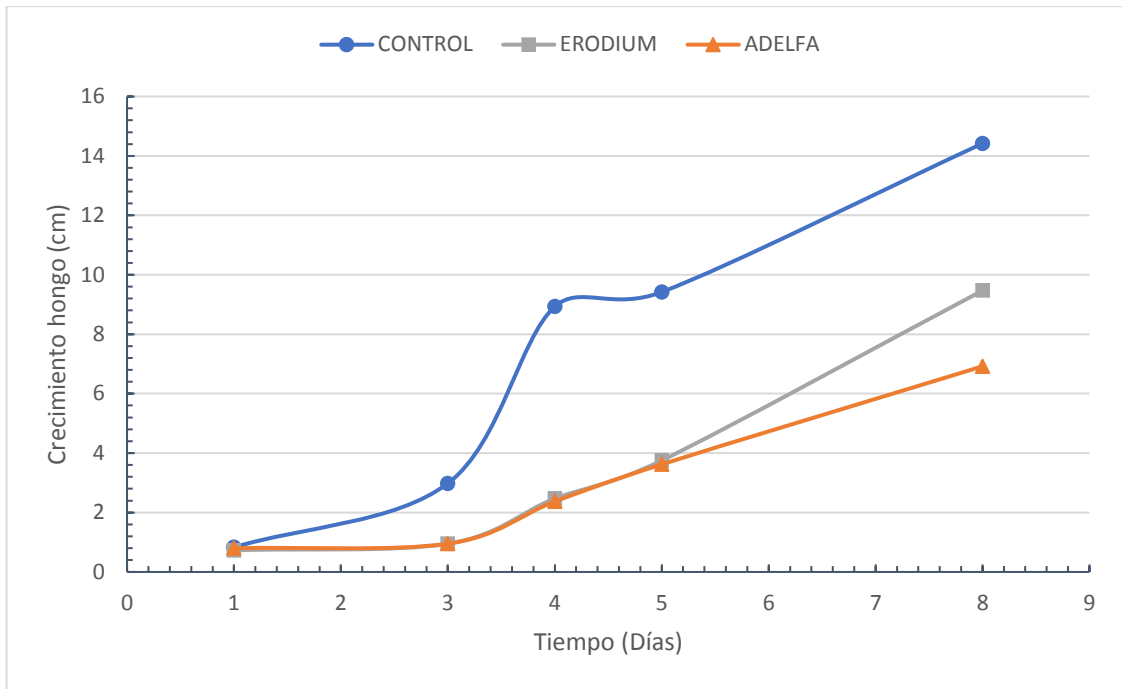
#### 4.2.2. Crecimiento *in vivo* en cítricos

Además del crecimiento del hongo en las manzanas, se ha estudiado el crecimiento del hongo sobre variedades de cítricos como son: limones Verna y naranjas Navelate. Los limones tienen una media de 8'25°Brix y las naranjas de 14°Brix.

Separamos los limones y las naranjas en 3 grupos de 3 frutos cada uno: grupo control (1), grupo tratado con *Erodium* (2) y grupo tratado con Adelfa (3). El ensayo duró 12 días en el caso de los limones y 8 en las naranjas. La medida del hongo fue cada 24h o 48h según la evolución del hongo fuera más o menos rápida en los frutos. En las gráficas 7 y 8 se representan, el crecimiento del hongo en los limones y las naranjas, respectivamente, en los frutos control y los frutos tratados con extractos.



Gráfica 7. Crecimiento de *P. digitatum* sobre limones en frutos control y frutos tratados con extractos.

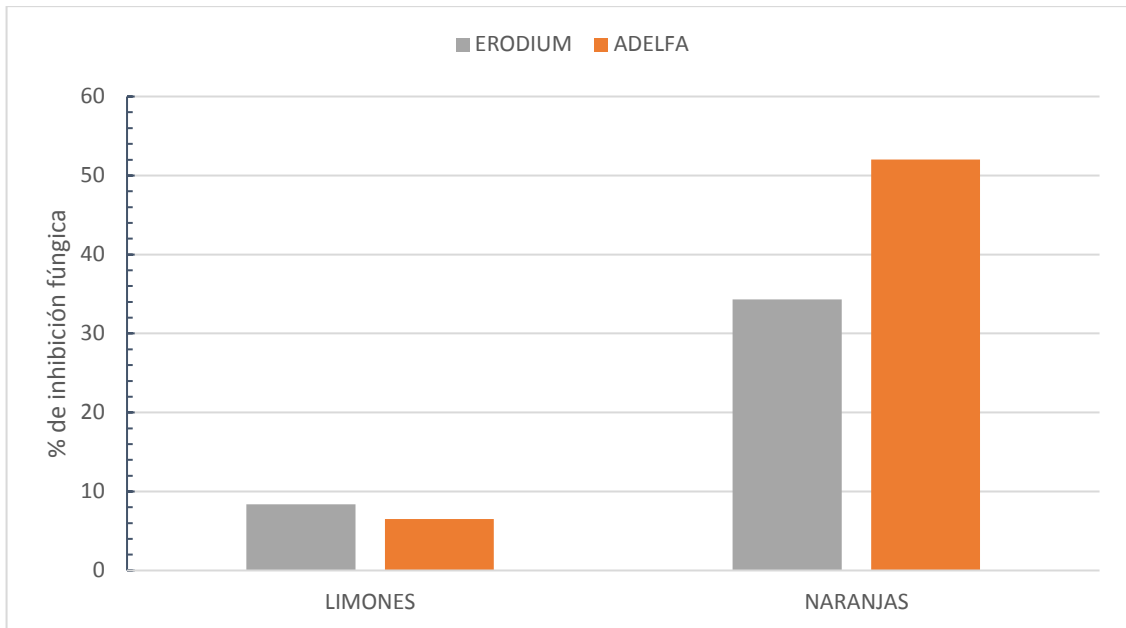


Gráfica 8. Crecimiento de *P. digitatum* sobre naranjas en frutos control y frutos tratados con extractos.

De los resultados se observa que, en los limones, *Erodium* es el extracto que produce una mayor inhibición sobre el crecimiento del hongo, aunque al final del ensayo la inhibición producida por *Erodium* y *Adelfa* alcanza unos valores muy similares (8,3 y 6,5 respectivamente). En el caso de las naranjas, es el extracto de *Adelfa* el que produce una mayor inhibición sobre el crecimiento del hongo, llegando hasta un 52,01%. Sin embargo, el extracto de *Erodium* solo inhibe un 34,3% el crecimiento de *P. digitatum* en naranjas.

En la gráfica 9 se muestran los porcentajes de inhibición de las dos especies vegetales (limones y naranjas) en los distintos extractos vegetales (*Erodium* y *Adelfa*).





Gráfica 9. Porcentaje de inhibición de *Erodium* y Adelfa en limones y naranjas.

Es evidente que en los limones no se presenta prácticamente inhibición de *Penicillium digitatum* mientras que en naranjas si se aprecia un mayor efecto inhibitorio. En la Fig. 7 se muestran imágenes del final del ensayo donde se observa que el avance del hongo en los limones es mayor que en las naranjas. En la imagen se muestran los frutos al final del ensayo, siendo de 12 días en los limones y de 8 días en las naranjas.

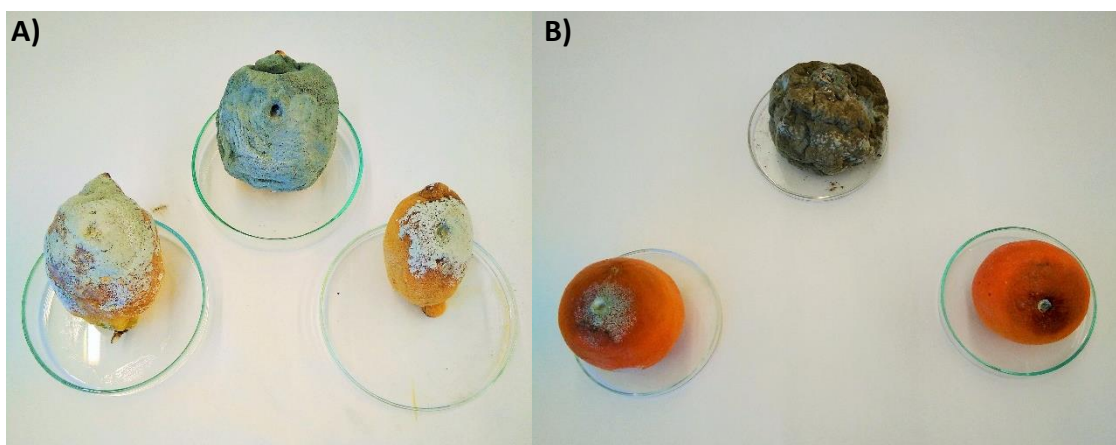


Fig. 7 Ensayos con limones (A) y naranjas (B). Arriba: fruto control, abajo izquierda: fruto tratado con extracto de *E. cicutarium* y abajo derecha: fruto tratado con extracto de *N. oleander*.

Con respecto a los extractos vegetales ensayados *Erodium* inhibe más el crecimiento de *P. digitatum* en los limones (menos de un 10%), mientras que Adelfa es más efectivo inhibiendo al hongo en naranjas (superior al 50%).

## 5. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos de los ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, podemos determinar que, tanto *Erodium cicutarium*, como *Nerium oleander* presentan poder inhibitorio frente al hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum*. Pero este efecto inhibitorio es distinto según el tipo de ensayo (*in vitro* o *in vivo*), y según el fruto sobre el que se realiza.

El ensayo realizado *in vitro* da como resultado que *Nerium oleander* posee mayor poder inhibitorio que *Erodium cicutarium*, este resultado es comparable al que ya se obtuvo en un estudio anterior sobre el efecto en el crecimiento de *Pythium ultimum* en presencia de extractos de *Erodium cicutarium* y *Nerium oleander* entre otras (Botía y Roda, 2010). En este ensayo el extracto de flor-fruto de *Erodium cicutarium* era el que mayor inhibición producía (27,7%).

Respecto a los ensayos realizados *in vivo* existen diferencias en los resultados según el fruto utilizado en cada ensayo. Nuestra hipótesis principal se basaba en el contenido en azúcares de cada fruto, así pues, sospechábamos que a mayor contenido en azúcares se produciría una menor inhibición, para ello medimos los grados Brix de los frutos. Sin embargo, al fin de los ensayos comprobamos que esta hipótesis no era del todo cierta, ya que, tanto en las manzanas como en los cítricos, se producía mayor inhibición en los frutos con mayores grados Brix (manzana Fuji y naranjas). Esto nos lleva a deducir que existen otros factores que intervienen en la respuesta de los frutos frente al ataque de un hongo fitopatógeno.

En ambas variedades de manzanas (Granny Smith y Fuji), es *Erodium cicutarium*, quien presenta mayor efecto inhibitorio. Por otro lado, en los cítricos (limones y naranjas) existe una diferencia sobre la inhibición que producen los extractos vegetales de planta completa. En los

limones, es *Erodium cicutarium* quien produce mayor inhibición, mientras que, en las naranjas, esta mayor inhibición la produce *Nerium oleander*.

## 6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Del trabajo realizado se puede determinar que:

- Los extractos vegetales de planta completa de *Erodium cicutarium* y *Nerium oleander*, muestran efecto inhibitorio frente al hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum*.
- En los ensayos *in vitro*, Adelfa (*Nerium oleander*) presenta mayor poder de inhibición (75,05%).
- En los ensayos *in vivo*, sobre la corteza de los frutos, es *Erodium cicutarium* la especie que muestra mayor inhibición frente al hongo; siendo manzana Granny Smith de 9,60%; manzana Fuji de 88,42% y limones Verna de 8,3%. En las naranjas, es Adelfa la especie con más poder inhibitorio frente a *P. digitatum* alcanzando un valor de 52,01%.
- Los grados Brix, del fruto, no son un factor determinante o directamente relacionado con la capacidad de inhibir el crecimiento de *Penicillium digitatum*.

Aunque es evidente la capacidad inhibitoria de *Erodium cicutarium* y *Nerium oleander* sobre *Penicillium digitatum*, son necesarios más estudios que permitan la obtención de nuevos datos que confirmen este poder. Estos estudios se podrían centrar en las propiedades químicas de las especies vegetales utilizadas para, así, deducir cuál o cuáles de ellas son las que más intervienen en esta capacidad inhibitoria. También sería útil estudiar qué partes de las plantas son más efectivas en la inhibición del hongo, en este sentido ha habido varios estudios anteriores que demuestran que unas partes de las plantas tienen más capacidad inhibitoria que otras.

Por otro lado, sería óptimo analizar las distintas propiedades y características que poseen los frutos (manzanas y cítricos), como los grados Brix en nuestro trabajo, para observar cuáles son las que actúan en respuesta frente al crecimiento de especies fúngicas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agulló, M.A. y Botía Aranda, J.M.** 2007. "Acción inhibitoria de *Ecballium elaterium* sobre el crecimiento "in vitro" de hongos fitopatógenos". Phytoma, pág. 49-55.
- Amadioha, A.C.** 2000. "Controlling riceblast in vitro and in vivo with extract of *Azadiractina indica*". Crop Protection. Pág. 19, 287-290.
- Bautista, S., Hernández, M., Díaz, J.C. y Cano, C.F.** 2000. "Evaluation of the fungical properties of plant extract to reduce *Rhizopus Stolonifer* of "ciruela" fruit (*Spondias purpurea L.*) during storage". Postharvest Biology and Technology. 20, 99-106.
- Benítez, Celia.** 2001. "Cosecha y postcosecha de peras y manzanas en los valles irrigados de la Patagonia".
- Botía Aranda, J.M.** 2007. "Inhibición del crecimiento de *Phytium ultimum* por extractos de *Diplotaxis erucoides* y *Conyza bonariensis*". En: Cuadernos de Fitopatología, pág.6-11.
- Botía Aranda, J.M., Berenguer Ferrández, A., Alfaro Jiménez, E. y Roda García, J.J.** 2008. "Control del crecimiento de hongos fitopatógenos mediante extractos de *Erodium cicutarium*". En: Cuadernos de Fitopatología, nº 97: Pág. 20-25.
- Botía Aranda, J.M., Berenguer Ferrández, A., Aliaga González, G., y Roda García, J.J.** 2009. "Inhibición del crecimiento de *Phytophthora citrophthora* y *Fusarium oxysporum* en presencia de extractos de adelfa (*Nerium oleander*)". En: Cuadernos de Fitopatología, 3<sup>er</sup> Trimestre. Pág. 9-12.
- Botía Aranda, J.M., Lavilla Jiménez, M. y Roda García J.J.** 2009. "Estudio del efecto insecticida de extractos de adelfa (*Nerium oleander*) sobre orugas de la procesionaria del pino (*Thaumetopoea pityocampa*)". En: Cuadernos de Fitopatología, 2<sup>o</sup> Trimestre. Pág.9-12.
- Botía Aranda, J.M. y Roda García J.J.** 2010. "Efecto sobre el crecimiento de *Pythium ultimum* en presencia de extractos de *Erodium cicutarium*, *Diplotaxis erucoides*, *Erica vesicaria* y *Nerium oleander*". 2010. En: Cuadernos de Fitopatología, 2<sup>o</sup> Trimestre. Pág.7-9.
- Botía Aranda, J.M.** 2014. "Efecto de lechetrezna (*Euphorbia helioscopia*) sobre *Penicillium digitatum* en ensayos sobre frutos de limón y en estudios comparativos "in vitro" con *Fusarium oxysporum*". En: Levante Agrícola 1<sup>er</sup> Trimestre, 3-6.

- Botía, J.M., De Esteban García, J. y García Berenguer, P.** 2018. "Extractos de Adelfa amarilla inhiben crecimiento de hongo *Phytophthora citrophthora* en naranjas". En: Levante Agrícola. Especial Postcosecha. Pág. 155-157.
- Bus, V.G.** 1992. "ED50 levels of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* with reduced sensitivity to thiabendazole, benomyl and imazalil". Postharvest Biology and Technology, 1, 305-315.
- Carmona, M., Zalacaín, R., Salinas, R., Alonso, G.L. y Hurtado, J.** 2001. "Los fitosanitarios vegetales: una opción de la agricultura moderna". En: Cuadernos de Fitopatología 1<sup>er</sup> Trimestre, 5-11.
- Charles, D.** 2001. "Lords of the harvest: Biotech, big money, and the future of food". Perseus Publishing, Cambridge, MA, 348 pp.
- Checa, E. y Botía, J.M.** 2005. "Nuevos insecticidas obtenidos a partir de malas hierbas para el control de las cochinillas". En: Malherbología Ibérica y Magrebí: Soluciones comunes a problemas comunes. Menéndez, J. y col., 317-321.
- Dunkel, F.V., Weaver, D.K., Van Puelde, L.** 1990. "Growth regulatory effects of Rwanda medicinal plant, *Tetradenia riparia* (Hochst) (Lamiaceae) on stored grain and vean insects". En: Proceedings 5<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-Products Protection. Fleurat-Lessard F and Ducom P., Burdeos, 1609-1618.
- Eckert, J.W. y Eaks, I.L.** 1989. "Postharvest disorders and diseases of citrus fruit". En: The Citrus Industry, Reuter, W., Calavan, E.C., Carman, G.E. (Eds.). Berkeley, USA: Univ. Calif. Press. Pp. 179-260: v 5.
- Govindachari, T.R., Suresh, G., Gopalaskrishnan, G., Banumathy, B. y Masilamani, S.** 1998. "Identification of Antifungal Compounds from the Seed Oil of *Azadiractina indica*". Phytoparasitica: 26, 1-8.
- Kareru, P.G., Keriko, J.M., Kenji, G.M. y Gachanja A.N.** 2010. Anti-termite and antimicrobial properties of Paint made from *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. Oil extract". African Journal of Pharmacy and Pharmacology: 4(2): 087-089.
- Pascual-Villalobos, M.J. y Robledo.** 1999. "Anti-insect activity of plant extracts form the wild flora in southeastern Spain". Biochemical Systematics and Ecology. 27, 1-10.

**Ravikumar, H.S., Makari, H.K. y Gurumurthy, H.** 2007. "In vitro antimicrobial activity of ethanol extract of *Thevetia peruviana*". Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry: 6(9): 1579-4377.

**Regnault-Roger, C. y Hamraoui, A.** 1994. "Antifeedant effect of Mediterranean plant essential oils upon *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera), bruchid of Kidney beans, *Phaseolus vulgaris* L." En: Store Product Protection. Highley, E., Wright, E.I., Banks, H.J., y Charnp, B.R. CAB International, Wallingford (UK), 837-840.

**Schmutterer, H.** 1990. "Properties and potential of natural pesticides from neem tree, *Azadirachta indica*." Annu. Rev. Entomol., 35, 271-297.

**Smith, I. M., Dunez, J., Lelliot, R. A., Phillips, D. H. y Archer, S. A.** 1992. "Manual de enfermedades de las plantas" Mundi-Prensa, Madrid. ISBN: 84-7114-358-5.

**Sung-Eun, L., Byeoung-Soo, P., Moo-Key, K. y Won-Sik, C.** 2001. "Fungal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L, against phytopathogenic fungi". Crop Protection: 20, 523-528.

**Urbano Terrón, P.** 2004. "Biopesticidas de origen vegetal". Ediciones Mundi-Prensa.

